ผลของสารฆ่าเชื้อ Oxonia Active® ต่อ *Weissella cibaria* ในกระบวนการผลิตนมผง

EFFECT OF Oxonai Active® AS SANITIZER ON *Weissella cibaria* FOUND IN MILK POWDER PROCESS

นุชนาถ เมืองเพ็ชร

NUTCHANAT MUANGPHET

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2560

KMITL-2017-AI-M-054-271

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของสารฆ่าเชื้อ Oxonia Active® ต่อ *Weissella cibaria* ในกระบวนการผลิตนมผง

EFFECT OF Oxonai Active® AS SANITIZER ON *Weissella cibaria* FOUND IN MILK POWDER PROCESS

นุชนาถ เมืองเพ็ชร

NUTCHANAT MUANGPHET

สาขหมู่.....
เลขทะเบียน 148026
รับ.เดือน.ปี 9 ก.ค. 2560

b.1286559x
l.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2560

KMITL-2017-AI-M-054-271

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECT OF Oxonai Active® AS SANITIZER ON *Weissella cibaria* FOUND IN MILK POWDER PROCESS

NUTCHANAT MUANGPHET

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN FOOD SAFETY MANAGEMENT

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2017

KMITL-2017-AI-M-054-271

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2017

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของสารฆ่าเชื้อ Oxonia Active® ต่อ *Weissella cibaria* ในกระบวนการผลิตนมผง

EFFECT OF Oxonia Active® AS SANITIZER *Weissella cibaria* FOUND IN MILK POWDER PROCESS

ชื่อนักศึกษา นางนุชนาถ เมืองเพ็ชร

รหัสประจำตัว 56608022

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา การจัดการความปลอดภัยอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

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

วัน / เดือน/ ปีที่สอบ 26 มิถุนายน 2560 เวลา 12.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 25 เดือน กค. พ.ศ. 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารฆ่าเชื้อ Oxonia Active® ต่อ *Weissellacibaria* ในกระบวนการผลิตนมผง
นักศึกษา	นางนุชนาถ เมืองเพ็ชร
รหัสประจำตัว	56608022
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.อดิศรเสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

การศึกษาแหล่งปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและชนิดสายพันธุ์ที่อาจพบในอุปกรณ์หลังล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อของโรงงานผลิตนมผงงานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างพื้นผิวอุปกรณ์ผลิตจากโรงงานผลิตนมผงแห่งหนึ่งในเขตกรุงเทพและปริมณฑลเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยการสวอป (Swab)บนพื้นผิวที่ยากต่อการทำความสะอาดทั้งหมด 15 จุด เก็บตัวอย่างบนพื้นผิวก่อนและหลังทำความทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ Total plate count (TPC), เชื้อกลุ่ม Coliform, *Staphylococcus aureus, Cronobacter sakazakii, Bacillus cereus,* Yeasts และ Molds ผลการทดสอบก่อนการทำความสะอาด จากจำนวน 9 จุดทดสอบ พบเชื้อ TPC และ Yeast& Molds ตรวจพบ 2 จุดทดสอบ และทุกจุดทดสอบไม่พบเชื้อ กลุ่ม Coliform, *S.aureus, C. sakazakii, B. cereus* และหลังการทำความสะอาดมีเพียงจุดที่ 6 จุดท่อแนวนอนส่งนมเพียงจุดเดียวที่พบ เชื้อ TPC ปริมาณ 10cfu/100 cm^2 นำเชื้อที่พบเหลือรอด ณ จุดดังกล่าวทั้งก่อนและหลังทำความสะอาด ส่งทดสอบด้วยเทคนิค 16s RNA เทียบลำดับเบสของ 16S rDNAของแบคทีเรียแลคติกในฐานข้อมูล GENBANKแสดง % identity เชื้อ *W. cibaria* 99 % และ 94 % ก่อนและหลังทำความสะอาดตามลำดับการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากจุดดังกล่าว ไม่มีจุดระบายเศษนม เมื่อหยุดกระบวนการผลิตอาจทำให้เกิดการติดค้างของผลิตภัณฑ์ในท่อ และมีจุดที่สารทำความสะอาดไม่สามารถเข้าไปทำความสะอาดได้ทั่วถึง ส่งผลให้เกิดการสะสมของอาหารจนเป็นแหล่งเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายกรดเปอร์อะซิติกที่ระดับความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 5 10 15 และ 20 นาทีต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *W. cibaria* ที่ตรวจพบในระดับ 6 log cfu/ml ในหลอดทดลอง พบว่า สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกสามารถลดเชื้อ *W. cibaria* ในหลอดทดลองได้ดี โดยสารที่ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่ำ ต้องใช้เวลานานขึ้นจะช่วยลดเชื้อจนหมดได้ จากนั้นได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.2 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 5 10 15 และ 20 นาทีต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ภายใต้สภาวะปนเปื้อนนมผง 1 % เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ พบว่าสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ได้ดี แม้อยู่ในสภาวะที่ปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีนซึ่งเป็นปัจจัยรบกวนลดประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกยังคงคุณสมบัติการฆ่าเชื้อได้ดี ความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกและระยะเวลาการสัมผัสมีอิทธิพลต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)โดยความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของการทดสอบนี้ สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกยังคงความสามารถฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ปริมาณเริ่มต้น 6.89±0.02 log cfu/ml ลงจนเหลือปริมาณ 1.81±0.02, 1.79±0.08, 1.25±0.05และ 1.05±0.02log cfu/ml ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 1, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับและเชื้อถูกทำลายได้หมดที่เวลา 20 นาที ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 เปอร์เซ็นต์สามารถทำลายเชื้อ *W. cibaria*ให้ลดลงอย่างชัดเจนใน 5 นาทีและทำลายเชื้อ *W. cibaria* หมดสิ้นเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที นอกจากนี้ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์สามารถทำลายเชื้อ *W. cibaria* ให้ลดอย่างชัดเจนใน1 นาทีและทำลายเชื้อ *W. cibaria* หมดสิ้นเมื่อเวลาผ่านไป 5 นาทีเนื่องจากบริษัทที่เป็นสถานที่ในการศึกษาการใช้สารดังกล่าวในการล้างอุปกรณ์การผลิตนมผงนี้ ได้ใช้สารกรดเปอร์อะซิติกในความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ต่าง ๆ ในขั้นตอนการผลิตนมผงของโรงงานเป็นเวลานาน 15 นาทีซึ่งอยู่ในช่วงที่มากกว่า ผลการศึกษาพบว่าสามารถลดเชื้อ *W. cibaria*ในปริมาณ 6 log cfu/ml ให้หมดลงได้ในเวลา 10 นาที ทั้งที่มีอาหารนมหลงเหลืออยู่ จัดว่าเป็นการทวนสอบการล้างด้วยวิธีดังกล่าวในระดับหนึ่งของโรงงานดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Effect of Oxonia Active® as sanitizer on *Weissellacibaria* found in Milk Powder
Student	Mrs.Nutchanat Muangphet
Student ID.	56608022
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Year	2017
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr.Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

The contamination of microorganisms on the infant milk powder production equipments was investigated by using swab technique on the 15 points of difficult to clean surfaces production equipments before and after cleaning process in order to determine the impact of the cleaning of each surface equipment on microbial contamination in an infant formula processing plant. Swab samples from these fifteen surface points were collected for total plate count (TPC), Coliform, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus cereus*, Yeasts and Molds. The results of before cleaning revealed that 9 and 2 points were found positive for TPC and yeasts and molds, respectively, while all points were tested negative Coliform, *Staphylococcus aureus*, *Cronobacter sakazakii* and *Bacillus cereus*. Only point 6 (horizontal pipes stainless) was found TPC level of 10 cfu/100cm^2 after cleaning. The contaminated strains before-after cleaning the equipment in point horizontal pipes stainless tipping station were further the identification step using 16S rRNA technique. The results informed that the 16S rDNA sequence of the contaminated strains before and after cleaning of this point was belonged to *W. cibaria* with 99% and 94% identity, respectively, which revealed the improper cleaning of this point after milk powder production. The effect of peracetic acid sanitizer at concentration of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 % for 1, 5, 10, 15 and 20 min to inhibit the contaminated strain of *W. cibaria* (6 log cfu/ml) was studied in an *in vitro*broth. It was found that peracetic acid sanitizer exerted a good activity in reducing *W. cibaria* in an *in vitro*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

broth. Higher concentration of peracetic acid revealed to give a better effect on the studied microorganism than the lower ones. The concentration of peracetic acid at 0.2, 0.3 and 0.4 % for 1, 5, 10, 15 and 20min to inhibit6 log cfu/ml of *W. cibaria* in the presence of 1% infant milk powder to confirmed effectiveness of peracetic acid sanitizer was also investigate in an *in vitro* broth. The results showed that peracetic acid sanitizer could also reduce the number of *W. cibaria* in the broth with and without 1% infant milk powder. It was showed that the reduction of *W. cibaria* were significantly influenced by peracetic acid sanitizer concentration and contacting time ($p \leq 0.05$). The lowest concentration of peracetic acid sanitizer (0.1%) exhibited the effect on6.89±0.02log cfu/ml *W. cibaria* by reducing the number of *W. cibaria* to 1.81±0.02, 1.79±0.08, 1.25±0.05 and 1.05±0.02log cfu/ml % after1, 5, 10 and 15 min of contacting time, respectively and totally diminished all *W. cibaria* after 20 min of contacting time. Peracetic acid sanitizer at concentration of 0.2 and 0.3 % were rapidly reduced the number of *W. cibaria* for 5 min of contacting time and were totally diminished the number of *W. cibaria* for 10 min of contacting time, while 0.4% of peracetic acid sanitizer could rapidly reduce the number of *W. cibaria* for 1 min of contacting time and could totally diminish the number of*W. cibaria* for 5 min of contacting time.Since this milk powder production company has currently used peracetic acid sanitizer at concentration of 0.3 % for the cleaning step of each studied point with the contacting time for 15 min. The results in this study revealed that *W. cibaria* at 6 log cfu/ml in the broth with and without 1% infant milk powder was totally diminished by 0.3% peracetic acid at 10 min. Thus, the cleaning step of each studied point with 0.3% peracetic acid for 15 min in this plant has been verified.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้ความรู้คำแนะนำข้อมูลที่มีประโยชน์ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประการณ์ช่วยเหลือที่ดีแก่ข้าพเจ้าตลอดจนให้ความช่วยเหลือ ดูแลเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์และขอกราบขอบพระคุณ ไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐที่ได้ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไข รวมทั้งให้คำปรึกษาแนะนำจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบรูณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ประภาพรขอไพบูลย์และ ดร.กิตติชัย บรรจง ที่ให้เกียรติเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไข รวมทั้งให้คำปรึกษาแนะนำจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบรูณ์

ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการ Microbial Technology คณะ Microbial Science and Technology มหาวิทยาลัย Kyushu ประเทศญี่ปุ่น และรองศาสตราจารย์ ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ได้ให้ความอนุเคราะห์ตรวจและยืนยันสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดาและคุณวีรพจน์ เมืองเพ็ชร สามีที่เป็นเสมือนคู่คิด คู่ชีวิต ทุกท่านที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีในการศึกษาครั้งนี้ รวมนักวิทยาศาสตร์ เพื่อนๆและน้องๆ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งมาส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีตลอดมา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดาและครอบครัวของข้าพเจ้าซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่งตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่านทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้าทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นุชนาถ เมืองเพ็ชร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญภาพ.....VII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3

1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 ลักษณะและการปนเปื้อนเชื้อ *Weissella* spp.....4

2.2 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในโรงงานผลิตนมผง.....9

2.3 การออกแบบที่ถูกสุขลักษณะ (Hygienic Design).....10

2.4 สารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหาร.....13

2.5 ขั้นตอนการทำความสะอาด.....20

2.6 วิธีการทำความสะอาด.....22

2.7 ประเภทสิ่งสกปรกหรือสิ่งตกค้าง.....23

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหาจุลินทรีย์ที่เหลือรอดจากสารฆ่าเชื้อ (neutralizer).....23

2.9 จลน์พลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์.....25

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....26

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....29

3.1 วัตถุดิบ.....29

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....29
3.4 สารเคมี.....30
3.5 วิธีการทดสอบ.....30

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....39
4.1 แหล่งปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์.....39
4.2 การแยกและจำแนกชนิดสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน.....42
4.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายกรดเปอร์อะซิติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Weissella cibaria* ในหลอดทดลองที่เวลาต่างๆ.....43
4.4 การยืนยันความถูกต้องของประสิทธิภาพสารละลายกรดเปอร์อะซิติกที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth.....48
4.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นสารละลายกรดเปอร์อะซิติกต่อการฆ่าเชื้อ *Weissella* spp. ภายใต้สภาวะนมผงปนเปื้อน 1% 49

บทที่ 5 สรุปผลการผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....54
5.1 สรุปผลการวิจัย.....54
5.2 ข้อเสนอแนะ.....55

บรรณานุกรม.....56

ภาคผนวก.....66
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....67
ภาคผนวก ข การตรวจวิเคราะห์เชื้อ.....72
ภาคผนวก ค วิธีการตรวจวิเคราะห์.....75

ประวัติผู้วิจัย.....77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ความสามารถทนสภาวะกรดของเชื้อ *Weissella* 8 สายพันธุ์.....5

2.2 ปริมาณมาตรฐานของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร.....21

2.3 ปริมาณเชื้อเป้าหมายที่ยังเหลืออยู่บนพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารหลังการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ.....21

3.1 แสดงจุดที่เก็บตัวอย่าง 15 จุด.....33

4.1 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม, เชื้อ *S. aureus* , เชื้อ *C. sakazakii*, เชื้อ *B. cereus* และ Yeast & Mold ในตัวอย่าง swab อุปกรณ์ผลิตนมผง.....41

4.2 ผลชีวเคมีชุดทดสอบ API 50 CHL ของโคโลนีที่ตรวจพบก่อนและหลังทำความสะอาดเทียบกับเชื้อ *W. confusa* 44

4.3 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกและระยะเวลาต่อการฆ่าเชื้อ W. *cibaria* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml.....46

4.4ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกและระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %.....51

4.5 สมการเส้นตรงแสดงการลดลงของเชื้อ *W. cibaria* และสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ขณะภายใต้สภาวะปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีน 1% 52

4.6 สมการเส้นตรงแสดงเวลาการตาย (t_m) และอัตราการตาย (k')ของเชื้อ *W. cibaria* ที่เวลาต่างๆ ของเชื้อ *W. cibaria* ที่เวลาต่างๆ ขณะภายใต้สภาวะปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีน 1%.....52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 การสร้างเอนไซม์ย่อยเม็ดเลือดแดงแบบ alpha -hemolytic-activity ของเชื้อ *Leuconostoc* และ*Weissella* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกิมจิโดยใช้ S. *aureus* USA300-p23 เป็นเชื้อ Positive control.....7

3.1 ขั้นตอนการผลิตนมผง.....31

4.1 ผลชีวเคมีโดย Software api*web* API 50 CHL V5.2ของโคโลนีที่ตรวจพบก่อนทำความสะอาด.....43

4.2 ผลชีวเคมีโดย Software api*web* API 50 CHL V5.2 ของโคโลนีที่ตรวจพบหลังทำความสะอาด.....43

4.3 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกในระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml.....47

ข-1 การอ่านผลปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อที่เก็บก่อนการทำความสะอาด.....72

ข-2 การอ่านผลปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อที่เก็บหลังการทำความสะอาด.....72

ข-3 ผล16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ EN1 ตัวอย่างเชื้อเก็บก่อนทำความสะอาด.....73

ข-4 ผล16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ EN2 ตัวอย่างเชื้อเก็บหลังทำความสะอาด.....74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

นมผงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการบริโภคในกลุ่มผู้บริโภคทุกกลุ่ม เนื่องจากมีประโยชน์และให้คุณค่าทางอาหารแก่กลุ่มผู้บริโภคทุกวัย ดังนั้นการผลิตนมผงเพื่อการจำหน่าย ในหลายประเทศจึงให้ความสำคัญและมีการควบคุมการผลิตอย่างเข้มงวด รวมถึงประเทศไทย ได้มีการประกาศเรื่องการควบคุมการผลิตนมปรุงแต่ง ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 350พ.ศ. 2556

เนื่องจากนมผงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณการบริโภคสูง จึงทำให้มีผู้ผลิตในแต่ละประเทศเกิดขึ้นจำนวนมาก ในประเทศไทยมีการนำเข้าผลิตภัณฑ์นมผงโดยทำการแบ่งบรรจุเพื่อการจำหน่ายหลายบริษัท ทำให้มีการแข่งขันทางการตลาดในประเทศเป็นจำนวนมาก ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ถ้าต้องการที่จะให้มีส่วนแบ่งทางการตลาดสูง ภาพลักษณ์ของแหล่งผลิต โดยเฉพาะ การควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยในระหว่างการผลิตในลักษณะแบ่งบรรจุ จึงต้องมีการควบคุมอย่างเข้มงวด เพื่อไม่ให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อที่มีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคในระหว่างการแบ่งบรรจุ ดังรายงานการตรวจพบเชื้อก่อโรคที่สำคัญในอดีต เช่น การตรวจพบสารพิษ staphylococcus enterotoxin A ในผลิตภัณฑ์นมผงของ สโนว์แบรนด์ ในปี พ.ศ.2543 หรือการตรวจพบ *Enterobacter sakazakii*วัตถุดิบเวย์โปรตีนชนิดเข้มข้นที่นำเข้าจาก บริษัท ฟอนเทียร่า ประเทศนิวซีแลนด์ ในปี พ.ศ.2548ซึ่งส่งผลให้สินค้าดังกล่าวไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค จนทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อเสียงครองตลาดนมผงมาเป็นเวลานานต้องหายไปจากท้องตลาด สิ่งสำคัญที่ส่งผลให้เกิดปัญหาด้านความไม่ปลอดภัยจากการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์ส่วนหนึ่งคือ ข้อผิดพลาดในขั้นตอนการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตหรือแบ่งบรรจุนมผง

นอกจากเชื้อที่เป็นปัญหาดังกล่าวที่มีผลในผลิตภัณฑ์นมผงแล้ว ยังมีรายงานการตรวจพบเชื้ออื่น ๆ ที่สำคัญ ดังเช่น เชื้อแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid Bacteria (LAB))ถือเป็นแบคทีเรียสำคัญถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร แต่ในขณะเดียวกันพบรายงานการควบคุมเชื้อนี้ในหลายประเทศ เนื่องจากหากมีเชื้อ LAB เหลืออยู่มากในสำไส้จะลดประสิทธิภาพของการทำงานของสำไส้และตับต่ำลง และส่งผลให้เกิดติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (Tuomola, 2001) ซึ่งรวมถึง*Weissella* spp.ที่อยู่ในกลุ่ม LAB จัดเป็น เป็นแบคมีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) รูปร่างกลมหรือบางสายพันธุ์รูปร่างท่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ผล catalaseเป็นลบ หมักแบบheterofermentative ได้เป็นกรดแลกติก เอทานอล กรดอะซีติก และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ทนกรด ทนเกลือน้ำดีและเกลือ ได้เป็นอย่างดี *Weissella*พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ รวมทั้งในกระบวนการผลิตนมผงสำหรับทารก การหมักผักหรือน้ำผลไม้หมัก *Weissella*พบได้ลำไส้ของมนุษย์, สุนัข,ไก่, เป็ด, ปลาบางสายพันธุ์ก่อให้เกิดโรคในคน และเกิดภาวะหูอักเสบในสุนัข (Olano และคณะ, 2001; Bjorkroth และคณะ, 2002; Flaherty และคณะ, 2003; Vela และคณะ, 2003; Shin และคณะ, 2007 และ Svec และคณะ,2007) จึงเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่อยู่ภายใต้การควบคุมด้วยเช่นกัน

สารทำความสะอาดอุปกรณ์ในโรงงานผลิตและแบ่งบรรจุนมผง เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญในการทำความสะอาด ซึ่งจะต้องมีประสิทธิภาพสูงในการขจัดคราบนมที่ตกค้าง รวมถึงกำจัดและทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอุปกรณ์การผลิตได้ดี เพื่อไม่ให้เกิดการเหลือรอดจนเพิ่มจำนวนของเชื้อที่หลงเหลือหลังการทำความสะอาดอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต ปัจจุบันสารทำความสะอาดที่ใช้ใหลายชนิด สารทำความสะอาดที่แพร่หลายทางการค้าทั่วไป มีส่วนประกอบทำให้น้ำซึมเข้าไปชำระล้างสิ่งสกปรกที่เกาะอยู่ตามผิวหน้าของเครื่องมือได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปแล้วสารทำความสะอาดมักเป็นส่วนผสมของสารประกอบเชิงซ้อนทางเคมี เศษอาหารและคราบสิ่งสกปรกเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญของจุลินทรีย์ ซึ่งจะถูกทำลายในระหว่างที่มีการทำความสะอาด ดังนั้นในสารทำความสะอาดส่วนใหญ่จึงมีสารประกอบน้ำยาทำความสะอาด และสารฆ่าเชื้อ (Sanitizers) โดยอาศัยพลังงานกล (mechanical engery)

สำหรับประเทศไทยการขึ้นทะเบียนผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535เรื่อง หลักเกณฑ์การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งไม่มีมีรูพรุนของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคชนิดของเหลวลงวันที่ 20 มีนาคม พ.ศ.2546 ได้กำหนดให้ทดสอบตามวิธีมาตรฐานใน AOAC Official Methods of The Association of Analytical Chemists (2000) หัวข้อสารทำความสะอาด (disinfectants) มี 2 วิธีคือวิธี Phenol Coefficientและวิธีการเจือจาง(Use-Dilution Method)โดยการหาค่าสัมประสิทธิ์ฟีนอล (phenol coefficient)ผลิตภัณฑ์ที่ฆ่าเชื้อได้ ต้องมีค่า phenol coefficientเท่ากับหรือมากกว่า 0.05และวิธีการเจือจาง (Use-Dilution Method) พิจารณาระดับความเจือจางสูงสุดของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคที่เหมาะสมสำหรับเชื้อใช้ทดสอบซึ่งเป็นตัวแทนของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆจำนวน 4 ชนิด ได้แก่*Staphylococcusaureus* ATCC 6538 *Salmonella* choleraesuis ATCC 10708 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 และ*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 และใช้ stainless steel ring เป็น carrierเกณฑ์พิจารณาความเข้มข้นที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ จะต้องฆ่าเชื้อได้ทั้ง 10 carriers ในเวลา 10 นาที

สารประกอบประเภทperoxidine และ peroxyacid (PPA) mixtureมีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent ซึ่งสารละลายผสมที่อยู่ในสภาวะสมดุล acetic acid กับ hydrogen peroxide และน้ำ เป็นสารที่มีความปลอดภัยทั้งต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมเพราะไม่ก่อให้เกิดสารตกค้าง ซึ่งเมื่อเกิดการสลายตัวจะได้น้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์และสอดคล้องกับงานวิจัย Campagna และคณะ (2013) ได้แนะนำสารประกอบประเภทperoxidine และ peroxyacid (PPA) mixtureใช้ทำความสะอาดอุปกรณ์ในอุตสาหกรรมประเภทผลิตภัณฑ์นม

จากความสำคัญของการทำความสะอาดที่ส่งผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์นมผงดังที่กล่าวมาแล้ว ด้วยเหตุนี้ การศึกษานี้จึงได้ทำการทวนสอบประสิทธิภาพของการล้างทำความสะอาดอุปกรณ์ ณ จุดต่าง ๆ ในระหว่างการผลิตแบบแบ่งบรรจุของโรงงานผลิตนมผงบริษัทหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร โดยทำการศึกษาหาเชื้อที่หลงเหลือจากการล้างทำความสะอาดหลังการผลิต และยืนยันชนิดสายพันธุ์ของเชื้อที่ตรวจพบศึกษาผลความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบ ที่ระดับต่างๆและในเวลาต่างกัน ตลอดจนเลือกความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมที่สุดต่อการฆ่าเชื้อที่ตรวจพบภายใต้การปนเปื้อนคราบนมผงเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1เพื่อศึกษาแหล่งปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย และ ชนิดสายพันธุ์ที่อาจพบในอุปกรณ์หลังล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อของโรงงานผลิตนมผง

1.2.2 เพื่อศึกษาผลความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบที่ระดับต่างๆและในเวลาต่างกัน

1.2.3 ยืนยันประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟต่อการฆ่าเชื้อ *Weissella cibaria* ที่ปนเปื้อนคราบนม 1%

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาแหล่งปนเปื้อนและจุดการสะสมของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวอุปกรณ์ต่างๆ ที่ทำความสะอาดไม่ทั่วถึงและนำผลของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ เชื้อ *W.cibaria* ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสม นำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการกระบวนการผลิตนมผง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและผลงานวิจัย

2.1 ลักษณะและการปนเปื้อนของเชื้อ *Weissella cibaria*

2.1.1 ลักษณะของเชื้อ

*Weissella*spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์จัดเป็นfacultative anaerobic สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ได้เป็น กรดแลกตริก เอทานอลกรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์เรียกการหมักนี้ว่า heterofermation ให้ catalase เป็นลบ เป็นแบคทีเรียที่สามารถทำลายเม็ดเลือดแดงแบบ alpha รูปร่างท่อนสั้นๆบางครั้งพบเป็นแท่งๆอยู่เป็นคู่และยาวต่อกันเป็นสาย (Collins และคณะ, 1993. Olanoและคณะ, 2001. Björkrothและคณะ, 2002) โดยมากมักพบเชื้อ *Weissella*spp.อยู่ปนกับเชื้อ *Lactobacillus* spp.ซึ่งทำให้เกิดความสับสนบ่อยครั้งในการวิเคราะห์งานทางเก็บตัวอย่างจากผู้ป่วยซึ่งจำเป็นจะต้องใช้เทคนิคขั้นสูงในการคัดเลือกพอสมควร (Facklamและคณะ, 1989; Facklamและ Elliott, 1995. Kumar และคณะ, 2011)

*Weissella*spp.แยกออกมาเป็นgenusใหม่ในปีค.ศ.1993 ด้วยเทคนิค16SrRNA gene sequence analysis และได้ตั้งชื่อตามนัก ชีววิทยาเยรมนี ชื่อ Norbert Weiss (Collins และคณะ, 1993)โดยแยกออกจากเชื้อ*Leuconostoc paramesenteroides* เป็นชื่อ genus*Weissella*ด้านวิเคราะห์ทางสายพันธุ์กรรมแล้วพบว่า มีความแตกต่างจึงถูกจัดแยกออกมาต่างหากจากเชื้อกลุ่ม lactic acidcแบคทีเรียตัวอื่นได้แก่ *Leuconostoc, Lactobacillus* และ*Streptococcus* (Flaherty และคณะ, 2003) ปัจจุบัน *Weissella* sppประกอบด้วย 19 species ได้แก่*Weissella beninensis, W. ceti, W. cibaria, W. confusa, W. diestrammenae, W. fabalis, W. fabaria, W. ghanensis, W. hellenica, W. halotolerans, W. kandleri, W. koreensis, W. minor, W. oryzae, W. paramesenteroides, W. soli, W. viridescens, W. uvarum, W. thailandensis*(Fusco และคณะ, 2015) มีเพียงเชื้อ *W. confus*a (เดิมเป็นเชื้อ*Lactobacillus confusus*), *W. cibaria,* และ*W. viridescens* มีรายงานพบในตัวอย่างทางคลินิกของคน (Björkrothและคณะ, 2002; Kulwichit และคณะ, 2000; Fusco และคณะ, 2015) และยังจัดว่าเป็นเชื้อฉวยโอกาสทำให้เกิดการติดเชื้อหากภูมิคุ้มกันลดต่ำลง (Fusco และคณะ, 2015) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิช่วงกว้าง 15-45 องศาเซลเซียส (Lee และคณะ, 2011)

2.1.2 ลักษณะทางชีวเคมีเชื้อ*Weissella* spp.

2.1.2.1 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *Weissella* spp. ต้านทานยา Streptomycin ได้ดี ต้านทานยา Gentamycin ได้ 38.2% ,ต้านทานยา Penicilin G ได้ 7.4% และสามารถต้านทานยา Penicilin G (JeongและLee, 2015)นอกจากนี้ยังต้านทานยา vancomycinสูงกว่า ค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ≥256µg/ml (Kambojและคณะ, 2015)

2.1.2.2การสร้างสารประเภท Amine

W. cibaria strains (CK0276, CK0487, CK0490, และ KK0720) สามารถสร้างสารประกอบ Amine ได้มากถึง 44% (JeongและLee, 2015) ซึ่งสารประกอบชีวภาพเอมีน อาจก่อโทษต่อร่างกายแต่ไม่ค่อยได้รับรายงานเกี่ยวรายงานเหล่านี้ จึงส่งผลต่อการประเมินความเสี่ยงยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำ พบรายงานการป่วยในประเทศ Taiwan ป่วยด้วยเชื้อ *W. cibaria* จากการบริโภค kimchi (Shalaby, 1996)เนื่องจากได้รับพิษของ Histamine ในปริมาณมากที่เชื้อ *W. cibaria*ผลิตขึ้นระหว่างการหมัก Kimchi ที่อาจปนเปื้อนระหว่างการแปรรูปอาหารและการเก็บรักษา

2.1.2.3ความสามารถทนกรด (Leeและคณะ, 2011)

การทดสอบการทนทานต่อ pHต่ำได้นั้นเป็นคุณสมบัติสำคัญของการเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Probiotic ได้พบว่า *Weissella* 8 strains ถูกฆ่าให้ตายเมื่ออยู่ในสภาวะ pH 2.0 เป็นเวลา 2ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเห็นได้ชัดเจนว่ามีการลดลงของเชื้อถึง 8 log และเมื่อลดค่าความเป็นกรด pH 3.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการเพิ่มจำนวนโดยเชื้อ*W. confuse* 31 มีอัตราการเจริญสูง 20.2% *W. cibaria*15 (17.2%) และ*W. confuse*(12.2%). ขณะที่ *W. cibaria* 18 เจริญน้อยสุด 2.4%แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการทนกรดซึ่งมีผลต่อรายงานการพบเชื้อกลุ่มแลกติกเป็นสำคัญ ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงความสามารถทนสภาวะกรดของเชื้อ *Weissella* 8 สายพันธุ์

Strains	Control[a] (CFU/ml)	pH 2.0 (CFU/ml)	SR[b] (%)	pH 3.0 (CFU/ml)	SR (%)
W. confusa 8	5.9×10^{10}	1.9×10^{2}	0.00	7.2×10^{9}	12.2
W. cibaria 15	6.4×10^{10}	6.2×10^{2}	0.00	1.1×10^{10}	17.2
W. cibaria 18	8.3×10^{10}	9.5×10^{2}	0.00	2.0×10^{9}	2.4
W. confusa 20	5.6×10^{10}	6.9×10^{2}	0.00	5.5×10^{9}	9.8
W. confusa 31	4.4×10^{10}	2.5×10^{2}	0.00	8.9×10^{9}	20.2
W. cibaria 33	4.6×10^{10}	9.0×10	0.00	1.2×10^{9}	2.6
W. cibaria 34	7.1×10^{10}	2.3×10^{2}	0.00	2.1×10^{9}	3.0
W. cibaria 37	7.2×10^{10}	9.4×10^{2}	0.00	2.0×10^{9}	2.8

ที่มา : ดัดแปลงจาก Lee และคณะ(2011)

[a]เชื้อเริ่มต้นที่pH 6.5

[b]SR (Survival ratio, %) ปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS pH 2.0 หรือ 3.0/ ปริมาณเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS pH 6.5x 100

2.1.2.4 ความสามารถต่อเกลือน้ำดี(bile salt) (Lee และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

W. confusa 31ทนเกลือได้มากสุดถึง 0.3% bile saltดูได้จากการปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นจากเดิม 128.8% ส่วนเชื้อ*W. cibaria* stain 18 ทนได้ที่2.2%แสดงให้เห็นว่าไวต่อสภาวะกรดเป็นอย่างยิ่ง และเมื่อปรับสภาวะเป็น pH 3.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 0.3% bile salts พบอัตราการรอดเพิ่มมากขึ้นยกเว้นเชื้อ*W. Confuse* 31ลดลงเป็น 20.5%จาก 128.8%

ผลการศึกษาความต้านทานเกลือน้ำดี 0.3เปอร์เซ็นต์จัดเป็นอัตราส่วนวิกฤตของเชื้อ*W. confusa* 31ได้แสดงลักษณะสำคัญของการเป็นโปรไบโอติกได้อย่างสมบรูณ์คือการต่อต้านสามารถต้านทานค่า pH ต่ำและน้ำดีเกลือได้ ซึ่งเป็นการยืนยันรายงานของ Lee และคณะ (2011) ได้มีการนำเชื้อ*Weissella* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสอดคล้องกับผลของห้องปฏิบัติการอื่นๆที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้

2.1.2.5ความสามารถในทนเกลือ NaCl (Lee และคณะ, 2011)

W. confusa stain 8 แสดงให้เห็นว่าทนเกลือ NaCl 6.5% ได้มากและนานที่สุด OD600=1.61 ในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ไม่มีเกลือ 6 ชั่วโมงและที่ NaCl 8.0% *W. confusa* 8 มีการเจริญอย่างช้าๆ OD600=0.89 ในเวลา 48ชั่วโมง*W. confuse* 20 reached OD600 value of 0.72 ส่วนเชื้อ *Weissella* สายพันธุ์อื่นยังสามารถเจริญในกิมจิได้เนื่องจากมีส่วนผสมของเกลืออยู่ที่ 3%

2.1.1.6ความสามารถในการทนความร้อน (Lee และคณะ, 2011)

Weissella ตายอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับความร้อนที่ 70และ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ยกเว้นเชื้อ *W. cibaria* 18เชื้อตายหลังจากได้รับความร้อน 70 องศาเซลเซียส 5 นาทีโดยเหลือรอดในปริมาณน้อยกว่า 100 cfu/g โดยสรุป *Weissella* จัดเป็นเชื้อทนความร้อนได้ในระดับปานกลางจัดเป็น mesophilic organism

2.1.2.7 กิจกรรมการย่อยเม็ดเลือดแดง(Hemolytic activity test) (Lee และคณะ, 2011)

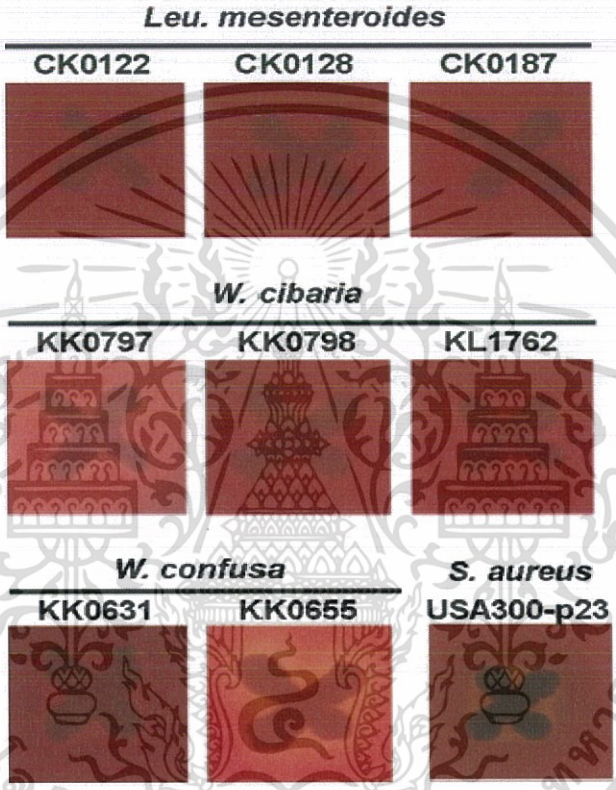
เชื้อ *W. cibaria* จำนวน 9 สายพันธุ์ strains ได้แก่ CK0276, CK0277, CK0483, CK0487,CK0489, CK0538, KK0797, KK0798และ KL1762 นอกจากนี้อีก 2 สายพันธุ์ของ*W. confuse*KK0631และ KK0655มีการย่อยเม็ดเลือดแดงalpha -hemolytic activities แสดงดังภาพที่ 2.1

ชุดทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่มีอยู่ในทางการค้า ได้แก่API (Analytical Profile Index systems bioMéreiux, France) และ RapiID Strep panel (Remel, USA) ต่างก็ไม่สามรถแยกความแตกต่างของเชื้อ *Weissella* spp. เช่น การวินิจฉัยเชื้อ *Weissella* spp. ด้วย API 20 Step หรือ API 50 CHL kit (Version 5.1) ไม่สามารถแยกเชื้อ *W. confuse* ออกจาก *W. viridescens* และ *W. cibaria* ได้(Kulwichitและคณะ, 2000) ดังนั้นหากต้องการแยกความต่างของเชื้อในกลุ่ม *Weissella* spp. ใช้เทคนิคการวิเคราะห์โมเลกุล DNA sequencing 16S rDNAจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดในการคัดแยก

2.1.3 แหล่งของเชื้อ *W. cibaria*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weissella spp.พบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป พบรายงานสามารถคัดแยกเชื้อจาก อุจจาระน้ำลายนมแม่ ปัสสาวะธัญพืชเนื้อสัตว์หมัก ผลิตภัณฑ์อ้อยน้ำแครอทใบกล้วยและผัก (Björkrothและคณะ, 2002; Fusco และคณะ, 2015) อุจจาระของบุคคลที่มีสุขภาพดี รวมทั้งช่องคลอด. *W. ceti* เกิดการระบาดปลาเรนโบว์เทราท์ที่เพาะเลี้ยงจาก United States, China, Brazil (Figueiredoและคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ช่องคลอดคนด้วย (Jin และคณะ, 2007)



ภาพที่2.1แสดงการสร้างเอนไซม์ย่อยเม็ดเลือดแดงแบบalpha -hemolytic-activity ของเชื้อ *Leuconostoc*และ *Weissella*ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกิมจิโดยใช้ *S.aureus* USA300-p23 เป็นเชื้อ Positive control

ที่มา : Jeong และLee (2015)

Weissella เป็นเชื้อที่อาศัยอยู่ร่วมกันของมนุษย์ในเยื่อเมือกระบบทางเดินทางอาหาร นอกจากนี้ยังพบ *W.confusa* พบในแผลติดเชื้อในแบคทีเรียระบบทางเดินอาหารและเยื่อบุหัวใจอักเสบ (Flaherty และคณะ, 2003)

2.1.4 การปนเปื้อนและอันตรายเชื้อ *Weissella* spp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาของอาหารทารกเป็นสิ่งที่สำคัญมากเนื่องจากทารกขาดการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายหรือลำไส้ที่ดีพอ (Townsend และ Forsythe, 2008)องค์การอนามัยโลก(WHO, 2007) ได้ออกคำแนะนำเกี่ยวกับการเตรียมนมสำหรับเด็กทารก นอกจากนั้นทาง CAC (2008) ได้ให้คำแนะนำในเรื่องของวิธีการตรวจสอบและการพัฒนาการผลิตและออกมาตรการควบคุมสภาวะต่างๆที่ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ

สำหรับการผลิตนมของทารกสิ่งที่มีความจำเป็นสุดที่สุดคือต้องควบคุมการผลิตให้อยู่ในสภาวะปราศจากการปนเปื้อนเชื้อให้มากที่สุดโดยเฉพาะเชื้อก่อโรคและเชื้อทั่วไปที่อาจเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วเกิดการสะสมของก่อโทษกับสำไส้เด็กได้ดังนั้นหากกล่าวถึงการป้องกันการสะสมของเชื้อในกระบวนการผลิตแล้วสิ่งแรกที่ควรคำนึงถึงคือวิธีการทำความสะอาดและสารทำความสะอาดที่จะต้องป้องกันการยึดเกาะของจุลินทรีย์กับพื้นผิวอุปกรณ์ที่เป็นจุดเชื่อมในการส่งผ่านเชื้อโรคในกระบวนการผลิตและการแปรรูปอาหารอุตสาหกรรม (Barnes และคณะ, 1999)เช่น การปนเปื้อนจากวัตถุดิบผ่านมือ การทำความสะอาดด้วยผ้าหรือฟองน้ำ ได้รับสัมผัสเชื้อโดยตรงผ่านอนุภาคอากาศ (Kusumaningrum และคณะ,2003)

W.confusa ที่เข้าสู่ร่างกายนั้นส่งผลต่อการทำงานของภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยตรง (Lahtinen และคณะ2012; Fairfax และคณะ2014 และ Medford และคณะ2014)ที่เกิดการติดเชื้อนั้นโดยมากมักจะเป็นในส่วนของระบบภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติซึ่งทำให้ยากต่อการรักษาทางการแพทย์เมื่อเร็วๆนี้ได้มีนำการรักษาโดยใช้เคมีบำบัดปลูกถ่ายอวัยวะ แผลไฟไหม้ โรคติดแอลกอฮอล์ ร่วมกับการให้ Steroid พบว่าการรักษาได้ผลไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากยังพบการเพิ่มจำนวนของเชื้อมากขึ้น(Flaherty และคณะ, 2003และ Salimnia และคณะ, 2011) ด้านการแพทย์พบการติดเชื้อเนื่องมากจากการปลูกอวัยวะกับกล้ามเนื้อของผู้ป่วย หลังจากมีการให้ยา vancomycin พบมีการต้านเช่นเดิมจึงทำให้ทราบแท้จริงแล้ว เชื้อ *Weiseella* เป็นเชื้อที่ทำให้กล้ามอักเสบเกิดการติดเชื้อ และเมื่อเก็บตัวอย่างของเหลวและปัสสาวะของผู้ป่วยไปตรวจแต่ไม่พบเชื้อนี้แต่อย่างใด แต่ต่างลงความเห็นว่าเชื้อที่มีความเสี่ยงนี้เกิดมาจากเชื้อกลุ่ม *Weissella* นี้เอง (Olanoetal,2001; Flaherty และคณะ, 2003;Kumarและคณะ, 2011;Lee และคณะ, 2011 และ Vasquez และคณะ, 2015)

Weissella โดยทั่วไปสามารถอาศัยในลำไส้ของคนได้ โดยอาศัยเยื่อบุสำไส้ช่วยปกป้องเชื้อให้อยู่รอดได้และเพิ่มจำนวน เช่น เชื้อ *W.confusa* ทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดและการอักเสบของเนื้อเยื่อ (Flaherty และคณะ, 2003และ Shin และคณะ, 2007) การอักเสบและตัวเชื้อนี้เองเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เป็นช่วงอ่อนแอชักนำเชื้อก่อโรคเยื่อเข้าสู่อวัยวะได้ง่าย ทำให้ป่วยในที่สุด (Kumar และคณะ, 2011) เชื้อ *W.confusa* ทำให้เกิดการติดเชื้อกับคน สาเหตุเกิดจากการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย (Green และคณะ, 1991; Bantar และคณะ, 1991 และ Salimniaและคณะ, 2011) ซึ่งเชื้อ *W.confusa* เป็นตัวที่บ่บอกการติดเชื้อของมนุษย์ที่มีความชัดเจนที่สุด (Olanoและคณะ, 2001; Kulwichitและคณะ, 2000; Svecและคณะ, 2007; Harlan และคณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

, 2011; Lee และคณะ, 2011; Salimniaและคณะ, 2011และ Vasquez และคณะ, 2015) อย่างไรก็ตามพบว่าการติดเชื้อที่เกิดขึ้นมักเกิดการอักเสบของกล้ามเนื้อร่วม (Kulwichitและคณะ, 2000)และเกิดเป็น ฝีนูนขึ้นมา (Bantarและคณะ, 1991) โดยเริ่มที่ท้องก่อนและลุกลามไปกับอวัยวะใกล้เคียงอื่นๆ *W.cibaria* พบได้ในน้ำปัสสาวะ ปวดและเลือดของผู้ป่วยที่มีภาวะติดเชื้อ ส่วนเชื้อ *W.viridescens* พบได้ในเลือดคนเช่นกัน (Kulwichitและคณะ, 2000) ในอุจาระของเด็กก็พบเชื้อนี้ได้ (Sanzและคณะ, 2007)

2.2 การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในโรงงานผลิตนมผง

2.2.1การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

จากงานวิจัยของ Sani และคณะ(2013)ได้ตรวจสอบหาเชื้อ Aerobic plate count (APC) ในตัวอย่างนมเด็กPowdered Infant Formulas (PIF) 51ตัวอย่างนมFollow-up Formulas (FOF) 21ตัวอย่างและนมInfant Foods 18 ตัวอย่าง รวมจำนวน 90 ตัวอย่าง พบเชื้อAPC $<10^2 - 7.3x10^3$ cfu/g ปริมาณเชื้อ $<10^2$คิดเป็น 78% ซึ่งตามข้อกำหนดของกฎหมาย CODEX (2008b) รายงาน"ไม่พบ" ได้เขียนข้อเสนอแนะควรนำปริมาณเชื้อ APC ที่พบในแต่ละจุดมาวิเคราะห์ต่อเนื่องจากอาจพบเชื้อฉวยโอกาสเพิ่มจำนวนหลังจากการผลิต

2.2.2 การตรวจหาจุลินทรีย์กลุ่มโคลิฟอร์ม

โคลิฟอร์มแบ่งตามแหล่งที่มา ได้ 2 ชนิด คือ Fecal Coliform พวกนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ของคน และสัตว์เลือดอุ่น ถูกขับถ่ายออกมากับอุจจาระ เมื่อเกิดการระบาดของโรคระบบทางเดินทางอาหาร ได้แก่ *E.coli* และ Non-fecal coliform ซึ่งอาศัยอยู่ในดินและพืชมีอันตรายน้อยกว่า *E.coli*

เชื้อที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม คือ Escherichia, Enterobacterและ Klebsiellaแหล่งที่อยู่ของเชื้อคือทางเดินอาหารส่วนลำไส้ของสัตว์ของสัตว์เลือดอุ่น เชื้อที่พบในนมผงบ่งบอกถึงสุขลักษณะที่ไม่ถูกต้องขณะผลิตนมผง

2.2.3 การตรวจหาเชื้อ *Cronobacter sakazakii*

การทดสอบเชื้อ*Enterobacteriaceae*ถึงแม้เชื้อนี้จะไม่ได้รับรายงานว่าก่อโรคร้ายกับเด็ก แต่สำหรับเด็กอ่อนเพิ่งคลอด เด็กคลอดก่อนกำหนด เด็กภูมิคุ้มกันบกพร่องเด็กอ่อนน้ำหนักน้อยต่ำกว่าเกณฑ์ 1500-2500 กรัมเด็กป่วยพักฟื้นจากอาการป่วย เด็กพิการ ยังพบการปนเปื้อนเชื้อ*Enterobacteriaceae*ในนมระหว่างขั้นตอนการเตรียมและการเก็บรอไว้รอดื่ม (FAO/WHO, 2004; Muytjens และคณะ, 1988)

เมื่อเร็วนี้Joseph และFrosythe (2011) ได้ศึกษามีการพบเชื้อ*Cronobacters akazakii*ST4ซึ่งเป็นสาเหตุหลักของโรคเยื่อหุ้มในสมองอักเสบ โดยปริมาณเชื้อ *Cronobacter* จากรายงาน FAO/WHO (2006) พบเชื้อ *Cronobacter* ในปริมาณที่น้อยคิดเป็น 2-22% จากตัวอย่างนมPIF ในหลายประเทศ และ Tudela และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ (2008)ได้ตรวจพบเชื้อ *Cronobactersakazakii* สายพันธุ์ก่อโรคจากตัวอย่างตัวอย่างนมผงในโรงพยาบาลจากตัวอย่างทั้งสิ้น 156 ตัวอย่าง

2.2.4การตรวจหาเชื้อ *S.auseus*

S. aureus เป็นสาเหตุสำคัญของโรคเต้านมอักเสบในวัวนม (Rabelloและคณะ, 2007)นำไปสู่ความเสียหายทางเศรษฐกิจมากด้านการผลิตนมลดลงและเป็นที่มาของการปนเปื้อนของนมและนมผลิตภัณฑ์ (Spanuและคณะ, 2013)นมผงไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อและอาจถูกปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียต่างๆ รวมทั้งเชื้อก่อโรค นมผงนับเป็นอาหารที่มีความเสี่ยงสูงในแง่ของการปรากฏตัวของเชื้อให้ผล coagulase เป็นบวก มีการกำหนดเกณฑ์การพบเชื้อชนิดนี้ในยุโรปโดยการออกกฎหมายพบได้จากตัวอย่าง 2 ใน 5 ตัวอย่างไม่เกิน < 10 cfu/g เชื้อ *S.aureus*สามารถเจริญได้ภายใต้นมผงที่มีความชื้นอย่างน้อย 0.86 (Bhunia, 2008และ Fernandes, 2009) และ0.83 (Schelinและคณะ, 2011) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 264) พ.ศ. 2556 กำหนดเกณฑ์มาตรฐานนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก (ชนิดผงหรือแห้ง) ไม่พบ *S.aureus* ใน 0.1 กรัม (g)

2.2.5 การตรวจหาเชื้อ *B.cereus*

พบเชื้อ *B.cereus* ในปริมาณต่ำในตัวอย่างนมผงจากรายงาน Beckercและคณะ(1989) และพบเชื้อ *B. cereus*60%จากตัวอย่างนมผงผู้ผลิตสหรัฐอเมริกา ลักษณะของการก่อโรคนั้นเกิดขึ้นจากการเพิ่มอุณหภูมิเป็นสาเหตุหลัก กระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 264) พ.ศ. 2556 กำหนดเกณฑ์มาตรฐานนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก (ชนิดผงหรือแห้ง) พบ *B.cereus* ไม่เกิน 100 ใน 1 กรัม (cfu/g)

2.3 การออกแบบที่ถูกสุขลักษณะ (Hygienicdesign)(นวภัทรา, 2555)

มาตรฐานความปลอดภัยที่เกี่ยวข้องกับการออกแบบเครื่องจักรและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตอาหาร ได้แก่ มาตาฐานISO14159 และ EN 1672-2 ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับมาตรฐาน ISO 22000 ซึ่งองค์ประกอบที่สำคัญข้อหนึ่งคือ การกำหนดมาตรฐานเกี่ยวกับการออกแบบและการติดตั้งเครื่องจักร เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารให้ถูกหลักสุขอนามัยหรือเรียกว่า hygienic design ความสำคัญยังรวมไปถึงการออกแบบและติดตั้งให้ถูกต้องตามหลักทางวิศวกรรมจากความสำคัญดังกล่าว หลายองค์กรจึงเข้ามามีบทบาทในการกำหนดแนวปฏิบัติ เช่น องค์การอาหารและยา หลักการผลิตที่ดี(GMP)American Society of Mechanical Engineers(ASME)และ European Hygienic Engineering และ Design Group (EHEDG)เป็นต้น

Hygienic design เป็นการออกแบบเพื่อป้องกันและลดการปนเปื้อนจากแหล่งภายนอกมาสู่อาหาร ซึ่งสามารถทำได้โดยการออกแบบโรงงาน อุปกรณ์และเครื่องจักรที่ใช้ในการผลิต โดยคำนึงถึงหลักความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลอดภัยทั้งกระบวนการผลิต การป้องกันการสะสมของอาหารและสิ่งสกปรกในส่วนต่างๆของเครื่องจักร รวมไปถึงการป้องกันการปนเปื้อนลงสู่อาหาร อันจะเป็นการเน้นการป้องกันการเกิดปัญหา การจัดการกระบวนการผลิตและการบำรุงรักษาทำได้ง่าย ลดต้นทุนในการผลิตและการตรวจสอบอาหารที่ผลิต และเมื่อเกิดข้อผิดพลาดขึ้น สามารถหาจุดบกพร่องของกระบวนการผลิตเพื่อทำการแก้ไขได้อย่างเป็นระบบและรวดเร็วยิ่งขึ้น

2.3.1 สิ่งที่ต้องคำนึงในการออกแบบ

2.3.1.1ความปลอดภัย ของผลิตภัณฑ์ก่อนที่จะถึงมือผู้บริโภคนั้นเป็นสิ่งสำคัญที่สุดของการออกแบบโดยต้องสามารถป้องกันผลิตภัณฑ์จากการปนเปื้อนทั้ง 3 ทางโดยเฉพาะการปนเปื้อนจากสิ่งมีชีวิตเล็กที่ก่อนให้เกิดโรคได้ เช่น *E.coli*, *Salmonella* spp.เป็นต้น ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้อาจอาศัยอยู่ในเครื่องมือและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนระหว่างการผลิตและปนเปื้อนเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ การออกแบบที่ได้นั้นจะต้องทำให้แน่ใจว่าในเครื่องมือเหล่านั้นไม่มีแหล่งที่จุลินทรีย์สามารถอาศัยอยู่ได้และไม่มีสิ่งติดค้างในเครื่องมือ

2.3.1.2 การทำความสะอาด เป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้ในการป้องกันการปนเปื้อน ซึ่งภายหลังเสร็จสิ้นการผลิตแล้วอาจเกิดการสะสมของกากที่เหลือซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เครื่องมือที่ยากต่อการทำความสะอาดจำเป็นที่จะต้องใช้สารเคมีทำความสะอาดที่เข้มข้นขึ้นและใช้ระยะเวลานานขึ้น โดยสิ่งที่ตามมาคือต้นทุนที่สูงขึ้น สูญเสียเวลาที่ใช้ในการผลิตและอายุการใช้งานที่จะสั้นลง ดังนั้นการออกแบบเครื่องมือที่ดีควรทำความสะอาดได้ง่าย

2.3.1.3 การควบคุมดูแล การตรวจสอบเครื่องมือเป็นสิ่งที่สำคัญสิ่งที่จะต้องนำมาพิจารณาและการตรวจสอบได้แก่ การควบคุม การทดลองและการพิสูจน์ผลจากการออกแบบเป็นไปตามข้อกำหนดด้านสุขลักษณะหรือไม่ หรือการตรวจสอบระบบการทำความสะอาดด้วยเช่นกัน

2.3.1.4 ความสอดคล้องกับกระบวนการ ผู้ออกแบบควรคำนึงหลักสุขลักษณะและฟังก์ชั่นการทำงานควบคู่ไปด้วยกัน การออกแบบควรเน้นด้านออกแบบเครื่องมือที่ถูกสุขลักษณะที่ดีจะช่วยลดเวลาที่ใช้ในการทำความสะอาดลดลงได้ซึ่งสามารถนำเวลาในส่วนนี้ไปใช้ในกระบวนการผลิตแทนได้

2.3.1.5 การประเมินความเสี่ยงในการออกแบบ ควรคำนึงถึงวัตถุประสงค์ที่ต้องการนำไปใช้ การจัดการระดับของมาตรฐานด้านสุขลักษณะก็จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเครื่องมือและขึ้นอยู่กับความเสี่ยงที่จะเกิดการปนเปื้อนของเครื่องมือไปสู่ผลิตภัณฑ์

2.3.2ส่วนประกอบในการออกแบบเครื่องมือ

2.3.2.1 การระบายน้ำของเหลวหรือน้ำทิ้งจากกระบวนการต่างๆ สามารถเป็นแหล่งเพาะเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี ไม่ว่าจะเป็นบริเวณท่อหรือพื้นผิวของอุปกรณ์ทุกชนิดควรออกแบบให้มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระบายน้ำได้ในตัวมันเองเพื่อลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิต ควรหลีกเลี่ยงการออกแบบที่ทำให้เกิดมุมแหลมขึ้นในอุปกรณ์ ควรเปลี่ยนจากมุมแหลมเป็นมุมโค้งหรือให้มนขึ้นช่วยลดการเกิดน้ำขังในบริเวณนี้ได้

2.3.2.2 วัสดุที่นำมาใช้ ควรเลือกวัสดุที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงกว้าง ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ ไม่เจือปน และไม่มีการดูดซับกับผลิตภัณฑ์อาหาร ไม่เกิดรอยแตกร้าว สึกกร่อนและมีอายุการใช้งานที่เหมาะสม สามารถป้องกันจากสิ่งแทรกซึมไม่พึงประสงค์ ง่ายต่อการทำความสะอาด

2.3.2.3 พื้นผิวที่สัมผัสอาหาร ในการออกแบบพื้นผิวที่จะต้องมีการสัมผัสกับอาหารนั้น ควรคำนึงถึงความราบเรียบของพื้นผิว ความต่อเนื่องกัน ไม่เป็นรอยแยกและจะต้องปราศจากรอยขูดขีดและไม่เป็นหลุมบ่อ อาจเป็นที่อาศัยของจุลินทรีย์และของเสียต่างๆได้ พื้นผิวที่ดีนั้นจะต้องสามารถทำความสะอาดได้ง่าย

2.3.2.4 มุม รอยแตกร้าวและจุดอับ ควรออกแบบให้เป็นส่วนโค้งเนื่องจากสามารถลดการสะสมของเชื้อโรคหรือสิ่งที่ไม่ต้องการได้ ทำความสะอาดได้ง่าย และควรหลีกเลี่ยงการทำให้เกิดรอยเชื่อมบริเวณมุมแหลม

2.3.2.5 รอยเชื่อมและข้อต่อ เป็นส่งที่ควรหลีกเลี่ยงเนื่องจากการใช้ข้อต่อจะทำให้เกิดขอบหรือส่วนที่ยื่นออกมา เกิดซอกเล็กต่างๆ รวมไปถึงรอยแยกบริเวณวงแหวนที่เป็นข้อต่อของท่อ สิ่งเหล่านี้เป็นการออกแบบไม่ถูกสุขลักษณะ ดังนั้นจึงควรเชื่อมแบบถาวรการใช้ข้อต่อจะช่วยลดความเสี่ยงทางสุขลักษณะลงได้ รอยเชื่อมที่ดีควรมีลักษณะราบเรียบเพื่อป้องกันไม่ให้เป็นแหล่งเพาะเชื้อ การออกแบบจุดเชื่อมต่อโดยใช้หมุดยึดควรใช้เมื่อจำเป็นเท่านั้น บริเวณจุดเชื่อมต่อนั้นควรออกแบบให้สามารถถอดประกอบได้ ไม่มีรอยแยกและควรใช้ยางเป็นวัสดุปกคลุม ด้านข้างของท่อจะต้องประกอบสนิทกันอย่างพอดีเพื่อป้องกันการกักเก็บจุลินทรีย์

2.3.2.6 หมุดยึด ในการออกแบบหรือเลือกใช้หมุดยึดหรือสกรูที่ไม่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดปัญหาตามมาหลายอย่าง เช่น การทำงานของเครื่องจักรหรือการไหลของผลิตภัณฑ์เกิดการติดขัดทำให้เกิดความเสียหายได้ นอกจากนี้การเลือกใช้หมุดยึดหรือสกรูผิดชนิดอาจทำให้เกิดการสะสมของกากทำให้เป็นอาหารของเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วได้ ดังนั้นการออกแบบและเลือกใช้ควรคำนึงถึงชนิด ลักษณะใช้งานให้เหมาะสม ควรเลือกหมุดยึดหรือสกรูที่ทำจากสแตนเลสสตีลและหากต้องมีการสัมผัสกับอาหารควรให้มีหัวน็อตคลุมบริเวณหัวของหมุดหรือสกรูเพื่อป้องกันการสะสมของสิ่งที่ไม่ต้องการบริเวณร่องสกรู

2.3.2.7 การซีล(Seal) ในการเลือกวัสดุที่จะนำมาใช้ในการผนึกควรเลือกวัสดุที่ไม่ก่อให้เกิดสารพิษกับผลิตภัณฑ์ สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง นอกจากนี้ยังควรเลือกใช้วัสดุที่สามารถยืดหยุ่นได้ดี ทนทานต่อแรงกด ทนทานต่อแรงกด ทนต่อความเป็นกรด-เบส ซึ่งวัสดุที่นิยมนำมาใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ วัสดุประเภทยาง การผนึกควรคำนึงการขยายหรือหดตัวของยางเมื่อได้รับความร้อนด้วยเนื่องจากการหดหรือขยายตัวนี้อาจทำให้เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ได้

2.3.2.8 ปลายเพลา(Shaft ends) เครื่องกวน เครื่องผสม หรือเครื่องตัด เครื่องเหล่านี้สามารถทำให้เกิดความเสี่ยงจากการแตกร้าวบริเวณที่โลหะกับโลหะ หรือพื้นที่ที่เข้าไม่ถึงในท่อ และการออกแบบจะต้องทำรอยต่อให้อยู่ในสภาพที่สมบรูณ์ เช่น ดุมล้อ น็อต และข้อต่อของเพลา ต้องซีลอย่างดีภายใต้การควบคุมความดันในการอัดและกด ตรงบริเวณมุมต้องมีความโค้งมนและมีความชัน หลีกเลี่ยงรอยต่อแบบสกรู

2.3.2.9 ฝาปิด การออกแบบให้ถูกสุขลักษณะของประตูและฝาปิดควรจะสามารถป้องกันการเข้าและสะสมสิ่งสกปรก คือออกแบบขอบฝาให้มีความลาดชันและอยู่ด้านนอกของภาชนะควรง่ายต่อการเคลื่อนย้ายในการทำความสะอาด

2.3.2.10 ขอบ การออกแบบขอบด้านบนของเครื่องมือที่ใช้บรรจุต้องหลีกเลี่ยงขอบที่ผลิตภัณฑ์สามารถเข้าไปสะสมและยากต่อการทำความสะอาด

2.3.2.11เครื่องมือควบคุมและอุปกรณ์การวัด เครื่องมือที่ต้องบรรจุของเหลวส่งให้ของเหลวผ่านจะต้องเลือกใช้วัสดุให้เหมาะสม ตัวอย่างเช่น เครื่องวัดความดันแบบ Bourdon เมื่อของเหลวไหลผ่านเครื่องมือควรเลือกวัสดุที่เหมาะสมกับชนิดอาหารที่ไหลผ่าน การเลือกวัสดุที่จะนำมาใช้ออกแบบต้องพิจารณาในเรื่องของจุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการผลิตเข้ามารวมในการพิจารณาเลือกวัสดุ ซึ่งจะทำให้ความเสี่ยงจากการติดเชื้อโรคลดลง

2.3.2.12 การติดตั้งเครื่องมือ ต้องเลือกตำแหน่งที่ถูกต้องตามสุขลักษณะ หากเลือกตำแหน่งไม่ถูกต้องก็อาจทำให้เครื่องมือไม่ถูกสุขลักษณะด้วยเช่นกัน

2.3.2.13 การหุ้มฉนวนและการหุ้มด้วยโลหะ ควรหลีกเลี่ยงการใช้วัสดุที่เป็นฉนวน เพราะอาจเป็นแหล่งสะสมของจุลินทรีย์และฝุ่นละอองสะสมอยู่ภายในได้ การใช้อากาศเป็นฉนวน สแตนเลสด้านนอกการท่อเชื่อมให้สนิทเพื่อป้องกันการเข้าของอากาศ ความชื้น หรือแมลง ที่อาจเข้าไปทำความเสียหายระหว่างผนังได้

2.4 สารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหาร (Marriott และ Gravani, 2006)

2.4.1 สารล้างทำความสะอาดเครื่องมือ อุปกรณ์ในโรงงานผลิตอาหาร

สารชะล้างหรือสารทำความสะอาด (detergents) หมายถึง สารหรือส่วนผสมของสารที่ช่วยในการทำความสะอาดโดยออกฤทธิ์ 4 ทางคือ สารทำให้เปียก (wetting agent) สารทำให้เกิดการละลาย (solubilizers)สารทำให้เกิดอีมัลชั่น (emulsion) สารทำให้เกิดการกระจายตัว (dispersants) ทำให้สารตกค้างละลายหรือหลุดออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารทำความสะอาดที่แพร่หลายทางการค้าทั่วไป มีส่วนประกอบทำให้น้ำซึมเข้าไปทำชะล้างสิ่งสกปรกที่เกาะอยู่ตามผิวหน้าของเครื่องมือได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปแล้วสารทำความสะอาดมักเป็นส่วนผสมของสารประกอบเชิงซ้อนทางเคมี เศษอาหารและคราบสิ่งสกปรกเป็นแหล่งสารอาหารที่สำคัญของจุลินทรีย์ ซึ่งจะถูกทำลายในระหว่างที่มีการทำความสะอาด ดังนั้นในสารทำความสะอาดส่วนใหญ่จึงมีสารประกอบน้ำยาทำความสะอาด (chlorinated) และสารฆ่าเชื้อ(sanitizers) โดยอาศัยพลังงานกล (mechanical energy) กระบวนการทำความสะอาด sanitizers ได้ถูกนำมาใช้ในการทำลายจุลินทรีย์

จากรายงานในอดีตที่ผ่านมาพบว่าการมีเศษของนมหรือ อินทรียวัตถุ ติดอยู่ที่ผิวอุปกรณ์และความกระด้างของน้ำที่ใช้ในการเตรียมมีผลต่อประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดทั้งสิ้น และสารทำความสะอาดนั้นสามารถต้านเชื้อได้นั้นทาง European Committee for Standardization ค.ศ.2002 (CEN, 2002) กำหนดว่าจะต้องมีคุณสมบัติลดเชื้อจุลินทรีย์ได้ไม่น้อยกว่า 4 log**cfu/g**

สารเคมีทำความสะอาดที่ใช้ควรเลือกสารเคมีทำความสะอาดให้เหมาะแก่การใช้งาน เพื่อประสิทธิภาพการล้างทำความสะอาดสารทำความสะอาดที่ใช้ในโรงงาน มักจะเป็นสารผสมของสารที่มีคุณสมบัติต่างๆ กัน เพื่อให้ใช้ได้หลากหลาย ดังนั้นจึงควรพิจารณาเลือกใช้ให้เหมาะกับประเภทของสิ่งสกปรก ลักษณะพื้นผิวของเครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ วิธีการทำความสะอาดที่ใช้ นอกจากนี้ควรศึกษาข้อมูล และข้อควรระวังในการใช้สารทำความสะอาดนั้นๆด้วย

โดยหลักการสารเคมีทำความสะอาดที่ดีจะต้องเข้าไปจับกับสิ่งสกปรกออกจากผิวที่ต้องการทำความสะอาด เข้าไปแทนที่สิ่งสกปรกที่จับอยู่กับพื้นผิวที่ต้องการทำความสะอาด ละลายสิ่งสกปรกออกจากพื้นและต้องป้องกันไม่ให้สิ่งสกปรกที่หลุดออกจากพื้นผิวทำความสะอาดกลับไปติดพื้นผิวที่ล้างทำความสะอาดแล้วได้อีกสารทำความสะอาดไม่จำเป็นต้องมีคุณสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ แต่โดยทั่วไปมักมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อด้วย

2.4.2 สารฆ่าเชื้อ (Sanitizers)

สารฆ่าเชื้อ (sanitizer) อาจเรียกว่า sanitizing agent หรือ disinfectant หมายถึง สารที่ใช้เพื่อลดหรือทำลายปริมาณจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ แบคทีเรีย โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) รวมถึงสปอร์ของราและสปอร์ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนบนพื้นผิวที่อาจหลงเหลือบนพื้นผิวเครื่องมืออุปกรณ์หลังการทำความสะอาดเช่น เครื่องจักรอุปกรณ์แปรรูปอาหาร และพื้นผิวสัมผัสอาหาร ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค

2.4.3ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ (สุวิมล, 2543)

ปริมาณเริ่มต้นของจุลินทรีย์ เมื่อปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นเพิ่มขึ้นจะต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีและเวลาในการทำลายเชื้อมากขึ้น (Park และคณะ, 1991; Wei และคณะ, 1985) องค์ประกอบของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญและสรีระวิทยาของจุลินทรีย์ เช่น เซลล์ปกติ(vegetative cell) กับสปอร์ (spore) เซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้ว (mature cell) กับเซลล์ที่อายุยังน้อย(younger cell) หรือชนิดของจุลินทรีย์ที่ต่างกัน จะมีความทนทานต่อสารเคมีชนิดหนึ่งๆ ต่างกัน

ระดับความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้(concentration or intensity of an antimicrobial agent) สารเคมีบางชนิดเมื่อความเข้มข้นมากขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์มากขึ้น แต่บางชนิดเมื่อความเข้มข้นน้อย มีประสิทธิภาพสูงกว่าความเข้มข้นที่มาก (Kest และ Marth, 1988)ความเข้มข้นที่ใช้ทั่วไป ส่วนใหญ่ไม่เกิน 0.35 เปอร์เซ็นต์ ถ้าความเข้มข้นจนถึง 0.50 เปอร์เซ็นต์ ใช้ทำลายสปอร์ในการบรรจุแบบปลอดเชื้อสำหรับอุปกรณ์ของสเตอไรส์ และภาชนะบรรจุที่มีการจำกัดเวลาในการฆ่าเชื้อ

ระยะเวลาที่สารเคมีสัมผัสกับจุลินทรีย์ (duration of exposure)จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความไวต่อสารเคมีไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับช่วงการเจริญ การสร้างสปอร์ และปัจจัยอื่นๆ จึงทำให้เวลาในการสัมผัสไม่เท่ากันของสารแต่ละชนิด Gelinas และคณะ (1983) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อ พบว่า เมื่อระยะเวลาและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

อุณหภูมิ(Temperature) สารละลายที่มีอุณหภูมิสูงจะลดแรงตึงผิวโดยทั่วไปแล้ว การเพิ่มอุณหภูมิจะเพิ่มอัตราการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ จากการทดลองของ Ito และSeeger (1980) อ้างโดย (สุภาวดี, 2543) กล่าวว่าประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

คุณภาพของน้ำที่ใช้ในการทำความสะอาด ความกระด้างของน้ำ ประกอบด้วย แคลเซียม แมกนีเซียม และโลหะต่างๆ มีผลต่อการขัดขวางประสิทธิภาพการทำงานของสารทำความสะอาด โดยเฉพาะไบคาร์บอเนต (Bicarbonate) ก่อให้เกิดตะกรันเป็นแหล่งสะสมของสิ่งสกปรกและจุลินทรีย์ จึงทำให้ยากแก่การทำความสะอาด สารพวก Quatenary ammonium compounds จะไม่ออกฤทธิ์ในน้ำที่เกลือแคลเซียมและแมกนีเซียม อยู่เกินกว่า 200 ppm ดังนั้นจึงควรใช้น้ำอ่อนร่วมกับสารทำความสะอาด ถ้าน้ำกระด้างมากประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อจะลดลง (Marriott และGravani, 2006)

อินทรียวัตถุ ติดอยู่ที่ผิวอุปกรณ์ในการทำความสะอาดแบบ CIP ช่วงแรกของการล้างจะมีการทำความสะอาดทางกายภาพและทางเคมี เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (Cords และคณะ, 2001) การมีเศษนมผงหรือเวย์จะไปลดประสิทธิการทำงานของ สารทำความสะอาดได้ ในประเทศแคนาดาได้มีการอนุญาตให้ใช้สารทำความสะอาดที่สัมผัสกับอาหารได้แก่ สารประเภท chlorine compound , peroxidine และ peroxyacid mixture , carboxylic acids,quaternary ammonium, anionic acids, iodine compound (Gaulinและคณะ, 2011)สำหรับการทำความสะอาดแบบ CIP ใน USA อนุญาตให้ใช้สารทำความสะอาดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึง 40 ชนิด(US FDA, 2012) EN 13610 (2002) ได้แนะนำวิธีการเลือกสารทำความสะอาดและฆ่าเชื้อทดสอบภายใต้สภาวะการปนเปื้อนนม 1% (v/v)

2.4.4 สารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคตทีฟ (Oxonia active)

สารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย (Oxonia active)เป็นชื่อทางการค้าของบริษัท เอ็กโคแล็บ จำกัด ประกอบด้วยสารกรดเปอร์อะซิติก 5.2 % (w/w) และ ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ 25.0 % (w/w) เป็นผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคชนิดกรดเปอร์อะซิติก ใช้ฆ่าเชื้อโรคตามพื้น ฝาผนัง สายพานลำเลียง และวัสดุอุปกรณ์ต่างๆในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ โรงเรือนเลี้ยงสัตว์ โรงฆ่าสัตว์และโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์

กรดเปอร์อะซิติกเป็นสารเคมีฆ่าเชื้อประเภท แอซิด แอนไอออนิก (acid-anionic sanitizer) ผลิตจากปฏิกิริยาระหว่าง กรดอะซิติก (CH_3COOH) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ดังสมการ (รุ่งทิพย์, 2552)

$$H_2O_2+CH_3COOH \longrightarrow CH_3COOOH+H2O$$

คุณสมบัติของกรดเปอร์อะซิติกเป็นตัวออกซิไดส์ที่แรงกว่าคลอรีนหรือคลอรีนไดออกไซด์ และมีศักยภาพมากกว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ดี ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ สปอร์ ยีสต์ และรา ที่อุณหภูมิต่ำกว่าและความเข้มข้นต่ำกว่า ใส ไม่มีสีและไม่สามารถเกิดฟอง พีเอชประมาณ 2.8 ซึ่งสารประเภทนี้จะเสถียรภาพเพิ่มขึ้นเมื่อมีค่าพีเอชต่ำลง ในช่วงพีเอชกว้างมีจำหน่ายอยู่ในรูปของเหลวที่ความเข้มข้น 5-37 เปอร์เซ็นต์ อาจมีการเติมสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) เช่น โซเดียมไพโรฟอสเฟต (sodium pyrophosphate) และไฮดรอกซีควิโนโลน (hydroxyquinolone) เป็นต้น

กรดอะซิตริกมีสูตรทางเคมีCH3COOH มีลักษณะเป็นของเหลว ไม่มีสี เป็นของแข็งที่อุณหภูมิ62 องศาฟาเรนไฮด์รวนตัวกับน้ำแอลกอฮอร์และกลีเซอรีนได้ดี (Chichesterและ Tanner, 1972) กรดอะซิติกหรือน้ำส้มสายชูเป็นสารให้กลิ่นรสและวัตถุกันเสียที่นิยมใช้กันมาตั้งแต่สมัยโบราณกรดอะซิติกเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำส้มสายชูและกรด Pyroligneousพบได้ตามธรรมชาติในผลมะเดื่อ การผลิตกรดอะซิติกนั้นสามารถทำได้หลายวิธีเช่น จากการหมักน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ น้ำตาลหรทอเมล็ดธัญพืชหรือจากการออกซิเดชัน(Oxidation) ของอะซิทอลดีไฮด์(Acetaldehyde) หรือของบิวเทน (Butane) หรือได้จากปฏิกิริยาของเมทานอล (Methanol) และคาร์บอนมอนอกไซด์ (Carbonmonoxide) กรดอะซิติกเป็นสารเจือจางในอาหารที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ภายใต้การควบคุมดังนั้นกรดอะซิติกและอนุพันธุ์จึงเป็นที่ยอมรับและอนุญาติให้ใช้ในอาหาร

การใช้กรดอะซิติกในผลิตภัณฑ์อาหารกรดอะซิติกหรือน้ำส้มสายชูที่ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารและในการถนอมอาหารมักใช้กันใน 2 รูปแบบคือใช้ในรูปแบบของน้ำส้มสายชูเข้มข้น5-10% และใช้ในรูปของสารละลายกรดอะซิติกสังเคราะห์เข้มข้น25-80 เปอร์เซ็นต์มีผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ที่ใช้กรดอะซิติกหรือน้ำส้มสายชูเป็นส่วนประกอบ เช่นซอสมะเขือเทศมายองเนสน้ำสลัดต่างๆอาหารดองทั้งเปรี้ยวและหวานนอกจากนี้ในการบ่มเนื้อและผลิตภัณฑ์ บรรจุกระป๋องสำหรับสาเหตุที่ใช้กรดอะซิติกหรือน้ำส้มในการถนอมอาหาร เนื่องจากกรดอะซิติกให้กลิ่นเฉพาะตัวและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (ไพบูลย์, 2532) ในอุตสาหกรรมการผลิตมายองเนสหากมีการเติมกรดอะซิติกลงไปด้วยจะทำให้ความสามารถในการต้านทานความร้อนของเชื้อ *Salmonella* ลดลง(ในกรณีที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ)และมีการใช้กรดอะซิติกเข้มข้น 1-3 เปอร์เซ็นต์ในผลิตภัณฑ์ปลาเพื่อป้องกันแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้โดยเฉพาะเชื้อ *Clostridium* ในประเทศฟิลิปินส์มีการทดลองใช้น้ำส้มสายชูในการยืดอายุเก็บรักษาปลาเค็มแห้ง (ศรวณีย์, 2542)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีคุณสมบัติเป็นพิษทางวิทยา โพรไบโอติกบางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้แก่ Lactobacilli, Lactococci, Pediococci , Leuconostoc และ Weissella (Hoover, 2000) แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้นและจุลินทรีย์ผู้ผลิตจะทนได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น(สุมณฑา, 2545) กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เกิดขึ้นโดยการออกซิไดซ์อย่างแรงบนเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาที่หมู่ซัลไฮดริล (sulhydryl group) ของโปรตีนในเซลล์ โครงสร้างชั้นนอกของกรดนิวคลีอิคและไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ในบางปฏิกริยาจะมีการจับออกซิเจนไว้ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ในสภาวะไร้อากาศจึงไม่สามารถเจริญได้ (Salminen และWright, 1993)

สารประเภทกรดเปอร์อะซิตริกสามารถทำลาย proteins หรือ nucleic acid ที่อาจมีการสะสมที่พื้นผิวของอุปกรณ์ได้ (Kitis, 2004; Maillardและคณะ, 1994และ McDonnell, 2007) จึงมีการนำสารทำความสะอาดประเภท peracetic acid และ aectic acid or PPA มาใช้การทำความสะอาดในอุตสาหกรรม dairy อย่างมาก ข้อเสียของสารทำความสะอาดประเภทนี้คือมีฤทธิ์การกัดกร่อนโลหะและstainless steel สูง (Gaulinและคณะ, 2011)ซึ่งอาจอาจกัดกร่อนผิวหนังของผู้ใช้ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการเจือจางก่อนการนำมาใช้ โดยผลของการเจือจางไม่ส่งต่อประสิทธิภาพของการทำงานและปลอดภัย ไม่ทิ้งสารตกค้างไว้ สามารถทำลายเชื้อ phage ได้เร็ว แต่ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของการใช้งาน คือสารออกฤทธิ์ทางเคมีนั้นมีผลตามอุณหภูมิที่เปลี่ยน ค่า pH ความกระด้างของน้ำ และสารตกค้างจากการผลิตประเภทสารอินทรีย์อาจลดประสิทธิภาพของสารทำความสะอาดได้ (Cords และคณะ, 2001)

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของสารทำความสะอาดประเภท Hydrogen peroxide และPeroxyacetic Acid โดยทั่วไปแล้วการเลือกสารทำความสะอาดที่มีความเหมาะสมและเพียงพอต่อการทำความสะอาดนั้นมีเกณฑ์ในการเลือกดังต่อไปนี้ (Gaulinและคณะ, 2011) มีความคงตัวราคาไม่แพงไม่ก่อพิษก่อผู้ใช้ ไม่ทิ้งสารตกค้างทนทานต่อน้ำกระด้างได้เป็นอย่างดีในอุตสาหกรรม dairy product ได้มีการแนะนำให้นำสารทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
148026

ความสะอาดทั้ง 8 ชนิดได้แก่ oxidizing, halogenated, alcohol, quaternary ammonium, anionic acids, iodine-base acid, amphoteric และ นำล้างจากการทำความสะอาดปกติ (Mercantiและคณะ, 2012)มาใช้เพื่อลดปริมาณ phage Lactococciที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมได้จำนวน 2 log ภายในเวลา 2 นาที ที่ระดับต่ำของสารทำความสะอาดมีสามารถในการทำลายเชื้อถึงระดับไบโอฟิล์มเนื่องจากไบโอฟิล์มมีเป็นแหล่งแพร่ของเซลล์จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับพื้นผิวและล้อมรอบในเมทริกซ์ของวัสดุ polysaccharideเป็นหลัก (Costertonและคณะ, 1995; Iturriagaและคณะ, 2007) นอกจากประสิทธิภาพการทำลายจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์ การไม่แตกตัวของกรดอินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับค่า pH และอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมด้วย โดยกรดอินทรีย์จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้น เมื่อสิ่งแวดล้อม มีค่า pH ต่ำลง และอุณหภูมิสูงขึ้น เพราะทำให้ปริมาณกรดที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้น เช่น กรดอะซิติกมีเปอร์เซ็นต์กรดที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้นจาก 0.54 เป็น 84.50 เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่า pH ลดลงจาก 7 เป็น 4 จากการรายงานของ Bell และKyriakides (2002) พบว่าประสิทธิภาพของน้ำส้มสายชู (กรดอะซิติก 2.5 เปอร์เซ็นต์) ในการทำลาย *E.coil*ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจาก 10 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ไบโอฟิล์มมีทนต่อความการทำลายในสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (Frank และKoffi, 1990; Iturriagaและคณะ, 2007) เนื่องจากไบโอฟิล์มของเชื้อมีไว้เพื่อให้การป้องกันสาร sanitizers เป็นอย่างดี (Kumar, 2011; Norwood และGilmour, 2000; Frank และคณะ, 2003; Ryuและ Beuchat, 2005; Kim และคณะ, 2008)ซึ่งปัจจัยที่มีผลกับการแนบติดของไบโอฟิล์มก่อตัวจากจุลินทรีย์ เช่น ความพร้อมสารอาหารและอุณหภูมิของการก่อตัวสภาพแวดล้อม (Kim และคณะ, 2008)นอกจากนี้การเหลือรอดของเชื้อที่ผ่านการผึ่งแห้ง เพิ่มขึ้นเกิดจากปัจจัยเกลืออินทรียวัตถุและเพิ่มระดับ RH ระดับร่วมด้วยเช่นกัน (Vogel และคณะ, 2010)

กลไกการยังยั้งจุลินทรีย์ผลของกรดเปอร์อะซิติกต่อจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ ซึ่งปฏิกิริยาทั่วไปในการทำงานและการแตกตัวของกรดเปอร์อะซิติกดังสมการ (Davidson และคณะ 2005)

$$CH_3COOOH + H_2O \longrightarrow CH_3COOH + H_2O_2 \text{ (Hydrolysis)}$$

$$CH_3COOOH \longrightarrow CH_3COOH + \tfrac{1}{2}\, O_2$$

$$H_2O_2 + e^- + 2 \longrightarrow H_2O_2 + OH^-$$

กรดเปอร์อะซิติกจัดเป็นสารเคมีอันเกิดจากการรวมตัวกันของกรดอ่อน อะซีติกและไฮโดรเจนออกไซด์ รวมตัวกันได้เป็นกรดเปอร์อะซิติกและน้ำ จัดเป็นสารละลายเมื่อละลายน้ำแล้วแตกตัวให้กรดอ่อนหรือกรดอินทรีย์ ดังนั้นกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยกรดอ่อนหรือกรดอินทรีย์ โดยการเข้าทำลายเซลล์ จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ในรูปของกรดที่ไม่แตกตัวเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งสามารถละลายในไขมัน (Lipophilic layer) ในชั้นผนังเซลล์ของ แล้วเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์ได้ในขณะที่กรดในรูปที่แตกตัวไม่สามารถผ่านไปได้ กรดที่ไม่แตกตัวนี้จะเกิดการแตกตัวภายในเซลล์จุลินทรีย์ทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ลดลง ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ โปรตีน รวมทั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดปกติ จึงทำให้เซลล์ถูกทำลาย (Garbutt, 1997) ส่งผลให้โปรตีนสลายตัว เสียสภาพ ขัดขวางการขนส่งของเซลล์ ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นกระบวนการเมทบอลิซึมของเซลล์และรบกวนการผ่านเข้าออกที่เยื่อหุ้มเซลล์

ผลของกรดเปอร์อะซิติกต่อเชื้อจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากค่า pH ของอาหารต่ำ และสามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายแบคทีเรียได้มากกว่ายีสต์และเชื้อรา ยับยั้งเชื้อ *Bacillus* spp. และแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) เชื้อ *Clostridium*และแบคทีเรียแกรมบวก กรดอะซิติกสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ได้โดยการแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้โปรตีนที่ผนังเซลล์เกิดการแปรสภาพหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีการตั้งสมมุติฐานว่า กรดไปรบกวนการสร้าง ATP โดยไปลดระบบการขนถ่ายอิเลคตรอน หรือยับยั้งการขนถ่ายเมแทบอไลท์ไปยังเซลล์ นอกจากนี้พบว่าประสิทธิภาพในการแทรกซึมของกรดอะซิติกสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าอยู่ในสภาพเป็นกรดที่ไม่แตกตัวจะจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เป็นผลให้สามารถละลายไขมันได้ดีมาก ความสามารถของกรดอะซิติกในการยับยั้งจุลินทรีย์นั้นเปลี่ยนแปลงตามผลิตภัณฑ์อาหาร สิ่งแวดล้อม และชนิดของจุลินทรีย์ (ศิวาพร, 2535)

การนำกรดเปอร์อะซิติกนำมาใช้งาน (สุมณฑา, 2547) ในปี ค.ศ. 1986 USFDA ได้ปรับปรุงกฎหมายว่าด้วยวัตถุเจือปน รวมทั้งให้การรับรองว่า กรดเปอร์อะซิติกมีความปลอดภัยที่จะนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อที่สามารถนำไปใช้กับสิ่งสัมผัสอาหารโดยตรงโดยไม่ต้องล้างออกด้วยน้ำบริโภคเป็นน้ำสุดท้าย กรดเปอร์อะซิติกมักใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ โรงงานทำผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้เพราะสลายตัวได้ตามธรรมชาติโดยแตกตัว เป็นอะซิติก (acetic) และเปอร์ออกไซด์ (peroxide) จากนั้นจะกลายตัวได้เป็นน้ำและออกซิเจน ส่วนปริมาณกรดอะซิติกเพียงเล็กน้อยบางครั้งไม่จำเป็นต้องล้างออก ดังนั้นจึงใช้ได้กับอาหารโดยตรง รวมทั้งใช้ทำความสะอาดพื้นผิวต่างๆที่สัมผัสอาหาร ใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาทำความสะอาดและน้ำยาฆ่าเชื้อ ระบบภายในท่อ cleaning in place (CIP) ซึ่งมีการศึกษาโดยนำกรดเปอร์อะซิติกฆ่าเชื้อเครื่องบรรจุและหัวบรรจุ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนหลังการพาสเจอร์ไรส์ พบว่า สามารถยืดอายุนมพาสเจอร์ไรซ์จาก 9 วันเป็น 33.9 วัน (Gruetzmacherและคณะ,1999) ปัจจุบันได้นำมาใช้ทดแทน กัลป์เทอร์รัลดีไฮด์(glutaraldehyde) ในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทางการแพทย์ที่ไวต่อความร้อน ได้มีผลิตภัณฑ์ในรูปโออินท์เมนท์(ointment) และโลชั่นที่ความเข้มข้น 0.05-0.10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดไบโอฟิล์ม (biofilm)นอกจากนี้ยังใช้ในการฆ่าเชื้อห้องต่างๆและในของเสียก่อนลงน้ำ รวมทั้งยังมีส่วนผสมระหว่างกรดเปอร์อะซิติกกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอลกอฮอล์ ใช้เป็นยาระงับเชื้อโรคบนผิวหนังและสามารถทำลายคราบไขมันและคาร์โบไฮเดรต กรดเปอร์อะซิติกในรูปแก๊สไม่เป็นที่นิยมเท่ากัลป์ชนิดเหลว เพราะควบคุมได้ยากกว่าแต่มีประสิทธิภาพดีกว่า มักใช้ในการรมควันในพื้นที่ปิด ฆ่าเชื้อในอาหารและอุปกรณ์ทางการแพทย์รวมถึงการทำพลาสมา (plasma) ปลอดเชื้อ อีกทั้งยังใช้ล้างขวด บรรจุภัณฑ์พลาสติกต่างๆ ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มต่างๆ (Orth, 1998)

ความเป็นพิษของกรดเปอร์อะซิติก(Davidson และคณะ, 2005) กรดเปอร์อะซิติกเป็นของเหลวที่ไม่มีสี มีกลิ่นฉุนแสบจมูก การทดสอบกรดเปอร์อะซิติกกับสัตว์ทดลองไม่พบความเป็นพิษที่รุนแรงและไม่ก่อมะเร็งที่ระดับความเข้มข้นสูง ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 0.30 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์กัดกร่อนและมีกลิ่นฉุนแสบระคายเคืองต่อตา เยื่อบุต่างๆและระบบทางเดินหายใจ ถ้าได้สัมผัสโดยตรงอาจทำให้คลื่นไส้ อาเจียนได้ จะมีผลเสียต่อตาเนื่องจากสลายตัวให้ออกซิเจน ดังนั้นต้องเก็บในภาชนะบรรจุที่ทนและแข็งแรงเพราะอาจระเบิดได้และต้องระวังไม่ให้สัมผัสพลาสติก ทองแดง และอลูมิเนียม

2.5 ขั้นตอนการทำความสะอาด (Michigan State University และ Global Food Safety Initiative licensed using Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported (CC-BY-SA), 2012)

ขั้นตอนการทำความสะอาดโดยทั่วไปมี 4 ขั้นตอน ได้แก่

- การทำความสะอาดเบื้องต้น(Prewash)ก่อนใช้สารทำความสะอาดต้องกำจัดสิ่งสกปรกหยาบออก อาจใช้แรงกระทำ (Mechanical action) เช่น การถู หรือการใช้แรงดันน้ำสูงๆ เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนให้หลุดออกจากผิวหน้าเครื่องมือ ไม่ควรใช้น้ำร้อนหรือไอน้ำทำให้ล้างยากขึ้น

- การล้างโดยใช้สารทำความสะอาด (Washing)ใช้การล้างด้วยมือ ได้แก่ ปั๊ม วาล์ว ข้อต่อ ถังรับนมผง ถังรับส่วนผสมที่เป็นผงท่อเดินนมผงที่สามารถล้างออกได้ สายพาน เครื่องบรรจุนมผง หัวบรรจุ ใช้อุปกรณ์ช่วยล้างที่เหมาะสม เช่น แปรงขนอ่อนเป็นต้น

- การชะล้าง (Rinsing) เป็นการกำจัดสารสารทำความสะอาดที่หลงเหลือออกด้วยน้ำสะอาดผ่านการฆ่าเชื้อ

การฆ่าเชื้อ (Sanitization) กระบวนการที่ใช้ความร้อนหรือความเข้มข้นของสารเคมีที่สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค บนอุปกรณ์และเครื่องมือที่ผ่านการทำความสะอาดแล้ว สามารถใช้กับสารเคมีที่มีความเข้มข้นเหมาะสมและไม่เป็นอันตรายกับผู้ปฏิบัติงานได้ ในทางกลับกันหากพื้นผิวยังไม่สะอาดจะทำความสะอาดและฆ่าเชื้อไม่มีประสิทธิภาพเช่นกัน

การประเมินความสะอาดของอุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ(สุวิมล, 2543) จะใช้วิธีการ Swab Test พื้นที่ผิวอย่างน้อง 50 ตารางเซนติเมตร เพื่อทดสอบหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิว ปริมาณมาตรฐานของเชื้อที่เหลือรอดอยู่หลังจากการฆ่าเชื้อหรือทำความสะอาด จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิต แสดงดังตามตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณมาตรฐานของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการตรวจสอบการSwab Test เครื่องมือ/อุปกรณ์ คือ TPC, Yeast&Mold, ส่วนการประเมินความสะอาดของมือพนังงาน ตรวจสอบเชื้อ TPC, *S.aureus*แสดงดังตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ปริมาณมาตรฐานของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด(TPC) บนพื้นผิวสัมผัสอาหาร

จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC)	ระดับความสะอาด
1 CFU/ตารางเซนติเมตร	ดีมาก
2-10 CFU/ตารางเซนติเมตร	ดี
11-100 CFU/ตารางเซนติเมตร	ใช้ไม่ได้ (ควรทำความสะอาดและฆ่าเชื้อใหม่)
101-1000 CFU/ตารางเซนติเมตร	ใช้ไม่ได้อย่างยิ่ง

ที่มา : IFT Food Service Division อ้างโดย สุวิมล (2543)

ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณเชื้อเป้าหมายที่ยังเหลืออยู่บนพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารหลังการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อ

ประเภทของโรงงาน	ระดับ/เป้าหมาย	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด
โรงงานอาหารกระป๋อง	ดีมาก	น้อยกว่า 540/100 ตร.ซม.
	ดี	540-2700/100 ตร.ซม.
	ใช้ไม่ได้	มากกว่า 2700/100 ตร.ซม.
โรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม	เป้าหมาย	น้อยกว่า 100/100 ตร.ซม.
โรงงานเนื้อสัตว์	เป้าหมาย	น้อยกว่า 800/100 ตร.ซม.
อุตสาหกรรมการบริการพื้นผิวสัมผัส (Food Service Industry)	เป้าหมาย	น้อยกว่า 1000/100 ตร.ซม.

ที่มา : Griffith และ Dillon (1999) อ้างโดย สุวิมล (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 วิธีการล้างทำความสะอาดสามารถทำได้หลายแบบได้แก่ (Michigan State University และ Global Food Safety Initiative licensed using Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 (CC-BY-SA), 2012)

การแช่โดยจุ่มในสารละลายทำความสะอาด หรือจุ่มเครื่องมือ ข้อต่อที่สามารถถอดออกได้ในสารละลายทำความสะอาด เป็นเวลา 15-30 นาที ก่อนการขัดด้วยมือ

การพ่นฝอย (Spray) โดยพ่นฝอยสารละลายทำความสะอาดบนพื้นผิว ซึ่งวิธีนี้อาจใช้เครื่องมือชนิดเครื่องมือชนิดเคลื่อนที่ได้ หรือชนิดติดตั้งอยู่กับที่ได้

การล้างแบบ CIP (Clean in place) เป็นระบบการทำความสะอาดแบบอัตโนมัตินิยมใช้ร่วมกับระบบท่อที่มีการเชื่อมต่ออย่างถาวร อาศัยการไหลของเหลวแบบปั่นป่วน (turbulence) ในท่อเป็นปัจจัยสำคัญในการกำจัดสิ่งสกปรก

การล้างแบบ COP (Cleaning out of place)เป็นการถอดเครื่องจักรและอุปกรณ์ออกเป็นชิ้นส่วนแล้วนำมาล้างด้วยสารทำความสะอาด โดยการขัดถูด้วยแปรง หรือดูดผงนมและฝุ่นละอองออกจากพื้นผิวให้หมดทั้งหมดภายในและภายนอกถอดอุปกรณ์ชิ้นส่วนของเครื่องจักรออกมาเพื่อล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในสารฆ่าเชื้อตามอัตราส่วนผสมที่ต้องการ วิธีนี้ใช้สำหรับการล้างเครื่องจักรและอุปกรณ์ที่สามารถถอดล้างได้ เช่น ท่อที่มีความยาวไม่มากนัก ข้อต่อ และวาล์ว การล้างวิธีนี้ทำให้ประหยัดเวลาและแรงงาน แต่ต้องมีอุปกรณ์เสริมคือ อ่างสแตนเลสและปั๊ม จากนั้นเช็ดฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70%เช็ดทำความสะอาดตามเครื่องจักร และใช้ผ้าชุบแอลกอฮอล์เช็ดพื้นผิวที่ทำความสะอาดให้ทั่วบริเวณอัตราส่วนผสมที่ต้องการตามเพื่อใช้ชำระสารเคมี และผึ่งให้แห้ง ข้อควรระวังคือ การปนเปื้อนระหว่างการขนย้ายเครื่องมือทั้งก่อนและหลังทำความสะอาด

การใช้โฟม (Foaming) การใช้ประโยชน์จากการผสมสารลดแรงตึงผิวเข้มข้นร่วมกับสารทำความสะอาดกรดหรือเบสความเข้มข้นสูง โฟมจะเกาะติดกับพื้นผิวที่ต้องการทำความสะอาด เมื่อเพิ่มระยะเวลาสัมผัสของของเหลวกับสิ่งสกปรกช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำความสะอาดได้

การใช้เจล (Gelling) เป็นการใช้สารละลายเจลชนิดผงความเข้มข้นสูงชนิดกรดหรือเบสในน้ำร้อนจะทำให้เจลที่มีความหนืด พ่นฝอยเจลสารทำความสะอาดบนพื้นผิวที่ต้องการทำความสะอาด เกิดฟิล์มบางของเจลของสารทำความสะอาดบนพื้นผิว ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที หรือนานกว่านั้น เพื่อขจัดสิ่งสกปรกออกใช้น้ำอุ่นที่มีแรงดันชะล้างสิ่งสกปรกและเจลออก

การขัดด้วยสารทำความสะอาดชนิดผงหรือเพส (paste) ใช้กำจัดสิ่งสกปรกติดแน่นที่ออกได้ยาก ต้องล้างให้หมดและต้องระวังไม่ให้เกิดรอยขีดข่วนบนพื้นผิวสแตนเลส ไม่ควรใช้แผ่นขัด (Scouring pads) กับพื้นผิวสัมผัสอาหารเนื่องจากชิ้นส่วนเล็กๆจากการขัด จะทำให้พื้นผิวสึกกร่อนหรือตกค้างในอาหารได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ประเภทสิ่งสกปรกหรือสิ่งตกค้าง(Michigan State University และ Global Food Safety Initiative licensed using Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 (CC-BY-SA), 2012) เช่น เศษอาหาร ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องจักรอุปกรณ์แปรรูปอาหาร ซึ่งจะต้องทำความสะอาดกำจัดสิ่งสกปรกเศษอาหารฝุ่นคราบไขมันหรือสิ่งแปลกปลอมต่างๆที่ไม่ต้องการหลุดออกไป การทราบถึงประเภทสิ่งสกปรกในพื้นที่ทำงานแต่ละส่วนเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณาก่อนการเลือกผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อได้อย่างเหมาะสมและคุ้มค่ากับประโยชน์สูงสุดในการทดความสะอาด ประเภทสิ่งสกปรกแบ่งตามการละลายออกเป็น 4 ชนิดได้แก่

ชนิดที่ละลายได้ในน้ำสิ่งสกปรกประเภทที่มีส่วนประกอบเกลือโซเดียมคลอไรด์สารคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเล็กเช่น น้ำตาล แป้งบางชนิด

ชนิดที่ละลายในเบสหรือด่างสิ่งสกปรกประเภทที่มีส่วนประกอบโปรตีนแป้งที่จับกับโปรตีนหรือไขมันฟิล์มแบคทีเรีย (ไบโอฟิล์ม)

ชนิดละลายในกรดสิ่งสกปรกประเภทเกลือของน้ำกระด้าง (เกลือแคลเซียมและแมกนีเซียม) ฟิล์มเกลือแร่ชนิดซับซ้อนรวมทั้งตะกรันของเหล็กและแมงกานีสจะละลายได้ดีในสารฆ่าเชื้อชนิดกรด

ชนิดละลายในสารลดแรงตึงผิว (Surfactants) สิ่งสกปรกประเภทไขมันน้ำมันและคราบไขมันเศษอาหารหลายชนิดสิ่งสกปรกอื่นๆเช่นกรวดหินดินเหนียวผงโลหะและไบโอฟิล์มบางชนิด

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหาจุลินทรีย์ที่เหลือรอดจากสารฆ่าเชื้อ (Neutralizer)

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535เรื่อง หลักเกณฑ์การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งไม่มีมีรูพรุนของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคชนิดของเหลวลงวันที่ 20 มีนาคม พ.ศ.2546 ได้กำหนดให้ทดสอบตามวิธีมาตรฐานใน AOAC Official Methods of The Association of Analytical Chemists (1990) หัวข้อ Disinfectants มี 2 วิธีคือวิธีความสามารถในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์สามารถวัดได้ โดยอาศัย phenol เป็นสารมาตรฐานในการเทียบการฆ่าเชื้อ (Phenol Coefficient)และวิธีการเจือจาง(Use-Dilution Method)โดยการหาค่า phenol coefficientผลิตภัณฑ์ที่ฆ่าเชื้อได้ ต้องมีค่า phenol coefficientเท่ากับหรือมากกว่า 0.05และวิธีการเจือจางพิจารณาจากความเข้มข้นที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ จะต้องฆ่าเชื้อได้ทั้ง 10 carriersในเวลา 10 นาที

ดังนั้นเพื่อให้วิธีการทดสอบและเกณฑ์การตัดสินเกี่ยวกับผลการทดสอบประสิทธิภาพ ตามที่ระบุให้แจ้งในรายการข้อมูลเพื่อการขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายเป็นบรรทัดฐานเดียวกันในผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันในขั้นตอนของการแปลการทดสอบกับผลผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคให้ได้ผลอย่างมีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นจะต้องให้สารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคที่มีสภาพเป็นกลาง (neutralizer) มีส่วนผสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายชนิดเพื่อช่วยให้สารออกฤทธิ์เป็นกลาง และในขณะเดียวกันช่วยในการเจริญเติบโต ฟื้นฟูเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่บาดเจ็บให้แสดงการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้

ในการทดสอบด้วยการเจือจาง การทำให้สารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคมีสภาพเป็นกลาง (neutralizer) เป็นสิ่งสำคัญ เป็นการควบคุมคุณภาพของผลทดสอบให้ได้ผลที่ถูกต้องซึ่งทำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมีทำให้เป็นกลาง (chemical neutralization) การทำให้เจือจาง การกรอง เป็นต้น สำหรับการใช้สารเคมีทำให้เป็นกลาง (chemical neutralization)มีความหลากหลายตามผู้ผลิตผงสำเร็จรูปพร้อมให้งานเช่น Dey/Engley broth (D/E), Letheen broth(LB), Neutralizing buffer, Trypton Azolectin Tween broth base (TAT) จึงต้องเลือกนำมาใช้ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ที่ใช้งาน ควรเลือก neutralizer ที่มีส่วนผสม(formula)ของสารที่สามารถออกฤทธิ์เป็นกลางได้หลายชนิด เช่น หากมีส่วนประกอบ เลซิติน ทำให้สารออกฤทธิ์ในกลุ่ม quaternary ammonium compound เป็นกลาง ขณะที่ Tween ทำให้สาร phenolic disinfectantsและ hexachlorophene เป็นกลาง เมื่อเลซิติน (lecithin)อยู่กับ Tween ช่วยทำให้เอทานอล (ethanol)เป็นกลางส่วนโซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) ช่วยทำให้ไอโอดีนและคลอรีนเป็นกลาง และโซเดียมไบซัลไฟท์ (sodium bisulfite)ทำให้สารในกลุ่ม aldehydes เป็นกลางด้านการฟื้นฟูซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลายควรมียีสต์ extractหรือ beef extractเป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอน วิตามิน และแร่ธาตุ เพื่อจุลินทรีย์นำมาเป็นแหล่งอาหารใช้ในการฟื้นฟูเซลล์จากการถูกทำลายโซเดียมคลอไรด์ ช่วยเรื่องสมดุลออโมซิสของเซลล์ ส่วนน้ำตาล เช่น น้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose) ช่วยเกี่ยวกับการสร้างพลังงาน ATP นอกจากนี้โซเดียมไทโอกลีโคเลท (Sodium Thioglycolate) จำกัดพิษสารฆ่าเชื้อประเภทปรอทโซเดียมไทโอซัลเฟต (Sodium Thiosulfate) จำกัดพิษสารฆ่าเชื้อประเภทไอโอดีนคลอรีนโซเดียมบีทซัลไฟต์ (Sodium Bisulfite) จำกัดพิษสารฆ่าเชื้อประเภทฟอร์มัลดีไฮด์(formaldehyde) และกลูเตอร์ดีไฮด์ (glutaraldehyde)เลซิติน จำกัดพิษสารฆ่าเชื้อประเภทคลอเทอร์นารีแอมโมเนีย (quaternary ammonium compounds) โพลีซอร์เบท 80(Polysorbate 80)จำกัดพิษสารฆ่าเชื้อประเภทฟีนอล (phenols) เฮกซคลอโรฟีน (hexachlorophene)และฟอร์มารีน(formalin)เลซิติน(Lecithin) จำกัดพิษสารฆ่าเชื้อประเภทเอทานอล บอเมอร์คลีซอล เพอเพิล (Bromcresol Purple) เป็นอินดิเคเตอร์สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเกิดจากการหมักน้ำตาลเดกซ์โทสของจุลินทรีย์ (Dey and Engley, 1995)

จากการศึกษาSutton และคณะ (2002) พบว่า Dey/Engley neutralizing broth (D/E) มีคุณสมบัติเป็น neutralizer ที่ดีมีส่วนผสมหลายชนิดเพื่อช่วยทำให้สารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคเป็นกลางและในขณะเดียวกันช่วยในการเติบโตของจุลินทรีย์

สิรินันท์ และคณะ (2553) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคจำนวน 17 ตัวอย่างด้วยวิธีเจือจาง (Use-Dilution method)ที่ใช้ LB เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและให้ผลลบปลอมกับเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตรฐานจำนวน 17 ตัวอย่างแต่เมื่อใช้ D/E+2×LB แทน LB พบว่าสามารถทำให้สารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคเป็นกลาง 14ตัวอย่างจาก 17 ตัวอย่าง (ร้อยละ 82.4) และให้ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคถูกต้องเพิ่มขึ้นอีก 2ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 1 และ 14) จาก 17 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 94.1 ประกอบกับการใช้ D/E+2×LBเมื่ออ่านผลทดสอบเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีชัดเจนแปลผลการทดสอบได้ง่ายให้ผลทดสอบถูกต้องสะดวกและรวดเร็วตลอดจนมีขั้นตอนในการเตรียมที่ง่ายดังนั้นในกรณีที่ทดสอบผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคด้วยวิธีการเจือจางและพบว่าเป็นผลลบซึ่งอาจเกิดจากการที่ LB ไม่สามารถทำให้สารออกฤทธิ์ในผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคเป็นกลางให้ยืนยันผลการทดสอบโดยใช้ D/E+2×LB เพื่อให้ผลการทดสอบถูกต้องขึ้น

จากคุณสมบัติของ D/Eดังกล่าวทางผู้วิจัยจึงโดยนำ D/Eมาใช้เนื่องจากช่วยลดผลกระทบตกค้างของสารออกฤทธิ์ในสารละลายตัวอย่างผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคที่ตกค้างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบและเพื่อให้สามารถแปลผลการทดสอบได้ถูกต้องอาหารเลี้ยงเชื้อเลี้ยงช่วยปรับเป็นกลางของผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด โดยวิธีการเจือจาง

2.9 จลนพลศาสตร์การอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์

เมื่อใช้คณิตศาสตร์ในการพิจารณาการเพิ่มจำนวน คำนวณได้จากสมการ (คณะอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2538; Bachrouri และคณะ, 2002)ดังนี้

$$N = N_0 e^{\mu t} \qquad \text{.....(1)}$$

เมื่อ N คือ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เวลา t

N_0 คือ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

ใน logalithm ให้สมการเกิดสมดุล

$$\text{Ln}(N) = \text{Ln}(N_0) + \mu \qquad \text{.....(2)}$$

เมื่อ μ คือค่าความชันของ Ln (N) เปรียบเทียบกับเวลา

หากต้องการคำนวณค่าเวลาสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (generation time, t_g)

เมื่อ N= 2 N_0คือมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เป็น 2 เท่า

$$t_g = \frac{\text{In } 2}{\text{slope}} = \frac{0.693}{\mu} \qquad \text{.....(3)}$$

จากข้อมูลของเชื้อจุลนทรีย์ส่วนใหญ่ไม่แสดงเป็น Log CFU/ml แต่แสดงเป็นเลขฐาน 10 Log CFU/ml ซึ่งการกำหนดเป็น Log_{10}ของ CFU/ml กับเวลา สามารถนำมาใช้เป็นสูตรคำนวณได้

$$t_g = \frac{\text{Log}(2)}{\text{slope}} = \frac{0.301}{\mu} \qquad \text{.....(4)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าคงที่อัตราการเจริญ (growth rate, k) จะมีค่าผกผันกับ generation time (t_g)

$$K = \frac{t}{\quad} \qquad \text{.....(5)}$$

จากสมการ 4 และ 5 มีความสัมพันธ์กับค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เวลาสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า (generation time, t_g) และค่าคงที่อัตราการเจริญ (growth rate, k) คือ

$$\mu = \frac{\text{Log}(2)}{t_g} = k \,.\, \text{Log}\,(2) \qquad \text{.....(6)}$$

Bachrouri และคณะ (2002) กล่าวถึง การเจริญและการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ สามารถใช้สมการคณิตศาสตร์ในการคาดเดาได้ ดังนั้นจากสมการการเจริญของเชื้อเป็น exponential growth ดังสมการ 1 สามารถนำมาคำนวณหาสมการการตายของเชื้อโดย

$$N = N_0 e^{ut} \qquad \text{.....(7)}$$

เมื่อ N คือ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เวลา t

N_0 คือ จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

จากสมการ 7 สามารถคำนวณค่าเวลาสำหรับการลดลงของเซลล์เป็น 2 เท่าหรือเวลาการตาย (death time, t_d) ได้จากค่าอัตราการตายจำเพาะ (μ') และอัตราการตาย (death rate, k,) ซึ่งแปรผกผันกับ t_d

$$t_d = \frac{0.301}{\mu'} \qquad \text{.....(8)}$$

$$k = \frac{1}{t_d} \qquad \text{.....(9)}$$

จากสมการดังกล่าวข้างต้นสามารถนำมาศึกษาการอยู่รอดของ *W. cibaria* เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก จากสมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับเวลา จะได้ค่าความชันของกราฟหรือค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และอัตราการตายจำเพาะ (μ') จากนั้นนำมาหาความคำนวณหาค่าเวลาสำหรับการลดลงของเซลล์เป็น 2 เท่า (t_g) และเวลาการตาย (t_d) รวมถึงค่าคงที่อัตราการเจริญ (k) และอัตราการตาย (k')

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Barnesและคณะ (1999) ทดสอบการใช้ alcohol ควบคู่กับสารทำความสะอาดประเภทต่างๆเช่นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิตริกสามารถลดเชื้อลงได้ 1.91 ถึง 4.77 log การอยู่รอดของเชื้อโรคที่ปนเปื้อนพื้นผิวของพื้นผิวการแปรรูปอาหาร เช่นสแตนเลส เหล็กแตกต่างกันขึ้นอยู่กับรูปแบบไบโอฟิล์ม ความชื้นสัมพัทธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(RH)และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง นอกจากนี้ alcohol-based sanitizersสามารถใช้เป็นเพิ่มที่มีศักยภาพ การทำงาน ลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวของเครื่องใช้อุปกรณ์การทำอาหารและอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องพื้นผิวได้อีกทาง

HilgrenและSalverda (2000)ได้รายงานสารทำความสะอาดที่ผสมสารออกฤทธิ์ประเภทperacetic acid และ aectic acid or PPA Oxi-D สามารถทำลายได้ทั้ง phage CB13 และP1532 ในผักที่ผ่านการหั่นได้ การจุ่มผักกาดแก้วในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวน *E.coil*ได้ (2.8 log cfu/g) มากกว่าการจุ่มผักที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส(1.8 log cfu/g) ที่ระยะเวลาการแช่ผักที่เท่ากัน

บริษัท Ecolab (2002) ผู้ผลิตและจำหน่ายกรดเปอร์อะซิติกเข้มข้น ได้ทำการทดลอบ Oxonia Active ซึ่งให้สารฆ่าเชื้อออกฤทธิ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และกรดเปอร์อะซิติก (Peracetic acid) กับเชื้อ *E. coli* ATCC 11229 และ *S. aureus* ATCC 6538 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 20 วินาที และหยุดปฏิกิริยากรดด้วยสารต่อต้าน (Neutralizer) 0.1% sodium thiosulfate 9 ml ผลการทดสอบสารทำความฆ่าเชื้อ Oxonia Active สามารถลดเชื้อทั้งสองได้ percent reduction > 99.999

Badoni และคณะ (2003) ได้ศึกษาการใช้กรดอะซิตริกในการลดเชื้อบนเนื้อสัตว์ พบว่ากรดอะซิตริก 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดเชื้อ *E.coil*ได้ 3.04 log cfu/cm^{2}และสามารถลดเชื้อ Salmonella ได้ 3.23 log cfu/cm^2

Baeและคณะ (2011) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมี sanitizers ในการยับยั้งการประเภทต่างๆ ของไบโอฟิล์มของเชื้อ *E. coli* O157: H7 และ *S. aureus* บนพื้นผิวของสแตนเลสภายใต้สภาวะความชื้นสัมพัทธ์ (RH) ที่มีต่างกัน RH 23, 43, 68, 85และ 100% ปริมาณเชื้อ*E. coli* O157: H7 และ *S. aureus* บนพื้นผิวของสแตนเลสก็ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังจากการเก็บรักษาที่ RH 23, 43, 68 และ85% ยกเว้นที่ 100% จึงได้ทำการทดสอบเชื้อลักษณะไบโอฟิล์มการใช้ alcohol ควบคู่กับสารทำความสะอาดสามารถลดเชื้อลงได้ 1.91 ถึง 4.77 log CFU/coupon, *E. coli* O157:H7ลดเชื้อลง 4.35 ถึง 5.35 log CFU/couponดังนั้นสารที่ใช้ในการทำความสะอาดจึงต้องมีประสิทธิภาพมากในการยับยั้งเชื้อโรคที่ติดอยู่หรือในลักษณะไบโอฟิล์มบนพื้นผิวของสแตนเลสด้วยการเหลือรอดของเชื้อโรคที่ปนเปื้อนพื้นผิวของพื้นผิวการแปรรูปอาหาร เช่นสแตนเลส เหล็กแตกต่างกันขึ้นอยู่กับรูปแบบ ความชื้นสัมRH และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง alcohol-based sanitizers สามารถใช้เป็นเพิ่มที่มีศักยภาพ การทำงาน วิธีการที่จะเอาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวของเครื่องใช้อุปกรณ์ทำอาหารและอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องพื้นผิว

Cristina และคณะ (2011) ได้ทดสอบ *L. monocytogenes* ในไบโอฟิล์มกับสารทำความสะอาดและฆ่าเชื้อประเภทกรดเปอร์อะซิตริก (peroxyacetic), คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) และโซเดียมพบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารฆ่าเชื้อดังกล่าวสามารถลดปริมาณเชื้อ 5 logCFU/gจากเชื้อเริ่มต้น 10logCFU/g ตามความเข้มข้นของการแนะนำของผู้ผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 นมผงสูตรเด็กเล็ก	Infant milk powder, Thaliand

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 ตู้บ่มเชื้อ(Incubator) 30 องศาเซลเซียส	Memmert, Thailand
3.2.2 ตู้บ่มเชื้อ(Incubator) 37 องศาเซลเซียส	Memmert, Thailand
3.2.3 เครื่องวัดพีเอช(pH Meter)	Seven easy, Mettle, Germany
3.2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Vortex mixer)	G650E, Scientific, USA
3.2.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	WNB14, Memmert, Germany
3.2.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Electronic balance)	Mettle Toledo, Germany
3.2.7 เครื่องนับโคโลนี (Colony counter)	Funke Gerber, Germany
3.2.8 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)	ES-315, Tommy, Japan
3.2.9 ชุดทดสอบความเข้มข้นของกรดเปอร์อะซิติก	Ecolab®, USA
3.2.10 ชุดทดสอบชุดทดสอบAPI 20 STREP Test Kit	bioMerieux, France
3.2.12 โถบ่มเพาะเชื้อในสภาพไม่มีออกซิเจน(Anaerobic jar)	Oxoid™, UK
3.2.13 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)	Bosstech, Italy
3.2.14 ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)	Heraeus,Germany
3.2.15 อุปกรณ์และเครื่องแก้วที่จำเป็น	
3.2.16 ก้านสวอปในหลอดฝาเกลียวบรรจุสารละลายPeptone Water 3M™, USA	

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 Trypticase (Tryptic) Soy Broth (TSB)	BD Difco™,USA
3.3.2 Trypticase (Tryptic) Soy Agar (TSA)	BD Difco™,USA
3.3.3 deMan Rogosa Sharpe agar (MRS Agar)	Oxoid™, UK
3.3.4 deMan Rogosa Sharpe Broth(MRS Broth)	Oxoid™, UK
3.3.5 Plate count Agar (PCA)	Oxoid™, UK

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.6 Violet red bile glucose agar (VRBG)	Oxoid™, UK
3.3.7 Baird parker agar (BP)	Oxoid™, UK
3.3.8 Egg yolk + Tellurite	Oxoid™, UK
3.3.9 Cronobacter Sakazakii Isolation Agar (CES)	Oxoid™, UK
3.3.10 Modified Lauryl sulfate tryptose broth (mLST)	Oxoid™, UK
3.3.11 Mannitol egg yolk polymyxin agar (MYP)	Oxoid™, UK
3.3.12 Egg yolk + Polymyxin	Oxoid™, UK
3.3.13 Yeast extract-Glucose-Chloramphenicol agar(YGC)	Oxoid™, UK
3.3.14 Dey/Engleyneutralizing Broth (D/E)	Himedia, India

3.4 สารเคมี

3.4.1 สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทดสอบเทียบ	
ค่าพีเอช 4.017.00 และ 9.21	Merck, Germany
3.4.2 สารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟ ออกฤทธิ์ประเภท	
Hydrogen peroxideและperoxyacetic acid	Ecolab®, USA
3.4.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.25 นอล์มัล	Scharlau®, Spin
3.4.4 Anaerogen	Oxoid™, UK
3.4.5 Anaerobic indicator	Oxoid™, UK
3.4.6 Vancomycin	Oxoid™, UK

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 แหล่งปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

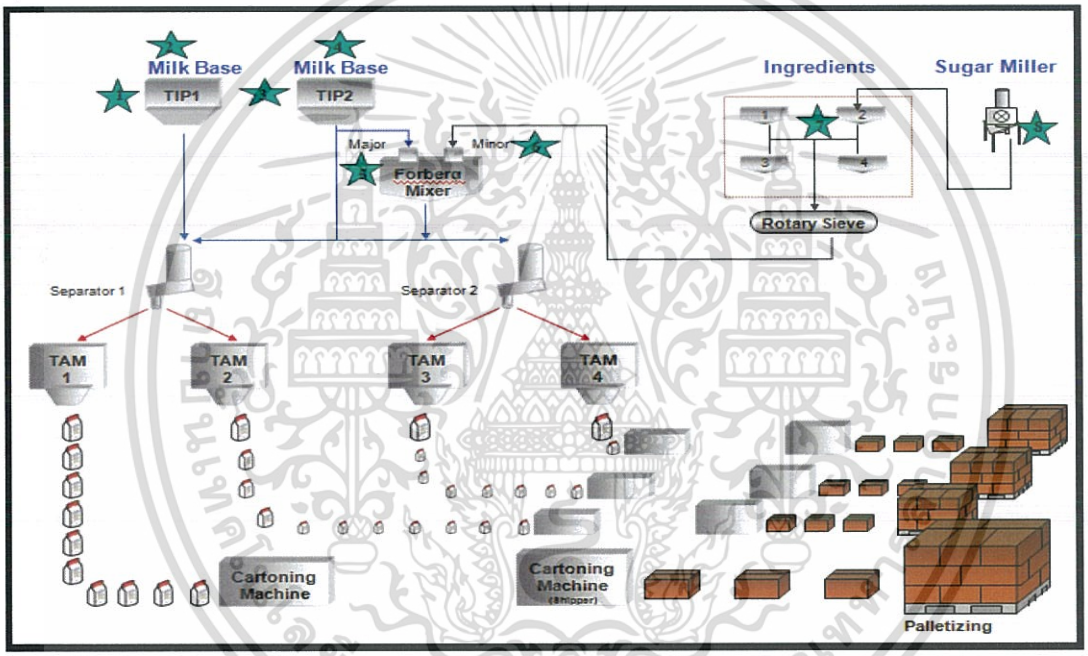
ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์พื้นผิว ณ โรงงานผลิตนมผงที่แห่งหนึ่งในภาคกลาง ขนาดอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ กำลังการผลิต 350 ตันต่อสัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างสวอปบนพื้นผิวของอุปกรณ์และเครื่องจักรก่อนและหลังการทำความสะอาดบริเวณอุปกรณ์และเครื่องจักรที่ใช้ในการผลิต ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ.2560 ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามภาพที่ 3.1 แสดงห้องจุดเก็บตัวอย่างสวอปได้แก่ ห้องเทนม(Tipping) ห้องเทส่วนผสมหลัก(Major Seperator)และส่วนผสมรอง(Minor Seperator) และห้องบดน้ำตาล(Sucrose milling)

3.5.1.1 จุดการเก็บตัวอย่างบนพื้นผิวของบริเวณเครื่องผลิตแต่ละจุด คือ ห้อง Tipping (จุดเก็บตัวอย่างที่ 1-7) ห้อง Minor Seperator (จุดเก็บตัวอย่างที่ 11) ห้อง Major Seperator (จุดเก็บตัวอย่างที่ 8-9) ห้อง Loss in Weight (จุดเก็บตัวอย่างที่ 10, 12-14)และห้อง Sucrose milling (จุดเก็บตัวอย่างที่ 15) ความถี่เก็บตัวอย่าง 3 สัปดาห์ต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้ง ซึ่งมีการควบคุมอุณหภูมิภายในห้อง 21-25 องศาเซลเซียส ความชื้น 40-45 % เก็บตัวอย่างบนพื้นผิวก่อนทำความสะอาด หลังจากดูดฝุ่นผงนมที่ติดอยู่กับอุปกรณ์ออกโดยอุปกรณ์เครื่องจักรในจุดเก็บตัวอย่างที่ 3, 8, 9, 10 และ 14 สามารถถอดออกมาล้างและแช่สารสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟได้เป็นเวลา 15 นาที ส่วนอุปกรณ์เครื่องจักรในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 4, 5, 7, 12, 13 และ 15 นั้นทำความสะอาดโดยใช้ผ้าสะอาด ชุบสารสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย

แอคทีฟเช็ดได้อย่างทั่วถึงได้ ยกเว้นในจุดเก็บตัวอย่างที่ 6 และ 11 ซึ่งเป็นท่อแนวนอนและท่อแนวตั้งตามลำดับ ไม่สามารถทำความสะอาดได้ทั่วถึงเนื่องจากความลึกของท่อ พนักงานใช้ชุบสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟเช็ดบริเวณช่วงต้นของท่อเท่านั้น ซึ่งสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟบริษัท ECOLAB®ที่มีสารออกฤทธิ์ประเภท Hydrogen peroxide และ peroxyacetic acidแสดดังตารางที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการผลิตนมผง

3.5.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่างสวอป

เปิดฝาเกลียวด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ นำก้านสำลีสวอปออกมาโดยใช้มือจับเฉพาะส่วนที่เป็นฝา กดหัวก้านสำลีสวอปกับข้างหลอดให้หมาด นำก้านสวอปมาสวอปบนพื้นผิวที่ต้องการตรวจสอบโดยขณะสวอปทำมุม 30 องสาดีกรีกับพื้นที่ผิวสัมผัส 100 ตารางเซนติเมตร (กว้าง 10 เซนติเมตรยาว 10 เซนติเมตร) จำนวน 3 ทิศทางหมุนก้านขณะสวอป (คล้ายอักษรตัว *N*) เมื่อสวอปครบทั้ง 3 ทิศทาง ให้นำก้านสวอปกลับเข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปในหลอดด้านเทคนิคปราศจากเชื้อ ปิดฝาเกลียวให้สนิท ทำการสวอปครบ 15 จุดตัวอย่างแล้วหลักจากนำตัวอย่างเก็บในภาชนะกันน้ำและส่งทดสอบในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทันทีภายใน 24 ชั่วโมง

3.5.1.3 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ จากข้อ 3.5.1.2 นำวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้คือ

3.5.1.3.1 วิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ใช้ตามวิธีของ ISO 4833-1 (2013) โดยนำหลอดที่มีก้านสำลีสวอปมาปั่นเหวี่ยงและปิเปตสารละลายในหลอดจำนวน 1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้น pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ30±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72±3 ชั่วโมง รายงานผลโดยการนับจำนวนโคโลนีต่อ100ตารางเซนติเมตรยืนยันผลเชื้อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย API 50 CHL Test Kit บริษัท BioMerieux ประเทศฝรั่งเศส

3.5.1.3.2 วิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceaeใช้ตามวิธีของISO21528-1 (2004-1)

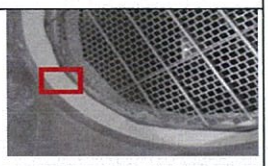
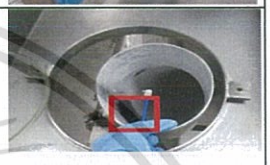
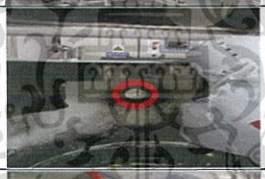
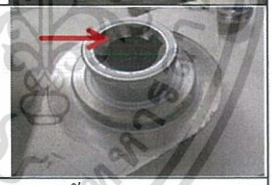
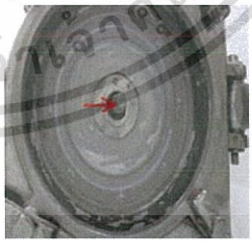
โดยนำหลอดที่มีก้านสำลีสวอปปั่นเหวี่ยงและปิเปตสารละลายในหลอดจำนวน 1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้น pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBG และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48±3 ชั่วโมง รายงานผลโดยการนับจำนวนโคโลนีสีแดงเข้มต่อ100ตารางเซนติเมตร

3.5.1.3.3 วิเคราะห์หาเชื้อ *S.aureus*ใช้ตามวิธีของISO6888-1 (1999)

โดยนำหลอดที่มีก้านสำลีสวอปมาปั่นเหวี่ยงและปิเปตสารละลายในหลอดจำนวน 0.1 มิลลิลิตรลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BP ที่เติม Egg yolk Tellurite จากนั้นใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อ spead plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล โดยให้ตรวจนับโคโลนีที่เป็น typical colonies ที่ปรากฏ และนำไปบ่มต่ออีก 24±2 ชั่วโมง และอ่านผลโดยการนับจำนวน typical colonies ที่ขึ้นใหม่ รวมทั้งนับ Atypical colonies ที่พบใหม่ด้วยนับจำนวนโคโลนีที่เป็น Typical และ Atypical colonies ซึ่งลักษณะโคโลนีของ typical colonies คือลักษณะโคโลนีมีสีดำหรือเทา นูน ขนาดประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง และขนาด1.5-2.5 มิลลิเมตร หลังจากบ่ม 48 ชั่วโมงและมีบริเวณรอบ ๆ โคโลนีใส สำหรับ Atypical colonies จะมีลักษณะโคโลนีสีดำอาจจะมีหรือไม่มีบริเวณรอบๆโคโลนีเป็นขอบขาวและไม่มีบริเวณรอบๆโคโลนีใสหรือมีน้อยมากหรืออาจจะมีลักษณะโคโลนีเป็นสีเทาและไม่มีรอบๆโคโลนีใสทดสอบยืนยัน coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus*) นำโคโลนีไม่ว่าจะเป็น typical หรือ atypical colonies มาอย่างน้อย 5 โคโลนี หรือถ้ามีลักษณะโคโลนีทั้ง 2 ชนิด ก็ให้นำมาอย่างละ 5 โคโลนีใช้ที่เขี่ยเชื้อที่ลนไฟแล้วเขี่ยโคโลนีและนำมาถ่ายใส่หลอดหรือขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ brain-heart infusion broth โดยใช้ 1 โคโลนีต่อ 1 หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24± 2 ชั่วโมง ปิเปตต์ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี 0.3 มิลลิลิตรของ rabbit plasma และนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 4 ถึง 6 ชั่วโมง สังเกตการจับตัวกันเป็นก้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1แสดงจุดที่เก็บตัวอย่าง 15 จุด

จุดที่เก็บตัวอย่าง	ภาพ	จุดที่เก็บตัวอย่าง	ภาพ
จุดที่ 1 ท่อ Dust รับนมส่งนม		จุดที่ 9 Sock connection	
จุดที่ 2 ท่อใหญ่ส่งนม		จุดที่ 10 กรวยเล็กรับนม ถอดจากกันไม่ได้	
จุดที่ 3 ฝาปิดช่องเทนมผง ห้อง Tip station		จุดที่ 11 ท่อส่ง Ingredient	
จุดที่ 4 เก็บตัวอย่างนม Auto Sample		จุดที่ 12 แกนหมุนล่าง ห้องMajor ingredient	
จุดที่ 5 ท่อระบายฝุ่นนม		จุดที่ 13 ท่อ Put Pressure ด้านล่าง	
จุดที่ 6 ท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสม		จุดที่ 14 ข้อต่อเพลาหมุน	
จุดที่ 7 ท่อรูเล็ก Put Pressure ด้านล่างของ Hopper		จุดที่ 15 แกนบดน้ำตาล	
จุดที่ 8 ตะแกรงรับนมห้อง Loss In Weight			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

plasma ถ้าให้ผลเป็นลบให้บ่มต่อ 24 ชั่วโมง หรือบ่มตามเวลาที่ระบุโดยผู้ผลิต โดยถ้าผลเป็นบวกจะต้องเกิดการจับตัวกันเป็นก้อนมากกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาตรทั้งหมดรายงานผลโดยการนับจำนวนโคโลนีในผลบวกต่อ100ตารางเซนติเมตร

3.5.1.3.4 วิเคราะห์หาเชื้อ *C.sakazakii*ใช้ตามวิธีของISO/IS 22964 (2006)

โดยนำหลอดที่มีก้านสำลีสวอปบ่มที่ อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มปิเปต 0.1 มิลลิลิตรลงใน 10 มิลลิลิตร Modified Lauryl sulfate tryptose broth (mLST)เข้าบ่มอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 42±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง สังเกตหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ขุ่น จากนั้นทดสอบต่อไป โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ 1 ลูปstreak เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อCESบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48±2 ชั่วโมงโคโลนี typical colonies ลักษณะสีเขียนเข้มมันวาว รายงานผลโดยการนับจำนวนโคโลนีสีเขียวเข้มคูณอัตราเจือจาง 10 เท่า ต่อ100ตารางเซนติเมตร

3.5.1.3.5 วิเคราะห์หาเชื้อ *B.cereus*ใช้ตามวิธีของISO/IS 7932 (2004)

โดยนำหลอดที่มีก้านสำลีสวอปมาปั่นเหวี่ยงและปิเปตสารละลายในหลอดจำนวน 0.5 มิลลิลิตรลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP ที่เติม Egg Yolk + polymyxin จานจำนวน 2 plates จากนั้นใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อ spead plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำ*B. cereus* มาจำนวน 5 โคโลนีหรือหากเชื้อเจริญน้อยกว่าให้นำโคโลนีทั้งหมดนำมาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sheep Blood agar อ่านผลการเกิด Haemolysis ใน Blood agar เพื่อยืนยัน*B. cereus*(Haemolysis reaction เกิด clear zone บริเวณรอบๆโคโลนีบน Blood agar เรียกβ-haemolysis)รายงานผลโดยการนับจำนวนโคโลนีชมพูอมส้มคูณอัตราเจือจาง 10 เท่า ต่อ100 ตารางเซนติเมตร

3.5.1.3.6 วิเคราะห์หาเชื้อYeasts และ Molds ใช้ตามวิธีของISO 6611 (2004)

โดยนำหลอดที่มีก้านสำลีสวอปมาปั่นเหวี่ยงและปิเปตสารละลายในหลอดจำนวน 1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้น pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YGC และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-5 วัน รายงานผลโดยการนับจำนวนโคโลนี typical colonies คูณอัตราเจือจาง 10 เท่าต่อ100ตารางเซนติเมตร

3.5.2 การแยกและจำแนกชนิดสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

3.5.2.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ typical colonies ของเชื้อ *S.aureus*, Enterobacteriaceae, *C.sakazakii*, *B.cereus*, Yeasts และ Molds นำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์โดยวิธี Streak plate บนอาหาร Trytic soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำไปย้อมสีแกรม และส่องกล้องจุลทรรศน์

3.5.2.2 การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย API 50 CHL Test Kit

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

API®50 CHLคือ แถบพลาสติกประกอบด้วยหลุม หรือช่อง (microtubes) ที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) จำนวน 50ช่อง ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อเติม suspension ของเชื้อลงไปในช่องที่บรรจุสารเคมีเชื้อจะสามารถเจริญและใช้สารเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นเช่น การเปลี่ยนแปลงสี, ความขุ่นหลังจากบ่มเพาะเชื้อและเติม reagent บางชนิดลงไป สำหรับผลที่บันทึกได้จากการทดสอบ จะนำไปแปรผลจาก Analytical Profile index หรือ Identification Software เพื่อทราบชนิดของเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมinoculums เตรียม suspension medium เอง โดยเขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ จากจานอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีอายุ 18-24 ชั่วโมง 1 โคโลนี ใส่ลงใน API Suspension Medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตรเขย่าขวด suspension medium เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน suspension ของเชื้อที่เตรียมขึ้นจะต้องนำไปใช้ทดสอบทันทีหยด inoculums ลง stripใช้ปิเปตดูด suspension (inoculum) ของเชื้อเติมลงในหลุมของ strip หลุมทดสอบให้เต็มหลุมเพื่อให้มีสภาวะ Anaerobe (ดังภาพ) จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 5 มิลลิลิตรลงในหลุมทุกหลุมของถาดล่างเพื่อให้มีความชื้นปิดฝากล่อง สำหรับ incubate แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 36 ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาอ่านผลและแปรผลจาก Stripหลังจาก incubate ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ± 2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24ชั่วโมงแล้ว ถ้ามีสีเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเกิดขึ้นให้บันทึกผลเป็นบวกถ้าสีม่วงให้บันทึกผลเป็นลบจากนั้นใช้ Software ในการแปรผล API 50 CHL V5.2โดยใส่เป็นเครื่องหมาย +, - ในช่องผลทดสอบในโปรแกรมSoftwareเมื่อได้ครบกด confirm จะปรากฏค่าในการแปรผล

3.5.2.3การตรวจวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรียแลคติกโดยวิธี16S rDNA sequence analysis

นำเชื้อที่ทราบผลสายพันธุ์ของเชื้อเบื้องต้นจาก API 20 STREP V8.0 TestKit จากข้อ 3.5.2.2 มาทำการสกัด genomic DNA จากนั้นนำ genomic DNA ที่ได้มาใช้เป็นแม่แบบ (template) เพื่อทำ PCR (polymerase chain reaction) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ลำดับเบสผ่านทางบริษัทที่รับวิเคราะห์ลำดับเบสทางการค้า แล้วนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ของบริษัทไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GENBANK โดยห้องปฏิบัติการ Microbial Technology คณะ Microbial Science and Technology มหาวิทยาลัย Kyushu ประเทศญี่ปุ่น

3.5.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*Weissella* spp. ในหลอดทดลอง

3.5.3.1 การเตรียมสารสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกทำการเจือจางOxonia โดยปิเปตOxonia เข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตรในน้ำDIปราศจากเชื้อ 1000 มิลลิลิตรและกวนหรือคนสารละลายให้ผสมกันดีทั่วถึงวัดพีเอชและความเข้มข้นของกรดเปอร์อะซิติก ด้วยชุดทดสอบวัดความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดอะซิติก (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสารละลาย100, 200, 300 และ400 ppm ตามลำดับ สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่เตรียมไว้ไม่ควรทิ้งไว้นานเกิน 15 นาที

3.5.3.2 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นสำหรับใช้ทดสอบนำเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์จากข้อ 3.5.2 มาเตรียมสารละลายเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าของหลอดอาหาร MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง ภายใต้ไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar เมื่อครบเวลาบ่มใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากหลอดอาหาร MRS Agar ลงในMRS Broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างแบบ 1:10(ten fold dilution) โดยใช้ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างจากMRS Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงใน 90 มิลลิลิตรของTSBเขย่าขวดเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดีจะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจางเป็น 10^{-2} จากนั้นทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม โดยต้องเปลี่ยนปิเปตใหม่ทุกๆ ระดับความเจือจาง ใช้ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 1 หรือ 2 มิลลิลิตรดูดสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเจือจาง มา 2 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ 2 จาน จานละ 1 มิลลิลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่หลอมละลายและอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิประมาณ 45±1 องศาเซลเซียสลงในจานเพาะเชื้อประมาณจานละ 15-20 มิลลิลิตร โดยกำหนดให้ใช้เวลาภายใน 15 นาที ตั้งแต่ขั้นตอนการเตรียมสารละลายตัวอย่างความเจือจางแรกจนถึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ลงในจานเพาะเชื้อหมุนจานเพาะเชื้อไปมาเพื่อให้สารละลายตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อผสมเข้ากันดี ระวังอย่าให้กระฉอกไปติดฝาจานแล้วตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวนำไปบ่มแบบคว่ำจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมงภายใต้ไร้ออกซิเจนใน anaerobic jarเก็บสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเจือจางไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 5±3องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลาการบ่มให้นำจานเพาะเชื้อออกมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกนับจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี/เพลท

3.5.3.3 ผลของความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ*Weissella* spp.

ปิเปตสารละลายเชื้อ *Weissella* spp.เชื้อเริ่มต้น 6 log cfu/ml ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.3.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองน้ำDI ปราศจากเชื้อที่เติมสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์หลอดละ 10 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 หลอด จากข้อ3.5.3.1 ตามลำดับจับเวลาที่ 0, 1, 5, 10 และ 15 นาที เมื่อครบเวลา แล้วปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth 9 ml ทันทีเพื่อทำให้สารมีฤทธิ์เป็นกลางจากนั้นปิเปตตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่หลอมละลายและอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิประมาณ 45±1 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อประมาณจานละ 15-20 มิลลิลิตร เข้าบ่มอุณหภูมิ37±1 องศาเซลเซียสเวลา 48±2 ชั่วโมงภายใต้ไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar เมื่อครบเวลาบ่มนับจำนวนเชื้อ *Weissella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spp. ที่รอดชีวิต โดยเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อ *Weissella* spp.ที่ไม่ได้เติมสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก เพื่อหาความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Weissella* spp. ได้ดีที่สุด

3.5.4 การยืนยันความถูกต้องของประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *Weissella* spp.ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth

คัดเลือกสารละลายฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก ความเข้มข้นที่ไม่พบเชื้อจุลินทรีย์เจริญในข้อ 3.5.3.3 มาเติมเชื้อ *Weissella* spp. อายุ 24-48 ชั่วโมง จำนวน 5-100 cfu/ml ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37±1 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมงภายใต้สภาพไร้ออกซิเจนใน anaerobic jarเพื่อตรวจสอบความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกสามารถทำลายเชื้อ *Weissella* spp. ได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาที่กำหนด และเป็นการตรวจสอบผลการตกค้าง(residual effects)ของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่อาจตกค้างอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Brothสังเกตการณ์เจริญของหลอดทดลองที่เติมจุลินทรีย์เกณฑ์การพิจารณาสำหรับผลที่ถูกต้อง จะต้องพบการเจริญของจุลินทรีย์ในหลอดที่เติมเชื้อจุลินทรีย์แสดว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Brothสามารถหาการเหลือรอดของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกได้ไม่มีผลกระทบตกค้างของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิตริก

3.5.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกต่อการฆ่าเชื้อ *Weissella* spp. ภายใต้สภาวะนมผงปนเปื้อน 1%(Gibson และคณะ, 2008; Cord และคณะ, 2001)

3.5.5.1 การเตรียมนมเด็กเล็กเตรียมอุปกรณ์เปิดภาชนะ และอุปกรณ์ตัดตัวอย่างให้ปลอดเชื้อด้วยการผ่านความร้อนแห้งของตู้อบเครื่องแก้วที่อุณหภูมิ 180±10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือฆ่าเชื้อโดยจุ่มอุปกรณ์ตรงส่วนที่ต้องสัมผัสกับตัวอย่างลงในภาชนะที่บรรจุ ethyl alcohol 95% แล้วลนไฟด้วยตะเกียงโดยต้องทิ้งให้อุปกรณ์เย็นลงก่อนจึงค่อยนำมาสัมผัสกับตัวอย่างฆ่าเชื้อบริเวณรอบนอกภาชนะบรรจุตัวอย่างโดยเช็ดด้วยสำลีชุบ ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ให้เขย่าถุงผสมตัวอย่างให้เข้ากัน จากนั้นเปิดถุงตัวอย่างแล้วใช้ช้อนปลอดเชื้อตักตัวอย่างด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่มีสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกเตรียมไว้จากข้อ 3.5.3.1หลอดละ 0.1 กรัม

3.5.5.2 ผลของความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกต่อการฆ่าเชื้อ *Weissella* spp. ที่มีนมผสมอยู่ 1%นำหลอดทดลองที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.5.1 ซึ่งประกอบด้วยสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้นที่คัดเลือกและนมผงเด็กเล็ก1% ถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อ *Weissella* spp. 6 log cfu/ml ทิ้งไว้ที่เวลา 0, 1, 10, 15และ 20 นาที ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth 9 ml ทันทีเพื่อทำให้สารมีฤทธิ์เป็นกลาง จากนั้นปิเปตสารละลายที่เติมเชื้อลงในแต่ละหลอดทดลองใส่ในจานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่หลอมละลายแล้วอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จานละ 15 มิลลิลิตร โดยผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาพไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar ครบเวลานับจำนวนโคโลนีที่เจริญในจานเพาะเชื้อ คำนวณเป็น cfu/ml

3.5.6 การเลือกใช้สถิติแผนการทดลองเป็นแบบ RCBDนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (SPSS analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละวิธี ด้วย Ducan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการเหลือรอดของจุลินทรีย์ทั้งก่อนและหลังการล้างเครื่องมืออุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนมผง

เนื่องจากการผลิตนมดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็กมีข้อกำหนดในด้านการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์นมต่ำมาก ตามประการสาธารณสุข ฉบับที่ 156 โดยมีข้อกำหนดไม่มีแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด *E.coli* ในนม 1 กรัมและตรวจพบแบคทีเรียไม่เกิน 10,000 cfu ต่อนม 1 กรัม ซึ่งการปนเปื้อนเชื้อของผลิตภัณฑ์นมผงของโรงงานมีรายงานความเป็นไปได้สูงจากการปนเปื้อนเหลือรอดของจุลินทรีย์ที่ติดมากับอุปกรณ์การผลิตที่มีการล้างไม่เหมาะสม หรือน้ำยาฆ่าเชื้อที่ใช้ไม่เพียงพอ (Cristina และคณะ, 2011) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้เริ่มทำการทวนสอบขั้นตอนการล้างของโรงงานโดยทำการสวอปอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ในช่วงการบรรจุ ซึ่งเป็นจุดที่การทำความสะอาดอาจไม่ทั่วถึง จนเป็นสาเหตุของการสะสมของนมผงและเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน โดยทำการเก็บตัวอย่าง swab ในอุปกรณ์และเครื่องจักรในการผลิตก่อนและหลังทำความสะอาด ตามจุดต่าง ๆ รวม15 จุด (ตารางที่ 3.1) คือ จุดที่ 1 ท่อ Dust รับส่งนม จุดที่ 2 ท่อใหญ่ส่งนม จุดที่ 3 ฝาปิดช่องเทนมผงห้อง Tip station จุดที่ 4 เก็บตัวอย่างนม Auto sample จุดที่ 5 ท่อระบายฝุ่นนม จุดที่ 6 ท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสม จุดที่ 7 ท่อรูเล็ก Put Pressure ด้านล่าง จุดที่ 8 ตะแกรงรับนม จุดที่ 9 sock connection จุดที่ 10 กรวยเล็กรับนม จุดที่ 11 ท่อส่ง Ingredient จุดที่ 12 แกนหมุนล่าง จุดที่ 13 ท่อ Put Pressure ด้านล่าง จุดที่ 14 ข้อต่อเพลาหมุน จุดที่ 15 แกนบดน้ำตาลโดยการทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องจักรในจุดเก็บตัวอย่างที่ 3, 8, 9, 10 และ 14 สามารถถอดออกมาล้างและแช่สารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟ เป็นเวลา 15 นาที ส่วนอุปกรณ์เครื่องจักรในจุดเก็บตัวอย่างที่ 1, 2, 4, 5, 7, 12, 13 และ 15 นั้นทำความสะอาดโดยใช้ผ้าสะอาด ชุบสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟเช็ดได้อย่างทั่วถึงได้ ยกเว้นในจุดเก็บตัวอย่างที่ 6 และ 11 ซึ่งเป็นท่อแนวนอนและท่อแนวตั้ง ตามลำดับ ไม่สามารถทำความสะอาดได้ทั่วถึงเนื่องจากความลึกของท่อ พนังงานใช้ชุบสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟ เช็ดบริเวณช่วงต้นของท่อเท่านั้น ซึ่งผลจากการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่า ก่อนการทำความสะอาดตรวจสอบพบเชื้อ Yeast & Mold 10-20 cfu/100 cm^2พบจุดที่ 11 ท่อส่ง Ingredientจุดที่ 13 ท่อ Put Pressure ด้านล่าง ห้องMajor ingredient จำนวน 10 และ 20 cfu/100 cm^2ตามลำดับและปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 10-130 cfu/100 cm^2หลายจุดได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุดที่ 2 ท่อใหญ่ส่งนมจากห้องBig Bagจุดที่ 3 ฝาปิดช่องเทนมผง ห้องTip station1จุดที่ 6 ท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสมด้านล่างใต้บันได จุดที่ 7 ท่อรูเล็ก Put Pressure ด้านล่างของ Hopper จุดที่ 9 Sock connection ห้อง Major ingredient จุดที่ 10 วงแหวนด้านในของกรวยเล็กรับนม Major ingredient ไม่สามารถถอดจากกันได้ จุดที่ 12 แกนหมุนล่าง ห้องMajor ingredient จุดที่ 13 ท่อ Put Pressure ด้านล่าง ห้องMajor ingredient และจุดที่ 14 ข้อต่อเพลาหมุนปริมาณ 30, 120, 40, 10, 20, 10, 30, 130 และ 100 cfu/100 cm^2ตามลำดับ การพบแบคทีเรียทั้งหมดในปริมาณสูง > 100 cfu/100 cm^2 และเชื้อ Yeast & Mold 20 cfu/ml ณ จุดที่ 13ท่อ Put Pressure ด้านล่าง ห้อง Major ingredient ซึ่งท่อเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางเล็ก < 1.5 เซนติเมตร ยากต่อการทำความสะอาดจึงทำให้เกิดการสะสมของเชื้อจุลินทรีย์จนมีโอกาสตรวจพบได้ แต่หลังจากการทำความสะอาดในส่วนท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสมด้านล่างใต้บันได มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลงเหลือ 10 cfu/100 cm^2 ในส่วนบริเวณอื่นไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ทุกบริเวณของการ swab อุปกรณ์และเครื่องจักรในการผลิตนมผง แสดงว่าการทำความสะอาดด้วยสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟของโรงงานผสมนมผงแห่งนี้สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกจุด มีเพียงบริเวณท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสมด้านล่างใต้บันไดพบแบคทีเรียทั้งหมด ก่อนทำความสะอาด 40 cfu/100 cm^2หลังการทำความสะอาดยังตรวจพบเชื้อ 10 cfu/100 cm^2 ซึ่งจากผลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า บริเวณนี้ควรมีการปรับปรุงวิธีการทำความสะอาดโดยอาจต้องเพิ่มความเข้มข้นหรือเวลาสัมผัสการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากท่อส่งนมแนวนอน ไม่มีจุดระบายเศษนม เมื่อหยุดกระบวนการผลิตอาจทำให้เกิดการติดค้างของผลิตภัณฑ์ในท่อ ส่งผลให้เกิดการสะสมของอาหารจนเป็นแหล่งเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ ดังจะเห็นได้จากอุปกรณ์เครื่องจักรจุดที่ 6 และจุดที่ 11 ที่ไม่สามารถถอด ชิ้นส่วนทำความสะอาดและมีจุดที่สารทำความสะอาดไม่สามารถเข้าไปทำความสะอาดได้ทั่วถึง จึงมีโอกาสเกิดการสะสมของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงควรเฝ้าระวังทำความสะอาดให้ทั่วถึงต้องทวนสอบการทำความสะอาดเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อต่อไป

จากผลการทดสอบตามจุดเก็บตัวอย่างทั้ง 15 จุด จะเห็นได้ว่าเชื้อที่ทดสอบ เป็นการติดตามประกาศสาธารณสุข ฉบับที่ 156 โดยมีข้อกำหนดไม่มีแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ตรวจไม่พบแบคทีเรียชนิด *E. coli* ในนม 1 กรัมและตรวจพบแบคทีเรียไม่เกิน 10,000 cfu ต่อนม 1 กรัม จึงได้ข้อสรุปว่า ตรวจไม่พบอันตรายจากเชื้อก่อโรคเป้าหมายที่ปรากฏตามประกาศนั้น เนื่องจากวัตถุดิบที่นำมาผลิต มีเกณฑ์มาตรฐานที่ดี เมื่อนำมาแบ่งบรรจุเพื่อจำหน่ายในโรงงาน โรงงานมีมาตรการหรือระบบคุณภาพและความปลอดภัยในการผลิตดี สามารถควบคุมผู้ผลิตได้ดี รวมถึงแมลงและสัตว์พาหะดี จึงทำให้ไม่พบเชื้อก่อโรคที่บ่งชี้ว่ามาจากมือคนหรือผิวหนังคน เช่น *S. aureus* (สุวิมล , 2543) และควรระวังการปนเปื้อนระหว่างการขนย้าย ทั้งก่อนและหลังการทำความสะอาด การล้างโดยคนที่ผ่านการฝึกอบรมด้านทำความสะอาด (กองควบคุมยา, 2546) นอกจากนี้เชื้อก่อโรคที่บ่งชี้ว่ามาจากคนหรือสัตว์พาหะ จากการควบคุมแมลงและสัตว์พาหะในโรงงานไม่ดี เช่น *Salmonella, B. cereus* หรือ *C. sakazakii* (สุวิมล , 2543) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม, เชื้อ *S.aureus* , เชื้อ *C.sakazakii*,เชื้อ *B.cereus*และ Yeast & Mold ในตัวอย่าง swab อุปกรณ์ผลิตนมผง

จุดเก็บตัวอย่าง	แบคทีเรียทั้งหมด (cfu/100cm^2)		Coliform (cfu/100cm^2)		เชื้อ *S.aureus* (cfu/100cm^2)		เชื้อ *B.cereus* (cfu/100cm^2)		เชื้อ *C.sakazakii* (cfu/100cm^2)		เชื้อยีสต์ (cfu/100cm^2)		เชื้อรา (cfu/100cm^2)	
	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง	ก่อน	หลัง
จุดที่ 1 ท่อ Dust รับนมส่งนมจากห้อง Big Bag	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 2 ท่อใหญ่ส่งนมจากห้อง Big Bag	30	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 3 ฝาปิดช่องเทนมผง ห้อง Tip station	120	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 4 เก็บตัวอย่างนม Auto Sample	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 5 ท่อระบายฝุ่นนม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 6 ท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสม	40	10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 7 ท่อรูเล็ก Put Pressure ของ Hopper	10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 8 ตะแกรงรับนมห้อง Loss In Weight	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 9 Sock connection	20	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 10 กรวยเล็กรับนม ถอดจากกันไม่ได้	10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 11 ท่อส่ง Ingredient	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	10	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 12 แกนหมุนล่าง ห้องMajor ingredient	30	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 13 ท่อ Put Pressure ด้านล่าง	130	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	20	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 14 ข้อต่อเพลาหมุน	100	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
จุดที่ 15 แกนบดน้ำตาล	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

4.2 การแยกและจำแนกชนิดสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน

เมื่อนำโคโลนีเชื้อจุลินทรีย์ที่พบเหลือรอดในส่วนท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสมด้านล่างใต้บันไดก่อนทำความสะอาดปริมาณ 40 cfu/100 cm^2หรือ 4 โคโลนีและหลังทำความสะอาดปริมาณ 10 cfu/100 cm^2 หรือ 1 โคโลนีทดสอบลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้น พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 โคโลนี ย้อมแกรมติดสีม่วงคริสตัลไวโอเลต จัดเป็นคุณสมบัติแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกและเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์มีลักษณะรูปร่างกลม และตรวจทางชีวเคมีจากนั้นเลือกโคโลนีก่อนทำความสะอาด เลือกมาทดสอบ 1 โคโลนีก่อนทำความสะอาด และ 1 โคโลนีหลังทำความสะอาดที่นำมาเป็นตัวแทนของ ทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL 1 โคโลนีพร้อมแปรผลด้วย Software api*web* API 50 CHL V5.2แสดงดังภาพที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าผลโคโลนีของเชื้อที่ตรวจพบทั้งก่อนและหลังทำความสำอาดได้เป็นเชื้อ *W. confusa* ที่ระดับความเชื่อมั่น 96.4 %และ 99.99 % ตามลำดับ เนื่องจากข้อจำกัดของ API 50 CHL สามารถแยกสายพันธุ์ *Weissella* spp. 2 สายพันธุ์ได้แก่ *W. confuse*และ *W. viridescens* สอดคล้องกับรายงาน Kulwichit และคณะ (2007) ระบุว่าเชื้อ *W. confuse* และ *W. cibaria* มีความใกล้ชิดกันมากไม่สามารถแยกความแตกต่างด้วยชุดทดสอบ API จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิค PCR เพื่อแยกความต่างระหว่างเชื้อทั้งสองได้จากผล API ที่ได้เบื้องต้น ทางทีมผู้วิจัยจึงได้ส่งเชื้อดังกล่าวทดสอบต่อไปโดยเน้นหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยเทคนิค 16S rDNA ห้องปฏิบัติการ Microbial Technology คณะ Microbial Science and Technology มหาวิทยาลัย Kyushu ประเทศญี่ปุ่น จะเห็นได้ว่า เชื้อที่เก็บตัวอย่างจากก่อนทำความสะอาด แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% identity) ระหว่างลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกในฐานข้อมูล GENBANKใช้แทนสัญลักษณ์ด้วย EN1 แสดง % identity เชื้อ *W. cibaria* 99 %ภาพแสดงในภาคผนวกที่ ข-1ส่วนเชื้อที่เก็บตัวอย่างจากหลังทำความสะอาด แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% identity) ระหว่างลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกในฐานข้อมูล GENBANK แทนสัญลักษณ์ด้วย EN2 ภาพแสดงในภาคผนวกที่ ข-2แสดง % identity เชื้อ *W. cibaria* 94 % เช่นกันแสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ ทนทานต่อการชะล้างทำความสะอาดด้วยสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกซึ่งเชื้อนี้ Land และคณะ (2005) รายงานว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้ติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อราในกระแสเลือดได้ (bacteremia และfungemia) โดยเฉพาะในผู้ที่มีภาวะภูมิต้านทานต่ำ (immune compromised host)อาจมีอาการไม่สบายท้อง ท้องอืดและมีแก๊สในระบบทางเดินอาหาร จากผลการทดสอบทางผู้วิจัยจึงได้นำเชื้อ *W. cibaria*สายพันธุ์ EN2 ศึกษาต่อไปเนื่องจากเป็นเชื้อสายพันธุ์ทนต่อสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนียมากที่สุดโดยได้กำหนดเอาเชื้อ *W. cibaria*สายพันธุ์ EN2 เป็นปัจจัยวิกฤตที่สำคัญที่สุด (worst case) เป็นตัวแทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบในการทดสอบนี้เพื่อศึกษาทวนสอบความถูกต้องในการทำความสะอาดที่ใช้อยู่ในปัจจุบันของโรงงานแบ่งบรรจุผลิตภัณฑ์นมผงแห่งนี้

Strip	API 50 CHL V5.2
Profile	----+++---++++--------+++++++--+-------+-------+--
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Weissella confusa	96.4	0.88	LARA 19%	RIB 19%		
Lactobacillus brevis 1	3.4	0.91				

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Lactococcus lactis ssp lactis 1	0.1	0.73	LAC 90%	TRE 90%		

ภาพที่ 4.1 ผลชีวเคมีโดย Software api*web* API 50 CHL V5.2ของโคโลนีที่ตรวจพบก่อนทำความสะอาด

Strip	API 50 CHL V5.2
Profile	------+---+++--------+++++++--+-------+-------+--
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Weissella confusa	99.9	0.8	MNE 100%			

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Lactobacillus brevis 1	0.1	0.67	MNE 99%			

ภาพที่ 4.2 ผลชีวเคมีโดย Software api*web* API 50 CHL V5.2 ของโคโลนีที่ตรวจพบหลังทำความสะอาด

4.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *W. cibaria*ในหลอดทดลองที่เวลาต่างๆ

เมื่อทราบสายพันธุ์เชื้อที่เหลือรอดจากสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ *W. cibaria*จึงทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารละลายกรดเปอร์อะซิติกในระดับ 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ที่ระดับ 6 log cfu/ml ใช้เวลา 0, 1, 5, 10 และ 15 นาทีในหลอดทดลอง จากผลการทดลองพบกรดเปอร์อะซิติกที่ระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สามารถลดเชื้อ *W. cibaria*ในหลอดทดลองได้ดี โดยไม่พบจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากใช้เวลา 5 นาที ในขณะที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ฆ่าเชื้อลดลง 6.90±0.02log cfu/ml และทำลายเชื้อภายในเวลา 15 นาทีจึงตรวจไม่พบเชื้อ เมื่อเทียบกับหลอดทดลองควบคุม(ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ไม่มีการเติมสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก) จากผลทดสอบจะเห็นได้ว่าเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อและความเข้มข้นสารสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกมีผลต่อการฆ่าเชื้อ*W. cibaria* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลชีวเคมีชุดทดสอบ API 50 CHL ของโคโลนีที่ตรวจพบก่อนและหลังทำความสะอาดเทียบกับเชื้อ *W. confusa*

Tube	Test	Active ingredients	Result		
			Positive *W.conusa*	เชื้อก่อนทำความสะอาด	เชื้อหลังทำความสะอาด
0		CONTROL	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
1	GLY	GLYcerol	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
2	ERY	ERYthritol	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
3	DARA	D-ARAbinose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
4	LARA	L-ARAbinose	colorless (-)	Yellow (+)	colorless (-)
5	RIB	D-RIBose	colorless (-)	Yellow (+)	colorless (-)
6	DXYL	D-XYLose	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
7	LXYL	L-XYLose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
8	ADO	D-ADOnitol	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
9	MDX	Methyl-βD-Xylopyraniside	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
10	GAL	D-GALactose	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
11	GLU	D-GLUcose	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
12	FRU	D-FRUctose	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
13	MNE	D-MaNnosE	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
14	SBE	L-SorBosE	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
15	RHA	L-RHAmnose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
16	DUL	DULcitol	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
17	INO	INOsitol	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
18	MAN	D-MANnitol	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
19	SOR	D-SORbitol	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
20	MDM	Methyl-αD-Mannopyranoside	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
21	MDG	Methyl-αD-Glucopyranoside	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลชีวเคมีชุดทดสอบ API 50 CHL ของโคโลนีที่ตรวจพบก่อนและหลังทำความสะอาดเทียบกับเชื้อ *W. confusa*(ต่อ)

Tube	Test	Active ingredients	Result		
			Positive *W.conusa*	เชื้อก่อนทำความสะอาด	เชื้อหลังทำความสะอาด
22	NAG	N-AcetylGlucosamine	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
23	AMY	AMYgdalin	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
24	ARB	ARButin	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
25	ESC	ESCulin ferric citrate	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
26	SAL	SALicin	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
27	CEL	D-CELiobiose	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
28	MAL	D-MALtose	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
29	LAC	D-LACtose(bovine orgin)	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
30	MEL	D-MELibiose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
31	SAC	D-SACcharose(sucrose)	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
32	TRE	D-TREhalose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
33	INU	INUlin	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
34	MLZ	D-MeLeZitose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
35	RAF	D-RAFfinose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
36	AMD	AmiDon(starch)	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
37	GLYG	GLYcoGen	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
38	XLT	XyLiTol	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
39	GEN	GENtiobiose	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
40	TUR	D-TURanose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
41	LYX	D-LYXose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
42	TAG	D-TAGatose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
43	DFUC	D-FUCose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลชีวเคมีชุดทดสอบ API 50 CHL ของโคโลนีที่ตรวจพบก่อนและหลังทำความสะอาด เทียบกับเชื้อ *W. confusa*(ต่อ)

Tube	Test	Active ingredients	Result		
			Positive *W.conusa*	เชื้อก่อนทำความสะอาด	เชื้อหลังทำความสะอาด
44	LFUC	L-FUCose	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
45	DARL	D-ARabitoL	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
46	LARL	L-ARabitoL	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
47	GNT	potassium GlucoNaTe	Yellow (+)	Yellow (+)	Yellow (+)
48	2KG	potassium 2-KetoGluconate	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)
49	5KG	potassium 5-KetoGluconate	colorless (-)	colorless (-)	colorless (-)

ตารางที่ 4.3ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกและระยะเวลาต่อการฆ่าเชื้อ W.*cibaria* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml

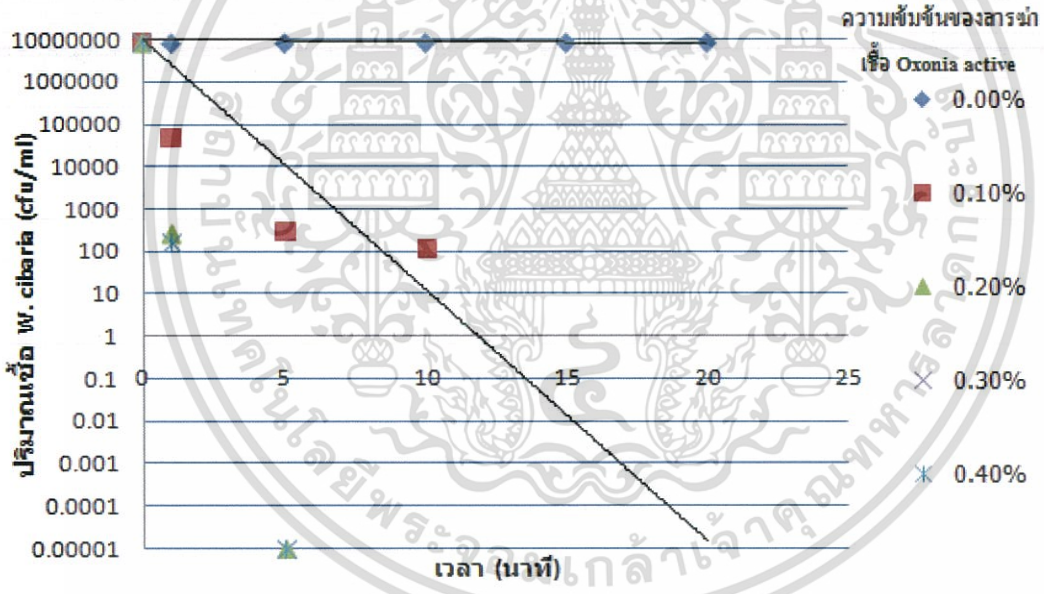
กรดเปอร์อะซิติก(%)	ปริมาณเชื้อ(log cfu/ml)ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0.0	6.90 ± 0.00^{c}	6.90 ± 0.02^{b}	6.91 ± 0.01^{a}	6.91 ± 0.01^{a}	6.91 ± 0.01^{a}	6.92 ± 0.02^{a}
0.1	6.90 ± 0.01^{c}	4.67 ± 0.03^{b}	2.46 ± 0.04^{a}	2.04 ± 0.02^{b}	0^{d}	0^{d}
0.2	6.90 ± 0.01^{b}	2.41 ± 0.01^{b}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}
0.3	6.90 ± 0.02^{b}	2.19 ± 0.02^{b}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}
0.4	6.90 ± 0.02^{b}	2.18 ± 0.02^{b}	0^{d}	0^{d}	0^{d}	0^{d}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ในขณะเดียวกันหากเพิ่มความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกมากกว่า 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถลดเชื้อ 6.90±0.01log cfu/ml และเชื้อจะค่อยๆลดลงปริมาณตั้งแต่นาทีที่ 1 จนทำลายเชื้อได้หมด 100 % เมื่อผ่านไป 5 นาที และสอดคล้องกับภาพที่ 4.3 พบว่าสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้น 0.2,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.3,0.4 %เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณเชื้อลง 90% ของปริมาณเริ่มต้น(D-value) โดยใช้เวลาตั้งแต่ 2 นาทีเป็นต้นไป ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ใช้ในความเข้มข้นต่ำ ต้องใช้เวลานานขึ้นจะช่วยลดเชื้อจนหมดได้ สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้น 0.2, 0.3, 0.4 %เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณเชื้อลง 90% ของปริมาณเริ่มต้น(D-value) ใช้เวลา 2 นาทีเป็นต้นไป ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงาน Campagna และคณะ(2013) ได้ทำการทดสอบสารทำความสะอาด peroxyacetic acid (PAA) mixture ทดสอบกับแบคทีเรียแลคติก ใช้เวลาทดสอบ 2 และ 15นาทีที่อุณหภูมิห้องพบว่า สารประเภท peroxyacetic acid (PAA) mixture สามารถทำลายแบคทีเรียแลคติก 7 สายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ ยังสอดคล้องกับรายงานของกัลย์กมล (2552) รายงานว่าได้ทดสอบสารทำความสะอาดและสารฆ่าเชื้อ โซเดียม เมตะซิลิเกต 0.2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกรดอะซิตริก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแอโรปได้ 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ การใช้กรดอะซิติก 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแอโรปได้ 99 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.3 ประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกในระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อการฆ่าเชื้อ *W.cibaria* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml

ในขณะที่ค่า pH ระหว่างของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์มีค่า 6.92-6.94, 4.60-4.62, 4.10-4.12, 4.06-4.08, 3.94-3.92 ตามลำดับ เห็นได้ว่าค่าพีเอชของสารฆ่าเชื้อลดลงลดลงในช่วง 2.0-2.3 ตามความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เพิ่ม เป็นผลจากการแตกตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของกรดอินทรีย์ของกรดเปอร์อะซิติก ซึ่งโปรตอนจากกรดอินทรีย์จะทำให้ความเป็นกรดภายในไซโตพลาสซึมเพิ่มสูงขึ้น จึงต้องมีการกำจัดกรดส่วนที่เกินไปออกสู่ภายนอกเซลล์การขับโปรตอนออกสู่ภายนอกเซลล์จำเป็นต้องใช้พลังงานในรูป ATP ดังพลังงานภายในเซลล์ถูกนำมาใช้ในการกำจัดโปรตอนจนหมดทำให้ขณะเดียวกัน จะเกิดการรบกวนการผ่านเข้า-ออกของสารในเมนเบรน ทำให้แบคทีเรียขาดพลังงานและตายในที่สุด จึงเลือกความเข้มข้นที่ 0.2 0.3และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก สลายตัวเร็วควรเตรียมไว้ใช้ไม่เกิน 15 นาที ดังนั้นที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์จึงไม่เลือกนำมาทดสอบต่อในหัวข้อ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

4.4 การยืนยันความถูกต้องของประสิทธิภาพสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ *W.cibaria*ในอาหารเลี้ยงเชื้อD/E neutralizing broth

ขั้นตอนนี้เป็นการยืนยันความถูกต้องของการนับเชื้อจากข้อที่ 4.3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลกระทบตกค้างของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิตริกหลงเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth ดังนั้นจึงทำการถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองที่มีสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้น 0.20, 0.30 และ 0.40 เปอร์เซ็นต์ เริ่มจากนำผลทดลองลบในข้อ 4.3 (หลอดที่เชื้อไม่เจริญ) ซึ่งตรงกับความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ทำการศึกษาความเข้มข้น 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ที่ปริมาณ 6 log cfu/ml หมดภายใน 5 นาที หลังจากทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 นาที มาเติมเชื้อ *W. cibaria* อายุ 24-48 ชั่วโมง จำนวน 5-100 cfu/ml ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37±1 องศาเซลเซียส นาน 48±2 ชั่วโมงภายใต้ไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar ผลการทดสอบพบว่าสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้น 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ พบการเจริญของเชื้อ *W. cibaria* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth ขุ่นเมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงแสดงว่า อาหารหลอดทดลองที่ให้ผลลบในข้อ 4.3 ถูก Neutralize หมดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth ไม่มีผลกระทบตกค้างของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกหลงเหลืออยู่ในหลอดทดลอง หรือกล่าวอีกนัยองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth สามารถใช้ในการหาจุลินทรีย์ที่เหลือรอดของสารฆ่าเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth ได้อย่างสมบรูณ์ แสดงให้เห็นว่าผลลบจากการทดลองในข้อ 4.3 เป็นผลลบจริง สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเมื่อเติมเชื้อลงไปสีที่เปลี่ยนเกิดจากการหมักน้ำตาลซูโครสของเชื้อจุลินทรีย์เป็นกรดเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อสร้างความน่าเชื่อถือข้อมูล นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับคำแนะนำ Sutton และคณะ (2002) ให้ใช้ D/E Neutralizing มีคุณสมบัติเป็น neutralizer ที่ดีมีส่วนผสมหลายชนิดเพื่อช่วยทำให้สารออกฤทธิ์ที่เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นกลางและในขณะเดียวกันมีสารอาหารจำเป็นที่ช่วยฟื้นฟูเชื้อจุลินทรีย์ที่หลงเหลือจากการทำปฏิกิริยาให้ฟื้นสภาพ

ในทางตรงกันข้ามหากหลอดทดลองที่เติมเชื้อเชื้อ *W. cibaria* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth ใส ไม่ขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงแสดงว่า สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่เหลือคงฤทธิ์ในหลอดทดลองที่ให้ผลลบในข้อ 4.3 และถูก Neutralize ด้วย D/E Neutralizing ได้ไม่หมดนั้นเอง แม้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth จะมีส่วนประกอบ เลซิติน ทำให้สารออกฤทธิ์ในกลุ่ม quaternary ammonium compound เป็นกลาง ขณะที่ Tween ทำให้สาร phenolic disinfactants และ hexachlorophene เป็นกลาง เมื่อเลซิติน (lecithin)อยู่กับ Tween ช่วยทำให้เอทานอล (ethanol)เป็นกลาง ส่วนโซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) ช่วยทำให้ไอโอดีน กรดและคลอรีนเป็นกลางและโซเดียมไบซัลไฟท์ (sodium bisulfite)ทำให้สารในกลุ่ม aldehydes เป็นกลางด้านการฟื้นฟูซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลายมี yeast extract หรือ beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอน วิตามิน และแร่ธาตุ เพื่อจุลินทรีย์นำมาเป็นแหล่งอาหารใช้ในการฟื้นฟูเซลล์จากการถูกทำลาย โซเดียมคลอไรด์ ช่วยเรื่องสมดุลออโมซิสของเซลล์ น้ำตาลเด็กซ์โทส (dextrose) แหล่งสร้างพลังงาน ATPผ่านกระบวนการหมัก ไม่อาจฟื้นฟูเซลล์เชื้อจุลินทรีย์จากการรบกวนของอนุพันธ์ของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่หลงเหลือในหลอดทดลองได้ แสดงว่า ผลลบที่ได้ในข้อ 4.3 เป็นผลลบปลอมนั่นเอง

การทดสอบในข้อนี้จึงเป็นการทวนสอบความถูกต้องค่าความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกก่อนนำผลมาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นการยืนยันความเหมาะสมในการเลือก Neutralize เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อหาจุลินทรีย์ที่เหลือรอดของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกมีความเหมาะสมและสามารถนำใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกได้อย่างสมบูรณ์ดังได้แสดงข้างต้น

4.5 ผลของความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกต่อการฆ่าเชื้อ*W. cibaria* ภายใต้สภาวะนมผงปนเปื้อน 1%

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้น 0.2, 0.3และ 0.4 เปอร์เซ็นต์ต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่างกันในหลอดทดลองในหัวข้อ 4.3 นั้น การศึกษาขั้นต่อไปศึกษาความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ภายใต้สภาวะที่มีนมผงปนเปื้อนอยู่ 1 % เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อทำความสะอาด จากการศึกษาประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อและความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria*ได้ดีกว่าความเข้มข้นต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)แสดงดังตารางที่ 4.3 ซึ่งได้ผลการทดลองพบว่าหลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อ *W. cibaria*ปริมาณ 6.89±0.02 log cfu/ml สังเกตว่าเชื้อถูกทำลายลงเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป 1, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับ ปริมาณ 1.81±0.02, 1.79±0.08, 1.25±0.05 และ1.05±0.02log cfu/ml ตามลำดับแสดงดังตารางที่ 4.4 และทำลายเชื้อได้หมดนานาทีที่ 20 สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ฆ่าเชื้อ *W. cibaria*ปริมาณ 6.89±0.02 log cfu/ml สังเกตว่าเชื้อถูกทำลายลงเมื่อเวลาผ่านไป 1, 5 และ10 นาที ตามลำดับ ปริมาณ 1.73±0.03, 1.72±0.03 และ 1.02±0.02 log cfu/ml ตามลำดับ และทำลายเชื้อได้หมดในนาทีที่ 15 นอกจากนี้ยังพบว่าสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อ *W. cibaria*ปริมาณ 6.89±0.01log cfu/ml เชื้อถูกทำลายลงเมื่อเวลาผ่านไป 1และ 5 นาที ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.3ปริมาณ 1.28±0.09 และ 1.16±0.03log cfu/ml ตามลำดับ และทำลายเชื้อได้หมดที่ 10 นาที และสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อ *W. cibaria*ปริมาณ 6.89±0.00log cfu/ml เชื้อถูกทำลายลงตั้งแต่นาทีที่ 1นาที ปริมาณ 0.79±0.09 log cfu/ml และทำลายเชื้อได้หมดใน 5นาที

จากคุณสมบัติของกรดเปอร์อะซิติกมีค่า pKa สูงกว่ากรดแลกติก จึงมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลกติก (อดิศรและคณะ, 2548) สอดคล้องกับการทดลอง Cristina และคณะ (2011) พบว่าสารฆ่าเชื้อประเภท Peroxyacetic acid ความเข้มข้น 250 µg/ml สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกไบโอฟิมพ์ รูปร่างท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ได้ 5 log cfu/ml นอกจากนี้จากรายงานของ Kubota และคณะ (2008) พบว่าเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกไบโอฟิมพ์ ไม่สร้างสปอร์ มาทดสอบกับกรดเปอร์อะซิติก 8 เปอร์เซ็นต์พบว่าลดการเจริญแบคทีเรียแลคติกไบโอฟิมพ์ และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ใส่ลงในหลอดทดสอบพบการเกาะติดกับพื้นผิวเพิ่มขึ้น 30-40% เท่านั้น เชื้อที่สัมผัสสารละลายกรดเปอร์อะซิติกเกิดการบาดเจ็บโดยรบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรน โดยทำให้ความต่างศักย์ทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical potential) เป็นกลาง ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ลดลง และยับยั้งการขนส่งของกรดอะมิโนได้ทำให้ยากต่อฟื้นฟูแม้จากการทดลอง Kubota และคณะ (2008) จะใช้กรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้นสูงกว่านั่นย่อมแสดงให้เห็นว่า กรดที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จะอยู่ในรูปกรดที่ไม่แตกตัวเป็นสำคัญ ดังนั้นในการเลือกใช้กรดอินทรีย์ในการทำลายจุลินทรีย์ต้องพิจารณาถึงค่า pKaในช่วง 3.0-5.0 ของกรดชนิดนั้นๆเช่นเดียวกับรายงาน วราวุฒิ และคณะ(2547) ได้รายงานว่าน้ำส้มสายชูหมักที่ความเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ได้ ซึ่งกรดเปอร์อะซิติกเป็นสารออกฤทธิ์ในยับยั้งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

ในขณะที่ค่า pH ระหว่างของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 เปอร์เซ็นต์มีค่า 6.92-6.94, 5.80-5.82, 5.60-5.50, 5.22-5.18, 4.90-4.92 ตามลำดับ เห็นได้ว่าค่าพีเอชของสารฆ่าเชื้อลดลงในช่วง 0.4-2.0 ตามความเข้มข้นของกรดอะซิติกที่เพิ่ม จากปริมาณเชื้อที่เหลือจะเห็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ว่า สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ได้ดีแม้อยู่ในสภาวะที่ปนเปื้อนนมผงหรือเวย์ ในขณะที่นมผงหรือเวย์โปรตีนมีผลในการลดประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของกรดเปอร์อะซิติก ปัจจัยรบกวนอันเกิดจากนมผงหรือเวย์โปรตีนนั้นประกอบด้วย casein, α-lactalbumin,β-lactoglobulin และไขมันซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างจับกับโปรตอนจากกรดเปอร์อะซิติกจึงเป็นเหตุให้มีผลในการลดประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของกรดเปอร์อะซิติกทำให้โปรตอนที่หลงเหลือน้อยลงทำลายเชื้อ *W. cibaria* ได้ช้าและเวลาที่มากขึ้นจะช่วยให้โปรตอนของสารฆ่าเชื้อและทำความสะอาดกรดเปอร์อะซิติกฆ่าเชื้อให้ตายในที่สุด (Campagna และคณะ 2014, Gaulin และคณะ 2011และ Gelinas และ Goulet, 1983) สรุปได้ว่า การใช้สารฆ่าเชื้อเปอร์อะซิติกสามารถฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ได้แม้อยู่ภายใต้สภาวะนมผงปนเปื้อน ทั้งนี้เวลาที่มากขึ้นจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลดเชื้อได้จนหมด

ตารางที่ 4.4 ผลของความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกและระยะเวลาสัมผัสต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ที่ปริมาณเชื้อ 6 log cfu/ml ที่มีนมผสมอยู่ 1 %

Peroxyacetic acid (%)	ปริมาณเชื้อ(log/ml)ที่ลดลงในระยะเวลา (นาที)					
	0	1	5	10	15	20
0.0	6.89 ± 0.02^{d}	6.89 ± 0.02^{d}	6.89 ± 0.02^{d}	6.89 ± 0.02^{d}	6.89 ± 0.01^{d}	6.90 ± 0.02^{d}
0.1	6.89 ± 0.02^{d}	1.81 ± 0.02^{c}	1.79 ± 0.08^{bc}	1.25 ± 0.05^{bc}	1.05 ± 0.02^{ab}	0^{e}
0.2	6.89 ± 0.02^{d}	1.73 ± 0.03^{bc}	1.72 ± 0.03^{b}	1.02 ± 0.02^{ab}	0^{e}	0^{e}
0.3	6.89 ± 0.01^{d}	1.28 ± 0.09^{ab}	1.16 ± 0.03^{ab}	0^{e}	0^{f}	0^{e}
0.4	6.89 ± 0.00^{d}	0.79 ± 0.02^{a}	0^{c}	0^{e}	0^{f}	0^{e}

หมายเหตุค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ในการศึกษาการอยู่ลดลงของ *W.cibaria* ในสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก ที่มาการใช้เวลาและความเข้มข้นต่างๆ สามารถศึกษาจลนพลศาสตร์การลดลงของเชื้อ *W. cibaria*ภายใต้สภาวะปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีน 1 % ได้จากสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ *W. cibaria*(Log CRU/g) (x) และเวลา (y) ดังตารางที่ 4.5 ซึ่งจากสมการ ดังกล่าวสามารถหาความชันของกราฟจากสมการเส้นตรง แสดงอัตราการตายจำเพาะ (specific death rate, μ') ได้

ในช่วงของการฆ่าเชื้อพบว่า สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.2 จำนวน *W.cibaria*ลดลงอย่างต่อเนื่องที่อัตราการตายจำเพาะ (μ') มีค่าเท่ากับ -0.2862 ต่อนาที ต่างจากสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.3 และ 0.4 เปอร์เซนต์ที่ปริมาณเชื้อ *W. cibaria* ลดลงเล็กน้อย ทำให้อัตราการตายจำเพาะ มีค่าเท่ากับ -0.0038 และ 0.0322 ตามลำดับ จากนั้นนำมาหาเวลาการตาย (t_m) และอัตราการตาย (k') ของ *W. cibaria* ได้จาก $t_m = 0.301/\mu$ และ $k' = 1/\mu$ พบว่า ที่เวลา 10 นาที สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกใช้เวลาฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ได้หมด t_m เท่ากับ 0.0678 นาที ซึ่ง t_m เร็วกว่าเวลา 20 5 1 และ 15 นาทีตามลำดับ ดังตารางที่ 4.6 สำหรับค่า k' พบมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับค่า μ' และ t_m คือ พบว่าการอัตราตายของเชื้อ *W. cibaria* ในหลอดทดลองภายใต้สภาวะปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีนที่เวลา 10 นาทีทำลายเชื้อ *W. cibaria* ได้มากกว่าเวลา 20, 5, 1 และ 15 นาทีตามลำดับ (Gaulinและคณะ, 2011)

ตารางที่ 4.5 สมการเส้นตรงแสดงการลดลงของเชื้อ *W. cibaria*และสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) ภายใต้สภาวะปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีน 1%

ความเข้มข้นสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก	สมการเชิงเส้น*	R^2
0.00%	Y = 2.222X+1.3224	0.9942
0.20%	Y = -0.2862X+1.0151	0.9998
0.30%	Y = -0.0038X+1.000	0.9706
0.40%	Y = -0.0322X+0.9977	0.9993

หมายเหตุ : * ปริมาณของ (Log CFU/g)(X) และเวลา (นาที)(Y)

ตารางที่ 4.6สมการเส้นตรงแสดงเวลาการตาย (t_m) และอัตราการตาย (k') ของเชื้อ *W. cibaria*ที่เวลาต่างๆ ของเชื้อ *W. cibaria*ที่เวลาต่างๆ ขณะภายใต้สภาวะปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีน 1%

เวลาเชื้อสัมผัสสารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติก (นาที)	สมการเชิงเส้น*	t_m (นาที)	k'
1 นาที	Y=-0.0619X+1.0062	4.8627	0.2056
5 นาที	Y=-0.4448X+1.0553	0.6767	1.4777
10 นาที	Y=-4.4409X+1.0002	0.0678	14.7538
15 นาที	Y=-0.0003X+1.0003	1.3333	0.0010
20 นาที	Y=2.2205X+1.0004	0.1356	7.3771

หมายเหตุ : * ปริมาณของ (Log CFU/g)(X) และเวลา (นาที)(Y)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษา สรุปได้ว่าการใช้สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการทำลายเชื้อ *W. cibaria* ในช่วงระยะเวลา 10 นาทีเป็นช่วงที่มีประสิทธภาพในการทำลายเชื้อหรือยับยั้งเชื้อ *W. cibaria* ได้ดีกว่าความเข้มข้นอื่น เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการทำความสะอาดอุปกรณ์และเครื่องมือผลิตแบ่งบรรจุนมผงขณะอยู่ภายใต้ปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีน 1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาแหล่งปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียและชนิดสายพันธุ์ที่อาจพบในอุปกรณ์หลังล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อของโรงงานผลิตนมผงโดยทำการเก็บตัวอย่างสวอปในอุปกรณ์และเครื่องจักรในการผลิตก่อนและหลังทำความสะอาด ตามจุดต่าง ๆ รวม15 จุด ดังกล่าวมาในบทที่ 3(ตารางที่ 3.1)พบการทำความสะอาดด้วยสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟของโรงงานผสมนมผงแห่งนี้สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกจุด มีเพียงบริเวณท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสมด้านล่างใต้บันไดพบแบคทีเรียทั้งหมด ก่อนทำความสะอาด 40 cfu/100 cm^2หลังการทำความสะอาดยังตรวจพบเชื้อ 10 cfu/100 cm^2และเมื่อตรวจสอบสายพันธุ์เชื้อที่ปนเปื้อนทั้ง 2 ครั้งคือเชื้อ *W. cibaria* แสดงว่าการทำความสะอาดด้วยสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟของโรงงานผลิตนมผงแห่งนี้สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ได้ดีทุกจุด มีเพียงจุดเก็บตัวอย่างที่ 6 พนักงานทำความสะอาดไม่ทั่วถึง ลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ 75-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเชื้อ *W. cibaria* จึงถูกเลือกให้เป็นตัวแทนเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบในการทดสอบนี้เพื่อศึกษาทวนสอบความถูกต้องในการทำความสะอาดที่ใช้อยู่ในปัจจุบันของโรงงานแบ่งบรรจุผลิตภัณฑ์นมผงและเป็นเชื้อสายพันธุ์ได้แสดงคุณสมบัติทนทานต่อการชะล้างทำความสะอาดด้วยสารฆ่าเชื้อและทำความสะอาดกรดเปอร์อะซิติกมากที่สุดในการทดสอบครั้งนี้

จากนั้นทำการศึกษาผลความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟที่มีผลต่อการฆ่าเชื้อ*W. cibaria* ที่ระดับต่างๆและในเวลาต่างกันพบว่า สารฆ่าเชื้ออ๊อกโซเนีย แอคทีฟซึ่งมีสารออกฤทธิ์ เป็นกรดเปอร์อะซิติกและไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์ สามารถยับยั้งเชื้อ *W. cibaria* ได้ดี ที่ระดับ 6 log cfu/ml จากผลการทดลองพบกรดเปอร์อะซิติกที่ระดับความเข้มข้น0.2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สามารถลดเชื้อ *W. cibaria*ในหลอดทดลองได้ดี ขณะที่ความเข้มข้น 0.1% ต้องใช้เวลา 15 นาทีจึงไม่พบเชื้อ จะเห็นได้ว่าเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อและความเข้มข้นสารละลายกรดเปอร์อะซิติกมีผลต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* โดยกรดเปอร์อะซิติกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ทำให้เชื้อลดลง 6.90±0.02log cfu/ml และทำลายเชื้อจนหมดภายในเวลา 15 นาทีในขณะเดียวกันหากเพิ่มความเข้มข้นของกรดเปอร์อะซิติก 2 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปพบว่าสามารถลดเชื้อ 6.90±0.01log cfu/mlและเชื้อจะค่อยๆลดลงปริมาณตั้งแต่นาทีที่ 1 จนทำลายเชื้อได้หมดเมื่อผ่านไป 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารฆ่าเชื้อและทำความสะอาดกรดเปอร์อะซิติกที่ใช้ในความเข้มข้นต่ำ ต้องใช้เวลานานขึ้นจะช่วยลดเชื้อจนหมดได้

การศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้นต่างๆต่อการฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ภายใต้สภาวะปนเปื้อนนมผง 1 % เพื่อยืนยันประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อทำความสะอาดจากผลการทดสอบสรุปได้ว่า สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ได้ดีแม้อยู่ในสภาวะที่ปนเปื้อนนมผงหรือเวย์โปรตีน สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกยังคงสามารถทำลายเชื้อ *W. cibaria* ได้หมดเพียงต้องเวลาที่มากขึ้น ดังจะเห็นได้จากความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำสุดของการทดสอบนี้ สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกยังคงความสามารถฆ่าเชื้อ *W. cibaria* ปริมาณ 6.89±0.02 log cfu/ml ได้โดยเชื้อถูกทำลายลงเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไป 1, 5, 10 และ 15 นาที ตามลำดับปริมาณ 1.81±0.02, 1.79±0.08, 1.25±0.05และ 1.05±0.02log cfu/ml ตามลำดับ และได้หมดในที่สุดที่เวลา 20 นาทีเป็นต้น

จากการทดสอบที่กล่าวมาข้างต้นทั้งหมดในทางปฏิบัติจริงปัจจุบันบริษัทแบ่งบรรจุนมผงแห่งนี้ได้ใช้สารฆ่าเชื้อกรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 15 นาทีซึ่งเป็นระยะการสัมผัสทำความสะอาดที่ค่อนข้างนานส่งเสริมให้สารฆ่าเชื้อกรดอะซิติกสัมผัสกับเชื้อได้มากขึ้น จึงสามารถควบคุมเชื้อให้คงเหลืออยู่ตามเกณฑ์ที่ยอมรับได้และเป็นไปตามเกณฑ์ตารางที่ 2.3 เชื้อเป้าหมายที่ยังเหลืออยู่บนพื้นที่ผิวสัมผัสกับอาหารหลังทำความสะอาดและฆ่าเชื้อของโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม (Griffith และ Dillon, 1999 และ สุวิมล, 2543)การทดสอบนี้จึงเป็นการทวนสอบความสามารถในการฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อและทำความสะอาดของโรงงานผลิตนมผงแบบแบ่งบรรจุบริษัทหนึ่งในเขตกรุงเทพมหานคร ซึ่งผลการทวนสอบสามารถฆ่าเชื้อได้จริง จึงแสดงให้เห็นว่าบริษัทตัวแทนแห่งนี้มีขั้นตอนการทำความสะอาดของโรงงานเป็นการล้างที่ถูกต้องและเหมาะสม การควบคุมการทำความสะอาดในสภาวะที่มีหรือไม่มีการปนเปื้อนนมสารฆ่าเชื้อและทำความสะอาดสามารถทำลายเชื้อลดลงให้ได้เมื่อผ่านไป 10 นาที ในส่วนจุดที่ตรวจสอบพบเชื้อหลังทำความสะอาดนั้นจำต้องระมัดระวังเป็นพิเศษอาจพัฒนาอุปกรณ์เครื่องจักรผลิตให้สามารถถอดชิ้นส่วนออกล้างหรือการออกแบบให้สารทำความสะอาดสามารถเข้าทำความสะอาดได้อย่างทั่วถึงช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อ *W. cibaria* ที่อาจติดค้างในท่อส่งนมระหว่างการผลิตได้รวมทั้งต้องทวนสอบความถูกต้องการทำความสะอาดเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่าจุดที่ 6 ท่อนอนยาวส่งนมเข้าผสม เป็นแหล่งปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ตามงานวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้ว ซึ่งจุดดังกล่าวจึงถือได้ว่าเป็นจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (critical control point) มีสาเหตุเกิดจากการทำความสะอาดไม่ทั่วถึงเนื่องจากอุปกรณ์ดังกล่าวไม่สามารถถอดออกมาล้างทำความสะอาดได้ ไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุดระบายผงนม ต้องมีการเฝ้าระวังทวนสอบเก็บตัวอย่างสวอปทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทุกครั้งหลังจากทำความสะอาดก่อนทำการผลิตใหม่ทุกครั้งเพื่อพิจารณาความเหมาะสมของการล้างตามสถาณการณ์ นอกจากนี้ในส่วนดังกล่าวจะต้องออกแบบที่ถูกต้องตามหลักสุขลักษณะเนื่องจากการวางท่อในลักษณะนี้เมื่อหยุดกระบวนการผลิต อาจทำให้เกิดการติดค้างของผลิตภัณฑ์ในท่อ แนวทางแก้ไขควรใช้คัปปลิ้งเชื่อมต่อท่อ (นวภัทรา, 2555) ทำให้สามารถถอดชิ้นส่วนประกอบต่างๆ เพื่อระบายของไหลที่ตกค้างออกและทำความสะอาดได้อย่างทั่วถึงป้องกันการสะสมของเชื้อแบคทีเรียในปริมาณมาก การทวนสอบจึงต้องเน้นในเรื่องการเลือกใช้สารเคมีทำความสะอาดพื้นผิวสัมผัสจึงแนะนำให้ใช้กรดเปอร์อะซิติกที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์จึงสามารถทำลายเชื้อ *W. cibaria*ได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่มีหรือไม่มีนมผงปนเปื้อน ไม่สลายตัวไม่เกิดสารพิษตกค้าง ปลอดภัยต่อผู้ใช้งานและผู้บริโภค สามารถตรวจสอบสารตกค้างได้โดยใช้ชุดทดสอบความเข้มข้นเปอร์ออกไซด์ซึ่งทำให้มั่นใจว่าไม่มีสารตกค้างหลงเหลือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นภา โล่ทอง, ธงชัย คัมภีร์, ชัยรัฒน์ คีตะจิตต์, วิเชียร ยามาฉิตชัยและพัชรี สุนทรนันท. 2538. **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ.** กรุงเทพ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นวภัทรา หนูนาค. 2555. **การออกแบบระบบผลิตอาหารเหลวพาสเจอร์ไรซ์ตามหลักสุขลักษณะ. สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร** คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปิยาณี จันท์ปัญญาศิลป์. 2542. **ประสิทธิภาพของสารประกอบคลอรีนร่วมกับกรดอินทรีย์ในการลดปริมาณ E.*coil* ในผักสด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 .**ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา เรื่องหลักเกณฑ์การทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโรคบนพื้นแข็งที่ไม่มีรูพรุนของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคชนิดของเหลว.** (ลงวันที่ 20 มีนาคม 2546).

ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก. 2532. **กรรมวิธีการแปรรูปอาหาร.** สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น. 2552. **สารฆ่าจุลชีพ ยาระงับเชื้อโรคและยาฆ่าเชื้อโรค.** ภาควิชาสัตว์แพทย์สาธารณสุข คณะสัตว์แพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง, วีนา กอบเจริญธรรม และอรนงค์ อดิศัยภารดี. 2547. **การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาข้างเหลืองกึ่งแห้งที่ใช้น้ำส้มสายชูในการยืดอายุการเก็บรักษา.** วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 12: 43-49

ศรวณีย์ รอดเที่ยง. 2542. **ผลของกรดต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาปลาสลิดเค็ม.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาคหกรรมศาสตร์ ภาควิชาคหกรรมศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวาพร ศิเวชช. 2535. **วัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร.** ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. หน้า 42-57.

สิรินันท์ ไทยตระกูลพาณิช, สิริมา สายรวมญาติ, พงษ์วัฒน์ ศรีงาน และกนกอร กรีเหลี่ยง. 2553. **อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรผสมสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ฆ่าเชื้อโรคด้วยวิธีเจือจางที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบปลอม.** วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 54 (3-4) :127-129.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุภาวดี ตั้งจิตร. 2543. **ผลของสารฆ่าเชื้อประเภทคลอรีนต่อการบาดเจ็บของ *S.* Typhimurium.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. หน้า 78-122. กรุงเทพฯ.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2547. **การสุขาภิบาลอาหาร.** มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. หน้า 91-130. กรุงเทพฯ.

สุวิมล กีรติพิบูล. 2543. **ระบบการจัดการและควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัย.** เล่ม 1 จัดทำโดยศูนย์โทรศึกษาและการฝึกอบรม สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น) หน้า 133.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2537.**ประกาศสาธารณสุข(ฉบับที่ 156) พ.ศ.2537 เรื่อง นมดัดแปลงสำหรับทารกและนมดัดแปลงสูตรต่อเนื่องสำหรับทารกและเด็กเล็ก.**กระทรวงสาธารณสุข.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2556.**ประกาศสาธารณสุข(ฉบับที่ 350) พ.ศ.2556 เรื่อง นมโค.** กระทรวงสาธารณสุข.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2548. **การศึกษาการยอมรับผลิตภัณฑ์แหนมที่ผลิตโดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน.** โครงการวิจัยเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2548 คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

AOAC/FDA (Association of Official Analytical Chemists/United States Food and Drug Administration). 2002. **Disinfectants. Association of official Analytical Chemists**, Arlinton.

Bachrouri, M., Quinto, E.J. and Morn, M.T.2002. "**Survival of Escherichia coil O157:H7 During Storage of Yoghurt at Different Temperatures**". Journal of Food Science. 65 : 1899-1903.

Badoni, M. and Gill, C. O. 2003. **Effects of storage under a modified atmosphere on the microbiological and organoleptic qualities of ground beef prepared from pasteurized manufacturing beef**. International Journal of Food Science and Technology. 38: 233-240.

Bae, Y. M., Baek, S. Y. and Lee, S. Y. 2011. **Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers**. School of Food Science and Technology. Chung-Ang Universit.

Bantar, C. E., Relloso, S., Castell, F. R., Smayevsky, J. and Bianchini, H.M. 1991. **Abscess caused by vancomycin - resistant *Listeria confusus***. Journal Clinical Microbiology. 29 : 2063–2064.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R. and Chamberlain, A. H. L. 1999. **Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces**. Applied and Environmental Microbiology. 1997 4543–4548.

Becker, H., El-Bassiony, T.A. and Terplan, G. 1989. **Incidance of *Bacillus* and other pathogen microorganism in infant food. Zentralblant der bakteriologie and Hygine.** 1989. 198-216.

Bell, C. and Kyriakides, A. 2002. *Salmonella* : **A Practical Approach to the Organism and Its Control in Food**. United Kingdom Blackwell Science. 2002. p 330.

Bhunia, A. K. 2008 . **Foodborne microbial pathogens**. 1st ed p.276 .Mechanisms and pathogenesis New York.USA: Spinger Science and Business Media.

Björkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B. and Holzapfel, W. H. 2002. **Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* detected in food and clinical samples**. Microbiology. 52: p 141–148.

Campagna, C., Villion, M., Labrie, S., Duchaine, C. and Moineau, S. 2013. **Inactivation of dairy bacteriophages by commercial sanitizers and disinfectants.** International Journal of Food Microbiology. 171. p 41-47.

Chichester, D.F. and Tanner, F.W. 1972. **Antimicrobial Food Additives**. In T.E. Furia (ed.). Handbook of Food Additive. The chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio. 1972. 115-184.

Codex Alimentarius Commission (CAC). 2008. **Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children. (Annex to CAC/RCP 66-2008. Rev.2 2008)**. Joint FAO/WHO Food Standard Program, FAO, Rome.

Collins, M. D., Samelis, J., Mataxapoulos, J.and Wallbanks, S. 1993. **Taxonomic studies on some *Leoconostoc* like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Listeria paramesenteroides*group of species.Applied and Environmental Microbiology**. 75 : 595–603.

Cord, B. R. and Dychdala, G. R. 1993. Sanitizers : **Halogens Surface active Agent and Peroxide**. Applied Dairy Microbiology. 1993. p. 467-537.

Cord, B. R., Dychdala, G. R., Richter, F. L., Marth, E. H. and Steele, J. L. 2001. **Cleaning and sanitizing in milk production and processing**. Applied Dairy Microbiology. USA. 2001. p 547–586.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott, H. M. 1995. **Microbial biofilms**. Annual Review of Microbiology. 1995. p 711–745.

Cristina, D. C. and Graham, C. F.. 2011. **Assessing manufacturers' recommended concentrations of commercial sanitizers on inactivation of *Listeria monocytogenes***. Food Control. 26: 194-199.

Davidson, P., Sofos, J. and Branen, A. 2005. **Antimicrobials in food**. Publish Taylor and Francis group. USA.

Dey, B. P., and Engley, F. B. 1995. **Comparison of Dey and Engley (D/E) Neutralizing Medium to Letheen Medium and Standard Methods Medium for recovery of *Staphylococcus aureus* from sanitized surfaces.** Journal Industrial Microbiology. 14:21-25.

Ecolab company. 2002. **Modified food contract sanitizer test efficacy of 0.3% Oxonia active against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *E.coli* ATCC 11229**. Microbiological services report. Brandon Hart Food & Beverage Division. USA. p. 1-3

EN 13610:2002. **Chemical disinfectants Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity against bacteriophages of chemical disinfectants used in food and industrial areas Test method and requirements (phase 2, step 1).** Geneva. Switzerland.

European Committee for Standardization (CEN), 2002. **Chemical disinfectants quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity against bacteriophages of chemical disinfectants used in food and industrial areas test method and requirements (phase 2, step 1)**. Reference number EN 13610:2002, Brussels, Belgium.

Facklam, R. and Elliott, J. A. 1995. **Identification classification and clinical relevance of catalase-negative, gram positive cocci, excluding the streptococci and enterococci**. clinical *Microbiology. Revise* 8 : 479–495.

Facklam, R., Hollis, D. and Collins, M. D. 1989. **Identificationof gram positive coccal and coccobacillary Vancomycin resistantbacteria**. Microbiology. 27 : 724–730.

Fairfax, M. R., Lephart, P. R. and Salimnia H. 2014. ***Weissella confusa*: problems with identification of an opportunistic pathogen that has been found in fermented foods and proposed as a probiotic**..Microbiol.volume 5 : 254..

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2004. ***Cronobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula**. Meeting report. Microbiological risk assessment series No. 6

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). 2004. ***Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula**. Meeting report. Microbiological risk assessment series No. 10.

Fernandes, R. 2009. **Micrology handbook**. In dairy products.1st ed., Vol. 1 p.175. Leatherhead. UK: Leatherhead Food Imternational Ltd.

Figueiredo, H. C. P., Costa, F. A. A., Leal, C. A. G., Carvalho-Castro, G. A. and Leite, R. C. 2011. ***Weissella* spp. outbreaks in commercial rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Brazil Laboratory of Aquatic Animal Diseases**. Federal University of Minas Gerais.

Flaherty, J. D., Levett, P. N., Dewhirst, F. E.,Troe, T. E.,Warren, J. R. and Johnson, S. 2003.**Fatal case of endocarditis due to *Weissella confusa***. Journal Clinical Microbiology. 41 : 2237–2239.

Frank, J. F., Ehlers, J. and Wicker, L. 2003. **Removal and disinfection of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agent under static conditions**. Food Protection Trands. 2003. 654–663.

Frank, J. K. and Koffi, R. A. 1990. **Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat**. Journal of Food Protection. 1990. 550–554.

Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D. and Neve, H. 2015. **The genus *Weissella*: taxonomy, ecologyand biotechnological potential**. Microbiology. 6 : 155.

Garbutt, J. 1997. **Essentials of Food Microbiology**. p 54-78. Arnold. London.

Gaulin,C., Shum, M. and Fong, D. 2011. **Disinfectants and Sanitizers for Use on Food Contact Surfaces**. Evidence Review. National Collaborating Centre for Environmental.

Gelinas, P., Goulet, J., Tastayre, G.M. and Picard, G.A. 1983. **Effect of Temperature and Contact Time on the Activity of Eight Disinfectants a Classification**. Journal of Food Protection. Vol. 47. No. 11. pp. 841-847.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gibson, H., Sinclair, L.A., Brizuela, C.M.,Worton, H.L., Protheroe, R.G., 2008. **Effectiveness of selected premilking teat-cleaning regimes in reducing teat microbial load on commercial dairy farms**.Applied. Microbial. 46, 295–300.

Green, M., Barbadora, K. and Michaels, M. 1991. **Recovery of vancomycin- resistantgram positive cocci from pediatric liver transplant recipients. Journal of Food Microbiology**. 29. 2503–2506.

Green, M.,Wadowsky, R. M. and Barbadora, K. 1990. **Recovery of vancomycin- resistantgram-positive cocci from children**. Journal of Food Microbiology. 28. 484–488.

Griffith, C and Dillon, M. 1999. **How to clean.** M.D. Associates. UK.

Gruetzmacher, T. J and Bradley, R. L. 1999. **Identification and control of processing variables that affect the quality and safety of fluid milk.** Journal of food Protection. 62 : 625-631.

Harlan, N. P., Kempker, R. R., Parekh, S. M., Burd, E. M. and Kuhar, D. T. 2011. ***Weissella confusa* bacteremia in a liver transplant patient with hepatic artery thrombosis**. Journal of Food Microbiology. 13: 290–293.

Hilgren, J. D. and Salverda, J. A. 2000. **Antimicrobial efficacy of a peroxyacetic/octanoic acid mixture in fresh-cut-vegetable process waters.** Food Science. 65: 1376–1379.

Ito, K. A. and Seeger, M. L. 1980. **Effect of Genmicide on Microorganism in Can Cooling Water**. Journal of Food Protection. Vol. 43. p.484-487.

Iturriaga, M. H., Tamplin, M. L. and Escartin, E. F. 2007. **Colonization of tomatoes by *Salmonella* Montevideo is affected by relative humidity and storage temperature**. Journal of Food Protection. 2007. 30–34.

Jeong, D. W. and Lee, J. H. 2015. **Antibiotic resistance hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter**. Food Science and Technology. Korea. 2015. 443-760.

Jin, L., Tao, L., Pavlova, S. I., So, J. S., Kiwanuka, N. and Namukwaya, Z. 2007. **Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea**. Journal of Microbiology. 2007.1107–1115.

Joseph, S. and Forsythe, S. 2011. **Association of *Cronobater sakazakii* ST4 with neonatal infections.** Emerging Infective Disease. 17 (9): 1713-1715.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kamboj, K., Vasquez, A. and Balada, M. B. 2015. **Identification and significance of *Weissella* species infections.** Clinical Microbiology Laboratory. Department of Pathology. The Ohio State University.

Kest, S.E. and Marth, E.H. 1988. **Inactivation of Listeria monocytogenes by Chlorine**. Journal of Food Protection. Vol.51. pp.520-524.

Kim, H., Bang, J., Beuchat, L. R. and Ryu, J. H. 2008. **Fate of *Cronobater.sakazakii* attached to or in biofilms on stainless steel upon exposure to various temperatures or relative humidifies.** Journal of Food Protection. 2008. 940–945.

Kitis, M. 2004. **Disinfection of wastewater with peracetic acid**: a review. Environ Int. 30: 47–55.

Kulwichit, W., Nilgate, S., Chatsuwan, T., Krajiw, S., Unhasuta, C. and Chongthaleong, A. 2000. **Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: acomparison of API systems and conventional phenotypic assays**. BMC Infective. Disease. *2000.*7-69.

Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H. and Uchiyama, H. 2008. **Biofilm Formation by LacticAcid Bacteria and Resistance to Environmental Stress.** Journal of Bioscience and Bioengineering. vol. 106. No. 4: 381–386.

Kumar, A. D., Sudhindran, S., Kurian, A.M., Dinesh, K. R. and Karim, S. 2011. ***W.confuse* : ara cause of vancomycin- resistant Gram-positive bacteraemia.** Journal of Microbiology. 60: 1539-1541.

Kumar C. G. and Anand S. K. 1998. **Significance of microbial biofilms in food industry: a review.** International Journal of Microbiology. 42: 9–27.

Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C. and Beumer, R. R. 2003. **Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods.** International Journal of Microbiology. 2003. 227–236.

Lahtinen, S.,Ouweh, A., Salminen, A. C. and Von, W. A. 2012. **Lactic Acid Bacteria**. Microbiological and Functional A spects, 4th. Boca Raton,FL: CRCPress; Taylor and Francis.

Lee, K. W., Park, J. Y., Jeong, H. R., Heo, H. J., Han, N. S. and Kim, J. H. 2011. **Probiotic properties of *Weissella*strains isolated from human faeces**. Division of Applied Life Science .Gyeongsang National University.

Maillard, J. Y., Beggs, T. S., Day, M. J., Hudson, R. A. and Russell, A. D. 1994. **Effect of biocides on MS2 and phages**. Applied. Environmental *Microbiology.*60 : 2205–2206.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Marriott, G. N. and Gravani, B. R. 2006. **Principles of Food sanitiation, 5th ED**.United States of America. 2006. p 141-297.

McDonnell, G. E. 2007. **Antisepsis Disinfection and Sterilization: Types Action and Resistance**. ASTM Press. Washington D.C.

Medford, R., Patel, S. N. and Evans, G. A. 2014 . **A confusing case-*Weissella confusa* prosthetic joint infection a case report and review of the literature.** Journal Infection Disease Medical Microbiology. 25 : 173-175.

Mercanti, D. J., Guglielmotti, D. M., Patrignani, F., Reinheimer, J. A., Quiberoni, A. 2012. **Resistance of two temperate *Lactobacillus paracasei* bacteriophages to high pressure homogenization, thermal treatments and chemical biocides of industrial application**. Food Microbiol. 29:99–104.

Michigan State University and Global Food Safety Initiative licensed using Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported (CC-BY-SA). 2012. **Source: Global Food Safety Initiative and Michigan State University, original at http://www.fskntraining.org, licensed using Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported.** 2009.Microbiological risk assessment Series 10.

Muytjens, H. L., Roelofs, W. H. and Jaspar, G. H. 1988. **Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae***. Journal Clinical Microbiology. 26: 743-746.

Norwood, D. E. and Gilmour, A. 2000. **The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm**. Journal of Applied Microbiology. 512–520.

OECD SIDS.2006. **Sodium percarbonate (CAS number: 15630-89-4). SIDS Initial Assessment Report** For SIAM 20. Screening Information Data Set (SIDS).United Nations.

Olano, A., Chua, J., Schroeder, S., Minari, A., LaSalvia, M. and Hall, G. 2001. ***Weissella confusa* (basonym: *Listeria confusus*) bacteremia:a casereport**. Journal Clinical Microbiology. 39:1604–1607.

Orth, R. 1998. **The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage production.** International Biodeterioration and Biodegradation. 41: 201-208.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Park, D. L., Rua, S. M. and Acker, A. 1991. **Direct Application of New Hypochlorite Sanitizer for Reducing Bacterial Contamination on food**. Joumal of Protection. 54 : 960-965.

Rabello, R. F., Lopes, B. M., Riley, R. M. and Castro, A. C. 2007. **Multilocus sequence typing of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cows with mastitis in Brazilian dairy herds.** Journal of Medical Microbiology. 56:1505-1511.

Ryu, J. H. and Beuchat, L. R. 2005. **Biofilm formation by *E. coli* O157:H7 on stainless steel: effect of expolysaccharide and production on its resistance to chlorine**. Applied and Environmental Microbiology. 2005. 247–254.

Salimnia, H., Alangaden, G. J., Bharadwaj, R., Painter, T. M., Chandrasekar, P. H. and Fairfax, M. R. 2011. ***Weissella confusa*: an unexpected cause of vancomycin-resistantgram-positive bacteremia in immune com promised hosts**. Infective Disease. 13. 294–298.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. **Lactic Acid Bacteria**. New York : Marcel Dekker Inc.

Sani, N. A., Hartantyo, S. H. P. and Forsythef, S. J. 2013. **Microbiological Assessment And Evaluation of Rehydration Instructions on Powdered Infant Formulas, Follow-up Formulas and Infant Foods in Malaysia.** Science Programme. Faculty of Science and Technology.Universiti Kebangsaan Malaysia.

Sanz, Y., Sánchez, E., Marzotto, M., Calabuig, M., Torriani, S. and Dellaglio, F. 2007 . **Differences in faecal bacterial communities in celiac and healthy childrenas detected by PCR and denaturing gradient electrophoresis**. Medicine Microbiology. 51. 562–568.

Schelin, J., Walilin, N., Barker, G. C. and Radstrom, P. 2011. **The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environment and advance in risk assessment.** Virulance 2: 580-592.

Shalaby, A. R. 1996. **Signifcance of biogenic amines to food safety and human health.** Food Research International. 29:675-690.

Shin, J. H., Kim, D. I., Kim, H. R., Kim, D. S., Kook, J. K. and Lee, J. N. 2007. **Severe infective endocarditis of native valves caused by *Weissella confusa* detected incidentally on electrocardio graphy**. Journal Infecive. 54. 49–151.

Spanu, V., Scarano, C., Virdis, S., Melito, S. and Spanu, C. 2013. **Population structure of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank goat's milk**. Foodborne Pathogens and Disease. 10 : 310-315.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sutton, S. V. W., Proud, D. W., Rachui , S. and Brannan, D. K. 2002. **Validation of microbial recovery from disinfectants.** PDA J Pharm Sci Technol. 56(5) : 255-66.

Svec, P., Sevcíková, A., Sedlácek, I., Bednárová, J., Cindy, S. C. and Lefebvre, K. 2007. **Identification of lactic acid bacteria isolated from human blood cultures**. Medicine Microbiology. 49. 192–196.

Townsend, S. and Forsythe, S. J. 2008. **The neonatal intestinal microbial flora, immunity, and infections.** ***Enterobacter sakazakii.*** ASM Press,Washington.

Tudela, E., Croize, J., Lagier, A., and Mallaret, M. R. 2008. **Micobiological monitoring of milk samples and surface samples in a hospital infant formula room (original article in French).** Pathol. Biol. (Paris). 56(5) : 272-278.

Tuomola, E, Crittenden, R, Playne, M, Isolauri, E, Salminen, S. 2001. **Quality assurance criteria for probiotic bacteria**. Journal Clinical Microbiology. 73 page 383

US FDA. 2012. **Indirect food additives: adjuvants, production aids, and sanitizers.** Code of Federal Regulations. Title 21vol. 3 p.21(CFR178.1010).

Vasquez, A., Pancholi, P. and Balada, J. M. 2015. **Photoquiz:confusing bacteremia in a Crohn's disease patient.** Journal Clinical Microbiology. 53-759.

Vela, A.I., Porrero, C., Goyache, J., Nieto, A., Sánchez, B., Briones, V. 2003. ***Weissella confusa* Infection in Primate (*Cercopithecusmona*)**. Emerging Infection.volume9 : 1307–1309.

Vogel, B. F., Hansen, L. T., Mordhorst, H. and Gram, L. 2010. **The survival of *Listeriamonocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material.** International Journal of Food Microbiology. 2010. 192–200.

Wei, C. I., Cook, D. L. and Kirk, J. R. 1985. **Use of Chlorine Compounds in the Food Industry**. Food Technology. Vol. 39. No.1. pp. 107-115.

World Health Organization (WHO). 2007. **Safe preparation, storage and handling of powdered infant formula guidelines.**http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pif2007/en/index.html.

Wyman, D. P. 1996. **Understanding active chlorine chemistry**. Food Quality. 2 : 18-77.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase (Tryptic) Soy Agar (TSA)

Trypticase peptone	15.0	g
Phyto peptone	5.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	15.0	g
น้ำกลั่น	1.0	L

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปต้มเดือดและปั่นบน Hot plate stirrer จนอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วัดค่า pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)pH 7.3±0.2แบ่งใส่หลอดทดลอง หรือบรรจุใส่ขวดตามปริมาตรที่เหมาะสม นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. Trypticase (Tryptic) Soy Broth (TSB)

Trypticase peptone	17.0	g
Phytone peptone	3.0	g
D(+)glucose	2.5	g
Sodium chloride	5.0	g
Di-potassium hydrogen phosphate	2.5	g
น้ำกลั่น	1.0	L

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปต้มเดือดและปั่นบน Hot plate stirrer จนอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วัดค่า pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl)pH 7.3±0.2 แบ่งใส่หลอดทดลอง หรือบรรจุใส่ขวดตามปริมาตรที่เหมาะสม นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. De Man Rogosa and Sharpe (MRS) Broth

Peptone	10.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Di-potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Di-ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121^{o}C เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัมแต่ถ้าเตรียมเป็น MRS solf agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 0.5 กรัม

4. Plate count Agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCAและเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปต้มเดือดและปั่นบน Hot plate stirrer จนอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกันวัด pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl) pH 7.0±0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclaveที่อุณหภูมิ121^{o}C เป็นเวลา 15 นาที

5.Baird–Parker Agar Medium (BP)

Tryptone	10.0	กรัม
Meat extract	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Sodium pyruvate	10.0	กรัมg
Glycine	12.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lithium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	950	มิลลิลติร

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ BP และเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปปั่นและต้มเดือดบน Hot plate stirrer จนอาหารหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วัด pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl) pH 6.8±0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ121°C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้งานนำขวดบรรจุอาหาร BP ไปต้มที่อุณหภูมิ 90-100°C จนละลาย แล้วนำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 45±1°C เติม Egg yolk tellurite emulsion 50 ml. ลงใน melted base ปริมาตร 950 ml. แล้วผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน(พยายามไม่ให้เกิดฟอง)

6. Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)

Yeast Extract	3.0	กรัม
Peptone	7.0	กรัม
Bile Salt	1.5	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Neutral Red	0.03	กรัม
Crystal Violet	2.0	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBG และเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปต้มเดือดและปั่นบน Hot plate stirrer จนอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกันไม่ต้องฆ่าเชื้อด้วย Autoclaveทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิห้องใช้เทสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ลงใน Sterile petri dish ประมาณ 12-15 ml

7. Chromoginic Enterobacter Sakazakii Agar (CES)

Tryptone	15.0	กรัม
Soya peptone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	1.0	กรัม
Sodium desoxycholate	1.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sodium thiosulphate	1.0	กรัม
Chromogen	0.1	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ CESและเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปต้มเดือดและปั่นบน Hot plate stirrer จนอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกันวัด pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl) pH 7.3±0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclaveที่อุณหภูมิ121°C เป็นเวลา 15 นาที

8. Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar(MYP)

Meat extract	1.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Mannitol	10.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
Phenol Red	0.025	กรัม
Agar	12.0	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MYPและเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปต้มเดือดและปั่นบน Hot plate stirrer จนอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกันวัด pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl) pH 7.3±0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ121°C เป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำมาใช้งานนำอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar แช่ใน water bath รอจนได้อุณหภูมิประมาณ 45±1°C เติม sterile Egg Yolk emulsion 50% 50 ml และเติม Polymyxin B sulfate 1 vial แล้วผสมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันเทสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ลงใน sterile dish ประมาณ 12-15 ml

9. **Modified Lauryl sulfate Tryptone (mLST)**

Tryptose	20.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Di-potassium Phosphate	2.75	กรัม
Tri-potassium Phosphate	2.75	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Sodium Lauryl Sulfate	0.1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ LST และเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปปั่นด้วย Hot plate stirrer จนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน วัด pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl) pH 6.8±0.2 บรรจุใส่หลอดทดลองขนาด 16 x150 mm ที่มี Durham's tube หลอดละ 10 mlนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

10. Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar (YGC)

Yeast Extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Chloramphenicol	0.1	กรัม
Agar	13.0	กรัม

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ YGCและเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุ นำไปต้มเดือดและปั่นบน Hot plate stirrer จนอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมละลายเป็นเนื้อเดียวกันวัด pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl) pH 6.6±0.2 นำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclaveที่อุณหภูมิ121°C เป็นเวลา 15 นาที

11. D/E Neutralizing Broth

Enzymatic Digest of Casein	5.0	กรัม
Polysorbate 80	5.0	กรัม
Yeast Extract	2.5	กรัม
Dextrose	10.0	กรัม
Sodium Thioglycollate	1.0	กรัม
Sodium Thiosulfate	6.0	กรัม
Sodium Bisulfite	2.5	กรัม
Lecithin	7.0	กรัม
Bromcresol Purple	0.02	กรัม

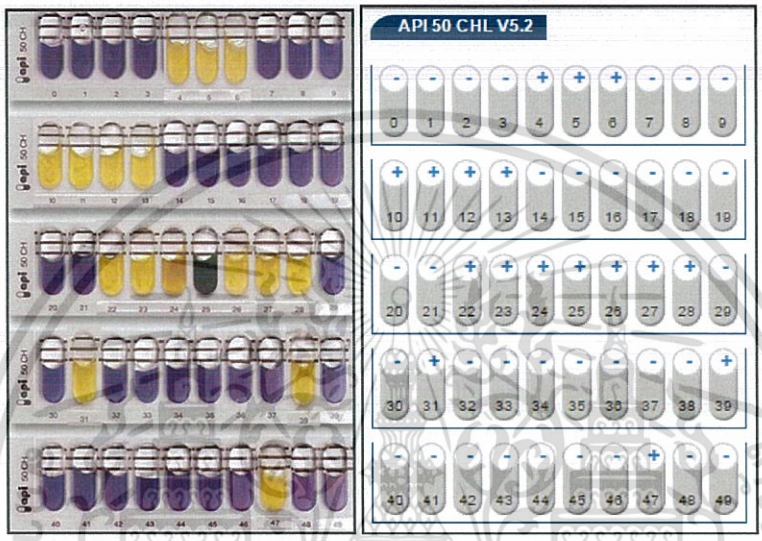
ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ D/E Neutralizing Broth และเติมน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดไว้ที่ข้างภาชนะบรรจุนำไปปั่นด้วย Hot plate stirrer จนเป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน วัด pH (ปรับด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl) pH 7.3±0.2 บรรจุใส่หลอดทดลองขนาด 16 x150 mm ที่มี Durham's tube หลอดละ 10 mlนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

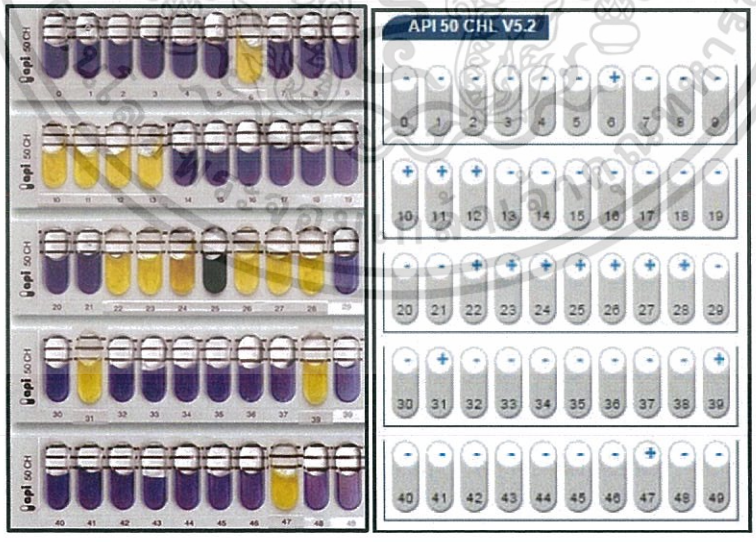
ภาคผนวก ข

การตรวจวิเคราะห์เชื้อ

1.การทดสอบทางชีวเคมี โดยชุดทดสอบ API®50 CHL



ภาพที่ ข-1 แสดงการอ่านผลปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อที่เก็บก่อนการทำความสะอาด



ภาพที่ ข-2 แสดงการอ่านผลปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อที่เก็บหลังการทำความสะอาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.ผล16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ EN1 ที่เก็บก่อนทำความสะอาด

> EN1

99% identities Weissella cibaria strain CH2, complete genome Sequence ID: gb|CP012873.1|

Range 1: 344083 to 344609GenBankGraphicsNext MatchPrevious Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
955 bits(517)	0.0	524/527(99%)	2/527(0%)	Plus/Plus

```
Query  6       TTCTGGT-AGATACCGTCACACATTGAACAGTTACTCTCAATGTCATTCTTCTCTTACAA  64
               ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344083  TTCTGGTAAGATACCGTCACACATTGAACAGTTACTCTCAATGTCATTCTTCTCTTACAA  344142

Query  65      CAGTGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCG  124
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344143  CAGTGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCG  344202

Query  125     CCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCC  184
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344203  CCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCC  344262

Query  185     CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGTCTTGGTGAGCCATTACC  244
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344263  CATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGTCTTGGTGAGCCATTACC  344322

Query  245     TCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGCAGAACCATCTTTTAA  304
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344323  TCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGCAGAACCATCTTTTAA  344382

Query  305     GTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCC  364
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344383  GTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTATACGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCC  344442

Query  365     CCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTCTTTGCAATGTCC  424
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344443  CCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTCTTTGCAATGTCC  344502

Query  425     ATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACAAAGCGTTCGACTTGCATG  484
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344503  ATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACAAAGCGTTCGACTTGCATG  344562

Query  485     TATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGTTCAAAC-CTC  530
               ||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||| |||
Sbjct  344563  TATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAGGATCAAACTCTC  344609
```

ภาพที่ ข-3 ผล16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ EN1 ตัวอย่างเชื้อเก็บก่อนทำความสะอาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ผล16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ EN2 ที่เก็บหลังทำความสะอาด

>EN-2
94% Weissella cibaria gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: 1201
Sequence ID: dbj|AB593341.1|

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
776 bits(420)	0.0	496/530(94%)	16/530(3%)	Plus/Minus

```
Query  7    TTCT-GTATGATACCGTCACACGTTGTAACAGTTACTCTCTACTCGCACAGTTTCCTTTC  65
            |||| ||| |||||||||||||| ||| |||||||||||||| | | |  ||  || | |||
Sbjct  531  TTCTGGTAAGATACCGTCACACATTG-AACAGTTACTCTC-AAT-G-TCA--TT-C-TTC  480

Query  66   TCTTACAACAGTAGTCTTTACGAGCCGAAACCCTTCATTCCACATCCAACGCGGCGTTGC  125
            |||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||  ||||  | ||||||||||||
Sbjct  479  TCTTACAACAGT-GT-TTTACGAGCCGAAACCCTTCAT--CACA--C-ACGCGGCGTTGC  427

Query  126  TCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGG  185
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  426  TCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGG  367

Query  186  GCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCACCCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGTCT  245
            |||||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  366  GCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGTCT  307

Query  246  TGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGC  305
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  306  TGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGGGACCATCTCTTAGTGATAGC  247

Query  306  AGAACCATCTTTTAAATAACAACCATGCGGTTGCTATTGTTATACGGTATTAGCATCTGT  365
            |||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  246  AGAACCATCTTTTAAGTAGCAACCATGCGGTTGCTATTGTTATACGGTATTAGCATCTGT  187

Query  366  TTCCAAGTGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCA  425
            |||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  186  TTCCAAATGTTATCCCCTGCTAAGAGGTAGGTTTCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCA  127

Query  426  CTCTTTGCAAGGTCCATCCTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAATTGAACCACATAC  485
            |||||||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||| |
Sbjct  126  CTCTTTGCAATGTCCATCGTCATATCTGAGCAAGCTCTTCAAATCAGTTGAACCACAAAG  67

Query  486  CGTTCAACTTGCAGGTATTAGGCACGCCGCCGGCGTTCATCCTGACCCAG  535
            ||||| ||||||| |||||||||||||||| |||||||||||||| ||||
Sbjct  66   CGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCATCCTGAGCCAG  17
```

ภาพที่ ข-4 ผล16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ EN2 ตัวอย่างเชื้อเก็บหลังทำความสะอาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการตรวจวิเคราะห์

1.การวัดค่าความเป็นกรดด่างโดยเครื่องวัดพีเอช (pH)

- ก่อนการใช้งานเครื่องวัดพีเอชต้องทำการสอบเทียบ (calibrate) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน Buffer Solution pH 4.01, pH 7.00 และ pH 9.21

- ใช้น้ำกลั่นล้างปลายแท่ง (probe electrode)แล้วเช็คในแห้งด้วยกระดาษชำระนุ่มจุ่มลงในสารละลายที่ต้องการวัดค่า pH

- กดปุ่ม Read เครื่องจะทำการอ่านค่า โดยหน้าจอด้านขวาจะมีสัญญาลักษณ์ "A" กระพริบอยู่ตลอดเวลา ขณะที่เครื่องกำลังทำการอ่านค่า เครื่องจะหยุดทำการอ่านให้อัตโนมัติเมื่อถึงจุดยุติ โดยที่หน้าจอสัญญาลักษณ์ "A" จะหยุดกระพริบ และแสดงสัญญาลักษณ์ /A หน้าจอจะได้ค่าpH ของสารละลาย

- ก่อนและหลังนำ Electrode จุ่มวัดค่า pH สารละลายใด ต้องล้างส่วนปลายของ Electrode ที่จุ่มสารละลายนั้นด้วยน้ำกลั่น โดยฉีดล้างให้สะอาดหลายๆครั้ง และซับด้วยกระดาษชำระนุ่มให้แห้ง (Electrode ต้องแช่ในน้ำกลั่นตลอดเวลาระหว่างใช้งานและหลังจากใช้งานประจำวันให้แช่แท่งprobe electrode ด้วย3 M KCl ให้ท่วมหัว Electrode

2.การวัดความเข้มข้นของสารละลายกรดเปอร์อะซิติก ชื่อทางการค้า Oxonia active

- เติมน้ำยาอ๊อกโซเนีย แอคทีฟ (Oxonia active, Ecolab, USA)ลงในหลอดทดลองปริมาณ 5 มิลลิลิตร

- เติมกรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) 28 เปอร์เซ็นต์ลงไป 10 หยด

- ไตรเตรทด้วย สารละลายโพเทสเซียมเปอร์แมงกาเนส (potassiumpermanganate) 0.1 นอร์มอลทีละหยด จากนั้นเขย่าให้เข้ากันสังเกตสีของสารละลายค่อยๆเปลี่ยนจากใสไม่มีสี เป็นสีชมพู จึงหยุด บันทึกจำนวนหยดที่ใช้ไตเตรท

- หยดสารละลายโพแทสเซียมไอโอดีน(potassium iodine) 10% จำนวน 10 หยดอย่างรวดเร็ว แล้วเขย่าให้เข้ากัน

- เติม Starch Indicator 2.0% จำนวน 5 หยด แล้วเขย่าให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ไตรเตรทต่อด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) 0.05 นอร์มอล ทีละหยด จากนั้นเขย่าให้เข้ากันสังเกตสีของสารละลายค่อยๆเปลี่ยนจากสีน้ำเงินหรือสีดำ เป็นใสไม่มีสี จึงหยุด บันทึกจำนวนหยดที่ใช้ไตเตรท

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของน้ำยาน้ำยาอ๊อกโซเนีย

% Peracetic acid = จำนวนหยดของสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต 0.05 นอร์มอล x 0.04

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางนุชนาถ เมืองเพ็ชร
วัน เดือน ปีเกิด	18 ธันวาคม 2526
ที่อยู่ปัจจุบัน	136/7 ถนนริมทางรถไฟเก่า เขตบางนา แขวงบางนา กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	2548 วท.บ. (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	
พ.ศ.2558-ปัจจุบัน	ตำแหน่งตัวแทนฝ่ายบริหารด้านคุณภาพ(QMR)
พ.ศ.2558-2556	ตำแหน่งหัวหน้าแผนกประกันคุณภาพ(QA)
พ.ศ.2556-2551	ตำแหน่ง Micro Technician บริษัท Newly Weds Foods Co.,LTD
พ.ศ.2551-2548	ตำแหน่งนักวิเคราะห์ทางจุลชีวะ บริษัท แหลมทองสหการ จำกัด
ผลงานวิจัยที่เผยแพร่	นุชนาถ เมืองเพ็ชร อดิศร เสวตวิวัฒน์ อพัชชา จินดาประเสริฐ และกิตติชัย บรรจง. 2560. Contamination of infant milk powder production equipment with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during pre and post cleaning step. หน้า 796-803. ในงานประชุมระดับนานาชาติ Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017) ครั้งที่ 19. กรุงเทพ : ไบเทคบางนา.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้