สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3

การยับยั้ง Salmonella ที่แยกได้จากไข่ผง โดยใช้ไนซินร่วมกับ EDTA

นางสาวกุลวดี ทองภูเบศร์
นางสาวสุธารัตน์ เอื้อเกียรติพงศ์
นางสาวอุไรลักษณ์ ทองดี

ปฟ.
ก728ก
2536

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

.b15537688

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2536

Inactivation of *Salmonella* Isolated from Dried Egg by Using Nisin Incombination with EDTA

Miss Kulwadee Tongpubesra

Miss Sutarat Uakiattipong

Miss Urailak Thongdee

Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1993

โครงงานพิเศษ การยับยั้ง Salmonella ที่แยกได้จากไข่ผง โดยใช้ไนซินร่วมกับ EDTA

โดย นางสาว กุลวดี ทองภูเบศร์

นางสาว สุธารัตน์ เอื้อเกียรติพงศ์

นางสาว อุไรลักษณ์ ทองดี

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ สุรีย์ นานาสมบัติ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2536

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาค

(อ.อุ่นเรือน คิริวานิชกุล)

คณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ

(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

_____ กรรมการ

(อาจารย์ สุรีย์ นานาสมบัติ)

_____ กรรมการ

(อาจารย์ วิไลพัฒ สุทธิชุ่น)

บทคัดย่อ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษ การยับยั้ง Salmonella ที่แยกได้จากไข่ผง โดยใช้ไนซินร่วมกับ EDTA
โดย นางสาว กุลวดี ทองภูเขศร์
นางสาว สุธารัตน์ เอื้อเกียรติพงศ์
นางสาว อุไรลักษณ์ ทองดี
อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ สุรีย์ นานาสมบัติ
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2536

บทคัดย่อ

การทดลองในครั้งนี้ ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของการใช้ไนซินร่วมกับ EDTA ในการยับยั้ง Salmonella ที่แยกได้จากไข่ผง ในขั้นแรกได้ทำการสุ่มตัวอย่าง ไข่เหลว ไข่แดง ไข่ขาวผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่ ชนิดละ 40 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อและจำแนกชนิดของ Salmonella ซึ่งปรากฏว่า พบ Salmonella ทั้งหมด 2 ชนิด คือ Salmonella mbandaka พบในไข่เหลวร้อยละ 2.5 และ Salmonella singapore พบในไข่แดงผง ร้อยละ 2.5 และพบในเปลือกไข่ร้อยละ 2.5 จากนั้นได้ทำการคัดเลือกเอา Salmonella singapore ที่แยกได้จากไข่แดงผงมาทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณของไนซินและ EDTA ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้ง Salmonella singapore

สำหรับการตรวจหาปริมาณไนซินและ EDTA ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้ง Salmonella singapore ได้ทดลองใช้ไนซินและ EDTA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กันพบว่า ในซินความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ในเซลล์บัฟเฟอร์ โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง Salmonella singapore มากที่สุด คือสามารถลดปริมาณ Salmonella singapore ลงได้ 6.43 และ 6.32 log cycle ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

Special Project Title	Inactivation of *Salmonella* Isolateed from Dried Egg by Using Nisin Incombination with EDTA
Name	Miss Kulwadee Tongpubesra
	Miss Sutarat Uakiattipong
	Miss Urailak Thongdee
Special Project Adviser	Miss Suree Nanasombat
Department	Applied Biology
Academic Year	1993

Abstract

In this study, efficiency of nisin in combination with chelating agent EDTA for inactivating *Salmonella* isolated from dried egg was investigated. To detect and identify *Salmonella*, 40 samples of liquid egg,dried egg yolk, dried egg white, dried whole egg and egg shell were each collected. The results indicated that two types of *Salmonella* were found. One of them was *Salmonella mbandaka* isolated from 2.5 % of 40 liquid egg samples. The other was *Salmonella singapore* isolated from 2.5 % of 40 dried egg yolk samples and 2.5 % of egg shell samples. Based on these results, *S. singapore* isolated from dried egg yolk was then chosen for determining the most suitable concentration of nisin and EDTA.

According to this study, various concentration levels of nisin and EDTA were used to inactivate *S. singapore*. It was found that the most suitable concentration of nisin were 50 and 100 µg/ml in combination with 20 mM EDTA in cell buffer. After a 1-h exposure to 50 µg/ml nisin/20 mM EDTA and100 µg/ml nisin/20 mM EDTA, 8.23 and 8.22 log-

cycle reduction in S. singapore populations were observed. The log reduction of S. singapore populations at these two concentration levels of nisin was not significantly different among each other.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งการดำเนินการจะไม่สามารถเสร็จสมบูรณ์ได้ หากไม่ได้รับคำแนะนำและตรวจแก้ไขจากผู้ทรงคุณวุฒิหลายท่าน ในการนี้คณะผู้จัดทำต้องขอขอบคุณ อาจารย์สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ได้ให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางใน การแก้ไขปัญหาและเอาใจใส่คณะผู้จัดทำตลอดการดำเนินงาน ทั้งในส่วนของการทดลองและการทำรายงาน คณะผู้จัดทำขอขอบคุณบริษัท ผลิตภัณฑ์ไข่แปดริ้ว จำกัด ที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่างไข่ผง ขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่กรุณาตรวจวิเคราะห์ Salmonella ในระดับ serological test และจำแนกสปีซีส์ให้ นอกจากนั้นยังได้เอื้อเฟื้อข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการตรวจวิเคราะห์และจำแนก Salmonella ขอขอบคุณคณะกรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการทำโครงงานพิเศษนี้ ขอขอบคุณ คุณพวงมาลี ทองภูเบศร์ที่ได้ให้การสนับสนุนอย่างเต็มที่ทั้ง กำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์มาโดยตลอด และที่จะลืมขอบคุณไม่ได้คือ พี่พยอม พี่สมบูรณ์ เพื่อนๆ น้องๆ และคุณพ่อ คุณแม่ของผู้จัดทำ รวมถึงผู้ที่ไม่ถูกกล่าวนามทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยเหลือให้โครงงานพิเศษนี้ เสร็จสมบูรณ์ลงด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

18 มีนาคม 2537

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 การดำเนินการทดลอง	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	35
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	49
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและเซลล์บัฟเฟอร์	50
ภาคผนวก ข การทดสอบเพื่อจำแนกชนิดของ Salmonella	53
ภาคผนวก ค การหา doubling time ของ Salmonella singapore และ การทำกราฟมาตรฐานของ Salmonella singapore	56
ภาคผนวก ง ตารางเทียบค่าสถิติ	61
เอกสารอ้างอิง	70

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของไข่	4
2	ปริมาณวัตถุแห้งในไข่ไก่	5
3	ปริมาณโปรตีนในส่วนต่าง ๆ ของไข่	6
4	ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในเปลือกไข่ไก่สะอาดและเปลือกไข่ไก่สกปรก	14
5	เปอร์เซนต์ของโรคที่แสดงออกในคนที่เป็นโรค Salmonellosis	22
6	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อที่ให้ผลบวกบนอาหาร XLD Agar และ BGA ซึ่งแยกได้จาก ไข่ขาว ไข่เหลว ไข่แดงผง และเปลือกไข่	35
7	จำนวนเชื้อที่ให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI และ LIM	37
8	จำนวนเชื้อ Salmonella ที่แยกได้จาก ไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่	38
9	ชนิดของ Salmonella 3 ไอโซเลตซึ่งแยกได้จาก ไข่เหลว ไข่แดงผง และเปลือกไข่	39
10	ปฏิกิริยาการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ S. singapore กับ S. mbandaka	40
11	การเปรียบเทียบจำนวน S. singapore ก่อนและหลังเติมไนซินที่ความเข้มข้นต่างๆ	41
12	analysis of variance ของประสิทธิภาพในการยับยั้ง S. singapore	45
13	ผลการเปรียบเทียบค่าลอการิทึมเฉลี่ยของจำนวน S. singapore ที่ลดลงหลังจากเติมไนซินและEDTA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน โดยใช้ DMRT 5%	46
14	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ S. singapore ใน BHI broth กับเวลาในการเจริญ	57
15	ความสัมพันธ์ระหว่างoptical density กับจำนวน S. singapore	59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของไข่	3
2	โครงสร้างผนังเซลล์แบคทีเรีย	17
3	ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ	18
4	การติดต่อของโรค Salmonellosis	19
5	โครงสร้างของไนซิน	25
6	โครงสร้างของกรดอะมิโนที่ไม่พบบ่อยนัก ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไนซิน	26
7	การทำงานของไนซินและสารถนอมอาหารอื่น ๆ ในขณะที่สปอร์งอก	27
8	อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และไข่ขาวผง	32
9	ขั้นตอนในการตรวจหาและจำแนกชนิด Sallmonella ในผลิตภัณฑ์ไข่	33
10	Salmonella ในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD Agar	41
11	Salmonella ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar	41
12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของจำนวนSalmonella ที่ลดลงกับปริมาณไนซินและ EDTA ที่ใช้	44
13	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ ระหว่าง optical density กับจำนวน Samonella	60

บทที่ 1
บทนำ

ไข่ เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เพราะประกอบไปด้วย สารอาหารต่าง ๆ ที่ร่างกายต้องการ เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุอื่น ๆ อีกหลายชนิด ทั้งยังสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลายประเภท เช่น อาหารคาว และขนม แต่การเก็บรักษาไข่ไข่ทั้งเปลือก ไม่สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน และยังไม่สะดวกต่อการขนส่งอีกด้วย เพราะเปลือกไข่ค่อนข้างเปราะบาง ดังนั้นจึงได้มีการคิดค้นหาวิธีที่จะสามารถเก็บรักษาไข่ให้ได้นานที่สุด วิธีต่าง ๆ ที่นิยมใช้ ได้แก่ การแช่แข็ง การทำแห้ง เป็นต้น การแช่แข็งนั้น แม้จะสามารถเก็บรักษาไข่ไว้ได้นาน แต่ในการขนส่งก็จำเป็นจะต้องมีเครื่องทำความเย็น เพื่อรักษาสภาพของเนื้อไข่ให้แข็งตัวอยู่ตลอดเวลา ส่วนการทำแห้ง หรือการผลิตไข่ผงนั้น จะเกิดปัญหา ในการเก็บรักษา และการขนส่งน้อยกว่า และยังประหยัดเนื้อที่ในการเก็บอีกด้วย (สุวรรณ,1986) ดังนั้นการผลิตไข่ผง จึงได้มีการพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีการผลิตไข่ผงเพื่อใช้ในประเทศ และเพื่อการส่งออก แต่เนื่องจากว่า ไข่ผงมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ในระหว่างการผลิต การขนส่ง และการเก็บรักษา โดยเชื้อที่พบมักเป็น เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น Salmonella , Micrococcus และ Coliform bacteria โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื้อ Salmonella ซึ่งเป็นแบคทีเรีย ที่ก่อให้เกิดโรค Salmonellosis โรคไทฟอยด์ จึงเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค (สุมาลี,1984) ทำให้มูลค่าการส่งออกลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่ง ที่จะต้องหาวิธีการยับยั้งเชื้อ Salmonella โดยทำการตรวจหา และจำแนกเชื้อ Salmonella ในไข่ เพื่อจะได้ทราบว่ามีชนิดใดบ้าง แล้วจึงทำการยับยั้งต่อไป

จากการที่มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับ การใช้แบคเทอริโอซิน ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหารนั้น ได้มีรายงาน เกี่ยวกับการใช้ไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซิน ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย และมีการใช้กันมาก ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารต่าง ๆ เช่น การผลิต cheese spread การป้องกันการเน่าเสียในอาหารกระป๋อง และยืดอายุการเก็บของนม และผลิตภัณฑ์นม (Kelly A.Steven และคณะ ,1992) โดยได้รับการยืนยัน ในประเทศสหรัฐอเมริกาว่า ไม่ก่อให้เกิดอันตรายหากใช้ในอัตราที่เหมาะสม และองค์การอาหาร และเกษตรกรรม แห่งสหประชาชาติ (FAO) ได้ตั้งข้อจำกัดในการใช้ คือ ประมาณ 33,000 มก./กก. (R. F. Roberts และคณะ ,1992) ไนซิน เป็นแบคเทอริโอซิน ที่ผลิตโดยLactococcus lactis subsp.lactiis มีคุณสมบัติ

ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและถูกค้นพบครั้งแรกโดย Mattrick และ Hirsch ต่อมาพบว่าหากใช้ไนซินควบคู่กับ คีเลตติง-เอเจนต์(Chelating agent) เช่น EDTA ก็จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วย เนื่องจาก EDTA จะจับกับ Mg^{2+} ซึ่งเป็นตัวช่วยให้ชั้น lipopolysaccharide (LPS) ใน outermembrane มีความคงตัว การจับตัวของ EDTA จะทำให้ LPS ไขมัน และโปรตีน ถูกขับออกจาก outermenbrane ทันที จึงทำให้โครงสร้างในส่วน LPSไม่คงตัว และมี cell permeability เพิ่มขึ้น ไนซินจึงเข้าสู่เซลล์ได้ (Kelly และคณะ , 1991) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำไนซินมาใช้ยับยั้ง Salmonella ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไข่ผง ฉะนั้นในการทดลองนี้หลังจากที่ทำการตรวจหาและจำแนกชนิดของ Salmonella แล้วจะทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณของไนซิน และ EDTAที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อ Salmonella ซึ่งพบในผลิตภัณฑ์ไข่ผงต่อไป เพื่อนำไปสู่การแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมการผลิตไข่ผง

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อตรวจหาปริมาณเชื้อและจำแนกชนิดของ Salmonella ที่มีการปนเปื้อนในไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผงและเปลือกไข่
2. เพื่อทดสอบหาปริมาณไนซินและ EDTA ที่เหมาะสมต่อการยับยั้ง Salmonella ที่แยกได้จากไข่ผง

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

เป็นการหาปริมาณไนซิน และ EDTA ที่เหมาะสมต่อการยับยั้ง Salmonella ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในผลิตภัณฑ์ไข่ผงได้ เพื่อแก้ไขในอุตสาหกรรมการแปรรูปไข่ต่อไป

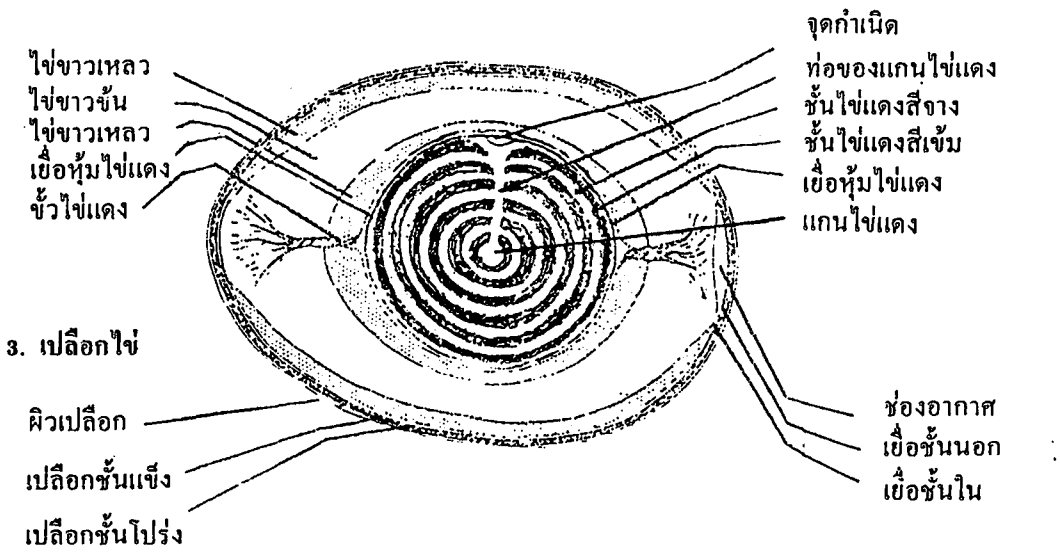
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถยับยั้ง Salmonella ในผลิตภัณฑ์ไข่ผงได้
2. นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม การแปรรูปไข่ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีมาตรฐานที่ดีขึ้น
3. เพิ่มความปลอดภัยให้แก่ผู้บริโภคทั้งในและนอกประเทศ

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ไข่เป็นอาหารที่มีผู้นิยมรับประทานกันมาก มีประโยชน์และคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นแหล่งที่ให้สารอาหารเกือบครบถ้วนตามความต้องการของร่างกาย โดยเฉพาะโปรตีนในไข่นั้น ทางองค์การอาหาร และเกษตร / องค์การอนามัยโลก (FAO/WHO) ได้จัดให้เป็น โปรตีนที่มีกรดอะมิโน ชนิดจำเป็น (essential amino acid) ครบถ้วน (อำนวย, 1982) นอกจากนี้ ไข่ไก่ยังเป็นแหล่งเริ่มต้น ที่ช่วยให้ชีวิตลูกไก่ได้เจริญเติบโตขึ้นมา โดยธรรมชาติได้สร้างสรรค์ให้องค์ประกอบในไข่นั้น มีหน้าที่เฉพาะอย่าง และสำคัญ ต่อการที่จะเป็นสิ่งช่วยประคับประคอง หล่อเลี้ยงชีวิตลูกอ่อน ให้เจริญเติบโตขึ้นได้โดยปกติ และปลอดภัย (สุวรรณ, 1986)



ภาพที่ 1 แสดงส่วนต่างๆ ภายในไข่

ไข่ขาวมีลักษณะกึ่งของเหลว และมีหน้าที่โดยธรรมชาติ ในการป้องกันการกระทบกระทั่ง ป้องกัน ความร้อนหนาว แก่เชื้อลูกไก่ ทั้งไข่ขาว และไข่แดง เป็นอาหารหล่อเลี้ยงชีวิตใหม่ไปจนกว่าชีวิตนั้น จะเจริญเติบโตจนสมบูรณ์ออกจากไข่

ชั้นนอกของไข่ไก่ ได้แก่ เปลือก เปลือกเป็นเสมือนเกราะป้องกันการกระทบกระเทือนแก่ลูกไก่เป็นที่ถ่ายเทอากาศระหว่างภายในกับภายนอกไข่ และเป็นที่ช่วยเก็บรักษาอาหารกับน้ำสำหรับลูกไก่ในไข่ที่กำลังฟักตัวอยู่

องค์ประกอบของไข่

องค์ประกอบส่วนใหญ่ในไข่ คือ น้ำ ถ้าระเหยน้ำออกให้หมด จะเหลือส่วนที่เป็นวัตถุแห้ง ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ และอินทรีย์สารเล็กน้อย โดยสารประกอบเหล่านี้ในไข่ไก่แต่ละฟอง จะมีสัดส่วนที่แตกต่างกัน

ในไข่ไก่ประกอบไปด้วย ธาตุหลักในอัตราส่วน ดังนี้ คือ คาร์บอน 53 เปอร์เซนต์ ออกซิเจน 20 เปอร์เซนต์ ไนโตรเจน 15 เปอร์เซนต์ ไฮโดรเจน 7 เปอร์เซนต์ ฟอสฟอรัส 4 เปอร์เซนต์ และซัลเฟอร์ 1 เปอร์เซนต์ ธาตุเหล่านี้ จะรวมตัวกันอยู่ในสารประกอบต่าง ๆ ในไข่ โดยมีน้ำเป็นองค์ประกอบสำคัญ และจะอยู่ในปริมาณที่มีความสัมพันธ์กับสารประกอบอินทรีย์ (organic compound) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นพวกโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตนอกจากนี้ ยังมีสารประกอบอนินทรีย์ (inorganic compound) อยู่ด้วย (สุวรรณ, 1986)

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของไข่ (เปอร์เซนต์)

ส่วนประกอบของไข่	น้ำ	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ไข่ทั้งฟอง	65.5	11.8	11.0	11.7
ไข่แดง	48.0	17.5	32.5	2.0
ไข่ขาว	82.0	11.0	0.2	0.8

ที่มา : Hart และ Fisher (1971)

ไข่ทั้งฟองเมื่อทำให้แห้งจะได้วัตถุแห้งประมาณ 34 เปอร์เซ็นต์ของไข่ทั้งหมดรวมทั้งเปลือก หรือ 26.6 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อไข่ทั้งฟอง ปริมาณวัตถุแห้งใน ส่วนต่าง ๆ ของเนื้อไข่แสดงไว้ใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณวัตถุแห้งในไข่ไก่

ส่วนประกอบ	ไข่ทั้งฟอง (%)	ไข่แดง (%)	ไข่ขาว (%)
โปรตีน (ไม่มีลิปิด)	51	32	92
ลิปิด	43	63	1.5
น้ำตาลอิสระ (95%กลูโคส)	1.1	0.4	3.0
อินทรีย์สารอื่นที่ปราศจากไนโตรเจน	1.8	2.4	0.5
อนินทรีย์	2.4	2.2	3.0
กำมะถัน	0.7	0.35	1.5
ฟอสฟอรัส	0.8	1.16	0.1

ที่มา : Blanch (1955)

จากข้อมูลนี้ จะเห็นว่า ในวัตถุแห้งของไข่ มีไขมันกับโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ และมีน้ำตาลอิสระ อินทรียสารที่ปราศจากไนโตรเจน อนินทรีย์ กำมะถัน และฟอสฟอรัส ในปริมาณค่อนข้างน้อย ในไข่แดงมี ลิปิดอินทรียสารที่ปราศจาก ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส สูงกว่าในไข่ขาว ส่วนในไข่ขาวมีโปรตีนสูงมากถึง 92 เปอร์เซ็นต์

โปรตีนในไข่

ไข่เป็นแหล่งโปรตีนที่ดี เนื่องจากในไข่ขาวมีโปรตีนสูง 59 เปอร์เซนต์ และในไข่แดงมีโปรตีน 44 เปอร์เซนต์ โปรตีนต่าง ๆ เหล่านี้ จะอยู่ในไข่ขาวและไข่แดงในรูปของ Simple Protein, Conjugated Protein และ lipoprotein และมีบางส่วนอยู่ใน Vitelline membrane เปลือกไข่ และเยื่อหุ้มไข่ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในส่วนต่าง ๆ ของไข่

ส่วนประกอบของไข่	ปริมาณโปรตีน	
	กรัม	เปอร์เซนต์ (%)
ไข่แดง	3.1	44.3
ไข่ขาว	3.5	50.0
เปลือกไข่	0.15	2.1
เยื่อหุ้มไข่	0.25	3.6
รวมทั้งหมด	7.0	100.0

ที่มา : Blanck (1955)

ไขมันในไข่

ไขมันที่อยู่ในไข่ ส่วนมากอยู่ในรูปของกลีเซอไรด์ (glyceride), เลซิธิน (lecithin) และ กรดไขมัน (fatty acid) แต่มีส่วนมากมีอยู่ในไข่แดงถึง 99 เปอร์เซนต์

เลซิธิน และ เซฟาลิน (cephaline) จะมีอยู่ในไข่แดง ประมาณ 10 เปอร์เซนต์ ทำให้ไข่แดงเป็น emulsifier ที่ดี ดังนั้นจึงจะเหมาะสมที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารประเภทใช้น้ำมันเป็นส่วนประกอบ กรดไขมันที่มีอยู่ในไข่แดง เป็นพวกกรดปาล์มิติก (Palmitic acid) กรดสเตียริก (Stearic acid) กรดโอเลอิก (Oleic acid) และ ลิโนเลอิก (linoleic acid) นอกจากนี้ ยังมีกรดไขมันอิ่มตัว เช่น อะราคิโดนิก เลซิธิน (Arachidonic lecithin) ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งของเลซิธิน

ลิโนเลอิก อาจจะเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาหารที่ไก่กิน ถ้าไก่กิน น้ำมันระหุ่ง (linseed oil) จะทำให้มี ลิโนเลอิก เพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า ซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติของไข่ ที่จะใช้ในอุตสาหกรรม ทำไข่แช่เย็น เนื่องจากปริมาณไขมันไม่คงที่ (ประจวบ, 1990)

คาร์โบไฮเดรต

ในไข่ขาว มีคาร์โบไฮเดรตน้อยมาก ประมาณฟองละ 0.5 กรัม ประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของ คาร์โบไฮเดรต มีอยู่ในไข่ขาว ซึ่งจะมีทั้งชนิดที่อยู่ในรูปอิสระ และรวมตัวกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กับ โปรตีน เป็นต้น

วิตามินและเกลือแร่

ไข่เป็นแหล่งอาหารที่อุดมด้วยวิตามิน (ยกเว้นวิตามิน ซี) เช่น วิตามิน riboflavin มีอยู่ในไข่ขาวมากกว่าวิตามิน อื่น ๆ มีประมาณ 200-500 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมของไข่ขาว วิตามินเอ มีมากในไข่แดง วิตามินดีมีมากในไข่แดง 10-15 หน่วย ส่วนวิตามิน บี 1 จะมีมากน้อยขึ้นกับอาหารที่ไก่กิน

เกลือแร่ ส่วนมากเป็นพวกอนินทรีย์สารในไข่ จะพบอยู่ในส่วนของเปลือกไข่ ประมาณ 94 เปอร์เซนต์ อีก 6 เปอร์เซนต์ นั้น อยู่ในไข่ขาวและไข่แดง เกลือแร่และอนินทรียสารต่าง ๆ มีประโยชน์สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อลูกไก่ เนื่องด้วยในไข่จะมีเกลือแร่ต่าง ๆ เหล่านี้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอาหารที่ไก่กินเป็นส่วนใหญ่ แร่ธาตุเกี่ยวกับการสร้างกระดูก ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส โดยมี วิตามินดีรวม อยู่ในอัตราส่วนที่ถูกต้อง แมกเนเซียมเป็นแร่ธาตุเกี่ยวกับออกซิเดชั่น (oxidation) ของเซลล์ที่มีชีวิต เหล็กและทองแดงจะถูกนำไปสร้างเม็ดเลือด

คุณภาพของไข่

ปัจจุบันประเทศไทยส่งไข่เป็นสินค้าส่งออกมากขึ้นทุกปี แต่การซื้อขายไข่ตามคุณภาพภายในของไข่และความสะอาดนั้น ในภูมิภาคเรายังทำกันน้อยมาก ถ้าเทียบกับตลาดยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และอีกหลายแห่ง ซึ่งซื้อขายไข่โดยมีมาตรฐานคล้าย ๆ กัน คือ มีการกำหนดหลักเกณฑ์คุณภาพภายใน และภายนอกของไข่ เพื่อความเป็นธรรมในการซื้อขาย ดังนั้น เราควรจะสนใจในหลักเกณฑ์ของสากล เพื่อที่จะได้หาตลาดต่างประเทศได้มากและสะดวกขึ้น

หลักทั่วไปและมาตรฐานคุณภาพไข่สด (สุวรรณ, 1986)

การคัดไข่ตามคุณภาพ มีความมุ่งหมายเพื่อการรักษาความสด และเพื่อการซื้อขายที่เหมาะสม อาจแยกออกเป็นหัวข้อได้ ดังนี้

1. โดยดูจากสภาพภายนอกของเปลือก (exterior)
2. ตรวจคุณภาพภายในของไข่ด้วยการส่อง (candling)
3. ต่อยไข่ออกตรวจคุณภาพภายใน (broken out)
   - 3.1 ดูด้วยสายตาธรรมดา (appearance)
   - 3.2 ดมกลิ่น (odor)
   - 3.3 ดูลักษณะของไข่ขาว (albumen characteristics)
   - 3.4 วัดด้วยเครื่องมือมาตรฐาน หรือมาตรฐานต่าง ๆ (Standard guage or measurements)
     - 3.4.1 วัดด้วยฮอฟเกจ (Haugh gauge)
     - 3.4.2 เทียบกับภาพมาตรฐาน (visual albumon score)
     - 3.4.3 อัลบูเมนอินเดกซ์ (albumen index)
     - 3.4.4 มาตรฐาน แวนแวกเกนเนน (Van Wagennen score)
     - 3.4.5 ดัชนีพื้นที่ไข่ขาว (albumen area index)
     - 3.4.6 เปอร์เซ็นต์ไข่ขาวข้น (percentage of thick albumem)
   - 3.5 วัดจากคุณภาพไข่แดง (yolk quality)
     - 3.5.1 สีของไข่แดง (yolk color)
     - 3.5.2 ดัชนีไข่แดง (yolk index)
4. ลักษณะเปลือกไข่ (shell quality)
5. การวิเคราะห์ทางเคมี (chemical analysis)
6. การวิเคราะห์ทางปริมาณจุลินทรีย์ (bacterial count)
7. การทดลองคุณสมบัติในการปรุงแต่งเป็นอาหารหรือผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (functional tests)
   - 7.1 การฟูตัว (whipping tests)
   - 7.2 การรวมตัวกับไขมัน (emulsifying tests)

สำหรับสาเหตุที่ทำให้คุณภาพของไข่แตกต่างกัน ก็มีหลายข้อด้วยกัน คือ

1. พันธุกรรม

พันธุกรรมมีผลต่อความข้นเหลวของไข่ขาวปริมาณของไข่ขาวข้นต่อไข่ทั้งหมด การมีจุดเลือด จุดเนื้อในไข่ขนาดของไข่ลักษณะของเปลือก สีของไข่แดง และยังมีอีกหลายลักษณะที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของไข่ เหล่านี้เป็นลักษณะทางพันธุกรรม แต่สีของไข่แดงบางครั้ง ก็อาจเนื่องมาจากยา เช่น Ethoxyquin (Harms และคณะ, 1983) หรือชนิดของอาหารสัตว์ เช่น ข้าวโพดเหลือง

2. อาหาร

อาหารที่ไก่กินมีผลต่อคุณภาพไข่ เช่น แคลเซียม และวิตามินดี มีผลต่อลักษณะของเปลือกไข่ อาหารที่มีวิตามินเอหรือเม็ดสีเหลือง (Carotenoid) จะทำให้ไข่แดงมีสีเหลืองข้น อาหารจากขยะ หรือมูลสัตว์ ทำให้ไข่มีกลิ่น อาหารมีกากเมล็ดฝ้ายสูงและเก็บไข่นั้นไว้นาน ไข่ขาวจะมีสีมะกอก วิตามินและสารอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่มากมายในอาหารช่วยให้ไข่มีคุณภาพทางโภชนาการบริบูรณ์ด้วย

3. เรือนโรงไก่ พื้นเล้า หรือพื้นกรง

โรงเลี้ยงไก่ที่เปียกและสกปรก ย่อมทำให้มีไข่สกปรกมากขึ้น

4. โรค

โรคบางชนิดจะทำให้ไข่ในระยะที่เกิดโรค มีรูปร่างผิดปกติ บุดเบี้ยว ไข่ขาวเป็นน้ำเหลว เช่น โรคนิวคาสเซิล หรือโรคหลอดลมอักเสบ (infectious bronchitis)

5. การเก็บรักษาไข่

ไข่ที่ออกมาใหม่ ๆ โดยมากภายในจะยังไม่มีจุลินทรีย์ ไข่ขาวข้น ยังมีความสดดี ถ้าการเก็บ รักษาไม่ดี ไข่สกปรก หรือถูกทอดทิ้งอยู่ในเล้า ไม่หมั่นเก็บ ภาชนะเก็บรักษาไม่ดี เก็บไข่ในที่อากาศร้อน หรือเก็บรักษาไว้นานกว่าเวลาอันควร คุณภาพไข่นั้นก็ย่อมจะเสื่อมลง

6. การขนส่งไข่

สินค้าไข่ทั้งเปลือก มักจะแตกร้าวเสียหายง่าย จากการขนส่งที่ขาดความระมัดระวัง จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาไข่ทั้งเปลือกทำได้ยาก เพราะจะมีการ เปลี่ยนแปลงของไข่ตามอายุการเก็บ (ประจวบ, 1990) เช่น น้ำหนักลด ช่องว่างของอากาศจะกว้างขึ้น และเก็บไข่ไว้ในเวลาจำกัดชั่วระยะหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้ยังเปลืองเนื้อที่เก็บมาก การขนส่งลำบาก เสียหายได้ง่าย ไม่สะดวกในการใช้ในอุตสาหกรรมใหญ่ ๆ ที่มีความต้องการมาก ๆ (ประจวบ 1990)

การเก็บเฉพาะเนื้อไข่สามารถเก็บได้ด้วยวิธีแช่แข็งและการทำให้แห้ง การแช่แข็งนั้นมีผลเสียที่สิ้นเปลือง ค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาสูง ไม่สะดวกต่อถิ่นทุรกันดาร ส่วนการทำให้แห้งนี้ ไข่ผงมีข้อดีคือ นอกจากจะทำให้ไข่เก็บไว้ได้นานยังประหยัดพื้นที่สำหรับเก็บ และสะดวกต่อการนำมาใช้และทุ่นแรงงาน เหมาะสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ไข่เป็นจำนวนมาก ๆ ทั้งยังสามารถแยกออกเป็นไข่ขาวและไข่แดงล้วนๆ ตามความต้องการผู้ใช้

กรรมวิธีการผลิตไข่ผง

หลักในการผลิตไข่แห้ง หรือไข่ผงนั้น ทำได้ง่าย ๆ คือ นำไข่มาทำการตอก แล้วนำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงนำมาแยกน้ำออกจากไข่ให้เหลือน้ำเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดยการทำให้แห้ง ก็จะได้ไข่ผง แต่กรรมวิธีการผลิตไข่ผงในโรงงานอุตสาหกรรมนั้น จะมีขั้นตอนที่ซับซ้อนยิ่งขึ้น โดยเฉพาะก่อนที่จะทำให้เป็นไข่ผง ต้องเตรียมไข่ซึ่งเป็นวัตถุดิบให้มีคุณสมบัติเหมาะสมก่อนที่จะนำไปทำการผลิต

คุณสมบัติของไข่เหลว

ความเข้มข้นของไข่เหลว (liquid egg) จะขึ้นอยู่กับปริมาณของแข็งทั้งหมดในไข่ ถ้ามีปริมาณของแข็งทั้งหมดในไข่สูง จะทำให้ไข่มีความหนืดมากขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับก้าล้งฉีดของหัวฉีด อุณหภูมิที่ใช้ทำแห้ง และจะทำให้ไข่ผงที่ได้มีคุณสมบัติไม่ดี พวกไข่ทั้งฟอง และไข่แดงเหลว จะมีปริมาณของแข็งทั้งหมดสูงสุด 26 และ 45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไข่ขาวจะมีปริมาณของแข็งทั้งหมด 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่พอเหมาะ สำหรับการทำให้แห้ง และไม่เกิดปัญหาเกี่ยวกับก้าลังฉีด ถ้าปริมาณของแข็งทั้งหมดสูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ จะฉีดได้ยากยิ่งขึ้นหรือไม่สามารถฉีดได้เลย

คาร์โบไฮเดรต

ปริมาณของคาร์โบไฮเดรต จะมีความสำคัญต่อการทำไข่ผงมาก เนื่องจากจะรวมตัวกับโปรตีน (Aldehyde group และ amino group) ทำให้ เกิดสีน้ำตาล ซึ่งเป็นผลให้เก็บไข่ไว้ได้ไม่นาน นอกจากนี้ ยังอาจจะเกิดกลิ่นและรสผิดปกติได้ เนื่องจากการสลายตัวของ lecithin และ cephalin ดังนั้น เราจะต้องกำจัดคาร์โบไฮเดรต ออกได้ 3 วิธี ด้วยกัน คือ

1. การหมักโดยใช้แบคทีเรีย (bacteria fermentation)

ไข่ตามธรรมชาติจะถูกหมักโดยแบคทีเรียอยู่แล้ว โดยเฉพาะ พวก Aerobacter หรือ Escherichia ซึ่งจะพบมากที่ผิวของเปลือกไข่ที่สกปรก แบคทีเรียเหล่านี้จะทำลายกลูโคสในไข่ขาวได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถจะใช้คุณสมบัตินี้ได้ดีในไข่ขาว สำหรับในไข่แดงหรือไข่ขาวผสมกัน เราไม่สามารถจะใช้ การหมักโดยใช้แบคทีเรียได้ เพราะจะทำให้เกิดกลิ่น และรสผิดปกติไป

2. การหมักโดยใช้ยีสต์ (yeast fermentation)

ยีสต์สามารถกำจัดกลูโคสได้อย่างดีจากไข่ขาว ไข่แดงและไข่ผสม อัตราเร็วของการกำจัดกลูโคส นั้นสามารถควบคุมได้ด้วยจำกัดจำนวนยีสต์ ที่ใส่ลงไปและอุณหภูมิที่ใช้การหมัก เราจะปล่อยที่อุณหภูมิ 80 องศาฟาเรนไฮต์ จะใช้เวลาในการหมักเพียง 2-3 ชั่วโมง

3. การใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase enzyme)

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะกำจัดกลูโคสได้ดี เมื่อมีออกซิเจน และ Catalyst (ตัวเร่งปฏิกิริยา) อยู่ด้วยและจำเป็นต้องเติม hydrogen peroxide ลงไปในเนื้อไข่ ซึ่งจะสลายตัวให้ออกซิเจนออกมา และออกซิไดส์กลูโคสให้เป็นกรดกลูโคนิค นอกจากนี้ hydrogen peroxide ที่เติมลงไปยังช่วยทำลายพวกแบคทีเรีย ในขณะบ่มของไข่ขาว หรือไข่ผสม

สำหรับการผลิตไข่ผงในอุตสาหกรรม มีขั้นตอนดังนี้

1.วัตถุดิบ ทางโรงงานจะซื้อไข่มาเก็บไว้ในห้องเย็น ณ อุณหภูมิ 50 องศาฟาเรนไฮต์ ตลอดเวลา จนกว่าจะนำเอามาผลิตต่อไป

2. การส่องไข่ (Candling) จะตรวจหาตำหนิ (defect) ของไข่ เช่น จุดเลือด (blood spot) และจุดเนื้อ (meat spot) ถ้าพบ ต้องกำจัดไข่นั้นออก

3. การทำความสะอาดเปลือกไข่ (Cleaning shell eggs) เป็นขั้นที่ใช้น้ำสะอาด หรือน้ำคลอรีนฉีดล้างผิวของเปลือกไข่ให้สะอาด เพื่อลดการติดเชื้อจากภายนอก และชะล้างเชื้อที่ติดอยู่ที่เปลือกไข่

4.การตอกไข่ (Breaking separating) เป็นการทุบให้เปลือกไข่แตก และ แยกไข่ขาวกับไข่แดงออกจากกันได้สะดวก และป้องกัน yolk membrane แตก ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียปนเปื้อนได้ เนื่องจากไข่แดง เป็นอาหารอย่างดีของแบคทีเรีย ส่วนไข่แดง และไข่ขาวที่แตกปนกันก็จะแยกไปทำไข่รวมผงต่างหาก

ในขณะที่คัดแยกไข่นี้ จะคัดเอาไข่ที่เสียออกและพวกที่มีกลิ่นผิดปกติ จะถูกคัดทิ้งไป ไข่ทั้งฟอง และไข่แดง จะทนความร้อนได้สูงกว่าไข่ขาวในสภาพของเหลว แต่ถูกทำให้เสียสภาพ (denature) ได้ง่ายเมื่อเข้าเครื่องทำแห้ง ผงของไข่จะจับกันแน่น และไหม้อยู่ที่ผนังของ chamber ซึ่งเราจะแก้ไขด้วยการเปากระแสลมวนไปที่ผนังของ chamber

5. การกวนไข่ (Churning) ไข่ที่แยกออกจากกันแล้ว และมีอุณหภูมิ 50 - 55 องศาฟาเรนไฮต์จะถูกกวนเข้ากันด้วย agitator ในช่วงนี้ อาจเติมสารเคมี พวก Sodium Lauryl Sulfate หรือ Sodium oleate ในปริมาณน้อยกว่า 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ ของ egg white solid เพื่อช่วยให้กวนเข้ากันได้ดียิ่งขึ้น แต่จะใช้ไม่ได้ดี กับการกวนให้ไข่แดงเข้ากับไข่ขาว

6. การกรอง (Clarifying or fillering) จะกรองเอาพวก Vitelline membrane ออก เพื่อป้องกันการอุดตันของหัวฉีด อุณหภูมิของของเหลว จะอยู่ที่ 50 - 55 องศาฟาเรนไฮต์

7. การทำให้เย็น (Cooling) จะลดอุณหภูมิของไข่เหลวลงเหลือ 40 องศาฟาเรนไฮต์ หลังจากนี้ส่งไปทำการพาสเจอไรส์ (Pasteurization)

8. การพาสเจอไรส์ (Pasteurization) เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายและทำให้ไข่ผงเสีย อุณหภูมิที่ใช้จะต่ำกว่า 150 องศาฟาเรนไฮต์ และเวลาต่าง ๆ กัน คือ ไข่ขาว พาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 137 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลา 4 นาที สำหรับไข่แดงพาสเจอไรส์ ที่อุณหภูมิ 140 องศาฟาเรนไฮต์เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งสามารถทำลายจุลินทรีย์ พวก Salmonella บางชนิดที่ไม่ทนความร้อนได้

9. Holding Processing tank ไข่เหลวที่ผ่านการพาสเจอไรส์แล้ว จะเก็บไว้ใน tank และให้ความร้อนแก่ไข่เหลวเพิ่มเป็น 138 องศาฟาเรนไฮต์ หรืออาจจะลดลงต่ำกว่า 45 องศาฟาเรนไฮต์ ก็ได้ เพื่อทำให้ไข่ผงที่ได้มีขนาดและสม่ำเสมอกันดีขึ้น

10. การทำให้แห้ง (Drying) ในทางการค้า นิยมทำแบบ Spray drying เป็นส่วนมาก ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมสะดวก และรวดเร็วดี การ spray นั้น จะต้องพยายามให้ลมร้อนที่ได้จาก Coil heat plate หรือ air combustion มีอุณหภูมิที่สม่ำเสมอ และมีความเร็วเข้าต่ำ ซึ่งจะทำให้ไข่ผงไม่เกิดการเกาะกันเป็นก้อน (ประจวบ, 1990)

ส่วนการทำให้ไข่กลับมาอยู่ในรูปเดิม ทำได้โดยการเติมน้ำ คุณภาพทางอาหารก็จะเหมือนเดิม สิ่งที่ต้องระวังมากในการผลิตคือ ความร้อน เพราะถ้าใช้ความร้อนมากไปไข่ก็จะสุก แต่ถ้าใช้น้อยเกินไป ก็จะไม่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ดังนั้น ความร้อนที่ใช้ต้องพอเหมาะ

จุลินทรีย์ในไข่ผง

ไข่และผลิตภัณฑ์ที่มีแนวโน้มที่จะมีการติดเชื้อและปนเปื้อนในหลาย ๆ ขั้นตอนการผลิตโดยมากจะมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนประมาณ 1.0×10^{5} เซลล์ ชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากไข่ จะแตกต่างกันไปตามตารางที่ 4 ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์แกรมบวก

ตารางที่ 4 ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบบนเปลือกไข่ไก่สะอาด และเปลือกไข่ไก่สกปรกหรือไข่ขาว

ชนิดของจุลินทรีย์	จำนวนจุลินทรีย์ (%)		
	ฟาร์ม	เครื่องต่อยไข่	สถานที่บรรจุ
Streptococcus		8(5)	
Staphylococcus	5	30	9(16)
Micrococcus	18	23(30)	37(94)
Sarcina	2	20	
Arthrobacter			5(23)
Bacillus	30	18	(2.5)
Pseudomonas	6		22.5(36.5)
Achromobactor	19		1.5(2)
Alcaligenes			(2)
Flavobacterium	3		
Cytophaga			(1)
Coli-aerogenes	5	19(12)	10.5(11.5)
Acromonas		20(20)	1
Proteus	1	20(50)	
Serratia		10(20)	
Mold	7		
Unclassified			12(11)

ที่มา : สุมาลี (1969)

* เลขนอกวงเล็บ เป็นข้อมูลที่ได้จากไข่สะอาด

** เลขในวงเล็บ เป็นข้อมูลที่ได้จากไข่สกปรกหรือไข่ขาว

บรรณาธิการ ... ลิขสิทธิ์

สำหรับจุลินทรีย์ที่แยกได้จากไข่ที่เสียแล้ว ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ เช่น Proteus, Aeromonas , Alcaligenes ส่วน Salmonella spp. พบว่า อาจมีอยู่ในไข่ไก่สด หรือปนเปื้อน (contaminate) ในระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งมีความสำคัญ เนื่องจากพบว่า มีจำนวนมากในไข่ผง(สุมาลี, 1992)

จุลินทรีย์ที่พบในไข่ผงอาจเกิดจาก การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอากาศ ที่มีอยู่มากเกินไปในระหว่างการผลิต แบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและท่อนอาจมาจากเปลือกไข่ในขณะที่ทำการต่อยไข่ หรือปนเปื้อนจากอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง ส่วน Salmonella จะมาจากลำไส้ของแม่ไก่ที่ติดเชื้อ

การกำจัดกลูโคสในไข่ขาว โดยกระบวนการหมักนั้น เป็นการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียให้มากขึ้นไปอีก แต่เนื่องจากความชื้นในไข่ผงมีน้อยมากไม่เพียงพอต่อความต้องการของแบคทีเรีย เพราะฉะนั้นเมื่อเก็บไข่ไว้ในสภาพดี จะทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลง โดยจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วในระยะแรก และค่อย ๆ ลดลงในระยะหลัง แต่สำหรับจุลินทรีย์ที่ทนความแห้งแล้งได้ดี อาจจะเพิ่มจำนวนได้บ้างแต่ถ้าไข่ผงมีความชื้นต่ำมาก แบคทีเรียก็จะตายมากขึ้น (สุมาลี, 1992) ถึงอย่างไรก็ตาม กระบวนการทำแห้ง (drying) ก็ ยังไม่อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ไข่ปราศจากเชื้อ Salmonella ได้ ดังนั้นในการแก้ปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อ Salmonella ให้เหลือปริมาณต่ำสุดในการทำแห้งไข่ด้วยเครื่องสเปรย์ดราย (spray dryer) จึงจำเป็นต้องใช้ไข่ที่สดและสะอาด (Solowey และคณะ, 1946) ส่วนการลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และการทำลาย Salmonella , Coliforms และ Staphylococcus ได้อย่างสมบูรณ์นั้น จะประสบความสำเร็จได้ โดยการใช้ความร้อนกับไข่เหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (Gibbons และคณะ, 1946) จากข้อมูลทั้งหมดนี้ จึงได้มีการพยายามที่จะเตรียมผลิตภัณฑ์ไข่ผงที่ได้รับการยอมรับคุณภาพ และปราศจากเชื้อ Salmonella โดยใช้หลักการที่ดีในการผลิตไข่ผง

สำหรับเชื้อ Salmonella นี้ เป็นเชื้อที่สำคัญที่มักพบในไข่ ซึ่งจากการศึกษาการปนเปื้อนของ Salmonella ในไข่ผง พบว่า เชื้อนี้สามารถรอดชีวิตได้ ถ้าเก็บผลิตภัณฑ์ไข่ผงไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิห้อง หรือต่ำกว่าโดยที่อุณหภูมิต่ำเชื้อจะมีชีวิตรอดในไข่ผงได้นานถึง 4 ปี (Bryan, 1968) ซึ่ง เอนโดทอกซิน จากผนังเซลล์ของเชื้อ Salmonella จะทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคนที่รับประทานอาหารที่มีไข่ผงที่ปนเปื้อนเชื้อ Salmonella

ลักษณะที่สำคัญของเชื้อ Salmonella

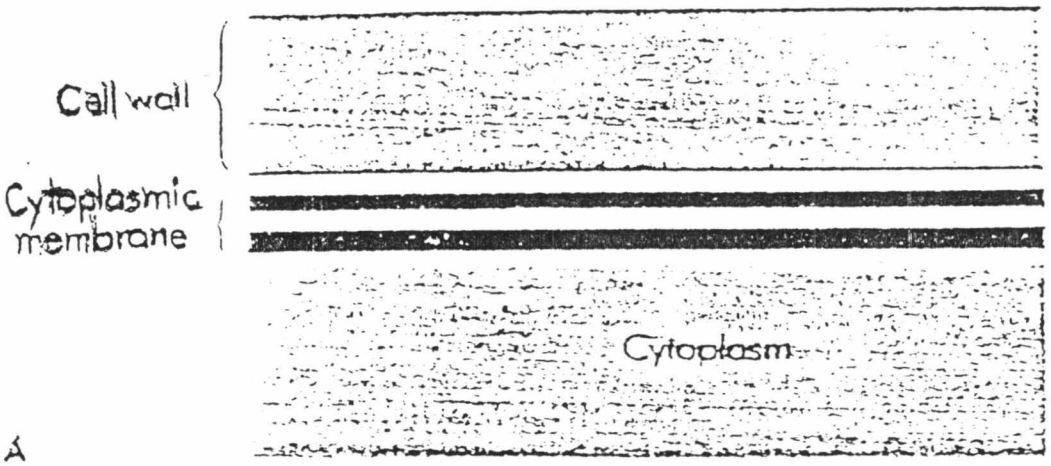
เชื้อ Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบไม่สร้างสปอร์ ขนาด 0.7 - 1.5 x 2.0 - 5.0 ไมครอน จัดอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae ไม่มีเอนไซม์ออกซิเดส แต่มีเอนไซม์คาตาเลส ส่วนใหญ่มีเพอริไตรคัส แฟกเจลลา(peritrichous flagella) เป็น facultative anaerobic เจริญได้ไม่ดีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน แต่สามารถเกิดกระบวนการหายใจ และกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตได้ โคโลนีของ Salmonella นั้น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 2-4 มิลลิเมตร

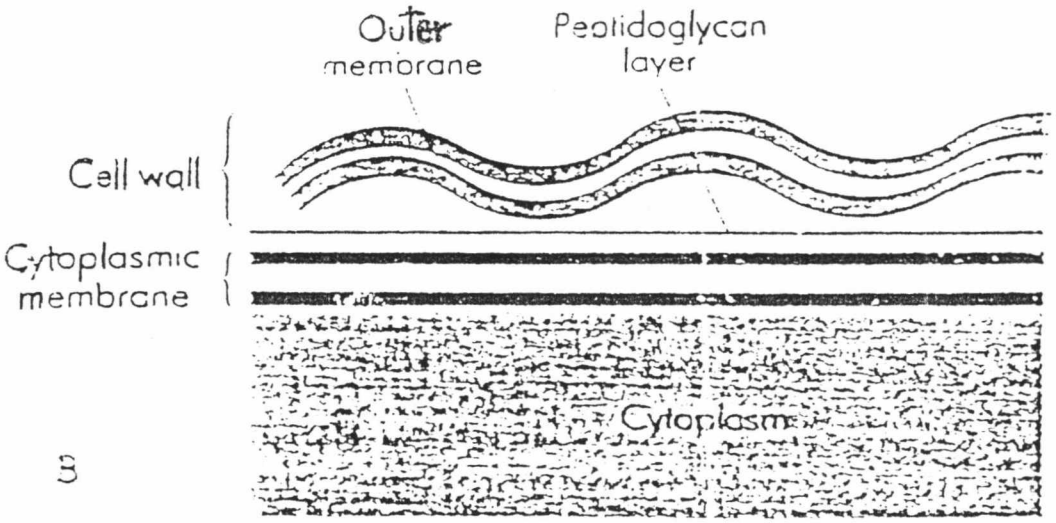
Salmonella ยังสามารถเปลี่ยนไนเตรต (nitrate) ให้เป็นไนไตรท์ (nitrite) สร้างก๊าซได้จากน้ำตาลกลูโคส ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI (Triple Sugar Iron agar) และสามารถใช้ซิเตรต (Citrate) เป็นแหล่งคาร์บอนพื้นฐานได้ ปกติแล้ว Salmonella จะแสดงผลบวก (positive) กับไลซีน (lysine) และ ออร์นิทีน · คาร์บอกซิเลส (ornithine carboxylase)ในปฏิกิริยาของ Mollers(Moller's reaction) แต่จะให้ผลลบ (negative) กับ การทดสอบยูรีเอส (Urease test) และไม่สามารถทำปฏิกิริยาดีอะมิชั่น (deamination) กับฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) และทริปโตเฟน (tryptophan) โดยทั่วไปแล้ว Salmonella จะไม่ใช้น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ซาลิซีน (Salicin) อิโนซิทอล (inositol) และเอมิลโกลาลิน (amylgolalin) ทั้งยังไม่ผลิตเอนไซม์ไลเปส และดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease) และที่สำคัญ คือ เชื้อนี้เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในสัตว์ ที่มีกระดูกสันหลังแทบทุกชนิด โดยเฉพาะในมนุษย์ขึ้นเกับจำนวน และซีโรไทป์ของเชื้อที่เป็นตัวก่อให้เกิดโรคนั้น ในการจำแนกซีโรไทป์ของเชื้อ นอกจากจะใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วยังจำเป็นต้องใช้ความแตกต่างของแอนติเจน ซึ่งเชื้อชนิดนี้มีอยู่ 2 ชนิด คือ Somatic (O) และ Flagella (H) บางชนิดอาจมีเปลือก (envelope) หรือ แคปซูลาร์ K (capsular K) แอนติเจนด้วย โดยเชื้อนี้มีแอนติเจน ประมาณ 2,000 ชนิด เชื้อนี้สามารถสร้างแอนโดทอกซิน (enotoxin) จากตัวเซลล์ซึ่งก่อให้เกิดโรคได้ (Michael และ คณะ, 1986) เชื้อที่มักพบว่า ทำให้เกิดโรค ได้แก่ S. typhimurium , S. enteritidis , S. heidelbeng

นอกจากนี้ ยังมีสิ่งที่น่าสนใจเกี่ยวกับโครงสร้างของ Salmonella และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ จุลินทรีย์เหล่านี้ มีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยมี

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

โครงสร้างพิเศษเพิ่มขึ้นจากจุลินทรีย์อื่นคือ เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งจะหุ้มชั้นเปปติโดไกลแคน(peptidoglycan) ไว้ดังภาพที่ 2





ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างผนังเซลล์แบคทีเรียโดยให้

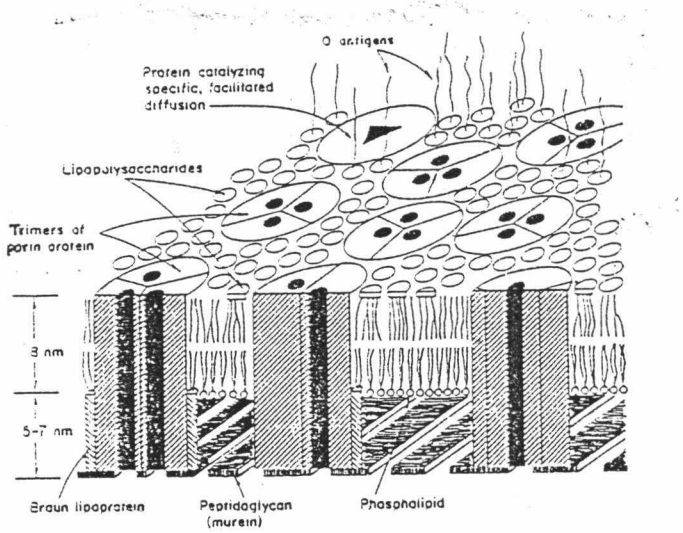
A : แบคทีเรียแกรมบวก

B : แบคทีเรียแกรมลบ

(Michael และคณะ, 1986)

เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกนี้ทำหน้าที่เป็นตัวขัดขวางการผ่านเข้าออก(impermiable barrier) เพื่อป้องกันไม่ให้เอนไซม์สารเคมี และสารปฏิชีวนะ(antibiotics) สัมผัสกับไซโตพลาสมิคเมม-เบรน(cytoplasmic membrane) (Kelly และคณะ, 1992) โมเลกุลของสารหรือโปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกได้ เว้นแต่เพียงเยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าวจะถูกทำลายไป(Michael และคณะ, 1986)

เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ ประกอบด้วยไขมัน (lipid) เป็นส่วนใหญ่ ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีไขมันมาก คือ ประมาณ 11-22 เปอร์เซนต์ ของน้ำหนักผนังเซลล์แห้ง ไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าว อยู่ในรูปสารประกอบ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ

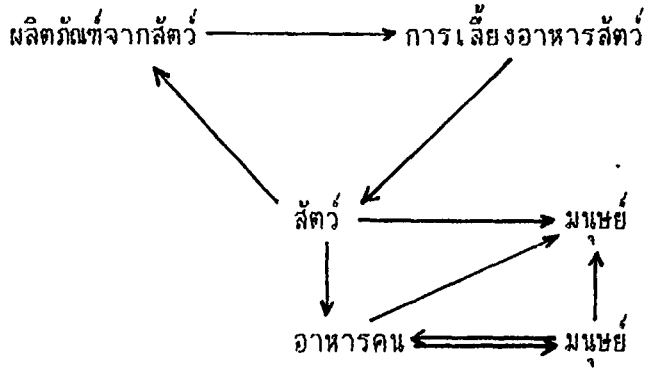
(Michael และคณะ, 1986)

ส่วนประกอบหลักในเยื่อหุ้มชั้นนอก คือ ไลโปโพลิแซคคาไรด์(lipopolysacharide) หรือ LPS ซึ่ง LPS นี้ มีคุณสมบัติเป็นพิษ (toxic) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันอย่างดีในชื่อ เอนโดทอกซิน ตามที่กล่าวมาข้างต้น

นอกจาก LPS แล้วสารประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ O แอนติเจน ซึ่งเป็นโพลิแซคคาไรด์ ชนิดหนึ่ง O แอนติเจนนี้สามารถแสดงลักษณะทาง ซีโรโลจิคอล (serological properties) ของแบคทีเรีย แต่ละชนิดได้ (Michael และคณะ, 1986)

จากข้อความที่กล่าวข้างต้นนี้ แสดงถึงเหตุผลให้เห็นได้ว่า Salmonella และแบคทีเรียแกรมลบสามารถสร้างเอนโดทอกซิน ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกาย ซึ่งได้มีการศึกษาการลดปริมาณเชื้อ Salmonella ในผลิตภัณฑ์อาหารและไข่ผง ด้วยวิธีต่างๆ มาโดยตลอด เพื่อป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ Salmonella

โรคที่เกิดจากเชื้อ Salmonella เกือบทุกชนิด สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้เช่นเดียวกับในสิ่งมีชีวิตประเภทมีกระดูกสันหลัง การถ่ายเทเชื้อ โดยปกติแล้วจะเกิดจากสัตว์มายังคน โดยการบริโภคอาหารที่มีเนื้อสัตว์เป็นแหล่งของเชื้อ ส่วนทางด้านอื่นที่เป็นไปได้ จากคนไปสู่คน จากคนไปสู่สัตว์ และจากสัตว์ไปสู่คน ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การติดต่อของโรคที่เกิดจากเชื้อ Salmonella (George, 1968)

อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ Salmonella สามารถแบ่งได้เป็น 4 ลักษณะ ซึ่งคนไข้อาจจะเป็นเพียงกลุ่มลักษณะเดียว หรือเป็นได้พร้อมกันหลายลักษณะ หรือเกิดอาการต่อเนื่องกันได้เมื่อติดเชื้อแล้ว ซึ่งแบ่งลักษณะของอาการได้ดังนี้คือ

1. ช่วงเป็นพาหะของโรคได้ (ระยะฟื้นไข้ ไม่แสดงอาการของโรค)
2. โรคเกี่ยวกับลำไส้ (ไทฟอยด์ พาราไทฟอยด์)
3. โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ (จากการติดเชื้อจากอาหาร)
4. โรคโลหิตเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์ในโลหิต ซึ่งจะแสดงลักษณะต่าง ๆ เช่น มีไข้ในระยะเวลาสั้นๆ หรือมีอาการเจ็บปวยทรุดหนักลง โดยจะแสดงความผิดปกติของหน้าที่และเนื้อเยื่อของอวัยวะ

โรคกระเพาะและลำไส้อักเสบแบบมีอาการรุนแรงนั้นเกิดจาก Salmonella เกือบทุกซีโรไทป์ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดในผู้ปวย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อนักจุลชีววิทยาทางอาหารที่จะต้องศึกษาต่อไป

ปัญหาที่สำคัญของโรคนี้ คือ สัตว์ที่ได้รับเชื้อนี้ บางครั้งไม่แสดงอาการเป็นพาหะสำคัญของโรคนี้เพราะจะจับเชื้อออกมาเป็นช่วง ๆ เมื่อเกิดความเครียด และก็ก่อให้เกิดโรคระบาด ทั้งยังก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจของอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์อย่างมาก และอาจรวมถึงชีวิตผู้คนที่บริโภคผลิตภัณฑ์ที่จากสัตว์นั้น ๆ และที่สำคัญ ไข่ ก็เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่มีโอกาสติดเชื้อจากไก่ที่เป็นโรค ติดเชื้อจาก Salmonella ได้เช่นกัน (George, 1968)

สำหรับโรค Salmonellosis เป็นอีกโรคหนึ่งซึ่งเกิดจากเชื้อ Salmonella ที่พบว่าเป็นปัญหามาก เนื่องจากพบว่ามักเกิดกับคนที่รับประทานไข่ที่มีเชื้อ Salmonella ซึ่ง Salmonellosis นี้ ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับลำไส้ แต่อย่างไรก็ตาม เคยพบหลักฐาน ที่เกี่ยวกับสารพิษ (toxin) ที่สร้างจุลินทรีย์ว่า มีส่วนในการก่อให้เกิดโรคได้เช่นกัน

Salmonellosis

โรค Salmonellosis นี้ เป็นการติดเชื้อซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อ Salmonella ที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้ ซึ่งมีลักษณะสำคัญดังนี้ คือ

ระยะฟักตัว : ในการสุ่มตัวอย่าง 34 ตัวอย่างจากการระบาด ซึ่งรายงานโดย CDC พบว่า ระยะเวลาในการฟักตัว มีช่วงเวลาแตกต่างกันไป ตั้งแต่ 1 ชั่วโมง ถึง 8 วัน แต่ระยะฟักตัวทั่วไปซึ่งพบนั้น มีช่วงเวลา ตั้งแต่ 6-48 ชั่วโมง (CDC, 1983)

อาการ : อาการที่สำรวจพบจากการระบาด 9 ตัวอย่าง โดย CDC แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่ง อาการและความรุนแรงของโรคนี้ขึ้นอยู่กับ จำนวน และซีโรไทป์ของ Salmonella ซึ่งจะแตกต่างกันไป ส่วนการต่อต้านของผู้ติดเชื้อก็เช่นกัน จะแตกต่างกันตามชนิดซีโรไทป์ และจำนวนของเชื้อ ขึ้นอยู่กับผู้ป่วยแต่ละราย ส่วนกลุ่มอาการที่พบมากที่สุดในผู้ป่วย คือ อาการท้องร่วง ตามมาด้วย อาการเกร็งในช่องท้อง เป็นไข้ คลื่นไส้ อาเจียน หนาวสั่น และปวดศีรษะ ส่วนมากจะแสดงอาหารหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ด้วย 12-36 ชั่วโมง

ระยะเวลาของอาการ : การติดเชื้อในคนปกติ ผู้ใหญ่ที่มีสุขภาพแข็งแรงดี ถ้าเกิดอาการกระเพาะลำไส้อักเสบนั้นจะเป็นนาน 2 - 3 วันเท่านั้น แต่ถ้าหากว่า มีการติดเชื้อเป็นเวลานานกว่านั้นอาการของโรคอาจแสดงไปเป็นเดือนหรือเป็นปีได้ และก็จะเสียชีวิตในที่สุด Thomas และ Mogford (1970) กล่าวว่าระยะการติดเชื้อที่ยาวนานกว่า 2 เดือนนั้นพบได้ 25 เปอร์เซนต์ ของผู้ป่วย และใน 20 เปอร์เซนต์ ของผู้ป่วย จะมีการติดเชื้อ เนื่องจาก การขับสารพิษของเชื้อเป็นช่วง ๆ ไม่ต่อเนื่องกัน และที่สำคัญ ถ้าเป็นในเด็กจะมีความไวต่อการติดเชื้อ และมีการขับสารพิษของเชื้อได้ยาวนาน และง่ายกว่าในผู้ใหญ่

สำหรับการบำบัดรักษาโรค Salmonellosis สิ่งที่จะต้องปฏิบัติคือ จะต้องรักษาสมดุลย์ของน้ำและเกลือแร่ของผู้ป่วยให้เป็นปกติ และป้องกันการสูญเสียของน้ำในร่างกายอีก ส่วนผู้ป่วยที่มีอาการหนัก ต้องส่งโรงพยาบาล และรีบการรักษาจากแพทย์อย่างใกล้ชิด (George, 1968)

ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์ของโรคที่แสดงออกในคนที่เป็นโรค Salmonellosis

อาการของโรค	ปริมาณการระบาดของโรค (เปอร์เซนต์)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ท้องร่วง	87	100	100	96	93	75	93	96	95
ท้องร่วง(มีเลือดออก)	4	-	-	-	5	-	-	-	-
เกร็งในช่องท้อง	70	47	70	81	86	82	76	66	57
เป็นไข้	68	82	-	85	62	80	48	97	43
คลื่นไส้	53	69	80	62	69	70	52	-	38
อาเจียน	53	82	80	40	40	62	26	54	19
หนาวสั่น	38	54	70	79	-	-	52	86	-
ปวดศีรษะ	36	66	60	-	65	-	63	-	29
เวียนศีรษะ	-	-	-	-	42	-	-	-	-
ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ	-	-	90	-	-	-	-	95	-

- หมายถึง ไม่พบในการรายงาน แต่อย่างไรก็ตามอาการดังกล่าว อาจมีเกิดขึ้นได้

ที่มา : รายงานประจำสัปดาห์ของ CDC

การใช้ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ในผลิตภัณฑ์อาหาร

แบคเทอริโอซิน ผลิตโดย แบคทีเรียแกรมบวก แบคเทอริโอซิน เป็นโปรตีนขนาดเล็กจากแบคทีเรีย หรือเปปไทด์ (peptide) ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรีย (bactericidal properties) ปัจจุบันพบว่า แบคเทอริโอซินผลิตได้จากแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันมากด้วย แบคเทอริโอซินมีผลต่างมากต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และการทำงานในธรรมชาติ โดยจะทำให้เซลล์ที่ถูกกระทำ มีความอ่อนแอ แบคเทอริโอซินซึ่งใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมมากชนิดหนึ่ง คือ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากจุลินทรีย์จำพวก แลกติคแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก สามารถใช้ยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก เช่น Clostridium, Staphylococcus และ Listeria ในอาหารหลายชนิด เช่น เนยแข็ง (cheese) ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (fermented meat) ซึ่งอาจจะผลิตได้เพียงพอที่จะป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการบวม (spoilage organism) ขึ้นได้ (Alan และ Barric, 1991) แบคเทอริโอซินมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น ไนซิน (nisin) แลคโตสเตรปซิน (lactostrepcin) เป็นต้น

การใช้ไนซิน (nisin) ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์อาหาร

ในการใช้ แบคเทอริโอซิน ทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นทราบว่า ไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่ง สามารถใช้ทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารต่างๆ ได้

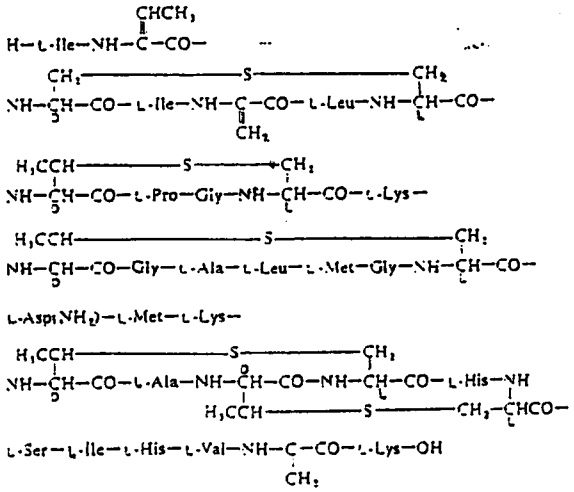
การนำไนซินไปประยุกต์ใช้สามารถอธิบายได้ โดย MattickและHirsch(1947), Mc Clintock และคณะ (1959) , Berridge (1959) , Rawley (1953) , Campbell และคณะ (1959) , Prescott และ Dunn (1959) , Goldberg (1959,1964) , Wheaton และ Hay (1964) Gibbs และ Hurst (1964) , Heinemann , voris Stumno (1965) นอกจากที่กล่าวมานี้ ยังมีผู้ทำงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ไนซิน ในการแปรรูปอาหารอีกมากมาย (Carl และ Seymour, 1968)

ในประเทศอังกฤษใช้ไนซินควบคู่กับการผลิต cheese spread (Carl และ Seymour, 1968) การพาสเจอร์ไรส์ (pasteurize) เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของสปอร์ (Hirsch และคณะ 1951), processed cheese (Mc Clintock และคณะ, 1952) และเนื่องจากไนซินมีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง(Heat stable) จึงได้มีการใช้ไนซินในอาหารกระป๋องที่ไม่ได้ทำการให้ความร้อนอย่างเพียงพอ เพื่อทำลาย Clostridium botulinum และใช้ในการยืดอายุการเก็บของนม และผลิตภัณฑ์นม (Michener, Thomoson และ Lewis, 1959) นอกจากนี้ ยังได้มีการใช้ไนซินในอาหารอีกหลายชนิด เช่น Heinmann และคณะ ได้ใช้ไนซินในนมผง บริษัท Aplin และ Barneti ใช้ไนซินเป็นสารควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ ซึ่งต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic spore forming bacteria)ในผลิตภัณฑ์นมคืนรูป และได้มีรายงานว่า ไนซินสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์และใช้ออกซิเจนในการเจริญ ซึ่งสามารถทนความร้อนในนมสเตอริไรซ์ได้อีกด้วย (Wajd และ Kalra, 1975)

ไนซินสามารถใช้ในอาหารได้ เพราะไม่เป็นพิษต่อร่างกายเมื่อรับประทานเข้าไป (Frazer,narratt และ Hickmann, 1962) โดยใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหาร (food additive) ซึ่งในประเทศอังกฤษยินยอมให้ใช้ได้ (Food Standard Commitee Report, 1959)และได้รับการยืนยันในประเทศสหรัฐอเมริกาว่า มีความปลอดภัยในการใช้ (Robert และคณะ , 1992) องค์การอาหาร และเกษตรกรรมแห่งสหประชาชาติ (FAO) ได้กำหนดให้ มนุษย์บริโภคไนซินได้โดยมิขีดจำกัดในการใช้ ประมาณ 33,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (FAO, 1985)

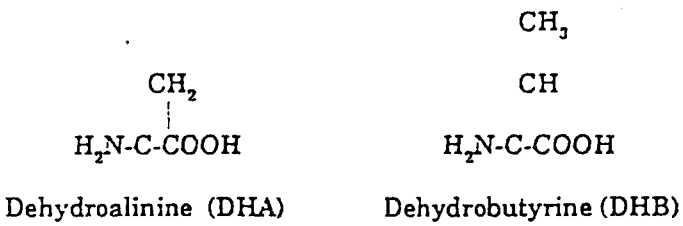
คุณสมบัติและการทำงานของไนซิน

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซิน ที่ผลิตจาก แลคติคแอซิคแบคทีเรียที่รู้จักกันดี คือ Lactococcus lactis subsp. lactis ซึ่งไนซินที่ได้ มีลักษณะเป็นโพลิเปปไทด์ (polypeptide) ขนาดใหญ่ ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัวเรียงกันอยู่ในวงแหวน 5 วง ดังภาพ ที่ 5 และมีสูตรโมเลกุล $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 3354.069 ดาลตัน (dalton) และประกอบด้วยกรดอมิโนที่ไม่ปรากฏบ่อยนักดังภาพที่ 6 (Bycroft,1988)

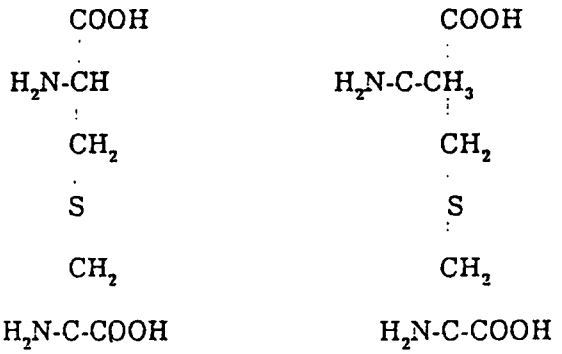


ภาพที่ 5 โครงสร้างของไนซิน (Bycroft., 1988)

จุลินทรีย์ที่สร้างไนซินโดยมากมักเป็น หัวเชื้อที่ทำการผลิตเนยแข็ง(cheese starter) เช่น Lactococcus lactis subsp. lactis หรือที่เรียกว่า Streptococcus lactis นั่นเอง(Alan และ Barric , 1991) จึงไม่น่าแปลกใจที่พบไนซิน ครั้งแรกในธรรมชาติจากเนยแข็ง ซึ่งแบคทีเรียแลคติคที่ใช้ในการบ่มเนยแข็งนั้นจะช่วยให้เกิดกลิ่นรสที่ดี (Carl และ Seymour,1968)



Dehydroalinine (DHA) Dehydrobutyrine (DHB)

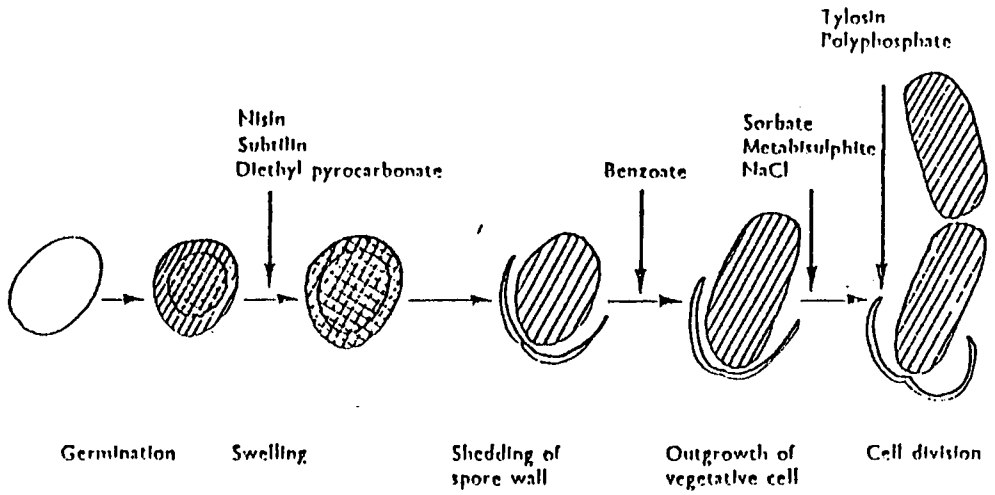


Lanthionine β-Methyllanthione

ภาพที่ 6 โครงสร้างของกรดอะมิโนที่พบไม่บ่อย ซึ่งเป็นส่วนประกอบของไนซิน (Alan และ Barrie, 1991)

J.Tramer ได้ทำการศึกษา คุณสมบัติของไนซินในการทนต่อความร้อนที่ทำการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) พบว่า ไนซินมีความคงตัวในสารละลายที่เป็นกรดดีกว่าเป็นกลางและพบว่าไนซินมีความทนต่อความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อได้ถึง 115.6 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที โดยไม่มีการสูญเสียกิจกรรมแต่อย่างใด (Tramer, 1964) อย่างไรก็ตาม ความคงตัวและการสลายของไนซิน ก็ยังขึ้นอยู่กับ pH อีกด้วย จากการทดลองของ Tramer พบว่าที่ pH 5 กิจกรรม จะลดลงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ และลดลงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 6.8 (Tramer, 1964) ส่วนที่ pH มากกว่า 7 กิจกรรมของไนซินจะถูกยับยั้งยิ่ง แม้ว่าจะอยู่ในอุณหภูมิห้องก็ตาม ไนซินถูกย่อยได้ โดยเอนไซม์ chymotrypsin ซึ่งผลิตจากตับอ่อน และขับออกมาในลำไส้เล็ก ด้วยคุณสมบัติที่ถูกย่อยได้นี้ จึงสามารถใช้ไนซินในการถนอมอาหาร โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์แต่อย่างใด (Alan และคณะ, 1991)

ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียพวกแกรมบวกได้หลายชนิด โดยเฉพาะพวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้ด้วย แบคทีเรียดังกล่าว ได้แก่ Staphylococcus (Gowans และคณะ, 1952) Streptococcus, Micrococcus และ Lactobacillus (Ogden & Tubb, 1985; Radler, 1990) Clostridium และ Bacillus (O'Brien และคณะ, 1956) และเร็วๆ นี้พบว่าไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นพิษในอาหาร คือ Listeria monocytogenes ได้เช่นกัน (Benkerroum & Sandine, 1989) โดยจะไปยับยั้งการงอกของสปอร์ในขณะที่กำลังโตขึ้น ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 การทำงานของไนซิน และสารถนอมอาหารอื่นๆ ในขณะที่สปอร์งอก (germinate)

(Gould, 1994)

จุดที่ไนซินออกฤทธิ์ (Mode of action)

สำหรับเซลล์ปกติไนซินจะกระทำต่อ cytoplasmic membrane ทำให้เกิดการถูกทำลาย และสารประกอบเซลล์ที่สำคัญ เช่น ATP ไหลออกมาจากเซลล์ หรือเกิดการ lysis (Ramseier, 1960) การศึกษาที่ละเอียดจนถึงขั้นจุดออกฤทธิ์ด้านชีวโมเลกุลนั้น พบว่าไนซินไปยับยั้งกลุ่มซัลไฟดริล (sulphydryl) ภายใน cytoplasmic membrane (Morris และคณะ, 1984)

ถ้าเป็นสปอร์ ไนซินจะออกฤทธิ์ฆ่าสปอร์(sporicidal) มากกว่ายับยั้งการงอกของสปอร์(sporostatic)

ความเป็นพิษของไนซิน

ไนซินผลิตขึ้นโดยแลคติกแอสิดแบคทีเรีย ซึ่งมีอยู่เองในนมดิบ และมนุษย์ได้บริโภคกันมาเป็นเวลานานแสนนาน จึงไม่น่าจะมีพิษ อื่นใด จากการสำรวจนมดิบ 251 ตัวอย่าง (จาก 9 ประเทศ 3 ทวีป) พบ ว่า 109 ตัวอย่างมี Lactococcus lactis ซึ่งสามารถผลิตไนซินได้

FAO/WHO ได้ทดสอบความเป็นพิษของไนซินแล้ว และได้ประกาศให้ใช้ไนซินในอาหารได้ เมื่อ 1969 (WHO, 1969) ปัจจุบันมีประเทศ ต่างๆ ประมาณ 47 ประเทศอนุญาตให้ใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ได้

การวิเคราะห์หาไนซิน

การวิเคราะห์หาไนซินมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น วิธีการเปลี่ยนสี methylene blue (Hirsch, 1950), วิธีวัดหาความขุ่น (Berridge & Barrett, 1952), การวัด horizontal agar diffusion (Fowler และคณะ, 1975) และการ วัด ATP ที่ปล่อยออกมาจาก Lactobacillus casei (Waites & Ogden, 1987) วิธีการที่ใช้ในปัจจุบันคือการหาไนซินแบบการเกิดโซนยับยั้งบน plate โดยใช้แบคทีเรีย Micrococcus luteus (M. flavus) วิธีการใหม่เช่น วิธี ELISA ก็สามารถใช้ได้ (Falahee และคณะ, 1990)

พันธุศาสตร์ของการผลิตไนซิน

ยีนที่ผลิตไนซินได้ถูก clone (Buchman และคณะ, 1988; Dodd และคณะ, 1990) ความสามารถของ Lactococcus lactis ใน การสังเคราะห์ไนซินสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธี conjugation เข้าไปสู่ สายพันธุ์ที่ไม่มียีนดังกล่าว (Tsai & Sandine, 1987)

โดยปกติโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบมีโครงสร้างของไขมันหนา และมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ทำให้ไนซินไม่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบ ได้ ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบที่ปนเปื้อนในอาหารที่ทำให้เกิดโรค เช่น Salmonella จึงได้ มีการศึกษาถึงการประยุกต์ใช้ไนซินกับแบคทีเรียแกรมลบร่วมกับคีเลทติง เอเจนต์(chelating agent) ซึ่งมีการค้นคว้าของนักวิจัยหลายท่านพบว่าไนซิน มีประสิทธิภาพต่อแบคทีเรียแกรมลบเมื่อใช้ไนซินร่วมกับ คีเลทติง เอเจนต์ โดยสามารถทำลายคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก ทำให้ไนซินสามารถทำงานได้ (Kelly และคณะ, 1992) ฉะนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะใช้ไนซินในการยับยั้ง Salmanella ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ปนเปื้อนในอาหาร และทำให้เกิดโรค ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นปัญหาต่อ อุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมาก

การใช้คีเลทติง เอเจนต์ (chelating agent) ร่วมกับไนซินในการยับยั้ง Salmonella

คีเลทติง เอเจนต์ เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ มีหลายชนิด ที่สำคัญคือ EDTA คีเลทติง เอเจนต์ จะทำลายเสถียรภาพของเซลล์ โดยทำให้ความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกสูญเสียไป โดยจับกับไอออนของโลหะ ซึ่งช่วยรักษาความคงตัว คือ แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+})ไว้ (Kelly และ คณะ, 1992) เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกสูญเสียความคงตัว ไนซินก็จะสามารถแทรกผ่านเข้าสู่ชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Michael และคณะ, 1986) จึงสามารถกล่าวได้ว่า คีเลทติง เอเจนต์ เป็นสารที่ทำให้ เซลล์แบคทีเรียแกรมลบ เกิดความอ่อนแอต่อสารปฏิชีวนะ ดังนั้น จึงสามารถใช้ไนซิน และคีเลทติง เอเจนต์ ร่วมกันในการลดปริมาณ เชื้อ Salmonella ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ทำให้เกิดโรคจากอาหารได้

บทที่ 3
การดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1.วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่รวมทั้งหมด 200 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างมาจากท้องตลาดและโรงงานผลิตไข่ผงของบริษัทผลิตภัณฑ์ไข่แปดริ้ว จำกัด จังหวัดฉะเชิงเทรา

2.เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้คือ Salmonella ที่แยกได้จากการทดลองในข้อ 1

3.อาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Brain Heart Infusion agar (BHI agar) Brain Heart Infusion broth (BHI broth) Brilliant Green agar (BGA) Lysine Indole Motility Medium (LIM) Trypticase Soy Broth (TSB) Triple Sugar Iron agar (TSI) Tetrathionate Broth Base (TIB) และ Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD)

4.สารเคมีที่ใช้ได้แก่ สารละลายไอโอดีน 2 เปอร์เซ็นต์ (2 % Iodine solution) สารละลายไนซิน สารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02 นอร์มอล และ 10 โมลาร์ แอลกอฮอล ทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCL) แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เจลาติน (Gelatin) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5.เครื่องมือได้แก่ ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) เครื่องกรองจุลชีพ (Milipore filter) ตู้เขี่ยเชื้อ ตู้แช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส วอร์เทกซ์ มิกเซอร์ (Vortex mixer) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven) สเปคโตรโฟโตมิเตอร์(Spectrophotometer) เครื่องวัดความเป็น กรด-ด่าง (pH meter) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

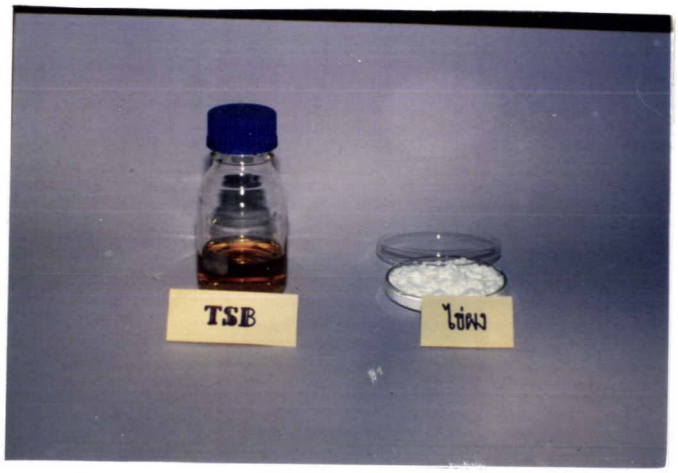
วิธีการทดลอง

1. การตรวจหาเชื้อ และ การจำแนกชนิดของ Salmonella ที่ปนเปื้อนใน ไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่

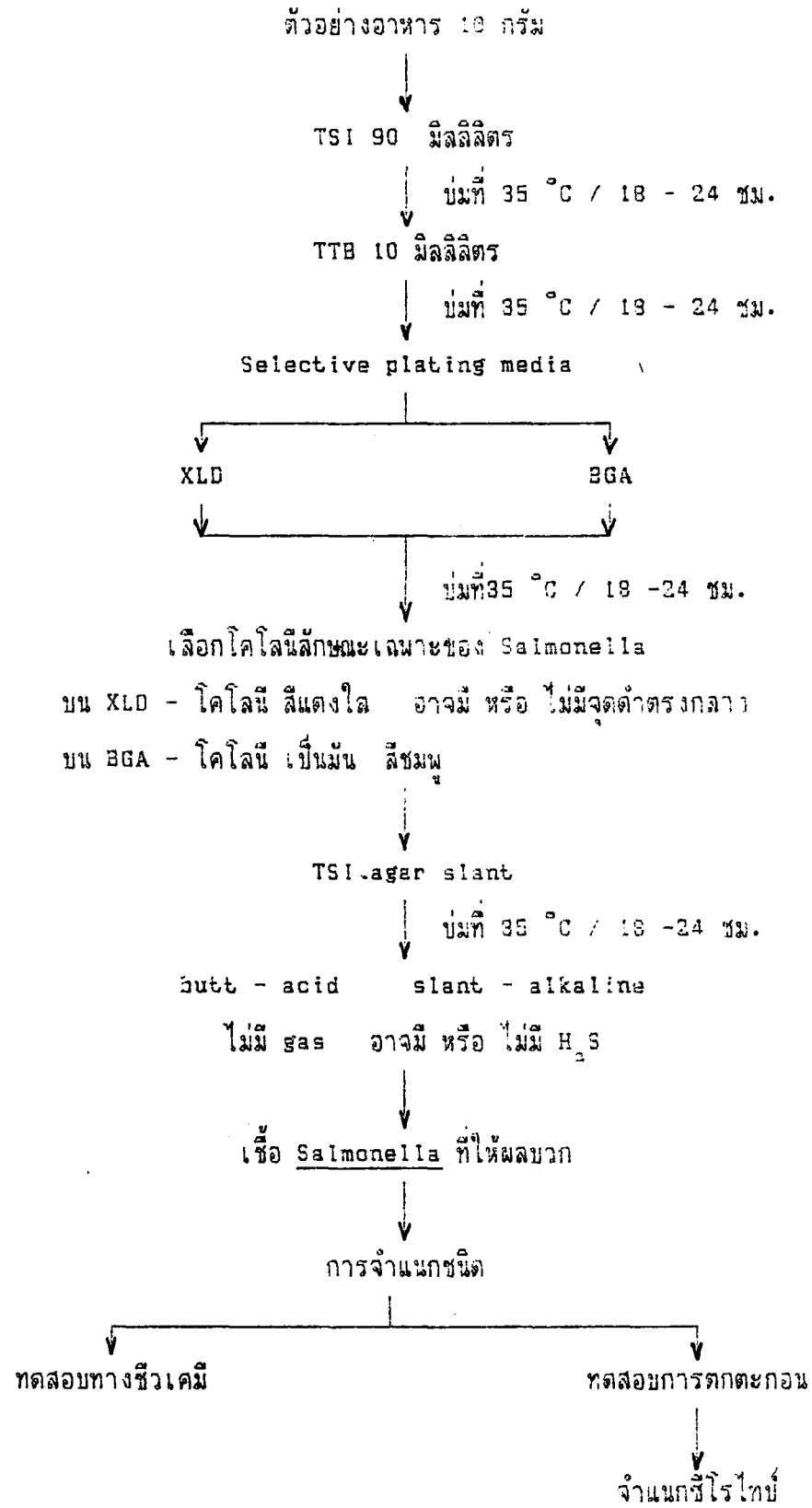
การทดลองในขั้นนี้ จะทำการสุ่มตัวอย่างดังนี้ คือ ไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และ เปลือกไข่ โดยใช้ชนิดละ 40 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 200 ตัวอย่าง แล้วทำการตรวจหา และ จำแนกชนิด ของเชื้อ Salmonella ตามวิธีของ Kauffmann-White Schema ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างไข่ ซึ่งได้แก่ ไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และ เปลือกไข่ ชนิดละประมาณ 10 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ตักใส่ลงในขวดบ่มเชื้อ ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ TrypLicase Soy Broth (TSB) 90 มิลลิลิตร ซึ่งเป็น pre enrichment media เขย่าให้เข้ากัน และบ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว จึงใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างอาหาร TSB ดังกล่าว 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ TetraThionate Broth (TTB) 10 มิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรีย ในตระกูล Salmonella ทำการบ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ TTB ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar และ Brilliant Green Agar (BGA) โดยเทคนิค streak plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18 24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีที่เจริญบน XLD Agar และ BGA เลือกโคโลนี ที่สงสัยว่าเป็น เชื้อ Salmonella เก็บไว้ใน Brain Heart Infusion (BHI) Agar และนำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น Salmonella มาทดสอบกับอาหาร Triple Sugar Iron (TSI) Agar และ อาหาร Lysine Indole Motility (LIM) ในการทดสอบกับอาหาร TSI ทำได้โดยถ่ายเชื้อลงบน slant และ butt ของหลอดอาหาร TSI โดยการ stab และ streak บ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เลือกตัวอย่างเชื้อที่ให้ผลบวก (+) คือ butt acid และ slant-alkaline โดยอาจมี หรือไม่มีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ก็ได้ สำหรับการทดสอบบนอาหาร LIM ทำโดยการ stab ลงบนอาหาร LIM บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลทุก 24 ชั่วโมง ซึ่ง Salmonella นี้ จะให้ alkaline reaction ไม่เปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ (Indicator) จึงมีสีม่วงเช่นเดิม อาจมีรอยขุ่นขาวรอบรอย stab เชื้อที่เป็น Salmonella จะให้ผลบวก ทั้งกับ TSI และ LIM คัดเลือกเชื้อเฉพาะที่ เป็น

Salmonella จริง ๆ ไปทำการแยกชนิด โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทำการทดสอบการตกตะกอน(Serological agglutination test) กับpolyvalent serum Salmonella Somatic (O) : กลุ่ม A-E (ในขั้นตอนนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก กองจุลชีววิทยาทางอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการใช้อุปกรณ์และสารเคมี รวมทั้งคำแนะนำจากผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ผล) จากนั้นทำการเก็บเชื้อที่แยกได้นี้ ที่ อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แล้วนำไปจำแนกซีโรไทป์ โดยส่งเชื้อ Salmonella ที่เพาะแยกได้ ไปยังศูนย์ซาลโมเนลลา และชิเจลลาแห่งชาติ (WHO National Salmonella and Shigella Center) กองพยาธิวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อทำการตรวจหา O - antigen และ H - antigen อ่านผลตาม โครงสร้างของแอนติเจน (antigenic structure) ของเชื้อ Salmonella ตามแบบของ Kauffmann - White Schema แล้วรายงานผลการจำแนกซีโรไทป์ของ Salmonella ที่ได้ ขั้นตอนในการแยกเชื้อทั้งหมด สรุปได้ดังภาพที่ 9 เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จะทำการคัดเลือกมา 1 ชนิด แล้วนำมาทำการทดลองในขั้นการตรวจหาปริมาณ ไนซิน และ EDTA ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้ง Salmonella ต่อไป



ภาพที่ 8 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และไข่ขาวผง



ภาพที่ 3 ขั้นตอนในการตรวจหาเชื้อและจำแนกชนิด Salmonella ในผลิตภัณฑ์ไข่

2.การตรวจหาปริมาณ ไนซิน และ EDTA ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้ง Salmonella ที่แยกได้จากไข่ผง

การทดลองในขั้นนี้ เป็นการหาสภาวะที่ดีที่สุดในการยับยั้ง Salmonella ชนิดที่แยกได้จากตัวอย่าง ไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่ ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำ Salmonella ชนิดที่แยก ซึ่งคัดเลือกมาจากผลการทดลองในข้อที่ 1 ถ่ายลงใน BHI broth แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ให้ได้จำนวนเซลล์ ประมาณ $6.0X10^7$ CFUต่อมิลลิลิตร (วัดค่า optical density ให้ได้ประมาณ 0.08 ตามกราฟมาตรฐานในข้อ 1 ภาคผนวก ค และหาค่า doubling time ตามวิธีในข้อ 2 ภาคผนวก ค) จากนั้น แยกเซลล์ออกจาก BHI broth โดยใช้วิธีการกรองด้วย milipore filter ซึ่งมีขนาดรูกรองของกระดาษกรอง เท่ากับ 0.45ไมครอน จากนั้นจึงนำไปทำ suspension ในสารละลายต่อไปนี้คือ เซลล์บัฟเฟอร์ (cell buffer) สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ในเซลล์บัฟเฟอร์ สารละลายไนซินความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเซลล์บัฟเฟอร์ และสารละลายไนซินความเข้มข้น 10,25,50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ ในเซลล์บัฟเฟอร์ จากนั้นนำ suspensionของเชื้อ Salmonella ที่ได้ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำเซลล์ไปกรองและทำความสะอาดอีกครั้งด้วยเซลล์บัฟเฟอร์ ทำการเจือจาง แล้วนับจำนวน Salmonella ที่เหลืออยู่ โดยวิธี pour plate ใน BHI agar ซึ่งบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

นำผลการทดลองที่ได้คือ จำนวน Salmonella เริ่มต้น และ จำนวน Salmonella ที่เหลืออยู่มาทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ analysis of variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ log reduction โดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจหาเชื้อ Salmonella และจำแนกชนิดของ Salmonella ที่ปนเปื้อนในไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่

จากการที่ได้สุ่มตัวอย่างไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่ ชนิดละ 40 ตัวอย่าง รวม 200 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อ และจำแนกชนิดของ Salmonella ตามวิธีของ Kauffmann-White Schewa ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ ซึ่งให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD agar และ BGA ซึ่งแยกได้จากไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบ	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อซึ่งให้ผลบวก		รวม
		อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD	อาหารเลี้ยงเชื้อBGA	
ไข่เหลว	40	11	13	24
ไข่ขาวผง	40	0	2	2
ไข่แดงผง	40	1	1	2
ไข่รวมผง	40	0	0	0
เปลือกไข่	40	12	10	22
รวม	200	24	26	50

จะเห็นได้ว่าเชื้อจากตัวอย่างที่ให้ผลบวก (+) บนอาหาร Selective plating media ซึ่งก็คือ XLD agar และ BGA มีทั้งหมด 50 ตัวอย่าง สำหรับตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกบน XLD agar นั้น พบทั้งหมด 24 ตัวอย่าง โดยพบเชื้อที่มีโคโลนีสีแดงใส ตรงกลางเป็นสีดำ อาหารเลี้ยงเชื้อ

ที่บริเวณรอบโคโลนี เปลี่ยนเป็นสีชมพู บางครั้งสังเกตเห็น ขอบโคโลนีของเชื้อ มีสีเหลือง ตรงกลางมีสีดำ แต่ถ้าบ่มนาน 48 ชั่วโมง โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู ใน 24 ตัวอย่างที่พบนี้เป็นไข่เหลว 11 ตัวอย่าง ไข่แดงผง 1 ตัวอย่าง และเปลือกไข่ 12 ตัวอย่าง ส่วนตัวอย่าง ที่ให้ผลบวกบน BGA พบทั้งหมด 26 ตัวอย่าง ซึ่งใน 26 ตัวอย่างที่พบนี้ เป็นไข่เหลว 13 ตัวอย่าง ไข่ขาวผง 2 ตัวอย่าง ไข่แดงผง 1 ตัวอย่าง และเปลือกไข่ 10 ตัวอย่าง โคโลนีที่สงสัยว่าเป็น Salmonella ซึ่งให้ผลบวกบน BGA จะมีลักษณะกลม มันเยิ้ม สีชมพู และอาหารรอบโคโลนีเป็นสีชมพูเช่นกัน และเมื่อนำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น Salmonella ทั้งหมดมาแยกเก็บไว้ จะได้เชื้อทั้งหมด 50 ไอโซเลต และนำเชื้อทั้ง 50 ไอโซเลตนี้มาทดสอบ ในอาหาร TSI และ LIM ได้ผลดังตารางที่ 7 ซึ่งจะเห็นได้ว่า เชื้อจากตัวอย่างไข่เหลว ที่สงสัยว่าเป็น Salmonella จาก 24 ตัวอย่างที่ทดสอบนั้น ให้ผลบวกใน TSI และใน LIM เพียง 1 ไอโซเลต คือ ในอาหาร TSI จะเกิดสีดำที่ก้นหลอด เพราะมีการย่อยโปรตีน และเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ส่วนด้านบนเป็นด่าง จึงมีสีแดงเหมือนเดิม เพราะไม่เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส และแลคโตส เรียกว่า butt-acid slant-alkaline สำหรับใน LIM นั้นให้ผลบวก โดยสังเกตได้ดังนี้ คือ อาหารมีสีม่วงดังเดิมไม่เปลี่ยนสี เนื่องจากมีเอนไซม์ไลซีน ดีคาร์บอกซิเลส (Lysine decarboxylase) ซึ่งจะย่อยสลายไลซีนโดยไม่เปลี่ยนสีอาหารแต่อย่างใด ภายในหลอดจะขุ่นเพราะเชื้อมีแฟลกเจลลา จึงมีการเคลื่อนที่ได้ ในอาหาร LIM สำหรับเชื้อ ซึ่งสงสัยว่าเป็น Salmonella ที่แยกจากไข่แดงผง และเปลือกไข่ มีจำนวน 2 ไอโซเลต และ 23 ไอโซเลต ตามลำดับนั้น พบว่าให้ผลบวก กับการทดสอบ TSI และLIM เพียงชนิดละ 1ไอโซเลต เท่านั้น ส่วนเชื้อจากไข่ขาวผงที่แยกได้จำนวน 2 ไอโซเลตนั้น ให้ผลลบ (-) กับการทดสอบใน TSI และ LIM ทั้งหมด

ตารางที่ 7 จำนวนเชื้อซึ่งให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI และ LIM

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนเชื้อทั้งหมดที่นำมาตรวจสอบ (ไอโซเลต)	จำนวนเชื้อซึ่งให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI และ อาหารเลี้ยงเชื้อ LIM (ไอโซเลต)
ไข่เหลว	24	1
ไข่ขาวผง	2	0
ไข่แดงผง	2	1
ไข่รวมผง	0	0
เปลือกไข่	22	1
รวม	50	3

ฉะนั้นจากผลการทดสอบใน TSI และLIM สรุปได้ดังตารางที่ 8 ว่าพบเชื้อ Salmonella ที่แท้จริงทั้งหมด 3 ไอโซเลต จากตัวอย่างไข่เหลว ไข่แดงผง และเปลือกไข่ ชนิดละ 1 ตัวอย่าง จากนั้นจึงได้นำเชื้อ Salmonella ทั้ง 3 ไอโซเลตนี้ มาทำการจำแนกชนิด โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และทำการทดสอบ การตกตะกอนต่อไป เพื่อจำแนกกลุ่ม (group) ของ Salmonella ที่พบ

ตารางที่ 8 จำนวนเชื้อ Salmonella ที่แยกได้จาก ไข่เหลว ไข่ขาวผง ไข่แดงผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ (ไอโซเลต)	
	Salmonella	ไม่ใช่ Salmonella
ไข่เหลว	1	23
ไข่ขาวผง	0	2
ไข่แดงผง	1	1
ไข่ขาวผง	0	0
เปลือกไข่	1	21
รวม	3	47

จากการนำ Salmonella ที่แยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลต มาจำแนกชนิด โดยทดสอบทางชีวเคมี และ Serological agglutination สามารถสรุปผลการจำแนกชนิดของ Salmonella ได้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ชนิดของ Salmonella 3 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จาก ไข่แดง ไข่แดงผง และเปลือกไข่

รหัสของเชื้อ	ชนิดของ Salmonella	ชนิดของตัวอย่างที่พบเชื้อ Salmonella	จำนวน	
			ไอโซเลต	ร้อยละ
S_1	S. mbandaka	ไข่เหลว	1	2.5
S_2	S. singapore	ไข่แดงผง	1	2.5
S_3	S. singapore	เปลือกไข่	1	2.5

จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่า Salmonella ที่พบจากไข่เหลว คือ S. mbandaka คิดเป็นร้อยละ 2.5 Salmonella ที่พบจากไข่แดงผง และเปลือกไข่ คือ S. singapore คิดเป็นร้อยละ 2.5 Salmonella ที่พบจากเปลือกไข่ คือ S. singapore คิดเป็นร้อยละ 2.5 เช่นกัน

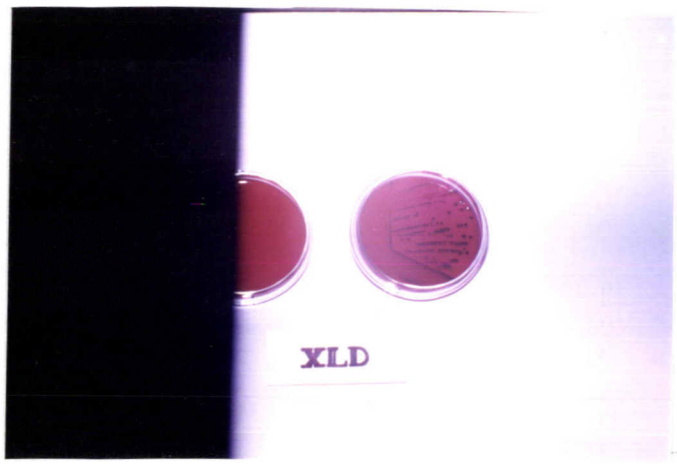
ส่วนในการตรวจสอบทางชีวเคมี ของ S. mbandaka กับ S. singapore ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปฏิกิริยาการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของS.mbandaka กับS.singapore

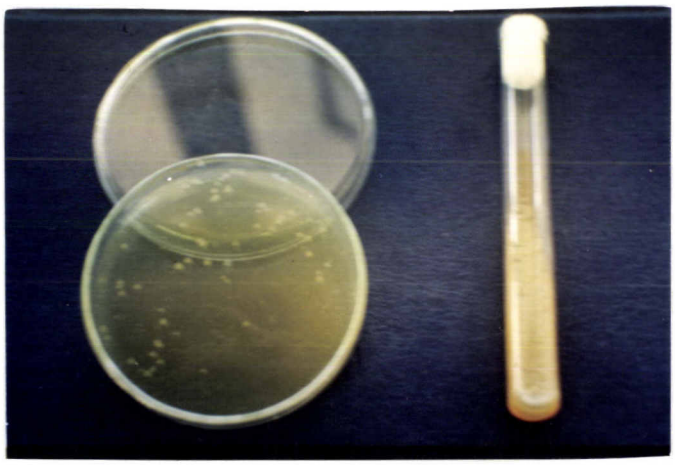
ปฏิกริยาทางชีวเคมี	S. mbandaka	S. singapore
oxidase	-	-
TSI	K / AG +	K / AG+
mobility	+	+
indol	-	-
citrate	v	v
LD	+	+
OD	+	+
urease	-	-
arabinose fermentation	-	-

นอกจากนี้ ยังได้ทดสอบการตกตะกอนกับ polyvalant serum Salmonella O : A-E พบว่า Salmonella ที่พบจาก 3 ตัวอย่างนั้น ล้วนอยู่ในกลุ่ม C ทั้งหมด สำหรับการจำแนกทางซีโรไทป์นั้น ศูนย์ซัลโมเนลลา และชิเจลลา แห่งชาติ (WHO National Salmonella and Shigella center) กองพยาธิวิทยา กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ให้ความอนุเคราะห์ ทำการตรวจหา C-antigen และ H-antigen อ่านผลตาม antigenic structure ของเชื้อ Salmonella ตามแบบของ Kauffmann-White Schema

จากการจำแนกเชื้อ Salmonella ที่ตรวจแล้ว พบว่าเป็น S. singapore และ S. mbandaka จึงทำการเลือกSalmonella เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นการตรวจหาปริมาณไบซ์ และ EDTA ที่เหมาะสมที่สุดในการชักนำ Salmonella ต่อไป โดยอาศัยข้อมูลจากศูนย์ซัลโมเนลลาและชิเจลลาแห่งชาติที่ได้ทำการสำรวจจำแนกเชื้อ Salmonellaในผักสดและอาหารสัตว์ ต่างๆตั้งแต่ พ.ศ.2527 ถึง พ.ศ.2537 ปรากฏว่าพบ S. singapore มากกว่า S. mbandaka ดังนั้น จึงเป็นเหตุผลในการเลือก S. singapore เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป



ภาพที่ 10 Salmonella ในอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD Agar



ภาพที่ 11 Salmonella ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BBL Agar

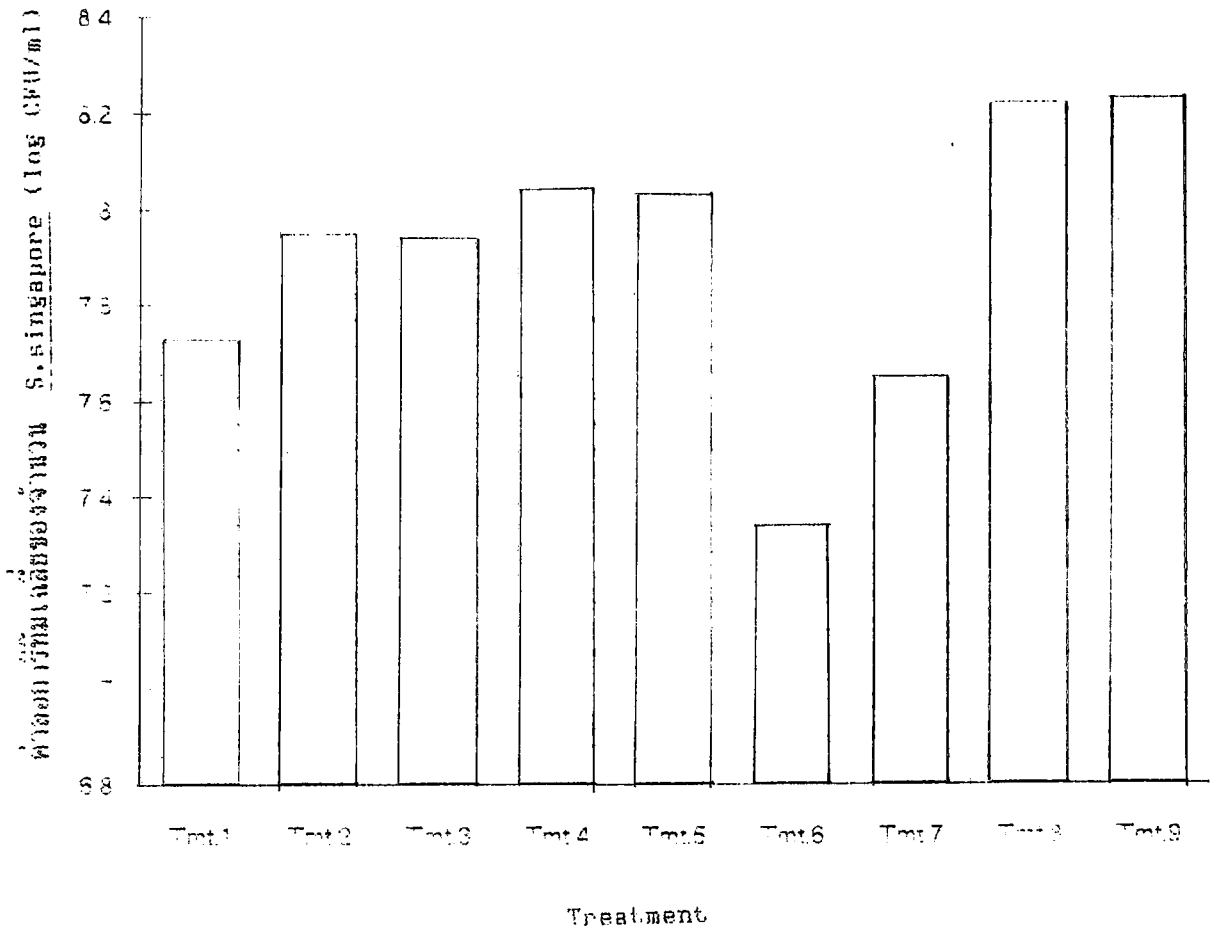
2. การตรวจหาปริมาณไนซิน และ EDTA ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้ง Salmonella ที่แยกได้จากไข่ผง

จากการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นของไนซินและ EDTA ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้ง Salmonella singapore ที่แยกได้จากไข่แดงผงในขั้นตอนการทดลองข้อ 1 โดยใช้เซลล์เริ่มต้นประมาณ 6.0×10^7 CFU/ml (OD_{600}=0.08) และเมื่อทำการทดลองพบว่าเชื้อจะเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆตามเวลาที่ผ่านไปในระหว่างทำการทดลอง ดังนั้นจึงต้องคำนวณหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่แท้จริงจาก doubling time ที่แสดงในภาคผนวก ข จากนั้น เมื่อได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่แท้จริงแล้ว จึงนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่หลังจากยับยั้งด้วยไนซินและ EDTAได้ผลดังตารางที่ 11 และสรุปปริมาณเชื้อ S. singapore ที่ลดลงหลังเติมไนซินและ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังภาพที่ 13 ซึ่งปริมาณเชื้อที่ลดลงนี้จะแสดงถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มปริมาณ S. singapore ได้

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบปริมาณ S. singapore ก่อนและหลังเติมไนซินและ EDTA ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้นของไนซินและEDTA ใน cell buffer	ครั้งที่ทดลอง	ปริมาณเชื้อ S. singapore (CFU/ml)		
		ปริมาณเริ่มต้น	ปริมาณที่เหลือ	ปริมาณที่ลดลง
ไนซิน 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$18.0x10^7$	$10.0x10^7$	$8.0x10^7$
+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	2	$18.0x10^7$	$14.4x10^7$	$3.6x10^7$
ไนซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$31.0x10^7$	$21.6x10^7$	$9.4x10^7$
+ EDTA 0 มิลลิโมลาร์	2	$31.0x10^7$	$27.6x10^7$	$3.4x10^7$
ไนซิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$31.0x10^7$	$21.0x10^7$	$10.0x10^7$
+ EDTA 0 มิลลิโมลาร์	2	$31.0x10^7$	$23.4x10^7$	$7.6x10^7$
ไนซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$31.0x10^7$	$22.0x10^7$	$9.0x10^7$
+ EDTA 0 มิลลิโมลาร์	2	$31.0x10^7$	$17.6x10^7$	$13.4x10^7$
ไนซิน 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$36.0x10^7$	$25.2x10^7$	$10.8x10^7$
+ EDTA 0 มิลลิโมลาร์	2	$36.0x10^7$	$25.2x10^7$	$10.8x10^7$
ไนซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$18.0x10^7$	$16.5x10^7$	$1.5x10^7$
+EDTA 20 มิลลิโมลาร์	2	$18.0x10^7$	$14.8x10^7$	$3.2x10^7$
ไนซิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$23.0x10^7$	$18.2x10^7$	$4.8x10^7$
+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	2	$23.0x10^7$	$18.8x10^7$	$4.2x10^7$
ไนซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$27.0x10^7$	$9.9x10^7$	$17.1x10^7$
+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	2	$27.0x10^7$	$10.8x10^7$	$16.2x10^7$
ไนซิน 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	1	$27.0x10^7$	$9.0x10^7$	$18.0x10^7$
+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	2	$27.0x10^7$	$11.0x10^7$	$16.0x10^7$

ภาพที่ 12 ค่าลดการฟื้นเฉลี่ยของจำนวน S.singapore ที่ลดลงหลังจากเติมไนซินและ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน



หมายเหตุ

Tmt. 1	หมายถึง	ไนซิน	0	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	20	มิลลิโมลาร์
Tmt. 2	หมายถึง	ไนซิน	10	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	0	มิลลิโมลาร์
Tmt. 3	หมายถึง	ไนซิน	25	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	0	มิลลิโมลาร์
Tmt. 4	หมายถึง	ไนซิน	50	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	0	มิลลิโมลาร์
Tmt. 5	หมายถึง	ไนซิน	100	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	0	มิลลิโมลาร์
Tmt. 6	หมายถึง	ไนซิน	10	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	20	มิลลิโมลาร์
Tmt. 7	หมายถึง	ไนซิน	25	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	20	มิลลิโมลาร์
Tmt. 8	หมายถึง	ไนซิน	50	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	20	มิลลิโมลาร์
Tmt. 9	หมายถึง	ไนซิน	100	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+	EDTA	20	มิลลิโมลาร์

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

จากผลการทดลอง สามารถนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติได้โดยใช้ analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละความเข้มข้น โดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT)ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงได้ดังตารางที่ 12 และ 13

ตารางที่ 12 analysis of variance ของประสิทธิภาพในการยับยั้ง S. singapore

Source of Variation	degree of freedom (df)	Sum of aquare (ss)	Mean square (MS)	F-Value	Tabular F	
					5 %	1 %
Treatment	8	1.30	0.16	10.45**	3.23	5.47
error	9	0.44	0.02			
Total	17	1.44				

Treatment หมายถึง สารละลายไนซินและ EDTA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

** หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตารางที่ 13 ผลการเปรียบเทียบค่าลอการิทึมเฉลี่ยของจำนวน S. singapore ที่ลดลงหลังจากเติมไนซินและ EDTA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้ DMRT 5%

ความเข้มข้นของไนซิน และ EDTA	ปริมาณ Salmonella ที่ลดลงเฉลี่ย (mean log reduction)
ไนซิน 0ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	7.73 bcd
ไนซิน 10ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 0 มิลลิโมลาร์	7.95 abc
ไนซิน 25ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 0 มิลลิโมลาร์	7.94 abc
ไนซิน 50ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 0 มิลลิโมลาร์	8.04 ab
ไนซิน 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 0 มิลลิโมลาร์	8.03 ab
ไนซิน 10ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	7.34 de
ไนซิน 25ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	7.65 cde
ไนซิน 50ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	8.22 a
ไนซิน 100ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร+ EDTA 20 มิลลิโมลาร์	8.23 a

ค่าเฉลี่ยใดที่ตามด้วยตัวอักษรไม่เหมือนกัน แตกต่างกันทางสถิติที่ DMRT 5%

จากผลการวิเคราะห์โดยใช้ตาราง analysis of varince (ANOVA) พบว่า แต่ละความเข้มข้นของไนซินและ EDTA มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 99 โดยเมื่อเปรียบเทียบค่าลอการิทึมเฉลี่ยของจำนวน S. singapore ที่ลดลง พบว่า เมื่อใช้สารละลายไนซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ในเซลล์บัฟเฟอร์ จะให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้สารละลายไนซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ในเซลล์บัฟเฟอร์แต่อย่างใด ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ซึ่งสามารถลดปริมาณ S. singapore ลงได้ 8.23 และ 8.22 log cycle ตามลำดับ ทั้ง 2 ความเข้มข้นนี้ให้ผลการยับยั้งได้ดีกว่าระดับความเข้มข้นอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ส่วนไนซิน 10,25,50,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในเซลล์บัฟเฟอร์สามารถยับยั้ง S. singapore ได้บางส่วน คือสามารถลดปริมาณเชื้อได้ 7.94-8.04 log cycle ซึ่งประสิทธิภาพ ณ ความเข้มข้นทั้ง 4 ไม่แตกต่างกัน และพบว่า ไนซิน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง S. singapore ไม่แตกต่างจากการใช้สารละลาย EDTA 20 มิลลิโมลาร์ในเซลล์บัฟเฟอร์แต่อย่างใด

สำหรับความเข้มข้นที่ยับยั้ง S. singapore ได้น้อยที่สุดคือ สารละลายไนซิน 10 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ในเซลล์บัฟเฟอร์ ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

คาดว่าสาเหตุที่การใช้สารละลายไนซิน 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ EDTA ให้ผลดีที่สุดเนื่องจากเกิดการสูญเสียแมกนีเซียมไอออนในชั้นลิโปโพลีแซคคาไรด์ของ Outer membrane การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการทำงานของ EDTA ซึ่งจะมีผลทำให้ความสามารถในการผ่านเข้า-ออกเซลล์ (cell permeability)เพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ไนซินสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มาก และทำการยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรีย โดยเข้าไปยับยั้งที่เยื่อหุ้มไซโตพลาสมิค ดังนั้นเมื่อใช้ไนซินปริมาณมาก ก็จะสามารถยับยั้งกิจกรรมของเซลล์แบคทีเรียได้มากกว่าเมื่อใช้ไนซินปริมาณน้อย (Kelly,1992)

ส่วนปริมาณไนซินที่เหมาะสมในการใช้กับ Salmonella สปีชีส์อื่น ๆ อาจให้ผลแตกต่างกันไปบ้างเล็กน้อยตามคุณสมบัติ cell permeability ของเชื้อแต่ละชนิด เช่น การศึกษาของ Kelly และคณะ(1992) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของไนซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้ร่วมกับEDTA 20 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้ง S. typhimurium 83 ได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นของไนซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ EDTA 20 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้ง S. enteritidis P.R.#1 และ S. hadar 3503-2 ได้ดีที่สุด ส่วน S. heidelberg ,S. choleraesuis ATCC 10708 ,S. infansis 310-2 เมื่อใช้ไนซิน 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ พบว่าจะยับยั้งได้ดีที่สุด และประสิทธิภาพในการยับยั้งของทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นไม่แตกต่างกัน

จากผลการทดลอง จึงแสดงได้ว่า ความเข้มข้นที่ดีที่สุดในการยับยั้ง S. singapore ซึ่งพบในไข่แดงผง คือ 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรร่วมกับ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งไม่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรใช้ความเข้มข้นไนซินที่ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ EDTA ในการยับยั้ง S. singapore เพราะปริมาณนี้สามารถใช้ได้น้อยและให้ผลไม่ต่างจากที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแต่อย่างใด

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจหา Salmonella ในตัวอย่างไข่ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ไข่เหลว ไข่แดงผง ไข่ขาวผง ไข่รวมผง และเปลือกไข่ ชนิดละ 40 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 200 ตัวอย่างนั้น ได้ตรวจพบ Salmonella จาก เปลือกไข่ ไข่เหลว และไข่แดงผง ชนิดละ 1 ตัวอย่าง เมื่อนำ Salmonella ที่แยกได้ไปจำแนกชนิด ปรากฏว่า Salmonellaจากไข่แดงผงเป็นชนิด S. singapore พบร้อยละ 2.5 และ Salmonella จากเปลือกไข่เป็นชนิด S. singapore พบร้อยละ 2.5 สำหรับไข่เหลวตรวจพบ Salmonella ชนิด S. mbandaka คิดเป็นร้อยละ2.5เช่นเดียวกัน ซึ่งมาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข กำหนดไว้ว่า ในผลิตภัณฑ์ไข่ จะต้องไม่พบ Salmonella แม้แต่เซลล์เดียว ดังนั้นจึงต้องหาวิธียับยั้ง Salmonella ในผลิตภัณฑ์ไข่ผงต่อไป

สำหรับการตรวจหาปริมาณไนซิน และ EDTA ที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้ง S. singapore พบว่า ที่ความเข้มข้นไนซิน 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ในเซลล์บัฟเฟอร์ จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง S. singapore ได้สูงสุด คือ สามารถลดปริมาณ S. singapore ลงได้ 8.23 และ 8.22 log cycle ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ Duncan Multiple Range Test พบว่า แตกต่างจากความเข้มข้นอื่นๆ และประสิทธิภาพของทั้งสองความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้น จึงควรใช้ไนซินระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้ร่วมกับ EDTA 20 มิลลิโมลาร์ในเซลล์บัฟเฟอร์ในการยับยั้ง Salmonella จากไข่ผง

จากการที่ตรวจพบ Salmonella ในไข่ผงนี้ ถึงแม้ว่าจะพบในปริมาณน้อย ก็ทำให้สามารถสรุปได้ว่า Salmonella นั้น สามารถรอดชีวิตได้จากการทำแห้ง หากผลิตภัณฑ์ไข่ผงที่ผลิตในประเทศไทยยังคงมี Salmonella ปนเปื้อนเช่นนี้ต่อไป ก็อาจมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศ คือทำให้ต่างประเทศไม่รับซื้อไข่ผงจากประเทศไทย มีผลให้มูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์ไข่ผงลดลง ดังนั้นจึงควรที่จะทำการศึกษาการยับยั้ง Salmonella ในไข่ผงโดยนำไนซินและ EDTA ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองนี้ เติมลงในไข่เหลวที่เพาะ S. singapore ไว้ แล้วนำไปผ่านขั้นตอนการทำไข่ผง เพื่อศึกษาถึงผลของไนซินและ EDTA ต่อการยับยั้ง S. singapore ในไข่ผง ซึ่งผลที่ได้ สามารถนำไปใช้แก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมการผลิตไข่ผงได้อย่างแท้จริงและคุ้มค่าทางเศรษฐกิจในที่สุด

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 Brain Heart Infusion broth (BHI broth)

Calf brain infusion	200	กรัม
Beef heart infusion	250	กรัม
Proteose peptone or gelysate	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Disodium phosphate	25	กรัม
Dextrose	2	กรัม

2 Lysine Indole Motility (LIM) Medium

Polypeptone	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
L-Lysine dihydrochloride	10.0	กรัม
L-Tryptophan	0.5	กรัม
Bromcresol purple	0.02	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 6.7

3 Trypticase Soy Broth (TSB)

Peptone 140	17.0	กรัม
Peptone 110	3.0	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Dibasic potassium phosphate	2.5	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.3

4 Triple Sugar Iron (TSI) Agar

Polypeptone	20.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Ferrous ammonium sulphate	0.2	กรัม
Sodium thiosulphate	0.3	กรัม
Phenol red	0.024	กรัม
Agar	13.0	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.3

5 Tetrathionate Broth Base (TTB)

Peptone 180 (Polypeptone)	5.0	กรัม
Bacteriological bile (bile salts)	1.0	กรัม
Calcium carbonate	10.0	กรัม
Sodium thiosulphate	30.0	กรัม
Distilled water	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.0

6 Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) Agar

Yeast extract	5.0	กรัม
Xylose	3.5	กรัม
L-Lysine hydrochloride	5.0	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Bile salts	2.5	กรัม
Sodium thiosulphate	4.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.4

7 Brilliant Green Agar (BGA)

Proteose peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Brilliant Green Indicator	0.0125	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

ให้ความร้อนจนเดือด 1 นาที แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

ปฏิกิริยาการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ของ S.singapore และ S.mbandaka

การพิสูจน์โดยวิธีการ typing (Serotyping)

แบคทีเรียเหล่านี้มีลักษณะแอนติเจนมากมาย ดังนั้นในการทดสอบเพื่อให้ทราบแน่นอนว่าแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้นั้นมีลักษณะแอนติเจนอะไรบ้าง จำเป็นต้องอาศัยแอนติเจนซีรัมที่จำเพาะเป็นจำนวนมาก ซึ่งเกินกำลังและจำเป็นสำหรับห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา อย่างไรก็ตามเมื่อแยกเชื้อที่มีลักษณะทางชีวเคมี และคุณสมบัติอื่นๆ คล้ายคลึงกับแบคทีเรียเหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Salmonella, Shigella และ V. cholerae แล้วควรทดสอบกับแอนติเจนซีรัมโพลีวาเลนท์ และทำการทดสอบกับแอนติเจนซีรัมที่จำเพาะต่อ serogroup หรือ ซีโรวาต่างๆ ต่อไป เมื่อแน่ใจว่าเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในลำไส้แล้ว ห้องปฏิบัติการสามารถรายงานผลการเพาะเชื้อ และจัดส่งเชื้อไปยังกองพยาธิวิทยาคลินิค กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อทำการตรวจยืนยันต่อไป

การทดสอบ serotyping ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคลินิคทั่วไป นิยมใช้วิธี slide agglutination โดยทำการทดสอบระหว่างเชื้อกับแอนติซีรัมที่จำเพาะ ดังขั้นตอนดังนี้

1. หยดน้ำเกลือนอร์มัล 1 หยดลงสไลด์ที่สะอาด เขี่ยเชื้อที่ได้บับการเพาะเลี้ยงใหม่ๆ ให้กระจายตัวในหยดน้ำเกลือ และดำเนินในลักษณะเดียวกันอีก 1 หยดในสไลด์แผ่นเดียวกัน เพื่อเป็นการทดสอบควบคุม (control) เชื้อที่นำมาทดสอบควรได้รับการพิสูจน์ทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น Salmonella, Shigella สำหรับ V. cholerae จำเป็นต้องละขั้นตอนการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อความรวดเร็วในการวินิจฉัย เมื่อแยกโคโลนีสีเหลืองได้บน TCBS agar ให้ทำการทดสอบทันที (แต่จะให้ผลไม่แน่นอนเท่าที่ควร)

2. หยดแอนติซีรัมลงบนน้ำเกลือที่มีเชื้อในข้อ 1 แล้วใช้ไม้จิ้มฟันกวนผสมให้เข้ากันดี สังเกตดูปฏิกิริยาการจับกลุ่มที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับหยดเชื้อควบคุมที่มิได้หยดแอนติซีรัมใดๆ ลงไป ปฏิกิริยาการจับกลุ่มเกิดขึ้นได้ภายในเวลา 0.30-1 นาที

การตรวจยืนยันเชื้อ Salmonella

1. เมื่อกองพยาธิวิทยาคลินิคได้รับเชื้อตัวอย่างจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาต่างๆ แล้ว จะทำการเพาะเชื้อลงบน Endo agar และนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2. เมื่อแยกโคโลนีได้แล้ว จะทำการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ glucose manitol dulcitol lactose salicin fermentation citrate test lysine decarboxylase test indole production test และ d-taetrate รวมทั้ง mucate malonate utillization ONPG hydrogen sulfide production และ motality test ถ้าปฏิกริยาชีวเคมีเป็นเชื้อ Salmonella จะทำการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อตรวจหา subspecies ต่อไป

3. การตรวจหา O และ H แอนติเจน

3.1 การตรวจหา O แอนติเจน

เชื้อที่แยกไปบน Endo agar จำเป็นต้องได้รับการตรวจว่าเชื้อจัดอยู่ใน O กรุ๊ปใด โดยนำเชื้อมาทำการทดสอบด้วยวิธี slide agglutination กับ O แอนติซีรัม

3.2 การตรวจหา H แอนติเจนเฟส 1 และเฟส 2

3.2.1 ถ่ายเชื้อจาก Endo agar ลงบน swarm agar plate ซึ่งปริมาณวุ้นเข้มข้นร้อยละ 0.7 โดยใช้เชื้อแตะตรงกลางจานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง ถ้าเชื้อนี้เป็นสายพันธุ์เคลื่อนที่ได้ (motile strain) ก็จะแผ่ไปเต็มบน swarm agar

3.2.2 ใช้ H แอนติซีรัม ได้แก่H โพลีวาเลนซ์ และ H แฟคเตอร์แอนติซีรัม ทดสอบกับเชื้อโดยวิธี slide agglutination ซึ่งต้องตรวจพบให้ได้ H แอนติเจนของเชื้อให้ได้ ซึ่งในการตรวจหาอาจจะพบเฟส 1 หรือ เฟส 2 ก็ได้

3.2.3 ถ่ายเชื้อจาก swarm agar จานที่ 1(ในข้อ 3.2.1) ลงใน swarm agar จานที่ 2 โดยเติมแอนติซีรัมชนิดเดียวกับเฟสในข้อ 3.2.2 ซึ่งมีไตเตอร์ ประมาณ 1:1,000 ปริมาณ 0.9 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับ swarm agar นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง แอนติซีรัมนี้จะไปจับกับแอนติเจนเฟสเดียวกันไว้ ส่วนแอนติเจนเฟสที่ไม่ถูกจับจะทำให้เชื้อแผ่กระจายออกมา แต่ถ้าเชื้อนี้ไม่แผ่คือหยุดอยู่ตรงกลางจาน แสดงว่าเชื้อนี้มี H แอนติเจนเฟสเดียว

3.2.4 ใช้ H แอนติเจนทดสอบหา H แอนติเจนของเฟสที่เหลือ เมื่อพบแล้วจึงถ่ายเชื้อจาก swarm agar จานที่ 2(ในข้อ 3.2.3) ลงบน swarm agar จานที่ 3 ซึ่ง swarm agar จะผสมเอชแอนติเจนชนิดเดียวกับที่พบทั้ง 2 เฟสในจานที่ 1 และ 2 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

3.2.5 สังเกตดูเชื้อใน swarm agar จานที่ 3 ถ้าเชื้อที่ทดสอบมี 2 เฟส เชื้อจะหยุดอยู่ตรงกลาง โดยแอนติเจนจะถูกจับด้วยแอนติซีรัมทั้ง 2 เฟส

ภาคผนวก ค

การหา doubling time และการทำกราฟมาตรฐานของ S. singapore

1.การหา doubling timeของ S. singaporeที่แยกได้จากตัวอย่างไข่ผง

การหา doubling time เป็นการหาระยะเวลาที่จำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เพื่อลดความผิดพลาดในการทดลองอันเนื่องมาจากจำนวนเชื้อที่เพิ่มขึ้นตลอดเวลา มีขั้นตอนดังนี้คือ นำเชื้อ Salmonella ที่ผ่านการแยก และ เลี้ยงไว้ใน BHI broth มาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ทุกๆ 10 นาที จากนั้นนำค่า OD ที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานความหนาแน่นของเซลล์ Salmonella แล้วจึงคำนวณ doubling time ของเชื้อสายพันธุ์นี้จากสูตร

$$t_d = \frac{t.\ln 2}{\ln x_t - \ln x_o}$$

t_d = doubling time of culture

t = passtime

x_t = ปริมาณเซลล์ ณ.เวลา t

X_o = ปริมาณเซลล์ ณ.เวลาเริ่มต้น

เนื่องจากในระหว่างการทำการทดลอง เชื้อจะมีการเจริญ และแบ่งตัวตลอดเวลา หากเทียบจำนวนจากเชื้อเริ่มต้นที่วัดได้คือ 5×10^7 CFU/ml. จะทำให้ผลการทดลองเกิดความคลาดเคลื่อนได้ จึงจำเป็นต้องทำการหา doubling time จากการทดลองได้ผลดังตารางที่

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ของ S.singapore ใน BHI broth กับเวลาในการเจริญ

เวลา (นาที)	จำนวนเซลล์ของ Salmonella (CFU/ml)
0	2.8×10^8
5	2.9×10^8
15	3.3×10^8
25	3.9×10^8
45	4.9×10^8
55	5.6×10^8
65	6.3×10^8
75	7.0×10^8
85	7.4×10^8
95	8.1×10^8
105	1.0×10^9
115	1.1×10^9

และเมื่อนำค่าจากตารางไปคำนวณหา doubling time จะได้ค่า doubling time ของ Salmonella singapore ใน BHI broth เท่ากับ 61.60 นาที ซึ่ง doubling time ที่ได้ จะใช้ในการหาจำนวนเซลล์ที่แท้จริงในขั้นต่อไป

2.การทำกราฟมาตรฐานของ S.singapore ที่แยกได้จากตัวอย่างไข่ผง

เนื่องจากในการศึกษาขั้นที่สองนี้ จำเป็นต้องทราบปริมาณเชื้อเริ่มต้นอย่างแน่นอน วิธีที่ตรวจสอบปริมาณเชื้อได้แน่นอน และรวดเร็ววิธีหนึ่ง คือ นำไปวัดความหนาแน่นของเซลล์ (Cell density) ที่เจริญในอาหารเหลว โดยอ่านค่าออกมาเป็น Absorbance หรือ Optical Density (O.D.) วิธีนี้อาศัยหลักการหักเหของแสง เมื่อส่องไปถูกเซลล์แบคทีเรีย ความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมสำหรับวัดความหนาแน่นของเซลล์คือ 600 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ไม่มีการดูดซับสีของอาหารเข้าไปด้วย จึงได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่แท้จริง

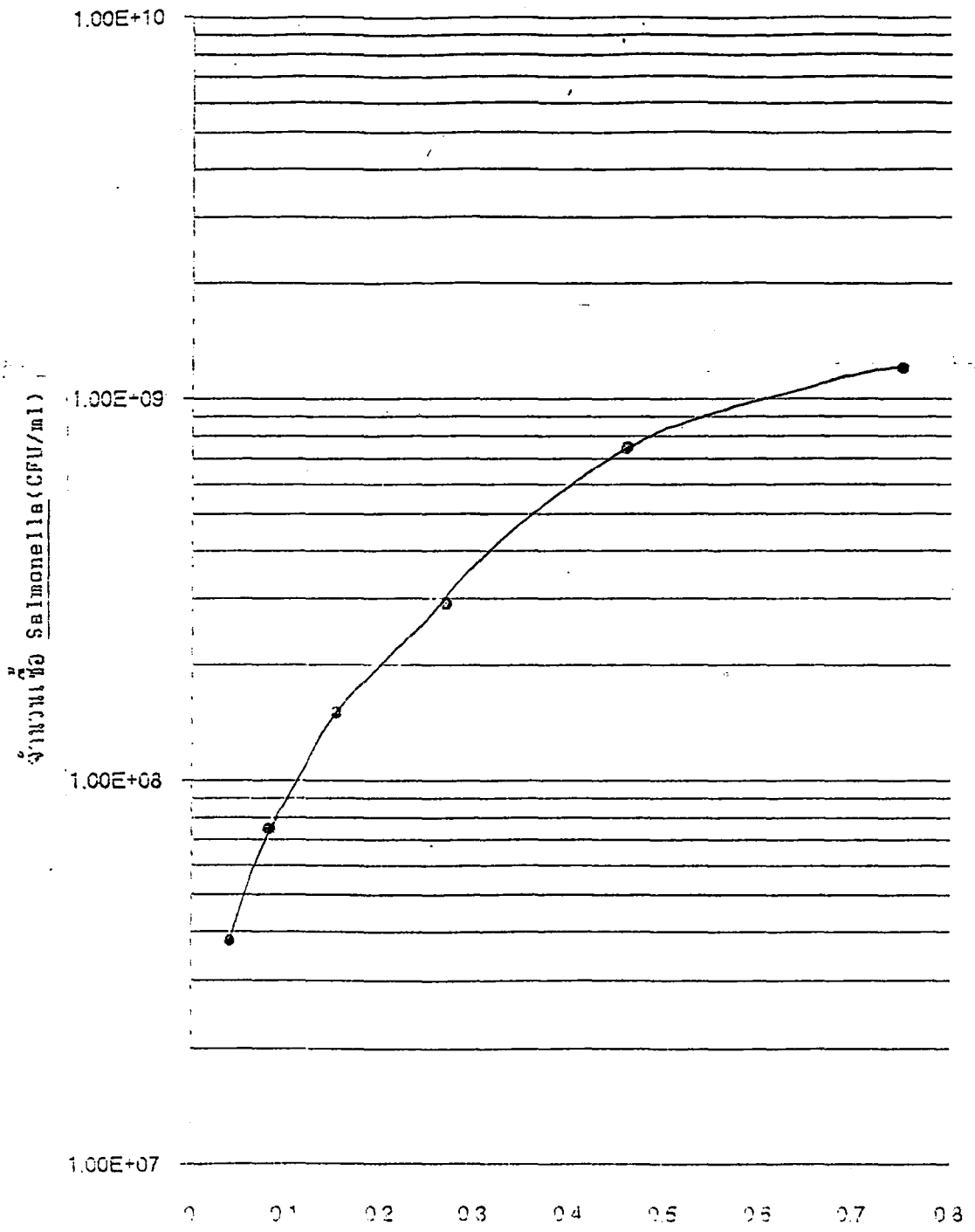
ในการทดลองจะทำการตรวจนับปริมาณของเชื้อ Salmonella ชนิดที่ได้คัดเลือกมาจากการทดลองในข้อ 1 โดยทำกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเชื้อ Salmonella กับค่า Optical Density (O.D.) เริ่มจากทำการถ่ายเทเชื้อที่เก็บไว้ (Stock culture) ลงในอาหาร Brain Heart Infusion (BHI) broth แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่า Optical Density (O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตรดังที่กล่าวไปแล้ว โดยวัดค่า O.D. ที่ระดับความเจือจาง 0.04, 0.08, 0.15, 0.27, 0.46 และ 0.75 แล้วนำตัวอย่างที่ เจือจางได้ มานับโคโลนีด้วยวิธี Pour plate ใน BHI Agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง เมื่อได้จำนวนโคโลนี และค่า O.D.600 แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง O.D.600 กับจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร (colony forming unit/ml. , CFU/ml.)

เมื่อนำเชื้อที่เลี้ยงใน BHI broth ไปวัดความหนาแน่นของเซลล์โดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร แล้วนับจำนวนโคโลนีที่ได้ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 15 และภาพที่ 14

ตารางที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่าง optical density กับจำนวนเซลล์ของ S. singapore

Optical density	จำนวนเซลล์ของ S. singapore
0.75	1.2×10^{9}
0.46	5.8×10^{8}
0.27	2.9×10^{8}
0.15	1.5×10^{8}
0.08	7.5×10^{7}
0.04	3.8×10^{7}

ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Optical Density (OD)กับจำนวนเซลล์ของ S. singapore



ตารางค่า F

d.f. ตัวหาร		d.f. ตัวตั้ง																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞
1	.05	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	243	244	245	246	248	249	250	251	252	253	253	254	254	254
	.01	4052	4999	5403	5625	5764	5859	5928	5981	6022	6056	6082	6106	6142	6169	6208	6234	6258	6286	6302	6323	6334	6352	6361	6366
2	.05	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.36	19.37	19.38	19.39	19.40	19.41	19.42	19.43	19.44	19.45	19.46	19.47	19.47	19.48	19.49	19.49	19.50	19.50
	.01	98.49	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.34	99.36	99.38	99.40	99.41	99.42	99.43	99.44	99.45	99.46	99.47	99.48	99.48	99.49	99.49	99.49	99.50	99.50
3	.05	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.88	8.84	8.81	8.78	8.76	8.74	8.71	8.69	8.66	8.64	8.62	8.60	8.58	8.57	8.56	8.54	8.54	8.53
	.01	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.34	27.23	27.13	27.05	26.92	26.83	26.69	26.60	26.50	26.41	26.35	26.27	26.23	26.18	26.14	26.12
4	.05	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.93	5.91	5.87	5.84	5.80	5.77	5.74	5.71	5.70	5.68	5.66	5.65	5.64	5.63
	.01	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.54	14.43	14.37	14.24	14.15	14.02	13.93	13.83	13.74	13.69	13.61	13.57	13.52	13.48	13.46
5	.05	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.78	4.74	4.70	4.68	4.64	4.60	4.56	4.53	4.50	4.46	4.44	4.42	4.40	4.38	4.37	4.36
	.01	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.45	10.27	10.15	10.05	9.96	9.89	9.77	9.68	9.55	9.47	9.38	9.29	9.24	9.17	9.13	9.07	9.04	9.02
6	.05	5.59	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.03	4.00	3.96	3.92	3.87	3.84	3.81	3.77	3.75	3.72	3.71	3.69	3.68	3.67
	.01	13.74	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.79	7.72	7.60	7.52	7.39	7.31	7.23	7.14	7.09	7.02	6.99	6.94	6.90	6.88
7	.05	5.99	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.63	3.60	3.57	3.52	3.49	3.44	3.41	3.38	3.34	3.32	3.29	3.28	3.25	3.24	3.23
	.01	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	7.00	6.84	6.71	6.62	6.54	6.47	6.35	6.27	6.15	6.07	5.98	5.90	5.85	5.78	5.75	5.70	5.67	5.65
8	.05	5.32	4.40	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.34	3.31	3.28	3.23	3.20	3.15	3.12	3.08	3.05	3.03	3.00	2.98	2.96	2.94	2.93
	.01	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.19	6.03	5.91	5.82	5.74	5.67	5.56	5.48	5.36	5.28	5.20	5.11	5.06	5.00	4.96	4.91	4.88	4.86
9	.05	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.13	3.10	3.07	3.02	2.98	2.93	2.90	2.86	2.82	2.80	2.77	2.76	2.73	2.72	2.71
	.01	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.62	5.47	5.35	5.26	5.18	5.11	5.00	4.92	4.80	4.73	4.64	4.56	4.51	4.45	4.41	4.36	4.33	4.31

ตารางค่า F

d.f. ตัวหาร		d.f. ตัวตั้ง																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞
10	.05	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.97	2.94	2.91	2.86	2.82	2.77	2.74	2.70	2.67	2.64	2.61	2.59	2.56	2.55	2.54
	.01	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.21	5.06	4.95	4.85	4.78	4.71	4.60	4.52	4.41	4.33	4.25	4.17	4.12	4.05	4.10	3.96	3.93	3.91
11	.05	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.86	2.82	2.79	2.74	2.70	2.65	2.61	2.57	2.53	2.50	2.47	2.45	2.42	2.41	2.40
	.01	9.65	7.20	6.22	5.67	5.32	5.07	4.88	4.74	4.63	4.54	4.46	4.40	4.29	4.21	4.10	4.02	3.94	3.86	3.80	3.74	3.70	3.66	3.62	3.60
12	.05	4.75	3.88	3.49	3.26	3.11	3.00	2.92	2.85	2.80	2.76	2.72	2.69	2.64	2.60	2.54	2.50	2.46	2.42	2.40	2.36	2.35	2.32	2.31	2.30
	.01	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.65	4.50	4.39	4.30	4.22	4.16	4.05	3.98	3.86	3.78	3.70	3.61	3.56	3.49	3.46	3.41	3.38	3.36
13	.05	4.67	3.80	3.41	3.18	3.02	2.92	2.84	2.77	2.72	2.67	2.63	2.60	2.55	2.51	2.46	2.42	2.38	2.34	2.32	2.28	2.26	2.24	2.22	2.21
	.01	9.07	6.70	5.74	5.20	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	4.02	3.96	3.85	3.78	3.67	3.59	3.51	3.42	3.37	3.30	3.27	3.21	3.18	3.16
14	.05	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.77	2.70	2.65	2.60	2.56	2.53	2.48	2.44	2.39	2.35	2.31	2.27	2.24	2.21	2.19	2.16	2.14	2.13
	.01	8.86	6.51	5.56	5.03	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.86	3.80	3.70	3.62	3.51	3.43	3.34	3.26	3.21	3.14	3.11	3.06	3.02	3.00
15	.05	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.70	2.64	2.59	2.55	2.51	2.48	2.43	2.39	2.33	2.29	2.25	2.21	2.18	2.15	2.12	2.10	2.08	2.07
	.01	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.73	3.67	3.56	3.48	3.36	3.29	3.20	3.12	3.07	3.00	2.97	2.92	2.89	2.87
16	.05	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.45	2.42	2.37	2.33	2.28	2.24	2.20	2.16	2.13	2.09	2.07	2.04	2.02	2.01
	.01	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.61	3.55	3.45	3.37	3.25	3.18	3.10	3.01	2.96	2.89	2.86	2.80	2.77	2.75
17	.05	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.62	2.55	2.50	2.45	2.41	3.38	2.33	2.29	2.23	2.19	2.15	2.11	2.08	2.04	2.02	1.99	1.97	1.96
	.01	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.52	3.45	3.35	3.27	3.16	3.08	3.00	2.92	2.86	2.79	2.76	2.70	2.67	2.65
18	.05	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.37	2.34	2.29	2.25	2.19	2.15	2.11	2.07	2.04	2.00	1.98	1.95	1.93	1.92
	.01	8.28	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.85	3.71	3.60	3.51	3.44	3.37	3.27	3.19	3.07	3.00	2.91	2.83	2.78	2.71	2.68	2.62	2.59	2.57
19	.05	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.55	2.48	2.43	2.38	2.34	2.31	2.26	2.21	2.15	2.11	2.07	2.03	2.00	1.96	1.94	1.91	1.90	1.88
	.01	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.36	3.30	3.19	3.12	3.00	2.92	2.84	2.76	2.70	2.63	2.60	2.54	2.51	2.49

d.f. ตัวหาร		d.f. ตัวตั้ง																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞
20	.05	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.52	2.45	2.40	2.35	2.31	2.28	2.23	2.18	2.12	2.08	2.04	1.99	1.96	1.92	1.90	1.87	1.85	1.84
	.01	8.10	5.84	4.94	4.43	4.10	3.87	3.71	3.56	3.45	3.37	3.30	3.23	3.13	3.05	2.94	2.86	2.77	2.69	2.63	2.56	2.53	2.47	2.44	2.42
21	.05	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.28	2.25	2.20	2.15	2.09	2.05	2.00	1.96	1.93	1.89	1.87	1.84	1.82	1.81
	.01	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.65	3.51	3.40	3.31	3.24	3.17	3.07	2.99	2.88	2.80	2.72	2.63	2.58	2.51	2.47	2.42	2.38	2.36
22	.05	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.47	2.40	2.35	2.30	2.26	2.23	2.18	2.13	2.07	2.03	1.98	1.93	1.91	1.87	1.84	1.81	1.80	1.78
	.01	7.94	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.18	3.12	3.02	2.94	2.83	2.75	2.67	2.58	2.53	2.46	2.42	2.37	2.33	2.31
23	.05	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.45	2.38	2.32	2.28	2.24	2.20	2.14	2.10	2.04	2.00	1.96	1.91	1.88	1.84	1.82	1.79	1.77	1.76
	.01	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30	3.21	3.14	3.07	2.97	2.89	2.78	2.70	2.62	2.53	2.48	2.41	2.37	2.32	2.28	2.26
24	.05	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.43	2.36	2.30	2.26	2.22	2.18	2.13	2.09	2.02	1.98	1.94	1.89	1.86	1.82	1.80	1.76	1.74	1.73
	.01	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.25	3.17	3.09	3.03	2.93	2.85	2.74	2.66	2.58	2.49	2.44	2.36	2.33	2.27	2.23	2.21
25	.05	4.24	3.38	2.99	2.76	2.60	2.49	2.41	2.34	2.28	2.24	2.20	2.16	2.11	2.06	2.00	1.96	1.92	1.87	1.84	1.80	1.77	1.74	1.72	1.71
	.01	7.77	5.57	4.68	4.18	3.86	3.63	3.46	3.32	3.21	3.13	3.05	2.99	2.89	2.81	2.70	2.62	2.54	2.45	2.40	2.32	2.29	2.25	2.19	2.17
26	.05	4.22	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27	2.22	2.18	2.15	2.10	2.05	1.99	1.95	1.90	1.85	1.82	1.78	1.76	1.72	1.70	1.69
	.01	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.17	3.09	3.02	2.96	2.86	2.77	2.66	2.58	2.50	2.41	2.36	2.28	2.25	2.19	2.15	2.13
27	.05	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.30	2.25	2.20	2.16	2.13	2.08	2.03	1.97	1.93	1.88	1.84	1.80	1.76	1.74	1.71	1.68	1.67
	.01	7.68	5.49	4.60	4.11	3.79	3.56	3.39	3.26	3.14	3.06	2.98	2.93	2.83	2.74	2.63	2.55	2.47	2.38	2.33	2.25	2.21	2.16	2.13	2.10
28	.05	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.44	2.36	2.29	2.24	2.19	2.15	2.12	2.06	2.02	1.96	1.91	1.87	1.81	1.78	1.75	1.72	1.69	1.67	1.65
	.01	7.64	5.45	4.57	4.07	3.76	3.53	3.36	3.23	3.11	3.03	2.95	2.90	2.80	2.71	2.60	2.52	2.44	2.35	2.30	2.22	2.18	2.13	2.09	2.06
29	.05	4.18	3.33	2.93	2.70	2.54	2.43	2.35	2.28	2.22	2.18	2.14	2.10	2.05	2.00	1.94	1.90	1.85	1.80	1.77	1.73	1.71	1.68	1.65	1.64
	.01	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.03	3.00	2.92	2.87	2.77	2.68	2.57	2.49	2.41	2.32	2.27	2.19	2.15	2.10	2.06	2.03

d.f. ตัวหาร		d.f. ตัวตั้ง																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞
30	.05	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.34	2.27	2.21	2.16	2.12	2.09	2.04	1.99	1.93	1.89	1.84	1.79	1.76	1.72	1.69	1.66	1.64	1.62
	.01	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.06	2.98	2.90	2.84	2.74	2.66	2.55	2.47	2.38	2.29	2.24	2.16	2.13	2.07	2.03	2.01
32	.05	4.15	3.30	2.90	2.67	2.51	2.40	2.32	2.25	2.19	2.14	2.10	2.07	2.02	1.97	1.91	1.86	1.82	1.76	1.74	1.69	1.67	1.64	1.61	1.59
	.01	7.50	5.34	4.46	3.97	3.66	3.42	3.25	3.12	3.01	2.94	2.86	2.80	2.70	2.62	2.51	2.42	2.34	2.25	2.20	2.12	2.08	2.02	1.98	1.96
34	.05	4.13	3.28	2.88	2.65	2.49	2.38	2.30	2.23	2.17	2.12	2.08	2.05	2.00	1.95	1.89	1.84	1.80	1.74	1.71	1.67	1.64	1.61	1.59	1.57
	.01	7.44	5.29	4.42	3.93	3.61	3.38	3.21	3.08	2.97	2.89	2.82	2.76	2.66	2.58	2.47	2.38	2.30	2.21	2.15	2.08	2.04	1.98	1.94	1.91
36	.05	4.11	3.26	2.86	2.63	2.48	2.36	2.28	2.21	2.15	2.10	2.06	2.03	1.98	1.93	1.87	1.82	1.78	1.72	1.69	1.65	1.62	1.59	1.56	1.55
	.01	7.39	5.25	4.38	3.89	3.58	3.35	3.18	3.04	2.94	2.86	2.78	2.72	2.62	2.54	2.43	2.35	2.26	2.17	2.12	2.04	2.00	1.94	1.90	1.87
38	.05	4.10	3.25	2.85	2.62	2.46	2.35	2.26	2.19	2.14	2.09	2.05	2.02	1.96	1.92	1.85	1.80	1.76	1.71	1.67	1.63	1.60	1.57	1.54	1.53
	.01	7.35	5.21	4.34	3.86	3.54	3.32	3.15	3.02	2.91	2.82	2.75	2.69	2.59	2.51	2.40	2.32	2.22	2.14	2.08	2.00	1.97	1.90	1.86	1.84
40	.05	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.07	2.04	2.00	1.95	1.90	1.84	1.79	1.74	1.69	1.66	1.61	1.59	1.55	1.53	1.51
	.01	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89	2.80	2.73	2.66	2.56	2.49	2.37	2.29	2.20	2.11	2.05	1.97	1.94	1.88	1.84	1.81
42	.05	4.07	3.22	2.83	2.59	2.44	2.32	2.24	2.17	2.11	2.06	2.02	1.99	1.94	1.89	1.82	1.78	1.73	1.68	1.64	1.60	1.57	1.54	1.51	1.49
	.01	7.27	5.15	4.29	3.80	3.49	3.26	3.10	2.96	2.86	2.77	2.70	2.64	2.54	2.46	2.35	2.26	2.17	2.08	2.02	1.94	1.91	1.85	1.80	1.78
44	.05	4.06	3.21	2.82	2.58	2.43	2.31	2.23	2.16	2.10	2.05	2.01	1.98	1.92	1.88	1.81	1.76	1.72	1.66	1.63	1.58	1.56	1.52	1.50	1.48
	.01	7.24	5.12	4.26	3.78	3.46	3.24	3.07	2.94	2.84	2.75	2.68	2.62	2.52	2.44	2.32	2.24	2.15	2.06	2.00	1.92	1.88	1.82	1.78	1.75
46	.05	4.05	3.20	2.81	2.57	2.42	2.30	2.22	2.14	2.09	2.04	2.00	1.97	1.91	1.87	1.80	1.75	1.71	1.65	1.62	1.57	1.54	1.51	1.48	1.46
	.01	7.21	5.10	4.24	3.76	3.44	3.22	3.05	2.92	2.82	2.73	2.66	2.60	2.50	2.42	2.30	2.22	2.13	2.04	1.98	1.90	1.86	1.80	1.76	1.72
48	.05	4.04	3.19	2.80	2.56	2.41	2.30	2.21	2.14	2.08	2.03	1.99	1.96	1.90	1.86	1.79	1.74	1.70	1.64	1.61	1.56	1.53	1.50	1.47	1.45
	.01	7.19	5.08	4.22	3.74	3.42	3.20	3.04	2.90	2.80	2.71	2.64	2.58	2.48	2.40	2.28	2.20	2.11	2.02	1.96	1.88	1.84	1.78	1.73	1.70
50	.05	4.03	3.18	2.79	2.56	2.40	2.29	2.20	2.13	2.07	2.02	1.98	1.95	1.90	1.85	1.78	1.74	1.69	1.63	1.60	1.55	1.52	1.48	1.46	1.44
	.01	7.17	5.06	4.20	3.72	3.41	3.18	3.02	2.89	2.78	2.70	2.62	2.56	2.46	2.39	2.26	2.18	2.10	2.00	1.94	1.86	1.82	1.76	1.71	1.68

ตารางค่า F

d.f. ตัวหาร		d.f. ตัวตั้ง																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞
55	.05	4.02	3.17	2.78	2.54	2.38	2.27	2.18	2.11	2.05	2.00	1.97	1.93	1.88	1.83	1.76	1.72	1.67	1.61	1.58	1.52	1.50	1.46	1.43	1.41
	.01	7.12	5.01	4.16	3.68	3.37	3.15	2.98	2.85	2.75	2.66	2.59	2.53	2.43	2.35	2.23	2.15	2.06	1.96	1.90	1.82	1.78	1.71	1.66	1.64
60	.05	4.00	3.15	2.76	2.52	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.95	1.92	1.86	1.81	1.75	1.70	1.65	1.59	1.56	1.50	1.48	1.44	1.41	1.39
	.01	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72	2.63	2.56	2.50	3.40	2.32	2.20	2.12	2.02	1.93	1.87	1.79	1.74	1.68	1.63	1.60
65	.05	3.99	3.14	2.75	2.51	2.36	2.24	2.15	2.08	2.02	1.98	1.94	1.90	1.85	1.80	1.73	1.68	1.63	1.57	1.54	1.49	1.46	1.42	1.39	1.37
	.01	7.04	4.95	4.10	3.62	3.31	3.09	2.93	2.79	2.70	2.61	2.54	2.47	2.37	2.30	2.18	2.09	2.00	1.90	1.84	1.76	1.71	1.64	1.60	1.56
70	.05	3.98	3.13	2.74	2.50	2.35	2.23	2.14	2.07	2.01	1.97	1.93	1.89	1.84	1.79	1.72	1.67	1.62	1.56	1.53	1.47	1.45	1.40	1.37	1.35
	.01	7.01	4.92	4.08	3.60	3.29	3.07	2.91	2.77	2.67	2.59	2.51	2.45	2.35	2.28	2.15	2.07	1.98	1.88	1.82	1.74	1.69	1.62	1.56	1.53
80	.05	3.96	3.11	2.72	2.48	2.33	2.21	2.12	2.05	1.99	1.95	1.91	1.88	1.82	1.77	1.70	1.65	1.60	1.54	1.51	1.45	1.42	1.38	1.35	1.32
	.01	6.96	4.88	4.04	3.56	3.25	3.04	2.87	2.74	2.64	2.55	2.48	2.41	2.32	2.24	2.11	2.03	1.94	1.84	1.78	1.70	1.65	1.57	1.52	1.49
100	.05	3.94	3.09	2.70	2.46	2.30	2.19	2.10	2.03	1.97	1.92	1.88	1.85	1.79	1.75	1.68	1.63	1.57	1.51	1.48	1.42	1.39	1.34	1.30	1.28
	.01	6.90	4.82	3.98	3.51	3.20	2.99	2.82	2.69	2.59	2.51	2.43	2.36	2.26	2.19	2.06	1.98	1.89	1.79	1.73	1.64	1.59	1.51	1.46	1.43
125	.05	3.92	3.07	2.68	2.44	2.20	2.17	2.08	2.01	1.95	1.90	1.86	1.83	1.77	1.72	1.65	1.60	1.55	1.49	1.45	1.39	1.36	1.31	1.27	1.25
	.01	6.84	4.78	3.94	3.47	3.17	2.95	2.79	2.65	2.56	2.47	2.40	2.33	2.23	2.15	2.03	1.94	1.85	1.75	1.68	1.59	1.54	1.46	1.40	1.37
150	.05	3.91	3.06	2.67	2.43	2.27	2.16	2.07	2.00	1.94	1.89	1.85	1.82	1.76	1.71	1.64	1.59	1.54	1.47	1.44	1.37	1.34	1.29	1.25	1.22
	.01	6.81	4.75	3.91	3.44	3.14	2.92	2.76	2.62	2.53	2.44	2.37	2.30	2.20	2.12	2.00	1.91	1.83	1.72	1.66	1.56	1.51	1.43	1.37	1.33
200	.05	3.89	3.04	2.65	2.41	2.26	2.14	2.05	1.98	1.92	1.87	1.83	1.80	1.74	1.69	1.62	1.57	1.52	1.45	1.42	1.35	1.32	1.26	1.22	1.19
	.01	6.76	4.71	3.88	3.41	3.11	2.90	2.73	2.60	2.50	2.41	2.34	2.28	2.17	2.09	1.97	1.88	1.79	1.69	1.62	1.53	1.48	1.39	1.33	1.28
400	.05	3.86	3.02	2.62	2.39	2.23	2.12	2.03	1.96	1.90	1.85	1.81	1.78	1.72	1.67	1.60	1.54	1.49	1.42	1.38	1.32	1.28	1.22	1.16	1.13
	.01	6.70	4.46	3.83	3.36	3.06	2.85	2.69	2.55	2.46	2.37	2.29	2.23	2.12	2.04	1.92	1.84	1.74	1.64	1.57	1.47	1.42	1.32	1.24	1.19
1000	.05	3.85	3.00	2.61	2.38	2.22	2.10	2.02	1.95	1.89	1.84	1.80	1.76	1.70	1.65	1.58	1.53	1.47	1.41	1.36	1.30	1.26	1.19	1.13	1.08
	.01	6.66	4.62	3.80	3.34	3.04	2.82	2.66	2.53	2.43	2.34	2.26	2.20	2.09	2.01	1.89	1.81	1.71	1.61	1.54	1.44	1.38	1.28	1.19	1.11
∞	.05	3.84	2.99	2.60	2.37	2.21	2.09	2.01	1.94	1.88	1.83	1.79	1.75	1.69	1.64	1.57	1.52	1.46	1.40	1.35	1.28	1.24	1.17	1.11	1.00
	.01	6.64	4.60	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41	2.32	2.24	2.18	2.07	1.99	1.87	1.79	1.69	1.59	1.52	1.41	1.36	1.25	1.15	1.00

ตารางค่า significant studentized ranges

$\alpha = .05$

d.f. ความคลาดเคลื่อน	p = จำนวนค่าเฉลี่ยในช่วงการเปรียบเทียบ																	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97
2	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085
3	4.501	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516
4	3.927	4.013	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033
5	3.635	3.749	3.797	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814
6	3.461	3.587	3.649	3.680	3.694	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697
7	3.344	3.477	3.548	3.588	3.611	3.622	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626
8	3.261	3.399	3.475	3.521	3.549	3.566	3.575	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579
9	3.199	3.339	3.420	3.470	3.502	3.523	3.536	3.544	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547
10	3.151	3.293	3.376	3.430	3.465	3.489	3.505	3.516	3.522	3.525	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526
11	3.113	3.256	3.342	3.397	3.435	3.462	3.480	3.493	3.501	3.506	3.509	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510
12	3.082	3.225	3.313	3.370	3.410	3.439	3.459	3.474	3.484	3.491	3.496	3.498	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499
13	3.055	3.200	3.289	3.348	3.389	3.419	3.442	3.458	3.470	3.478	3.484	3.488	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490
14	3.033	3.178	3.268	3.329	3.372	3.403	3.426	3.444	3.457	3.467	3.474	3.479	3.482	3.484	3.484	3.485	3.485	3.485
15	3.014	3.160	3.250	3.312	3.356	3.389	3.413	3.432	3.446	3.457	3.465	3.471	3.476	3.478	3.480	3.481	3.481	3.481
16	2.998	3.144	3.235	3.298	3.343	3.376	3.402	3.422	3.437	3.449	3.458	3.465	3.470	3.473	3.477	3.478	3.478	3.478
17	2.984	3.130	3.222	3.285	3.331	3.366	3.392	3.412	3.429	3.441	3.451	3.459	3.465	3.469	3.473	3.475	3.476	3.476
18	2.971	3.118	3.210	3.274	3.321	3.356	3.383	3.405	3.421	3.435	3.445	3.454	3.460	3.465	3.470	3.472	3.474	3.474
19	2.960	3.107	3.199	3.264	3.311	3.347	3.375	3.397	3.415	3.429	3.440	3.449	3.456	3.462	3.467	3.470	3.472	3.473
20	2.950	3.097	3.190	3.255	3.303	3.339	3.368	3.391	3.409	3.424	3.436	3.445	3.453	3.459	3.464	3.467	3.470	3.472
24	2.919	3.066	3.160	3.226	3.276	3.315	3.345	3.370	3.390	3.406	3.420	3.432	3.441	3.449	3.456	3.461	3.465	3.469
30	2.888	3.035	3.131	3.199	3.250	3.290	3.322	3.349	3.371	3.389	3.405	3.418	3.430	3.439	3.447	3.454	3.460	3.466
40	2.858	3.006	3.102	3.171	3.224	3.266	3.300	3.328	3.352	3.373	3.390	3.405	3.418	3.429	3.439	3.448	3.456	3.463
60	2.829	2.976	3.073	3.143	3.198	3.241	3.277	3.307	3.333	3.355	3.374	3.391	3.406	3.419	3.431	3.442	3.451	3.460
120	2.800	2.947	3.045	3.116	3.172	3.217	3.254	3.287	3.314	3.337	3.359	3.377	3.394	3.409	3.423	3.435	3.446	3.457
∞	2.772	2.918	3.107	3.089	3.146	3.139	3.232	3.265	3.294	3.320	3.343	3.363	3.382	3.399	3.414	3.428	3.442	3.454

ตารางค่า significant studencized ranges

$\alpha = .05$

d.f. ความคลาดเคลื่อน	p = จำนวนค่าเฉลี่ยในช่วงการเปรียบเทียบ																
	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	50	60	70	80	90	100
1	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97	17.97
2	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085	6.085
3	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516	4.516
4	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033	4.033
5	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814	3.814
6	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697	3.697
7	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626	3.626
8	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579	3.579
9	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547	3.547
10	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526	3.526
11	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510	3.510
12	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499	3.499
13	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490	3.490
14	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485	3.485
15	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481	3.481
16	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478	3.478
17	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476	3.476
18	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474
19	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474
20	3.473	4.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474	3.474
24	3.471	3.475	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477	3.477
30	3.470	3.477	3.481	3.484	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486	3.486
40	3.469	3.479	3.486	3.492	3.497	3.500	3.503	3.504	3 504	3.504	3.504	3.504	3.504	3.504	3.504	3.504	3.504
60	3.467	3.481	3.492	3.510	3.509	3.515	3.521	3.525	3.529	3.531	3.534	3.537	3.537	3.537	3.537	3.537	3.537
120	3.466	3.483	3.498	3.511	3.522	3.532	3.541	3.548	3.555	3.561	3.566	3.585	3.596	3.600	3.601	3.601	3.601
∞	3.466	3.486	3.505	3.522	3.536	3.550	3.562	3.574	3.584	3.594	3.603	3.640	3.668	3.690	3.709	3.722	3.735

ตารางค่า significant studentized ranges

$\alpha = .01$

d.f. ความคลาดเคลื่อน	p = จำนวนค่าเฉลี่ยในช่วงการเปรียบเทียบ																	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03
2	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04
3	8.261	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321
4	6.512	6.677	6.740	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756
5	5.702	5.893	5.989	6.040	6.065	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074
6	5.243	5.439	5.549	5.614	5.655	5.680	5.694	5.701	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703
7	4.949	5.145	5.260	5.334	5.383	5.416	5.439	5.454	5.464	5.470	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472
8	4.746	4.939	5.057	5.135	5.189	5.227	5.256	5.276	5.291	5.302	5.309	5.314	5.316	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317
9	4.596	4.787	4.906	4.986	5.043	5.086	5.118	5.142	5.160	5.174	5.185	5.193	5.199	5.203	5.205	5.206	5.206	5.206
10	4.482	4.671	4.790	4.781	4.931	4.975	5.010	5.037	5.058	5.074	5.088	5.098	5.106	5.112	5.117	5.120	5.122	5.124
11	4.392	4.579	4.697	4.780	4.841	4.887	4.924	4.952	4.975	4.994	5.009	5.021	5.031	5.039	5.045	5.050	5.054	5.057
12	4.320	4.504	4.622	4.706	4.767	4.815	4.852	4.883	4.907	4.927	4.944	4.958	4.969	4.978	4.986	4.993	4.998	5.002
13	4.260	4.442	4.560	4.644	4.706	4.755	4.793	4.824	4.850	4.782	4.889	4.904	4.917	4.928	4.937	4.944	4.950	4.956
14	4.210	4.391	4.508	4.591	4.654	4.704	4.743	4.775	4.802	4.824	4.843	4.859	4.872	4.884	4.894	4.902	4.910	4.916
15	4.168	4.347	4.463	4.547	4.610	4.660	4.700	4.733	4.760	4.783	4.803	4.820	4.834	4.846	4.857	4.866	4.874	4.881
16	4.131	4.309	4.425	4.509	4.572	4.622	4.663	4.696	4.724	4.748	4.768	4.786	4.800	4.813	4.825	4.835	4.844	4.851
17	4.099	4.275	4.391	4.475	4.539	4.589	4.630	4.664	4.693	4.717	4.738	4.756	4.771	4.785	4.797	4.807	4.816	4.824
18	4.071	4.246	4.362	4.445	4.509	4.560	4.601	4.635	4.664	4.689	4.711	4.729	4.745	4.759	4.772	4.783	4.792	4.801
19	4.046	4.220	4.335	4.419	4.483	4.534	4.575	4.610	4.639	4.665	4.686	4.705	4.722	4.736	4.749	4.761	4.771	4.780
20	4.024	4.197	4.312	4.395	4.459	4.510	4.552	4.587	4.617	4.642	4.664	4.684	4.701	4.716	4.729	4.741	4.751	4.761
24	3.956	4.126	4.239	4.322	4.386	4.437	4.480	4.516	4.546	4.573	4.596	4.616	4.634	4.651	4.665	4.678	4.690	4.700
30	3.889	4.056	4.168	4.250	4.314	4.366	4.409	4.445	4.477	4.504	4.528	4.550	4.569	4.586	4.601	4.615	4.628	4.640
40	3.825	3.988	4.098	4.180	4.244	4.296	4.339	4.376	4.408	4.436	4.461	4.483	4.503	4.521	4.537	4.553	4.566	4.579
60	3.762	3.922	4.031	4.111	4.174	4.226	4.270	4.307	4.340	4.368	4.394	4.417	4.438	4.456	4.474	4.490	4.504	4.518
120	3.702	3.858	3.965	4.044	4.107	4.158	4.202	4.239	4.272	4.301	4.327	4.351	4.372	4.392	4.410	4.426	4.442	4.456
∞	3.643	3.796	3.900	3.978	4.040	4.091	4.135	4.172	4.205	4.235	4.261	4.285	4.307	4.327	4.345	4.363	4.379	4.394

ตารางค่า significant studentized ranges

$\alpha = .01$

d.f. ความคลาดเคลื่อน	p = จำนวนค่าเฉลี่ยในช่วงการเปรียบเทียบ																
	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	50	60	70	80	90	100
1	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03	90.03
2	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04	14.04
3	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321	8.321
4	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756	6.756
5	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074	6.074
6	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703	5.703
7	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472	5.472
8	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317	5.317
9	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206	5.206
10	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124	5.124
11	5.059	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061	5.061
12	5.006	5.010	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011	5.011
13	4.960	4.966	4.970	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972	4.972
14	4.921	4.929	4.935	4.938	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940	4.940
15	4.887	4.897	4.904	4.909	4.912	4.914	4.914	4.914	4.914	4.914	4.914	4.914	4.914	4.914	4.914	4.914	4.914
16	4.858	4.869	4.877	4.883	4.887	4.890	4.892	4.892	4.892	4.892	4.892	4.892	4.892	4.892	4.892	4.892	4.892
17	4.832	4.844	4.853	4.860	4.865	4.869	4.872	4.873	4.874	4.874	4.874	4.874	4.874	4.874	4.374	4.874	4.874
18	4.808	4.821	4.832	4.839	4.846	4.850	4.854	4.856	4.857	4.858	4.858	4.858	4.858	4.858	4.858	4.858	4.858
19	4.788	4.802	4.812	4.821	4.828	4.833	4.838	4.841	4.843	4.844	4.845	4.845	4.845	4.845	4.845	4.845	4.845
20	4.769	4.786	4.795	4.805	4.813	4.818	4.823	4.827	4.830	4.832	4.833	4.833	4.833	4.833	4.833	4.833	4.833
24	4.710	4.727	4.741	4.752	4.762	4.770	4.777	4.783	4.788	4.791	4.794	4.802	4.802	4.802	4.802	4.802	4.802
30	4.650	4.669	4.685	4.699	4.711	4.721	4.730	4.738	4.744	4.750	4.755	4.772	4.777	4.777	4.777	4.777	4.777
40	4.591	4.611	4.630	4.645	4.659	4.671	4.682	4.692	4.700	4.708	4.715	4.740	4.754	4.761	4.764	4.764	4.764
60	4.530	4.553	4.573	4.591	4.607	4.620	4.633	4.645	4.655	4.665	4.673	4.707	4.730	4.745	4.755	4.761	4.765
120	4.469	4.494	4.516	4.535	4.552	4.568	4.583	4.596	4.609	5.619	4.630	4.673	4.703	4.727	4.745	4.759	4.770
∞	4.408	4.434	4.457	4.478	4.497	4.514	4.530	4.545	4.559	4.572	4.584	4.635	4.675	4.707	4.734	4.756	4.776

เอกสารอ้างอิง

วารสารสงขลานครินทร์ วารสารวิชาการทางเทคโนโลยี. ปีที่ 14 ฉบับที่ 3 ก.ค.-ก.ย. 2535 หน้า 285-293.

Bycroft,B.W. nisin in Dictionary of amtibiotics and Related Substances, (Bycroft,B.W.)pp.515, Chapman and Hall Ltd., New York. 1988

Byrne, A.F.,Rayman, M.M., and Schneider, M.D."Method for the detection and estimation of number of Salmonlla in Dried Egg and other Food Products" Apply Microbiology 3 (1955) : 368-370.

Carl A. Lawrence, Ph.D. and Seymour S. Block, Ph.D. Antimicrobial preservative and protectants in Disinfection, Sterilization, and preservation,(Lawrence ,C.A.,Block,S.S.)pp.644-645, Lea an Febiger, Philadelphia, 1968

Eileen B.Somers and Steve L.Taylor" Antibotulinal Effectiveness of Nisin in Pasteurized Process Cheese Spreads" J. of Food Protectionl.· 50(10)(1987) : 842-848.

Gould,G.H. Effect of Food Preservatives on the growth of Bacteria from spores "Microbial inhibitors in Food" Forth International Symposium on Food Microbiology(Molin,N.)pp.18," swedish institute for food preservation research (SIK), Sweden,June 1964 : 18.

Kelly A.Steven, Brain W.Sheldon, N.Arlee Klapes and Todd. R.Klaen hammer, "Effect of Treatment Condition on Nisin Inactivation of Gram-negative Bacteria" J. of Food Protection. 55(10)(1992) : 763-766.

Kelly A.Steven, Brain W.Sheldon, N.Arlee Klapes and Todd. R.Klaen hammer, "Nisin Treatmentfor Inactivation of Sallmonella Species and Other Gram-negative Bacteria" Applied and Environmental Microbiology, 57 (12)(1991) : 3613-3615.

Kelly A.Steven, Brain W.Sheldon, N.Arlee Klapes and Todd. R.Klaen hammer, "Antimicrobial Action of Nisinagainst Sallmonella typhimurium Lipopolysaccharide mutants "Applied and Environmental Microbiology. 58 (5)(1992) : 1786-1788.

Martin S. Peterson, Ph. D. Arnold H.,Johnson, Ph.D Food Poisoning in Encyclopedia of Food and Foodscience,(Peterson,M.S.,Johnson,A.H.) series 3,pp.321-322;673-674, The Avi publishing Company. inc, west ports, Connecticut, 1978.

Martin S. Peterson, Ph. D. Arnold H,Johnson, Ph.D Egg and Egg Products in Encyclopedia of Food Technology,(Peterson,M.S.,Johnson,A.H.) pp.351-361, The Avi publishing Company. inc, west ports, Connecticut, 1974.

Martin S. Peterson, Ph. D. Arnold H,Johnson, Ph.D Salmonella Contamination in Encyclopedis of Foodd Technology,(Peterson,M.S.,Johnson, A.H.)pp.776-778, The Avi publishing Company.inc, west ports, Connecticut. 1974.

Roberts,R.F., Zottola,E.A., and Mckay,L.L., "Use of a nisin- Producing Starter Culture Suitahle for Cheddar Cheese Manufacture" J.Dairy Science 75 (9)(1992) : 2353-2363

Richard K. Gast and C.W. Breard "Detection and Enumeration of Salmonella enteritidis in Fresh and Stored Eggs Laid by Experimentally Infected Hens" J. of Food Protection. 55(3) (1992) : 152-156.

Richard K. Gast "Recovery of Salmonella enteritidis from Innoculated Pools of Egg Contents "J. of Food Protection. 56(1) (1993) : 21-24.

Shah,D.B.,Bradshaw,J.G. andPeeler,J.T.," Thermal Resistance of Egg-Associated Epidemic Strains of Sallmonella enteritidis" J. of Food Science. 56 (2)(1991) : 391-393.

Stan J.bailey and Nelson A. Cox" Universal Preenrichment Broth for The Simultanous Detection of Salmonella and Listeria in Foods" J. of Food Protection. 55(4) (1992) : 256-259.

Waid,H.R.A. and Kalra ,M.S."Nisin as and Aid for Extending Shelf life of Sterilized Milk, J. of Food Science and Technology. 12(1976)

Willia R. North, JR. "Lactose Pre-enrichment Method for Isolatiion of Salmonella from Dried Egg Albumen" J. Apply Microbiology. (1961) : 188-195.