การศึกษาผลต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ Aerobic Plate Count (APC) และ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในกระบวนการผลิตแหนม เพื่อเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร

STUDY OF DIFFERENTIAL AMOUNT OF AEROBIC PLATE COUNT (APC) AND LACTIC ACID BACTERIA (LAB) AS THE FOOD-SANITATION INDEX OF NHAM : THAI FERMENTED PORK SAUSAGE

พรรณี ศิริโสม

PANNEE SIRISOM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

KMITL-2008-AI-M-054-085

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาผลต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ Aerobic Plate Count (APC) และ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในกระบวนการผลิตแหนม เพื่อเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร

STUDY OF DIFFERENTIAL AMOUNT OF AEROBIC PLATE COUNT (APC) AND LACTIC ACID BACTERIA (LAB) AS THE FOOD-SANITATION INDEX OF NHAM : THAI FERMENTED PORK SAUSAGE

T095722

พรรณี ศิริโสม

PANNEE SIRISOM

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....95722
วัน,เดือน,ปี.....27 MAY 2009

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL - 2008 - AI - M - 054 - 035

STUDY OF DIFFERENTIAL AMOUNT OF AEROBIC PLATE COUNT (APC) AND LACTIC ACID BACTERIA (LAB) AS THE FOOD-SANITATION INDEX OF NHAM : THAI FERMENTED PORK SAUSAGE

PANNEE SIRISOM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOGY LADKRABANG

2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL - 2008 - AI - M - 054 - 035

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2008
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาผลต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ Aerobic Plate Count และ Lactic Acid bacteria ในกระบวนการผลิตแหนมเพื่อเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร

Study of Differential Amount of Aerobic Plate Count and Lactic Acid Bacteria As the Food-Sanitation Index of Nham : Thai Fermented Pork Sausage

ชื่อนักศึกษา นางสาวพรรณี ศิริโสม

รหัสประจำตัว 48068757

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.เยาวลักษณ์	สุรพันธพิศิษฐ์	
รศ.ดร.อดิศร	เสวตวิวัฒน์	
รศ.ดร.วราวุฒิ	ครูส่ง	
รศ.ดร.สุเมธ	ตันตระเธียร	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 18 มกราคม 2551 เวลา 13.30 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้องสัมมนา D 213/2 อาคารเจ้าคุณทหาร

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.รวีวรรณ ชินะตระกูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 19 **เดือน** มีนาคม **พ.ศ.** 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	**การศึกษาผลต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ Aerobic Plate Count (APC) และ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในกระบวนการผลิตแหนม เพื่อเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร**
นักศึกษา	**พรรณี ศิริโสม**
รหัสประจำตัว	**48068757**
ปริญญา	**วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**
สาขาวิชา	**สุขาภิบาลอาหาร**
พ.ศ.	**2551**
อาจารย์ที่ปรึกษา	**รศ. ดร. วราวุฒิ ครูส่ง**

บทคัดย่อ

จากการศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักแหนม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพในการเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารของผลิตภัณฑ์แหนมในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g ทำการหมักเป็นเวลา 0 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Aerobic Plate Count (APC) และเชื้อ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในรูปค่าความต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์แหนม พบว่าปริมาณเชื้อ APC ตั้งต้นในตัวอย่างทดลองทั้งสองมีค่าเท่ากับ 6.22 Log CFU/g และ 7.10 Log CFU/g ปริมาณเชื้อ LAB ตั้งต้นเท่ากับ 5.18 Log CFU/g และ 5.33 Log CFU/g คุณภาพทางด้านเคมีตั้งต้นมีค่า pH เท่ากับ 4.99 และ 4.87 เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเท่ากับ 0.34 และ 0.39 เปอร์เซ็นต์เกลือเท่ากับ 2.34 และ 2.27 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้เท่ากับ 0.935 และ 0.932 ปริมาณไนไตร์ตน้อยกว่า 125 ppm

หลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อ APC เท่ากับ 6.14 Log CFU/g และ 6.40 Log CFU/g ลดลงคิดเป็น 1.3 และ 9.9 % ปริมาณเชื้อ LAB เท่ากับ 9.00 Log CFU/g และ 8.77 Log CFU/g เพิ่มขึ้นคิดเป็น 73 และ 64 % ค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.44 และ 4.54 ลดลงคิดเป็น 11 และ 6.8 % ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.47 และ 1.25 เพิ่มขึ้น 4 และ 3 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณตั้งต้น ค่าเปอร์เซ็นต์เกลือเท่ากับ 2.61 และ 2.33 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้เท่ากับ 0.963 และ 0.969 ตามลำดับ ปริมาณไนไตร์ตคงเหลือในผลิตภัณฑ์สุดท้ายน้อยกว่า 3 ppm และไม่พบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาศักยภาพในการนำค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนมเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร พบว่าหลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ LAB ในตัวอย่างทดลองทั้งสองมีค่ามากกว่าปริมาณเชื้อ APC โดยค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองเท่ากับ 2.86 Log CFU/g และ 2.37 Log CFU/g ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์แหนมที่จำหน่ายในท้องตลาด พบว่า ในตัวอย่างแหนมยี่ห้อที่ 1 ถึง 5 มีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่าปริมาณเชื้อ APC โดยค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองเท่ากับ 2.68 2.72 2.59 2.77 และ 2.63 Log CFU/g ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การพิจารณาความสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองในรูปค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนม สามารถใช้เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารได้ในระดับหนึ่ง ทั้งนี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมที่ผ่านกระบวนการหมักที่สมบูรณ์มีความปลอดภัยและพร้อมบริโภค มีคุณภาพผ่านเกณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544) ควรมีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่าเชื้อ APC โดยค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และ LAB ควรอยู่ที่ระดับ 2-3 Log CFU/g อาศัยข้อมูลสนับสนุนจากผลการทดลอง ดังนี้ ด้านคุณภาพทางเคมีกายภาพ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลองมีค่าไม่เกิน 4.6 ด้านคุณภาพทางจุลินทรีย์พิจารณาจากปริมาณเชื้อ LAB ของผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลองอยู่ที่ระดับ 8-9 Log CFU/g ซึ่งมีปริมาณที่เพียงพอในการผลิตกรดแลคติกเพื่อลดค่า pH ของผลิตภัณฑ์ ปริมาณเชื้อ LAB ที่มากกว่าปริมาณเชื้อ APC แสดงถึงความเสี่ยงต่ำจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม APC หรือที่เรียกว่ากลุ่ม Non-LAB (Angelidis และคณะ, 2006) และเมื่อพิจารณาด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แหนมจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค พบว่าหลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลอง และไม่พบเชื้อ *Pseudomonas cepacia* ในผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลอง เช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของตัวอย่างทดลองทั้งสอง พบว่าตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 7 Log CFU/g เริ่มมีปริมาณเชื้อ LAB สูงกว่า APC ในชั่วโมงที่ 36 ในขณะที่ตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 6 Log CFU/g มีปริมาณเชื้อ LAB สูงกว่าเชื้อ APC ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีปริมาณเชื้อ APC ต่ำกว่า 4 % ปริมาณเชื้อ LAB สูงกว่า 2.5 % ค่า pH ต่ำกว่า 2.2 % และกรดแลคติกสูงกว่า 17.6 % แสดงให้เห็นถึงสภาวะการหมักที่สมบูรณ์กว่าภายในระยะเวลาที่เท่ากัน ดังนั้นข้อเสนอแนะจากการทดลองคือควรควบคุมปริมาณเชื้อ APC ตั้งต้นในวัตถุดิบที่ระดับ 6 Log CFU/g เนื่องจากมีความเหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนม มีความเสี่ยงต่ำในด้านความไม่สมบูรณ์ของกระบวนการหมัก และลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Non-LAB และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคก่อนที่กระบวนการหมักจะสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	**Study of Differential Amount of Aerobic Plate Count (APC) and Lactic Acid Bacteria (LAB) As the Food-Sanitation Index of Nham : Thai Fermented Pork Sausage**
Student	**Miss Pannee Sirisom**
Student ID	**48068757**
Degree	**Master of Science**
Program	**Food Sanitation**
Year	**2008**
Thesis Advisor	**Assoc. Prof. Dr. Warawut Krusong**

ABSTRACT

The microbiological and chemical changes during fermentation of Nham:Thai Fermented Pork Sausage was studied. The aim of this study is to evaluate potential indicater of the food sanitation index of Nham and evaluate the effect of different levels of initial microbial in experimentally-inoculated Nham and study of the differential amount of Aerobic Plate Count (APC) and Lactic Acid Bacteria (LAB). Analyses were performed during fermentation at 0, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours at 35 ± 2°C. The initially of APC was 6.22 Log CFU/g and 7.10 Log CFU/g. The initially of LAB was 5.18 CFU/g and 5.33 Log CFU/g. pH was in the range of 4.99 and 4.87. The 0.34% and 0.39% of lactic acid, 2.34% and 2.27% of salt, 0.935 and 0.932 water activity were investigated, respectively. Nitrite was less than 125 ppm.

At 72 hours of fermentation, APC was found to decrease from 0 hour to 6.14 Log CFU/g and 6.40 Log CFU/g. The 1.3% and 9.9% decrease of APC was calculated. LAB increased to 9.00 Log CFU/g and 8.77 Log CFU/g at 73% and 64% increased. The pH decreased to 4.44 and 4.54 (decreased 11% and 6.8 %). Lactic acid increased to 1.47% and 1.25% (increased 4 and 3 times), respectively. In both treatments, the precent of salt was in the range of 2.61% to 2.33%. Water activity was in the range of 0.963 and 0.969. Nitrite was less than 3 ppm. Pathogenic bacterial were not detected in any of the analysed final product samples.

The study of the potential indicater of the food sanitation index of Nham revealed that at 72 hours, the amount of LAB was more than APC in the final product in both treatments. The differential amount of APC and LAB was in the range of 2.86 and 2.37 Log CFU/g, respectively,

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณี...

similar to 5 brands Nham in the market, in the range of 2.68 2.72 2.59 2.77 and 2.63 Log CFU/g, respectively.

The differential amount of APC and LAB is potentially an indicater of the food sanitation index of Nham. The level that indicates the quality of Nham complete fermentation, safe, ready-to-eat sausage and achieve a traditional Thai fermented sausage standard consistent with Thai Medical Science Department requirements was 2-3 Log CFU/g, in conditions where the amount of LAB was more than APC. Based on the study, the chemical quality of both treatments, the pH was less than 4.6, the microbiological quality of both treatments, the amount of LAB was 8-9 Log CFU/g, indicated that there was a sufficient amount of LAB to produced lactic acid and decreased pH, the higher amount of LAB than APC in Nham indicated that there was a low risk of APC or Non-Lactic Acid Bacteria contamination (Angelidis *et al.*, 2006) and in any of the analysed final product samples pathogenic bacterial and *Pseudomanas cepacia* were not detected.

In comparison of LAB in both treatments, the treatment that was inoculated with APC at a concentration of 7 Log CFU/g, the higher amount of LAB than APC was observed at 36 hours of fermentation, while in treatment inoculated with APC at a concentration of 6 Log CFU/g, the higher amount of LAB than APC was rapidly observed at 12 hours. In final product, APC was less than 4%, while LAB was more than 2.5%. The pH was less than 2.2% and the percentage of lactic acid was more than 17.6%. This result indicates that the fermentation profile of the treatment inoculated with APC at a concentration of 6 Log CFU/g was better than that with APC at a concentration of 7 Log CFU/g. The suggestion from this study is to control levels of microbial contamination in starting materials at 6 Log CFU/g was necessary for fermentation process of Nham due to the low risk of an incomplete fermentation process.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ดี เนื่องด้วยความกรุณาจาก รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ และ รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม รศ. ดร. สุเมธ ตันตระเชียร ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำปรึกษาและคำแนะนำอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคุณไพลิน นิมิตยงสกุล รองผู้จัดการใหญ่สายการผลิตอาหาร บริษัท เอส แอนด์ พี ซินดิเคท จำกัด (มหาชน) ที่เปิดโอกาสให้เข้าศึกษาในช่วงการทำงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทดสอบ สำหรับคำแนะนำด้านการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีและจุลินทรีย์อันเป็นประโยชน์และสนับสนุนข้อมูลการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท สาขาสุขาภิบาลอาหารทุกท่านที่คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษาด้วยดีตลอดมา

และสุดท้ายขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัว คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชายที่คอยห่วงใยและเป็นกำลังใจอย่างสม่ำเสมอ

พรรณี ศิริโสม

5 ตุลาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 ขอบเขตของการวิจัย.....3

1.3 วัตถุประสงค์.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....4

2.2 จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.....7

2.3 ครรชนีจุลินทรีย์.....10

2.4 การถนอมอาหารโดยการหมัก.....16

2.5 ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก.....17

2.6 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมัก.....20

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....22

3.1 วัตถุดิบ.....22

3.2 อุปกรณ์การทดลอง.....22

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....23

3.4 สถานที่ทำการทดลอง.....23

3.5 วิธีการทดลอง.....23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....28

4.1 การศึกษาระดับของปริมาณเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) ในกระบวนการผลิตแหนม.....28

4.2 การศึกษาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง.....33

4.3 การศึกษาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมของการตรวจหาเชื้อที่บาดเจ็บหลังผ่านสภาวะจำลองของการหมัก.....35

4.4 การศึกษาการเจริญของเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) และเชื้อ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในระหว่างกระบวนการหมักแหนม.....39

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....55

บรรณานุกรม.....58

ภาคผนวก.....66

ก. การเตรียมสารละลายเชื้อ.....67

ข. การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....68

ค. วิธีการทดสอบหาปริมาณเชื้อ.....73

ง. วิธีการทดสอบทางเคมี.....83

จ. ภาพผลกระทบของเฮอร์เดิลต่อจุลินทรีย์.....88

ฉ. ข้อมูลผลการทดลอง.....90

ประวัติผู้เขียน.....94

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบในตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตแหนม.....28

4.2 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคที่ตรวจพบในตัวอย่างวัตถุดิบ ในกระบวนการผลิตแหนม.....29

4.3 ปริมาณเชื้อ *Pseudomas cepacia* ที่รอดชีวิตหลังผ่านสภาวะการหมักที่ อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส.....37

4.4 ปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ที่ตรวจพบ (Log CFU/g) ระหว่างการหมักแหนม ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....42

4.5 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระหว่างการหมักแหนมที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส.....45

4.6 ผลวิเคราะห์ค่าทางเคมีของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างการหมักที่ อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส.....47

4.7 ค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในรูป Log CFU/g ในตัวอย่างทดลองที่มี ปริมาณเชื้อ Acrobic Plate Count (APC) ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g เปรียบเทียบกับตัวอย่างแหนมที่จำหน่ายในท้องตลาด.....52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ลักษณะของเชื้อ *Pseudomas cepacia* ภายใต้กล้อง Electron microscopic กำลังขยาย 158,000 เท่า.....8

3.1 ขั้นตอนกรรมวิธีการผลิตแหนม.....25

4.1 โคโลนีสีชมพูแดงของเชื้อ APC จากตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 33

4.2 โคโลนีสีขาวขุ่นของเชื้อ APC บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA).....34

4.3 Stock เชื้อ APC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant.....34

4.4 ความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อ APC และปริมาณเชื้อ LAB ในระหว่างการหมักแหนมที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส.....43

4.5 ความสัมพันธ์ของค่า pH และ เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ในระหว่างการหมักแหนมที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส.....48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

แหนม (Nham; Thai Fermented Pork Sausage) จัดเป็นอาหารพร้อมบริโภคประเภทอาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544) สามารถบริโภคโดยไม่ผ่านการปรุงสุก ในปัจจุบันมีการพัฒนากระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง ความน่าสนใจอยู่ที่วิวัฒนาการการผลิตเริ่มจากในอดีตไม่ทราบว่ากิจกรรมการหมักเกิดจากจุลินทรีย์ ได้ผลิตภัณฑ์แบบพบโดยบังเอิญ การผลิตแบบลองผิดลองถูก หรือ มีสูตรการผลิตจากบรรพบุรุษ ซึ่งอาศัยการหมักที่เป็นไปตามธรรมชาติ ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ เสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากจุลินทรีย์ที่ปนมากับอาหาร การผลิตไม่สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ในปัจจุบันทราบว่าจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก มีการพัฒนาแยกเชื้อที่มีอยู่ดั้งเดิมในอาหารหมักมาผลิตเป็นกล้าเชื้อเพื่อใช้ในการผลิต ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้มีคุณภาพ และรสชาติสม่ำเสมอในทุกรุ่นของการผลิต สามารถเพิ่มกำลังการผลิตได้มากขึ้น (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2548) รวมทั้งต่างประเทศให้ความสนใจเนื่องจากจัดเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไทย (Traditional Thai Fermented Pork) คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมักมีการสร้างกรดแลคติกเกิดขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของส่วนผสมลดลงจาก 6.5-6.6 เป็น 5.0-4.5 ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนรวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อโรคลดลงด้วย (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2547)

การที่จะพัฒนาอุตสาหกรรมแหนมให้มีความยั่งยืนยังคงมีอุปสรรคในด้านทัศนะของผู้ผลิต อารีย์ วิบูลย์พงศ์และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาทัศนะของผู้ประกอบการแหนม 80 ราย ในภาคเหนือตอนบนและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าผู้ผลิตส่วนใหญ่เข้าใจว่าผู้บริโภคตัดสินใจซื้อแหนมเนื่องจากแหนมมีรสชาติดี โดยคิดว่าผู้บริโภคให้ความสำคัญเกี่ยวกับปัจจัยทางด้านคุณภาพ ความสะอาด และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แหนมค่อนข้างน้อย เป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้กระบวนการผลิตของผู้ประกอบการโดยเฉพาะรายย่อยส่วนใหญ่ไม่ได้มาตรฐานตามที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนด ประกอบกับการผลิตแหนมสามารถทำได้โดยใช้เทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อนและผู้ผลิตรายย่อยมักใช้อุปกรณ์การผลิตเท่าที่มีอยู่ทำการผลิตในครัวเรือน จึงปรากฏว่าอุตสาหกรรมแหนมมีปัญหาและข้อจำกัดหลายประการในการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านการควบคุมคุณภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารและมาตรฐานให้คงที่ การผลิตที่ไม่ได้มาตรฐานกระบวนการผลิตที่ดี (Good Manufacturing Practices : GMP) และความไม่สะอาดและความไม่ปลอดภัยเนื่องจากการใช้วัตถุดิบที่ไม่สะอาด ทำให้เกิดโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย

การควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ดี โดยการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอาจเกิดจากวัตถุดิบ เนื้อสัตว์ที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าหรือการชำแหละซากที่ไม่ถูกสุขลักษณะ การปนเปื้อนในระหว่าง ขั้นตอนการผลิต การเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสมหรือขั้นตอนการหมักที่ช้า ซึ่งจะเปิดโอกาสให้ เชื้อจุลินทรีย์เจริญก่อนที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์จะลดต่ำลง มาตรการดังกล่าวยังคงมี ความจำเป็นเนื่องจากการมีปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เริ่มต้นในปริมาณที่สูง ซึ่งอาจเนื่องมาจาก การผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะทำให้ปัจจัยที่มีอยู่ไม่สามารถกีดขวางการเจริญของเชื้อที่ปนเปื้อน ดังกล่าวได้ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2548ก) การควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ดียังช่วยลดปัญหาการใช้วัตถุ กันเสียประเภท ไนเตรท ไนไตรท์ มากเกินมาตรฐานกำหนด ซึ่งทำให้เกิดการตกค้างและมีโอกาส เกิดสารก่อมะเร็งในกลุ่มไนโตรซามีนได้

จำนวนของจุลินทรีย์ในอาหารสามารถชี้บ่งถึงคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารได้ใน ระดับหนึ่ง จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นดรรชนีชี้วัดโดยทั่วไปคือ Coliforms, Enterococci และ Aerobic Plate Count (APC) การใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิด Coliforms มักใช้เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร ประเภทผลิตภัณฑ์นม อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อคำถามถึงข้อจำกัดของโอกาสในการเหลือรอดของ เชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นกรด (Birollo *et al.*, 2001) การใช้ Enterococci เป็นดรรชนีชี้ วัดการสุขาภิบาลอาหารมีความเป็นไปได้แต่จำเป็นจะต้องมีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ ให้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนการตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC มักนิยมใช้เป็น เกณฑ์กำหนดทั่วไป ข้อจำกัดคือ ผลจากการตรวจวิเคราะห์ไม่สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็น ประโยชน์และเป็นโทษในอาหารได้โดยเฉพาะเมื่อใช้เป็นเกณฑ์กำหนดในอาหารหมัก ซึ่งปริมาณจุ ลินทรีย์ส่วนใหญ่คือ Lactic Acid Bacteria (LAB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่เป็นประโยชน์ในอาหาร หมัก (Angelidis และคณะ, 2006)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ และทางเคมีของของผลิตภัณฑ์แหนม ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g และศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC และเชื้อ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในรูปของผลต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในกระบวนการผลิตแหนม เพื่อเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร และเป็นแนวทางในการตรวจติดตามคุณภาพทางจุล ชีววิทยาของวัตถุดิบเริ่มต้น ความมีประสิทธิภาพในการจัดการด้านสุขลักษณะการผลิต โดย ในทางทฤษฎีของผลต่างดังกล่าว คือ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Non - Lactic Acid Bacteria (Non-LAB) ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต (Angelidis และคณะ, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักแหนม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศักยภาพในการเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารของผลิตภัณฑ์แหนมในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g ทำการหมักเป็นเวลา 0 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Aerobic Plate Count (APC) และเชื้อ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในรูปค่าความต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์แหนม

1.3 วัตถุประสงค์

1) เพื่อศึกษาระดับของปริมาณเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) และเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ในวัตถุดิบและในกระบวนการผลิตแหนม
2) เพื่อศึกษาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิตแหนมในโรงงาน
3) เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ เพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหลังผ่านสภาวะการหมัก
4) เพื่อศึกษาศักยภาพในการนำค่าความต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนมเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารของผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

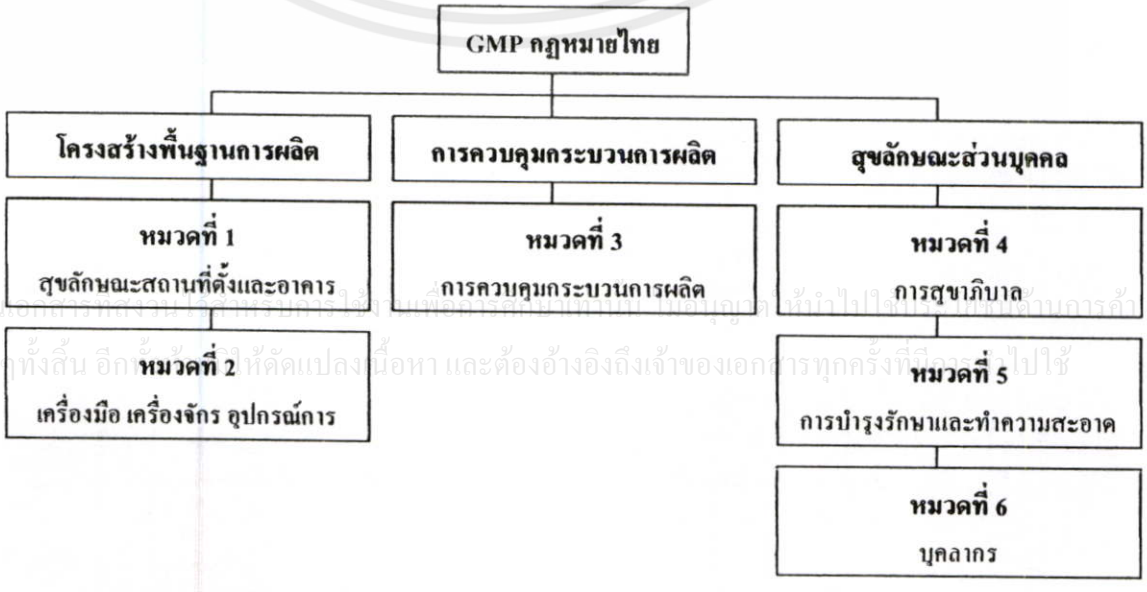
บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

มาตรฐานอาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไทยที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ถูกกำหนดโดยหน่วยงานที่มีอำนาจหน้าที่ในการกำหนดมาตรฐานระดับประเทศ เพื่อปกป้องและคุ้มครองผู้บริโภคในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้อง เหมาะสม ปลอดภัย และคุ้มค่า โดยในมาตรฐานดังกล่าวระบุถึงคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การใช้วัตถุเจือปนอาหาร หลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร มาตรฐานดังกล่าวประกอบด้วย

2.1.1 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข

ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ตามที่ระบุไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับ 243) พ.ศ. 2544 (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2544) โดยเฉพาะแหนมซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไทยที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูงทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ดังนั้นผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จึงเป็นหนึ่งในอาหาร 54 ชนิดที่ถูกกำหนดให้นำหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับ 193) พ.ศ. 2543 (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2543) มาใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติ เพื่อให้ทุกขั้นตอนในการผลิตเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและความปลอดภัย ข้อกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับ 193) พ.ศ. 2543 หรือ GMP กฎหมาย ด้านสุขลักษณะทั่วไป ประกอบด้วยโครงสร้าง 3 ส่วน หรือ 6 หมวดดังต่อไปนี้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยในหัวข้อการควบคุมกระบวนการผลิต สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไทยที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น แหนม มีกระบวนการบางขั้นตอนที่จำเป็นต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ ดังนี้

ก. การคัดเลือกเนื้อสัตว์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต

เป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมบริโภคแหนมโดยไม่ผ่านความร้อน ดังนั้นการจัดหาวัตถุดิบเนื้อสัตว์จึงต้องนำมาจากโรงฆ่าสัตว์ที่ได้มาตรฐานและมีการควบคุมเพื่อมิให้มีการปนเปื้อนจากพยาธิและให้มีการขนส่งในสภาวะที่ถูกสุขลักษณะ

ข. การชั่ง/ตวง

ควรมีการควบคุมการชั่งเนื้อดิบ หนังหมู และส่วนประกอบต่างๆ เช่น กระเทียม เกลือ เป็นต้น อีกทั้งสิ่งที่จะต้องให้ความสนใจเป็นพิเศษ คือ การคำนวณ และการชั่งสารเคมีไนไตรท์/ไนเตรท ให้ได้ตามสูตรและไม่เกินตามที่กฎหมายกำหนด

ค. การคลุกผสม

การคลุกเคล้าที่ดีช่วยทำให้ส่วนผสมกระจายตัวอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ซึ่งนอกจากจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติที่ดีและสม่ำเสมอแล้ว การกระจายตัวของไนเตรทและไนไตรท์อย่างทั่วถึงยังมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium botulinum* ได้อย่างมีประสิทธิภาพในขั้นตอนของการหมัก

ง. ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมัก

แหนมที่เหมาะสมต่อการบริโภค และปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคควรเป็นแหนมที่หมักจนเกิดรสเปรี้ยว ซึ่งมีความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกว่า 4.6 ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้สัมพันธ์กับเวลาในการหมัก โดยทั่วไปหากใช้อุณหภูมิในการหมักประมาณ 30-40 องศาเซลเซียสจะใช้เวลาประมาณ 2 วัน ในขณะที่การหมักในฤดูหนาวที่อุณหภูมิเฉลี่ย 20-30 องศาเซลเซียส จะใช้เวลานานประมาณ 3-5 วัน

2.1.2 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะและผู้สัมผัสอาหาร

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข กำหนดคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของอาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ดังนี้

- *Escherichia coli*	โดยวิธีเอ็มพีเอ็น น้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
- *Staphylococcus aureus*	น้อยกว่า 100 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
- *Bacillus cereus*	น้อยกว่า 100 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
- *Clostridium perfringens*	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.01 กรัม
- *Salmonella* spp.	ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
- Yeast	น้อยกว่า $1x10^4$ ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
- Mold	น้อยกว่า 500 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2546) มีเกณฑ์กำหนด ดังนี้

ก. คุณลักษณะที่ต้องการของผลิตภัณฑ์แหนมในด้านลักษณะทั่วไป สี กลิ่นรส ลักษณะเนื้อสัมผัส สิ่งแปลกปลอม การบรรจุ

ข. การใช้วัตถุเจือปนอาหาร

ข1. ห้ามใช้สีผสมอาหารทุกชนิด

ข2. หากมีการใช้วัตถุเจือปนอาหารให้ใช้ตามชนิดและปริมาณที่กำหนดดังต่อไปนี้

- โซเดียมไนไทรต์ หรือโพแทสเซียมไนไทรต์ (คำนวณเป็นโซเดียมไนไทรต์) ต้องไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือถ้าใช้ในรูปของผงเพรก (เกลือ : เกลือไนไตรท์ ในสัดส่วนร้อยละ 94 : 6) ต้องไม่เกิน 2 กรัมต่อเนื้อสัตว์ 1 กิโลกรัม
- ฟอสเฟตในรูปของโมโน-ได-และโพลิของเกลือโซเดียม หรือโพแทสเซียมอย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันในผลิตภัณฑ์สำเร็จ (คำนวณเป็น P_2O_5 จากฟอสฟอรัสทั้งหมด) ต้องไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ค. ความเป็นกรด-ด่าง ต้องไม่เกิน 4.6

ง. จุลินทรีย์

- *Salmonella* spp. ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
- *Staph. aureus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
- *C. perfringens* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
- *E. coli* โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม
- ยีสต์ และรา ต้องน้อยกว่า 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

จ. พยาธิ *Trichinella spiralis* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 100 กรัม

ฉ. สุขลักษณะ ในการทำแหนม ประกอบด้วยหัวข้อดังต่อไปนี้

ฉ1. สถานที่ตั้งและอาคารที่ทำ

ฉ2. เครื่องมือ เครื่องจักรและอุปกรณ์ที่ทำ

ฉ3. การควบคุมกระบวนการทำ

ฉ4. การสุขาภิบาล การบำรุงรักษา และการทำความสะอาด

ฉ5. บุคลากรและสุขลักษณะของผู้ทำ

รายละเอียดในข้อกำหนดด้านสุขลักษณะ สอดคล้องกับข้อกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับ 193) พ.ศ. 2543 หรือ GMP กฎหมาย ด้านสุขลักษณะทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณี... ครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2539) กล่าวว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่มาจากภายนอก โดยอาจปนเปื้อนในระหว่างการฆ่าและการชำแหละ จุลินทรีย์เหล่านี้มาจากขน หนัง กีบเท้า ทางเดินอาหารสัตว์ เสื้อผ้า มือของผู้ชำแหละ เครื่องมือ เครื่องใช้ อากาศ นอกจากนี้ในระหว่างจำหน่ายจุลินทรีย์มาจากภาชนะบรรจุ บริเวณวางจำหน่าย ผู้ซื้อ ผู้ขาย อากาศ เครื่องมือ เครื่องใช้ จุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์มีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ทั้งนี้แบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Pseudomonas, Alcaligenes, Bacillus, Proteus, Clostridium, Escherichia, Flavobacterium, Leuconostoc, Micrococcus, Streptococcus, Sarcina, Staphylococcus, Salmonella* เชื้อราที่พบ ได้แก่ *Alternaria, Monilia, Penicillium, Mucor, Geotrichum, Cladosporium, Thamnidium, Sporotrichum* ยีสต์ที่พบ ได้แก่ *Candida, Torulopsis, Debaryomyces, Rhodotorula* สำหรับในผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น เบคอน พบแบคทีเรียพวก *Aeromonas Alcaligenes, Bacillus, Micrococcus, Staphylococcus*

แบคทีเรียที่สามารถหมักกรดแลคติกได้ (Lactic Acid Bacteria) เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบเนื้อสัตว์ แบคทีเรียพวกนี้อยู่ตามผิวหน้าของเนื้อ ต้องการอากาศน้อยในการเจริญเติบโต (Facultative Anaerobic Bacteria) สามารถใช้น้ำตาลได้โดยการอ๊อกซิไดซ์ทำให้ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้ามีปริมาณอ๊อกซิเจนจำกัด หรือถ้าการอ๊อกซิไดซ์ของน้ำตาลไม่สมบูรณ์ จะทำให้เกิดกรดอินทรีย์เกิดขึ้น แบคทีเรียกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญต่อผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Fermentation Products) ซึ่งแบ่งเป็น 4 ชนิด คือ เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2536)

- Homofermentative Lactic Acid Bacteria ได้แก่พวก *Streptococci* และ *Lactobacilli* บางชนิด แบคทีเรียกลุ่มนี้จะให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียวในการหมัก
- Heterofermentative Lactic Acid Bacteria ได้แก่พวก *Leuconostoc* และ *Lactobacilli* บางชนิด แบคทีเรียกลุ่มนี้จะให้กรดแลคติก เอ็ททิลแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการหมัก
- *Bacillus* species แบคทีเรียพวกนี้จะพบเฉพาะในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่เติมสารไนเตรทเท่านั้น จะทำให้เกิดกรดแลคติก กรดอะซิติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- *Clostridium* species แบคทีเรียพวกนี้จะหมักให้เกิดกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดบิวทีริก อะซิโตน บิวทิวแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ ... ประการ

Pseudomonas cepacia (*P. cepacia*) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ เป็นกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย เซลล์รูปท่อน ยาว 1.6-3.2 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพที่ 2.1 ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส ติดสีแกรมลบ ไม่ทำให้เกิดการหมัก แบคทีเรียกลุ่มนี้พบในธรรมชาติ ดิน น้ำ พืช ดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นได้ ถูกค้นพบโดย Walter Burkholder ในปี ค.ศ. 1949 (Wikipedia, 2007)

ภาพที่ 2.1 : ลักษณะของเชื้อ *Pseudomonas cepacia* (*P. cepacia*) ภายใต้กล้อง Electron microscopic กำลังขยาย 158,000 เท่า

ที่มา : Hales และคณะ (1998)

2.2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ตามความรุนแรงของการเกิดโรค ลักษณะนิสัยในการเจริญเติบโต และลักษณะทางพันธุกรรมดังนี้ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545 และ ศิวาพร ศิวเวชช, 2542)

ก. กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร (Enteropathogenic *E. coli*) เขียนย่อว่า EPEC

ข. กลุ่มที่ทำลายเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร (Enteroinvasive *E. coli*) เขียนย่อว่า EIEC

ค. กลุ่มที่สร้างสารพิษขึ้นในทางเดินอาหาร (Enterotoxigenic *E. coli*) เขียนย่อว่า ETEC

ง. กลุ่มที่ทำให้เลือดออกในทางเดินอาหาร (Enterohemorrhagic *E. coli*) เขียนย่อว่า EHEC

จ. กลุ่มที่ทำให้เกิดการรวมตัวของผนังเซลล์บุผนังลำไส้ (Enteroaggregative *E. coli*) เขียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อว่า EAggEC

ทั้งนี้ *E. coli* เกือบทุกชนิดปนเปื้อนมาจากอุจจาระ สำหรับ *E. coli* สายพันธุ์ EPEC, EIEC และ ETEC แพร่กระจายอยู่ในน้ำและอาหาร ส่วน EHEC มักเกี่ยวข้องกับอาหารที่มีเนื้อวัวเป็นส่วนประกอบโดยเฉพาะเนื้อบด แต่อาจมีข้อยกเว้นเพราะเกิดการปนเปื้อนข้ามได้ ในขณะที่ *E. coli* สายพันธุ์ EHEC เป็นแบคทีเรียที่รู้จักกันในชื่อ *E. coli* O157:H7 มักพบในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเครื่องในสัตว์ และพบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

Staph. aureus เป็นแบคทีเรียสามารถผลิตสารพิษพวก Enterotoxin ซึ่งสร้างขึ้นภายในเซลล์ และเมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีเซลล์ของแบคทีเรียอยู่จำนวนมากพอ พบว่าภายใน 2-6 ชั่วโมง ภายหลังจากได้รับสารพิษ ผู้ป่วยจะเกิดการบวมพองของผนังในลำไส้และกระเพาะอาหาร (Gastro Intestinal Upset) มักพบในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ปิ้ง ย่าง รมควัน และเนื้อสด ซึ่งผ่านการให้ความร้อนในช่วงแรกไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ของแบคทีเรียได้ แต่ความร้อนที่ใช้จะเป็นตัวกระตุ้นให้แบคทีเรียที่เหลือรอดอยู่เจริญเติบโต และแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วในช่วงที่ทำให้เย็นลงช้าๆ และตั้งรอเวลาไว้ 8-12 ชั่วโมง ก่อนนำมารับประทาน (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536) สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นทนต่อความร้อน (Banwart, 1979) ความร้อนที่ใช้หุงต้มอาหารหรือความร้อนที่ใช้พาสเจอไรส์อาหารไม่เพียงพอที่จะทำลายสารพิษนี้ การป้องกันที่ดีที่สุด คือ ป้องกันมิให้เชื้อเจริญจนสร้างสารพิษขึ้นมามากในอาหาร หรือควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่เอื้อต่อการสร้างสารพิษของเชื้อ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีความรุนแรง แหล่งที่อยู่อาศัยลำดับแรกคือ ลำไส้ของสัตว์ พบการแพร่กระจายในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น เนื้อ นม ไข่ และผักเป็นส่วนประกอบ สัตว์ปีกเป็นแหล่งปนเปื้อนที่สำคัญ อาหารจากเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อพบว่ามีการปนเปื้อนอยู่เสมอ อาจมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยง หรือโรงฆ่าสัตว์ หรือระหว่างการตัดแต่ง หรือระหว่างการขนส่ง ฉะนั้นหากใช้กรรมวิธีการผลิตที่ไม่ดีพอ มีโอกาสที่จะพบว่ามาจากมูลสัตว์ อุปกรณ์เครื่องมือ สัตว์หรือคนที่เป็นพาหะ (ศิวาพร ศิวเวชช, 2542)

C. botulinum เป็นแบคทีเรียผลิตสารพิษที่มีชื่อว่า Botulism สารพิษนี้ถูกสร้างขึ้นและขับออกจากเซลล์มาอยู่ในอาหาร เป็นพวก Exotoxin ที่ถูกทำลายเมื่อนำไปต้มในน้ำเดือด (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) 10 นาที ความเป็นพิษของ Botulism พบว่าภายหลังจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษนี้อยู่ 24-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการกล้ามเนื้ออ่อนเพลีย ไม่มีแรงสูญเสียความสามารถในการสั่งการของสมองส่วนกลาง และถ้าบริโภคมากอาจถึงตายได้ *C. bolulinum* มี 3 กลุ่ม คือ A B และ E เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (Rod) พบอยู่ทั่วไปในดิน มักพบในอาหารประเภทโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ (Low Acid Food) เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ และผักบรรจุกระป๋อง แต่ไม่พบบ่อยนักในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีการเติมสารไนเตรท เพราะสารนี้จะยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. botulinum* ได้ (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)

C. perfringens พบในเนื้อสัตว์หลายชนิด ได้แก่ เนื้อโค สุกร แกะ และไก่ ทั้งในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์ แต่ส่วนใหญ่จะพบในเนื้อที่ผ่านการทำให้สุก และทิ้งไว้ให้เย็นอย่างช้าๆ ผู้บริโภคจะมีอาการปวดท้องและท้องเสียภายหลังจากรับประทานอาหารที่มี *C. perfringens* ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณมากเป็นเวลา 8-22 ชั่วโมง การหุงต้มโดยปกติจะสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียพวกนี้ได้ และถ้าต้องการทำลายสปอร์ต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้น (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)

2.3 ดรรชนีจุลินทรีย์

Tortorello (2002) ได้กล่าวถึง ดรรชนีจุลินทรีย์ ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่แสดงให้เห็นถึง

- การมีอยู่ การเจริญ และการเหลือรอดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค
- ความสมบูรณ์ เพียงพอ ของกระบวนการ
- ชี้บ่งถึงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของอาหาร
- ใช้เป็นเกณฑ์การยอมรับคุณภาพของวัตถุดิบ
- ใช้ในการติดตามความมีประสิทธิภาพในการจัดการด้านสุขลักษณะที่ดีในการผลิต

สอดคล้องกับ Schaffner และ Schaffner (2004) ในด้านความสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคกับดรรชนีจุลินทรีย์ โดยระบุว่า การกำหนดการวิเคราะห์กลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในวัตถุดิบเนื้อสัตว์เป็นงานประจำ ทำให้เกิดความไม่สะดวกในแง่ปฏิบัติ แต่ยังคงมีความจำเป็นเมื่อพบแนวโน้มหรือสิ่งที่แสดงให้เห็นว่าอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในวัตถุดิบเนื้อสัตว์ ความยุ่งยากในการวิเคราะห์เพื่อให้พบเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค คือ ปริมาณที่มีอยู่น้อยและการกระจายตัวไม่สม่ำเสมอในตัวอย่าง ดังนั้นเพื่อให้ง่ายในการตรวจวิเคราะห์จึงมีการสนับสนุนให้ใช้ดรรชนีจุลินทรีย์

Davies และ Boari (1998) กล่าวว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบเนื้อสัตว์มีหลากหลายชนิดทั้งที่ก่อให้เกิดโรคหรือทำให้เสื่อมเสีย ซึ่งมีความเป็นไปได้ยากในการที่จะตรวจติดตามเชื้อจุลินทรีย์ครบทุกชนิด ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้ดรรชนีจุลินทรีย์เพื่อตรวจติดตามจุลินทรีย์ที่คำนึงถึง และยังกล่าวว่า การวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชนิด Total Aerobic Plate Count (Total APC) ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่ามีความสะดวกและช่วยลดปัญหาดังที่กล่าวมา แต่อย่างไรก็ตามการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

วิเคราะห์เพียง Total APC อย่างเดียวยังไม่เพียงพอในการชี้บ่งถึงปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2545) ได้กล่าวถึงคุณสมบัติของดรรชนีจุลินทรีย์ดังนี้

ก. ดรรชนีชี้วัดคุณภาพของอาหาร (Product Quality Indicators) คือ จำนวนของจุลินทรีย์ในอาหารและสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่สามารถชี้บ่งถึงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของอาหารได้ในระดับหนึ่ง โดยมีสมบัติดังนี้

- มีอยู่ในอาหาร และตรวจพบได้จากอาหารทั่วไป
- การเจริญและการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ควรสวนทางกับคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร
- สามารถตรวจนับได้โดยวิธีการที่ง่าย และสะดวกสามารถบอกความแตกต่างจากจุลินทรีย์อื่นๆ ได้
- ใช้เวลาน้อยในการตรวจวิเคราะห์ (ถ้าเป็นไปได้ควรทราบผลภายในวันเดียว)
- เจริญในอาหาร โดยไม่มีผลกระทบต่อองค์ประกอบของจุลินทรีย์อื่นในอาหาร

ข. ดรรชนีชี้วัดความปลอดภัยและการสุขาภิบาลของอาหาร (Food Safety Indicators) คือ จุลินทรีย์ที่ถูกนำมาใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้ความปลอดภัยและการสุขาภิบาลของอาหารมากกว่าใช้ชี้บ่งคุณภาพอาหาร ควรมีสมบัติดังนี้

- สามารถใช้วิธีการวิเคราะห์ที่ง่าย และตรวจวิเคราะห์ได้รวดเร็ว
- มีความแตกต่างจากจุลินทรีย์อื่นๆ และอาหารอย่างชัดเจน
- มีประวัติเชื่อมโยงกับเชื้อก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่ต้องการชี้บ่ง
- ปริมาณการพบเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเชื้อก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร
- ต้องการปัจจัยในการเจริญเติบโตเหมือนกับเชื้อก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร
- อัตราการตายเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเชื้อก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร แต่ช้ากว่า
- ไม่พบ หรือพบน้อยมากในอาหารที่ไม่พบเชื้อก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่ต้องการชี้บ่ง

Tortorello (2002) กล่าวถึง จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นดรรชนีจุลินทรีย์โดยทั่วไป คือ APC, Coliform Count, Fecal Coliform Count, *E. coli*, *Enterobacteriaceae* และ Enterococci ซึ่งมีข้อมูลที่เกี่ยวข้องของเชื้อจุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์บางประการดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aerobic Plate Count (APC)

Smoot และ Pierson (1997) กล่าวถึงเชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC หรือ Standard Plate Count (SPC) ว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ใช้ในการตรวจติดตามความ

สอดคล้องกับเกณฑ์กำหนด ใช้ในการตรวจติดตามความมีประสิทธิภาพในการจัดการด้านสุขลักษณะที่ดีในการผลิต สอดคล้องกับ Tortorello (2002) กล่าวว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC มักใช้เป็นดรรชนีจุลินทรีย์เพื่อสะท้อนให้เห็นถึง ปริมาณเชื้อตั้งต้นในวัตถุดิบและส่วนผสม ความมีประสิทธิภาพในการควบคุมกระบวนการผลิต ความมีประสิทธิภาพในการบำรุงรักษาการทำความสะอาดอุปกรณ์เครื่องมือ และการควบคุมระยะเวลาในขั้นตอนการเก็บรักษาและการขนส่ง

ข้อจำกัดบางประการในการใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC เป็นดรรชนีจุลินทรีย์ Smoot และ Pierson (1997)

- การวิเคราะห์เชื้อ APC มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตในอาหาร ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดในการแปลผลปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบในอาหารที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อ การแช่แข็ง การหมักและการทำให้แห้ง ซึ่งกระบวนการดังกล่าวมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ APC ที่ปนเปื้อนจากวัตถุดิบตั้งต้นและระหว่างกระบวนการผลิตทำให้ปริมาณเชื้อลดลง
- การวิเคราะห์เชื้อ APC มีข้อจำกัดในการใช้เพื่อประเมินคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส เนื่องจาก APC จะมีผลกระทบต่อคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสก็ต่อเมื่ออยู่ในปริมาณที่สูง
- ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ใน APC มีหลากหลายชนิด ดังนั้นกิจกรรมทางชีวเคมีที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร สามารถเกิดขึ้นได้แม้มีปริมาณจุลินทรีย์ไม่มากนัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่โดดเด่นในนั้น

การใช้ APC เป็นดรรชนีย์จุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตอาหารนั้น เมื่อพบว่า APC มีปริมาณสูง จะต้องทำการตรวจสอบในแต่ละจุดควบคุมในกระบวนการผลิตหรือการขนส่ง ซึ่งจะต้องมีข้อมูลของปริมาณ APC ปกติที่เคยพบในแต่ละจุดควบคุมก่อนทำการพิจารณาปริมาณที่เกินเกณฑ์กำหนดและความจำเป็นในการสืบหาสาเหตุของปริมาณเชื้อ APC ที่มากขึ้นนั้น

Coliform Count, Fecal Coliform Count, *E. coli*, Enterobacteriaceae

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2545) กล่าวว่า เดิมแบคทีเรียที่ใช้เป็นดรรชนีความปลอดภัยของอาหาร ถือหลักว่าจะต้องเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้และปนเปื้อนในอุจจาระไม่ทางตรงก็ทางอ้อม ดังนั้นดรรชนีสุขาภิบาลจึงถือหลักเกณฑ์นี้ โดยการตรวจหาว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำหรือไม่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าจะมีเชื้อโรคลำไส้ที่ทำให้เกิดโรค ดรรชนีจุลินทรีย์แรกที่เป็นตัวชี้บ่งถึงการปนเปื้อนของอุจจาระ คือ *E. coli* เมื่อนำแนวคิดเกี่ยวกับการปนเปื้อนของอุจจาระมาเชื่อมโยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับความปลอดภัยของอาหาร มีการเพิ่มเกณฑ์อื่นเข้าไปอีกตามคำแนะนำของ Buttiaux และ Mossel (1961) และยังคงใช้กันมาจนถึงทุกวันนี้ คือ

- ถ้าเป็นไปได้ แบคทีเรียที่เลือกใช้เป็นดรรชนีความปลอดภัยของอาหารควรมีลักษณะที่เฉพาะ และเกิดในสิ่งแวดล้อมที่คล้ายกับสภาวะในลำไส้
- ควรพบในปริมาณสูงมากในอุจจาระ เพื่อจะได้สามารถตรวจพบได้ในสภาวะที่ทำการเจือจางสูงๆ
- ควรมีความต้านทานต่อสภาวะแวดล้อมที่มีมลพิษสูง
- ควรง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์ แต่มีความมั่นใจสูงแม้จะตรวจพบในปริมาณน้อยก็ตาม

สอดคล้องกับ Davies และ Boari (1998) ซึ่งกล่าวว่าการเลือกเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *E. coli* เป็นดรรชนีจุลินทรีย์ในวัตถุดิบประเภทเนื้อสัตว์ เนื่องจาก *E. coli* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากอุจจาระและจากสมมุติฐานที่ว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในวัตถุดิบเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่มีที่มาจากอุจจาระ

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2545) กล่าวว่า โดยการถือหลักปฏิบัติเช่นเดียวกับการใช้ *E. coli* เป็นดรรชนีบ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ จุลินทรีย์อื่นก็อาจใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้ความปลอดภัยและการสุขาภิบาลอาหารได้เช่นกันหลักการนี้ใช้กับจุลินทรีย์ต่อไปนี้

ก. Coliforms

เดิมการตรวจหา Coliforms มีวัตถุประสงค์เพื่อบอกว่าน้ำจะใช้ดื่มได้หรือไม่ ตั้งแต่นั้นมา Coliforms จึงถูกนำมาใช้เป็นดรรชนีบ่งชี้เชื้อโรคในน้ำ การปฏิบัติดังกล่าวได้ขยายมาใช้กับอาหารด้วย โดยในทางปฏิบัติ Coliforms หมายถึง แบคทีเรียใดก็ตามที่มีรูปร่างเป็นแท่งสั้น ย้อมสีติดแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ และใช้น้ำตาลแลคโตสในการหมักภายในเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้เกิดโคโลนีสีคล้ำ มีประกายของโลหะขึ้นบนวุ้นอาหารที่มีชื่อว่า Endo Agar (American Public Health Association, 1985) จากสมบัติดังกล่าว โคลิฟอร์มจึงหมายถึงแบคทีเรียกลุ่มหนึ่ง ที่ประกอบด้วย 4 จีนัส ทุกจีนัสล้วนเป็นสมาชิกในตระกูล Enterobacteriaceae ทั้งสิ้นได้แก่ *Citrobacter, Enterobacter, Escherichia* และ *Klebsiella*

เหตุที่ *E. coli* ถือว่าเป็นดรรชนีบ่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระมากกว่าแบคทีเรียจีนัสและสปีชีอื่นๆ บ่อยครั้งจึงต้องทำการตรวจหา *E. coli* จากแบคทีเรียจำพวก Coliforms ด้วย

ข. Fecal Coliforms หรือ Coliforms ในอุจจาระ

เป็นแบคทีเรียที่ให้กรดและกาซเมื่อเพาะเลี้ยงใน EC Broth ที่อุณหภูมิระหว่าง 44 - 46 องศาเซลเซียส การทดสอบ Fecal Coliforms มุ่งที่จะทดสอบ *E. coli* Type I เป็นสำคัญ การเจริญเติบโตเช่นเดียวกับแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ทำให้เกิดโรคทั้งหลาย เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายชนิดและในอาหารต่างๆ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดี ในขณะที่สภาวะนี้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ประเด็นนี้นับว่ามีประโยชน์ในการนำมาใช้พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือกเฉพาะ Coliforms ในการแยกและจำแนกแบคทีเรียนี้ในสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้สมบัติที่แตกต่างจากแบคทีเรียอื่นๆ คือ การเฟอร์เมนท์น้ำตาลแลคโตสให้กาซ เป็นสมบัติเด่นที่เพียงพอต่อการนำมาใช้คัดแยกแบคทีเรียอื่นๆ ออกไปในขั้นเริ่มต้นของกระบวนการทดสอบ (Presumptive Test) ความง่ายและความชัดเจนในการตรวจวิเคราะห์ เป็นผลให้ Coliforms เป็นแบคทีเรียที่มีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาใช้เป็นดรรชนีชี้บ่งความปลอดภัย และการสุขาภิบาลอาหาร

สำหรับสมบัติของ *E. coli* ที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นดรรชนีชี้บ่งถึงอุจจาระในน้ำ คือ ระยะเวลาในการอยู่รอด โดยทั่วไป *E. coli* ตายพร้อมๆ กับแบคทีเรียลำไส้ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอื่นๆ Buttiaux และ Mossel (1961) สรุปว่า เป็นไปได้ที่เชื้อโรคอื่นอาจมีชีวิตรอดอยู่ได้หลังจาก *E. coli* ถูกทำลายในอาหารที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง ผ่านการแช่เย็น หรือผ่านรังสีแล้ว ในทำนองเดียวกัน เชื้อโรคอื่นๆ อาจทนต่อวิธีการบำบัดน้ำหลังจาก *E. coli* ถูกทำลายไปแล้ว *E. coli* เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นดรรชนีชี้วัดความปลอดภัยของอาหารที่เป็นกรดเท่านั้น เนื่องจาก *E. coli* ทนต่อสภาวะที่มี pH ต่ำได้

ข้อจำกัดบางประการในการใช้ Coliforms เป็นดรรชนีชี้บ่งความปลอดภัยของอาหาร โดย สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2545) ได้สรุปข้อจำกัดจาก จากรายงานของนักวิจัยหลายคน ดังนี้

- การประเมินความพอเพียงของการพาสเจอไรซ์ โดยการตรวจ Coliforms ในผลิตภัณฑ์นมมิได้ตั้งใจที่จะชี้บ่งการปนเปื้อนของอุจจาระ แต่ประสงค์ที่จะสะท้อนถึงการสุขาภิบาลของฟาร์มโคนม และโรงงานผลิตนมเป็นสำคัญ
- สำหรับผักที่ผ่านการลวก ปริมาณ Coliforms มิได้หมายความว่าการสุขาภิบาลอาหารไม่ดี เพราะผักเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของ Enterobacter ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Coliforms ด้วย แต่ถ้าพบ *E. coli* ถือว่ามีปัญหาในการสุขาภิบาล
- Coliformsในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวชี้สภาวะของการสุขาภิบาล เนื่องจาก *Salmonella* spp. อาจมีอยู่ในสัตว์ปีกก่อนถูกฆ่า ดังนั้น การตรวจพบ Fecal Coliforms จึงมิได้หมายความว่าเกิดการปนเปื้อนขึ้นหลังจากสัตว์ถูกฆ่า
- การกำหนดมาตรฐาน Coliforms ไม่เหมาะสมสำหรับเนื้อสัตว์ เพราะมีการกระจายของแบคทีเรียลำไส้ที่เป็นพวกไซโครโทรปส์ และ *Aeromonas spp.* ในสิ่งแวดล้อมของเนื้อสัตว์มาก แต่ถ้าใช้ Fecal Coliforms เป็นดรรชนีน่าจะมีประโยชน์มากกว่า

ทั้งนี้ถึงจะมีข้อจำกัดดังกล่าวมาข้างต้น Coliforms ก็ได้พิสูจน์ให้เห็นแล้วว่ามีคุณค่าเพียงพอที่จะนำมาใช้ชี้บ่งความปลอดภัยของอาหาร (อย่างน้อยในอาหารบางชนิด)

ค. Enterococi

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ ... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ...

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2545) กล่าวว่า เหตุที่ Enterococci มีในอุจจาระ ดังนั้นจึงแนะนำให้ใช้ แบคทีเรียในจีนัส Enterococcus สองสปีชี คือ *En. faecalis* และ *En. faecium* เป็นดรรชนีชี้บ่งคุณภาพน้ำ เนื่องจาก

- โดยทั่วไป Enterococci ไม่เพิ่มจำนวนขึ้นในน้ำ โดยเฉพาะในสภาวะที่มีประมาณสารอินทรีย์ต่ำ
- โดยทั่วไปในอุจจาระของมนุษย์มี Enterococci น้อยกว่า *E. coli* คิดเป็นอัตราส่วน Fecal Coliforms ต่อ Enterococci 4:1 หรือสูงกว่า ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนจากของเสียของมนุษย์ ดังนั้นการทดสอบหา Enterococci น่าจะสะท้อนถึงจำนวนเชื้อโรคลำไส้ที่เป็นจริงได้มากกว่า Fecal Coliforms
- ในน้ำ Enterococci ตายช้ากว่า Fecal Coliforms ดังนั้นจึงน่าจะใช้ Enterococci ชี้บ่งถึงเชื้อโรคในน้ำที่ต้องการค้นหาได้ดีกว่า Fecal Coliforms

การใช้ Enterococci และ Coliforms เป็นดรรชนีชี้บ่งการปนเปื้อนของอุจจาระได้รับการสนับสนุนจาก Buttiaux (1959) ซึ่งให้ข้อสังเกตว่า ในอุจจาระของมนุษย์ และสุกรมี Enterococci ทุกตัวอย่าง (ร้อยละ 100) ในขณะที่มี Coliforms ร้อยละ 86-89 เท่านั้น

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (2545) ได้สรุปความสัมพันธ์ระหว่าง Enterococci กับสุขลักษณะของอาหาร จากข้อมูลก่อนปี ค.ศ. 1984 พบว่า การใช้ Enterococci เป็นตัวชี้วัดสุขลักษณะอาหารดีกว่า Coliforms โดยเฉพาะอาหารแช่แข็ง จำนวน Enterococci มีความสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมากกว่าจำนวน Coliforms ส่วนจำนวน Coliforms มีความสัมพันธ์กับจำนวน Enterococci มากกว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด ในอาหารแช่เยือกแข็ง พบ Enterococci มากกว่า Coliforms

กล่าวโดยสรุปคือ การใช้ Enterococci เป็นดรรชนีชี้วัดคุณภาพอาหารแทน Coliforms เป็นไปได้ โดยเฉพาะอาหารแช่แข็ง แต่จำเป็นจะต้องมีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ให้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ส่วนการใช้ Coliforms เป็นตัวชี้วัดคุณภาพอาหาร เป็นเพราะมี *E. coli* เป็นสมาชิกด้วย *E. coli* เป็นแบคทีเรียในลำไส้เช่นเดียวกับเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ และ *E. coli* เป็นตัวชี้บ่งถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำ ด้วยเหตุนี้ Coliforms จึงได้รับการนำมาใช้เป็นดรรชนีชี้บ่งคุณภาพอาหารมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การถนอมอาหารโดยการหมัก

ศิวาพร ศิวเวชช (2542) ได้กล่าวถึงหลักการถนอมอาหารโดยการหมักดังนี้

การหมักเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอินทรีย์สาร โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ได้เซลล์เพิ่มขึ้นหรือสารเคมีซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การแปรรูปอาหารโดยการหมักนั้นนอกจากจะเป็นการช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ยังเป็นวิธีการช่วยถนอมอาหารอีกวิธีหนึ่งด้วย

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการหมัก ที่สำคัญได้แก่

ก. จุลินทรีย์ที่ช่วยให้เกิดสภาวะการหมักได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา เป็นต้น การใช้จุลินทรีย์ชนิดใดขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และจุลินทรีย์นั้นๆ ควรจะมีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้รวดเร็วในวัตถุดิบที่ใช้ ควรเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการธาตุอาหารที่หายากหรือมีราคาแพง หรือเฉพาะเจาะจงนัก

ข. วัตถุดิบ จุลินทรีย์เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ที่ต้องการ คาร์บอน ไนโตรเจน แร่ธาตุและวิตามินต่างๆ สำหรับการเจริญเติบโต ฉะนั้นวัตถุดิบที่เลือกมาใช้จึงควรเลือกชนิดที่หาง่าย มีธาตุอาหารต่างๆ ที่กล่าวมาครบ

ค. การควบคุมสภาวะการหมัก เนื่องจากกระบวนการหมักต้องการสภาวะและสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในระหว่างการหมัก ความเป็นกรด-ด่างของวัตถุดิบ การให้อากาศระหว่างกระบวนการทั้งนี้เพราะว่าผลิตภัณฑ์หมักแต่ละชนิดจะได้มาจากกระบวนการหมักที่ใช้วัตถุดิบและเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันออกไป ฉะนั้นสภาวะจึงแตกต่างกันออกไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5 ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

ไส้กรอกเนื้อหมัก (Fermented Sausage) เป็นตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อสดติดมันบดรวมกับเครื่องปรุง ประกอบด้วย น้ำตาล เครื่องเทศเป็นหลัก บรรจุในไส้ อาจได้จากสัตว์ หรือใช้ไส้เทียมที่เป็นพลาสติกสังเคราะห์จากเซลลูโลสก็ได้ เครื่องปรุงที่มีเกลือจะทำหน้าที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ในขณะที่ Lactic Acid Bacteria (LAB) เจริญได้ การหมักกรดแลคติกเกิดขึ้นในขณะที่เก็บไส้กรอกไว้หลังจากบรรจุ จนกระทั่งถึงเวลาที่นำออกขาย เรียกว่า Ripening ในระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก เกิดการหมักกรดแลคติกโดย LAB ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ เรียกว่า Lactic Acid Fermentation และขั้นที่สองเกิดกลิ่น-รสในระหว่างการบ่ม เรียกว่า Ageing

ในการผลิตไส้กรอกหมักแบบตะวันตก อาจจำแนกไส้กรอกหมักตามระดับความชื้นออกเป็น 3 ประเภท คือ ไส้กรอกหมักสด เช่น แหนม และไส้กรอกพื้นเมืองของเยอรมนี (Teewurst และ Mettwurst) เป็นต้น ไส้กรอกหมักกึ่งแห้ง (Semi-Dry Sausage) เช่น ซาลามี่ เป็นต้น และไส้กรอกหมักแห้ง เช่น ไส้กรอกรมควันจนแห้ง (Dry Sausage) เป็นต้น ทั้งนี้ไส้กรอกหมักแบบแห้งจะมีความชื้นต่ำกว่า (ร้อยละ 35) ไส้กรอกหมักกึ่งแห้งมีความชื้นประมาณร้อยละ 50 ส่วนไส้กรอกสดมีความชื้นสูงใกล้เคียงกับเนื้อสด สำหรับการจำแนกประเภทของไส้กรอกหมักอย่างเป็นทางการนั้นจะแตกต่างกันไป ในแต่ละประเทศมีการใช้ปริมาณความชื้น ปริมาณโปรตีน สัดส่วนระหว่างความชื้นกับโปรตีน ตลอดจนน้ำหนักที่หายไปเป็นเกณฑ์ในการจำแนก

โดยทั่วไป ไส้กรอกหมักทำมาจากเนื้อสุกร แต่บางทีก็มีการใช้เนื้อสัตว์อื่น เช่น วัว แกะ ไก่ และ ไก่งวง เป็นต้น เหตุที่ไส้กรอกทำมาจากเนื้อดิบ ทิ้งไว้ให้เกิดการหมักกรดแลคติกขึ้นเอง แต่ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นอาจไม่มากพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ จึงมักจะทำการรมควัน หรือ ทำให้สุกก่อนบริโภค

นักจุลชีววิทยาทางอาหารใช้ค่าวอเตอร์แอคติวิตี (a_w) เป็นเครื่องจำแนกไส้กรอกหมัก โดยถือหลักว่าไส้กรอกหมักที่มีค่า a_w ระหว่าง 0.90-0.95 เป็นไส้กรอกประเภทกึ่งแห้ง และไส้กรอกหมักที่มีค่า a_w ต่ำกว่า 0.90 เป็นไส้กรอกหมักแบบแห้ง และไส้กรอกหมักสดมีค่า a_w สูงกว่า 0.95

วัตถุดิบในการผลิตไส้กรอกหมักแต่ละชนิดมีบทบาทดังนี้

ก. เนื้อ

เมื่อสัตว์ตายลง ไมโตคอนเดรีย (ที่ทำหน้าที่เป็นโรงงานผลิตพลังงานในการดำรงชีวิต) ขาดออกซิเจน จึงขาด ATP ดังนั้นกระบวนการไกลโคไลซีสจึงเกิดขึ้นหลังสัตว์ตายใหม่ๆ เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

95722

สลายไกลโคเจน อันเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สะสมในร่างกายสัตว์ไปเป็นกรดแลคติก มีผลให้ pH ของกล้ามเนื้อลดลงมาอยู่ที่ประมาณ 5.6-5.8 ซึ่งเป็นการลดลงของ pH แบบปกติ การขาด ATP มีผลให้เส้นใยโปรตีนชนิดหนา และชนิดบางยึดกันแน่น ทำให้กล้ามเนื้อหดตัว หากนำเนื้อในสภาวะเช่นนี้ไปบริโภค เนื้อจะเหนียว เรียกว่าเกิดอาการ Rigor Mortis ในเนื้อวัว อาการ Rigor Mortis จะจบลงเมื่อเวลาผ่านไปแล้ว 24-36 ชั่วโมงหลังฆ่า ส่วนเนื้อสุกรจะใช้เวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมง ถ้าหาก pH ของกล้ามเนื้อลดลงมาเป็น 5.8 ในเวลา 45 นาที หลังฆ่าในขณะที่อุณหภูมิของกล้ามเนื้อยังสูง (ประมาณ 40 องศาเซลเซียส) จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับกล้ามเนื้อโดยเฉพาะเนื้อสุกร จะมีสีซีดจาง เนื้อนุ่ม และมีน้ำไหลซึมออก เรียกว่า PSE มาจากคำว่า Pale-Soft-Exudative และเกิดขึ้นมากในกรณีที่สุกรมีอาการเครียดก่อนถูกฆ่า หรือในระหว่างฆ่า

หลังจากเกิดอาการ Rigor Mortis แล้ว pH ของเนื้อแดงจะอยู่ที่ประมาณ 5.5-5.9 อันเป็นการลดลงของ pH แบบปกติ เนื่องจากไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในร่างกายสัตว์เปลี่ยนเป็นกรดแลคติก โดยกระบวนการไกลโคไลซีส แต่ในสภาวะผิดปกติ เช่น ในกรณีที่สัตว์ตกใจ หรือ เกิดการต่อสู้กันก่อนถูกฆ่า สัตว์ได้ใช้ไกลโคเจนไปมาก จึงแทบจะไม่มีไกลโคเจนเหลือ เป็นผลให้ pH ลดลงเพียงเล็กน้อย (pH สูงกว่า 6.0) เนื้อสัตว์ที่มีลักษณะเช่นนี้ไม่เหมาะสมที่จะนำมาผลิตไส้กรอกหมัก เนื่องจากอุ้มน้ำไว้มาก มีผลให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสียง่าย และรวดเร็วกว่าเนื้อที่มี pH ต่ำ แต่ถ้าใช้เนื้อ PSE มาผลิตไส้กรอกหมักแบบแห้ง จะไม่มีผลในแง่ของจุลินทรีย์ เพียงแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสีซีดจางกว่าปกติ และน้ำหนักที่ได้จะไม่ดีเท่าที่ควร

ข. ไขมัน

การผลิตไส้กรอกหมักแบบแห้งที่ต้องการเก็บไว้นาน จำเป็นต้องเติมไขมันแข็ง ซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูง และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวน้อย ไขมันจากแผ่นหลังของสุกรเป็นไขมันที่ดีที่สุด ซึ่งจะทำให้ได้ไส้กรอกที่มีคุณภาพดี สุกรที่ให้อาหาร ปริมาณเปอร์ออกไซด์ในเนื้อเยื่อไขมันต้องควบคุมให้ต่ำที่สุด ซึ่งกระทำได้โดยการแช่แข็งไขมันทันทีหลังฆ่า และหลีกเลี่ยงการใช้ไขมันที่เก็บรักษาโดยแช่แข็งไว้เป็นเวลานาน

ค. คาร์โบไฮเดรต

ในระหว่างที่เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อ (Post Mortem) ปริมาณไกลโคเจนเพียงเล็กน้อยเปลี่ยนไปเป็นกลูโคส ไม่เพียงพอที่แบคทีเรียจะใช้เป็นอาหาร และเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกที่จะมีผลทำให้ pH ลดลงจนยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ ดังนั้นจึงต้องเติมคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลง่ายๆ ซึ่งแบคทีเรียจะสามารถนำไปใช้ได้ทันที และทำให้ pH ลดลงได้อย่างรวดเร็วจนเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียอื่นๆ การเติมคาร์โบไฮเดรตมีหลักการว่าต้องอยู่ในรูปที่แบคทีเรียใช้ได้ทันที หากเติมในรูปโอลิโกแซคคาไรด์ จะไม่มีผลทำให้ pH ลดลงในทันที

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณี ...

และเนื้อเน่าเสียก่อนเกิดการหมักขึ้น โดยเฉพาะเมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิสูง

ง. เกลือหมัก (Curing Agents)

ปกติจะเติมเกลือแกงในส่วนผสมร้อยละ 2.4-3 มีผลให้ a_w เริ่มต้นเป็น 0.965-0.955 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณไขมันในสูตร a_w ณ ระดับนี้มีผลยับยั้ง หรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และเอื้อต่อการเจริญของ LAB นอกเหนือจากผลในแง่จุลินทรีย์แล้ว เกลือแกงยังทำปฏิกิริยากับโครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อ และทำให้โปรตีนละลาย เกิดชั้นบางๆ เคลือบผิวหน้าของเนื้อ และมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่น-รสที่ดีด้วย

ไนไตรท์ หรือดินประสิวที่มีอยู่ในส่วนผสมของเกลือหมัก หรืออาจมีอยู่ในรูปของไนเตรท ซึ่งต้องการจุลินทรีย์ทำหน้าที่ลดออกซิเจนจากไนเตรทให้เป็นไนไตรท์เสียก่อน ไนไตรท์มีหน้าที่ดังนี้ :-

- ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดสีแดงตามธรรมชาติตามเอกลักษณ์ของเนื้อแดง
- ยับยั้งกระบวนการออกซิไดซ์ตัวเอง ที่นำไปสู่การเกิดกลิ่นหืน
- ช่วยให้เกิดสภาวะที่แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียอื่นๆ ได้ดีกว่า

ไนเตรทยังคงนำมาใช้ในการผลิตไส้กรอกหมักแบบแห้ง ที่ต้องการระยะเวลาในการหมักนานส่วนไส้กรอกหมักแบบอื่นๆ นิยมใช้ไนไตรท์มากกว่า ปริมาณของโซเดียมไนไตรท์ที่เติมลงไปไม่ควรเกิน 150 มล./กก. ถ้าเติมมากเกินไป อาจมีผลยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้เกิดการหมักด้วย นอกจากนั้นกฎหมายของหลายประเทศยังจำกัดปริมาณการใช้ (เช่น กฎหมายของไทยให้ใช้ไนไตรท์ได้ไม่เกิน 200 มล./กก. หรือพีพีเอ็ม และไนเตรทไม่เกิน 500 พีพีเอ็ม)

จ. เครื่องเทศ (Spices and Other Additives)

พริกไทยเป็นเครื่องเทศที่นิยมเติมในส่วนผสมสำหรับหมักไส้กรอกและแหนม ส่วนข้าวสุกและกระเทียมบดมีบทบาทสำคัญต่อการหมัก กระเทียมบดเป็นแหล่งของการเจริญของแบคทีเรียแลกติกและการสร้างกรดของเชื้อ มีสาร Allicin ช่วยยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2548) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ หากปราศจากกระเทียมบดเนื้อจะเน่าเสียก่อนเกิดกรดแลคติกขึ้น เครื่องเทศที่นิยมเติมในไส้กรอกหมักมีหลายชนิด ขึ้นกับสูตร และสไตล์การหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างการหมัก (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

แบคทีเรียแลคติก (LAB) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผักและผลไม้ ส่วนมากเป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย แบคทีเรียแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 วิถีทาง

แบบที่ 1 การหมักแบบ Homofermentative : เป็นการหมักที่ได้แลคเตทอย่างเดียวเป็นผลผลิตสำคัญ

แบบที่ 2 การหมักแบบ Heterofermentative : เป็นการหมักที่ได้แลคเตท เอทธานอล หรืออะซิเตท และคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส การระบุว่าเกิดการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟหรือไม่ อาศัยการชี้บ่งด้วยกาซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น

ในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนก *Lactobacilli* ออกเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ดังนี้

ก. กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ Homofermentative เพียงอย่างเดียว (Obligate Homofermenters) สปีชี ที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, Lb. delbruckii* และ *Lb. helveticus*

ข. กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้งสองแบบ (Facultative Heterofermenters) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *Lb. plantarum, Lb. casei* และ *Lb. sake*

ค. กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบ Heterofermentative เพียงอย่างเดียว (Obligate Heterofermenters) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *Lb. brevis, Lb. fermentum* และ *Lb. kefir*

สำหรับแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ ที่มิใช่ *Lactobacilli* ประกอบด้วย

- จีนัส *Leuconostoc* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญ ที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวก *Lactobacilli* ได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติก เพราะเกิดเมือก
- จีนัส *Pediococcus* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus*
- จีนัส *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียแลคติกอีกสปีชีหนึ่ง มีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่ม (จีนัส) คือ *Enterococci, Lactococcus* และ *Streptococcus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติก (LAB)

ผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่ได้จากการหมักกรดแลคติก สามารถเก็บไว้ได้นาน และปลอดภัยเมื่อนำไปบริโภค ทั้งนี้เป็นเพราะ LAB มีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนี้

ก. การลดลงของ pH และการเกิดกรดอินทรีย์

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก จะให้กรดอินทรีย์ คือ กรดแลคติก และกรดอะซิติก เป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ ทำให้ pH ของซับสเตรตต่ำลง ความเป็นกรดสูงและ pH ต่ำจึงมีผลยับยั้งจุลินทรีย์

ข. การเกิดแบคทีริโอซิน (Bacteriocins)

เป็นสารประเภทเปปไทด์ หรือ โปรตีนที่สามารถฆ่าแบคทีเรียซึ่งมีลักษณะนิสัยคล้ายกับแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกได้ เนื่องจากแบคทีริโอซินส์เป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม แบคทีริโอซินส์ที่ยอมรับ และอนุญาตให้นำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ในขณะนี้มีเพียงไนซิน (Nisin) อย่างเดียว

ค. การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen Peroxide, H_2O_2)

Hydrogen Peroxide เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้าง H_2O_2 เหตุที่แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้าง H_2O_2 แบคทีเรียแลคติกจึงทนสารนี้ได้มากกว่าแบคทีเรียอื่นๆ ปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดขึ้นในการหมักกรดแลคติก ขึ้นอยู่กับปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในซับสเตรตในตอนเริ่มต้นของการหมักเท่านั้น หลังจากการหมักดำเนินไปแล้ว จะไม่เกิด H_2O_2 ขึ้นมาอีก การเกิด H_2O_2 มากเกินไปอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นตัวการหมักได้

ง. การเกิดเอทธานอล (Ethanol)

การหมักแบบ Heterofermentative ในสภาวะที่ไม่มีอากาศทำให้เกิดเอทธานอลขึ้น เอทธานอลเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันเหนือแบคทีเรียอื่นๆ ในการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 หมูเนื้อแดงบด (ตรา CPF)

ใช้เนื้อหมูส่วนสะโพกบด ที่ได้จากโลตัสซุปเปอร์มาเก็ต มีการควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 10 องศาเซลเซียสก่อนการแปรรูป คัดเลือกวัตถุดิบเนื้อหมูที่ผลิตภายใต้การควบคุมสุขลักษณะที่ดีเพื่อควบคุมปริมาณเชื้อ APC ตั้งต้นอยู่ในระดับ 5 Log CFU/g

3.1.2 หนังหมูสุกหั่นเส้น

ใช้วัตถุดิบที่สั่งซื้อจากตลาด ล้างทำความสะอาดก่อนนำมาทดลอง

3.1.3 ข้าวสุก

ใช้ข้าวสุกใหม่ (สัดส่วนการหุงข้าว น้ำ 1,500 : ข้าวสาร 1,000 กรัม)

3.1.4 กระเทียม พริกขี้หนูสวน

ใช้วัตถุดิบที่ได้จากโลตัสซุปเปอร์มาเก็ต ล้างทำความสะอาดก่อนนำมาทดลอง

3.1.5 เกลือป่น (ตราปรุงทิพย์)

3.1.6 สารประกอบฟอสเฟต (ฟิตคอต)

3.1.7 ผงแหนม (ตราโลโบ)

3.2 อุปกรณ์การทดลอง

3.2.1 Autoclave	Tommy	รุ่น ES-315	ญี่ปุ่น
3.2.2 Incubator	Memmert	รุ่น INE600	เยอรมันนี
3.2.3 Hot Air Oven	WTB Binder	รุ่น ED 115	เยอรมันนี
3.2.4 Water bath	Memmert	รุ่น WB - 29	เยอรมันนี
3.2.5 Balance	Sartorius AG	รุ่น BL 210 S	เยอรมันนี
3.2.6 Lamina flow	ESCO	รุ่น AVC-6A1 EVC-6	สิงคโปร์
3.2.7 Stomacher	Seward	รุ่น BA 7021	อังกฤษ
3.2.8 Colony counter	Suntex	รุ่น 560	ไต้หวัน
3.2.9 pH Meter	Schott	รุ่น CD 840	เยอรมันนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 Plate Count Agar (PCA)	จากบริษัท	Merck จำกัด
3.3.2 MRS Agar	จากบริษัท	Merck จำกัด
3.3.3 Nutrient Agar (NA)	จากบริษัท	Merck จำกัด
3.3.4 Trypticase Soy Broth (TSB)	จากบริษัท	Merck จำกัด
3.3.5 Butterfield's Phosphate-Buffered (BPB)	จากบริษัท	Merck จำกัด
3.3.6 Pyruvic Acid	จากบริษัท	Merck จำกัด

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

3.4.1 ห้องปฏิบัติการสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 ศึกษาระดับของปริมาณเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) ในวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตแหนม

3.5.1.1 นำตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตแหนมจาก ข้อ 3.1.1 – 3.1.4 และตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุมาวิเคราะห์เชื้อ APC โดยวิธีของ Maturin และ Peeler (2001) ดังแสดงในภาคผนวก ค. โดยสุ่มตัวอย่างเนื้อหมูจากโรงงานแปรรูปขนาดกลาง (บริษัท ซี. เอ็ม. ฟู้ดส์. ซับพลาย จำกัด) และโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่ (บริษัท วีฟู้ดส์ ผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด) เพื่อวัตถุประสงค์ในการศึกษาระดับของเชื้อ APC ในวัตถุดิบเนื้อหมูจากแหล่งผลิตที่มีความเข้มงวดในการควบคุมระบบ GMP ที่แตกต่างกัน รวมจำนวน 20 ตัวอย่าง และสุ่มวัตถุดิบรายการอื่นๆ จำนวน 3 ซ้ำ นำผลการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ APC ที่เหมาะสมเพื่อใช้ศึกษาทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.5.1.2 ทำการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค *Salmonella* spp. (ISO, 2002) *E. coli* (ISO, 1991) *Staph. aureus* (AOAC, 2000) *B. cereus* (Rhodehamel and Harmon, 2001a) *C. perfringens* (Rhodehamel and Harmon, 2001b) และ *C. botulinum* (Solomon and Lilly, 2001) รายละเอียดวิธีวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ค.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

3.5.2 ศึกษาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแหนมที่ใช้ทดลอง

3.5.2.1 เก็บเชื้อ APC จากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุและหมัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Merck) โดยเลือกโคโลนีที่กลมนูนขนาดสมบูรณ์ ทำการ Streak เชื้อดังกล่าวเลี้ยงบน Nutrient Agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวจาก Nutrient Agar (NA) ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA Slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2.2 ส่งไปตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่ศูนย์รวมบริการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.5.3 ศึกษาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมของการตรวจหาเชื้อที่บาดเจ็บหลังผ่านสภาวะจำลองของการหมัก

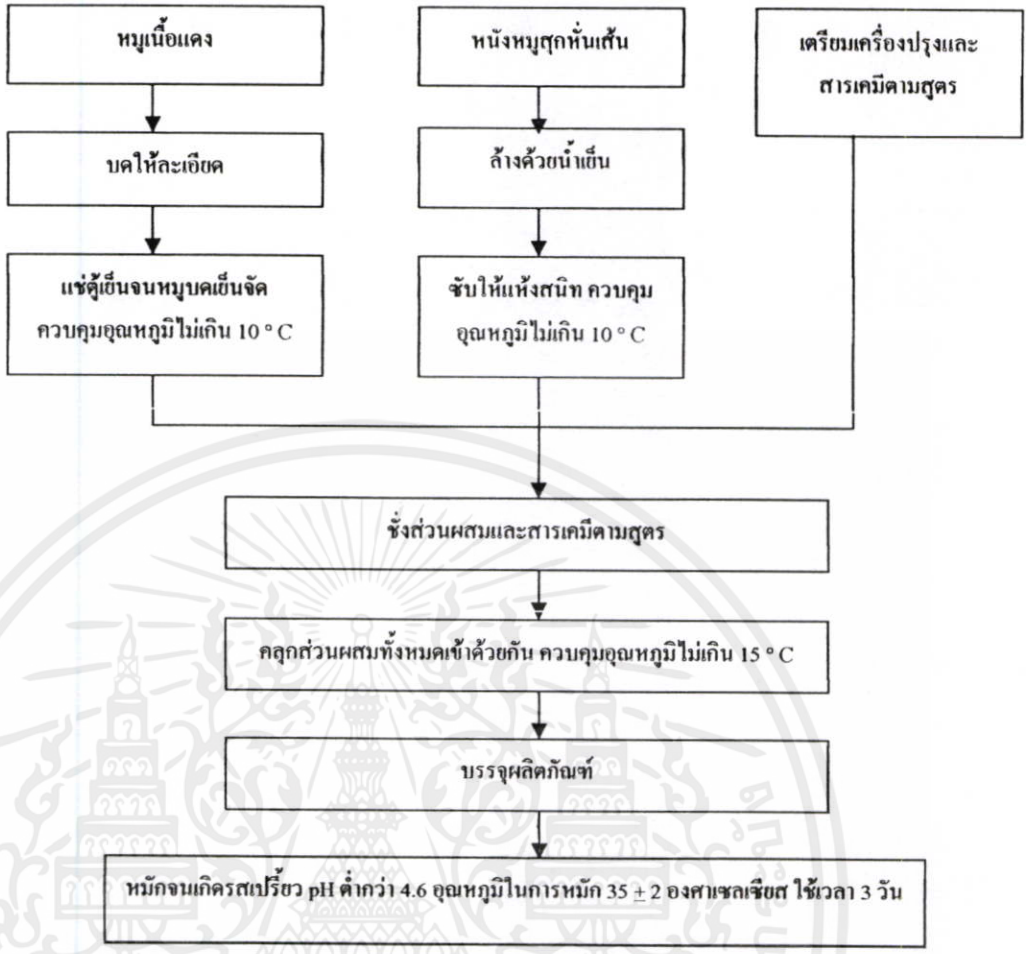
3.5.3.1 เตรียมสารละลายเชื้อ (ภาคผนวก ก) ที่มีปริมาณเชื้อตามข้อ 3.5.2.1 ที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g ในหลอดทดลองปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปเติมสารละลายกรดแลคติก 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ระดับ 4.5 ในสภาวะใกล้เคียงกับการหมัก จากนั้นทำการทดลองสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 1 2 และ 3 วัน

3.5.3.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากการทดลองสภาวะการหมักเป็นระยะเวลา 0 1 2 และ 3 วัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ Pyruvic Acid 1% เพื่อใช้ในการ Pre-Enrichment บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 1 2 3 และ 5 ชั่วโมง และทำการตรวจนับปริมาณเชื้อจากข้อ 3.5.2.1 ที่เหลือรอดโดยวิธี Pour Plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Merck) (อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์, 2549)

3.5.4 ศึกษาการเจริญของเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) และเชื้อ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในระหว่างกระบวนการหมักแหนม

3.5.4.1 ทำการผลิตแหนมตามขั้นตอนที่กำหนด ดังแสดงในภาพที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนกรรมวิธีการผลิตแหนม

ที่มา : ดัดแปลงจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2545)

3.5.4.2 เตรียมส่วนผสม ตามสูตร (ดัดแปลงจากกรมส่งเสริมการเกษตร, ม.ป.ป.)

หมูเนื้อแดงบด	1	กิโลกรัม
หนังหมูสุกหั่นเส้น	500	กรัม
ข้าวสุก	350	กรัม
กระเทียมสับ	75	กรัม
พริกขี้หนูสวน	50	กรัม
เกลือป่น	50	กรัม
ผงแหนม	140	กรัม
ฟอสเฟต	5	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.3 คลุกเคล้าหมูเนื้อแดงบดกับกระเทียม หนังหมู เกลือ ข้าวสุก พริกขี้หนูสวน

ใส่ทั้งเม็ด และทำการเติมเชื้อตามข้อ 3.5.2.1 ลงคลุกเคล้าให้เชื้อกระจายอย่างทั่วถึง เพื่อให้ได้ตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g บรรจุเนื้อที่คลุกเคล้าในถุงพลาสติกรัดให้แน่น

3.5.4.4 นำตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้า ที่ผ่านการเติมเชื้อตามข้อ 3.5.2.1 แล้ว ทำการหมักเป็นเวลา 0 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ทดลองในแต่ละระดับความเข้มข้นของเชื้อ APC ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.5.4.5 นำตัวอย่างแหนมหลังผ่านการหมักเป็นเวลา 0 ถึง 72 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ APC (Maturin และ Peeler, 2001) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ Pyruvic Acid 1% ในการ Pre-enrichment โดยใช้เวลาในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บจากข้อ 3.5.3

3.5.4.6 ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ LAB โดยเตรียมตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยวิธีปลอดเชื้อ เติม Butterfield's Phosphate-Buffered (BPB) (Merck) 225 ml ลงในตัวอย่าง ตีผสมตัวอย่างให้เข้ากัน โดยใช้ Stomacher 90 วินาที เจือจางใน BPB เพาะเชื้อโดยใช้เทคนิค Pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี (Rogosa และ Sharpa, 2000)

3.5.4.7 ทำการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค *Salmonella* spp. (ISO, 2002) *E. coli* (ISO, 1991) *Staph. aureus* (AOAC, 2000) *B. cereus* (Rhodehamel and Harmon, 2001a) *C. perfringens* (Rhodehamel and Harmon, 2001b) และ *C. botulinum* (Solomon and Lilly, 2001) รายละเอียดวิธีวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ค. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ Pyruvic Acid 1% ในการ Pre-Enrichment โดยใช้เวลาในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ APC นำผลวิเคราะห์มาประเมินโดยใช้เกณฑ์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของอาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544)

3.5.4.8 ทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก (%w/v) (Barry, 2000) เปอร์เซ็นต์เกลือ (%Salt) (Cunniff, 1998) วอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w) และปริมาณไนไตร์ต (ppm) ของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก รายละเอียดวิธีวิเคราะห์ ดังแสดงในภาคผนวก ง.

3.5.4.9 นำผลวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์และเคมีของผลิตภัณฑ์หลังผ่านการหมักเป็นเวลา 0 ถึง 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ One-Sample T Test และเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g โดยใช้ Paired- Samples T Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) ใช้โปรแกรม SPSS Version 10.0 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Mean Comparison) โดยวิธี Least Significant Difference (LSD) (วราวุฒิ ครูส่ง, 2548ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.10 ศึกษาศักยภาพในการนำปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนมเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร โดยพิจารณาจากค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์สุดท้ายของตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g หลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง และในตัวอย่างตัวอย่างแหนมที่จำหน่ายในท้องตลาดจำนวน 5 ยี่ห้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาระดับของปริมาณเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) ในวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการผลิตแหนม

จากการสุ่มตัวอย่างวัตถุดิบเนื้อหมูและวัตถุดิบรายการอื่นๆ จากแหล่งต่าง ๆ ตามข้อ 3.1 ทำการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ APC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) (Merck) นำผลวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ APC ในรูป Log CFU/g ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยอาศัยสถิติในการหาค่ามากที่สุด (Maximum) ค่ากลาง (Medium) และค่าน้อยที่สุด (Minimum) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบในตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตแหนม

รายการวัตถุดิบ	ปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบ (Log CFU/g)		
	Maximum	Medium	Minimum
1. หมูเนื้อแดงบด	7.83	6.41	5.20
2. หนังหมูสุกหั่นเส้น	5.73	5.73	4.18
3. ข้าวสุก	2.40	2.34	1.65
4. กระเทียมสับ	6.30	6.26	6.11
5. พริกขี้หนูสวน	5.86	5.54	5.34
6. เนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุ	6.98	6.78	6.50

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 พบว่าปริมาณเชื้อ APC ระดับสูงสุดตรวจพบในตัวอย่างหมูเนื้อแดงบดอยู่ในช่วง 5.20-7.83 Log CFU/g ถือว่าอยู่ในเกณฑ์สูงเมื่อเทียบกับมาตรฐานจุลินทรีย์ในเนื้อสด (Standard of Microorganism in Fresh Meat) สำนักงานคณะกรรมการมาตรฐานอาหารสากล (CODEX, 1993) ซึ่งกำหนดปริมาณจุลินทรีย์ในเนื้อบดไม่เกิน 250,000-10,000,000 CFU/g สาเหตุเนื่องจากเนื้อสัตว์จัดเป็นอาหารที่ดีที่สุดต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ความชื้นสูง มีสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ (Fermentable Carbohydrate) อย่างสมบูรณ์ มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (pH = 5.6) (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2536) และการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาในระดับที่เกิดอันตรายสูงสุด (Worst Case) จึงทำการสุ่มตัวอย่างเนื้อหมูทั้งจากโรงงานแปรรูปขนาดกลาง (บริษัท ซี. เอ็ม. ฟู้ดส์. ซับพลาย จำกัด) และโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่ (บริษัท วีฟู้ดส์ ผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด) เพื่อศึกษาระดับของเชื้อ APC ในวัตถุดิบเนื้อหมูจากแหล่งผลิตที่มีความเข้มงวดในการควบคุมระบบ GMP ที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบในตัวอย่างหมูเนื้อแดงจากโรงงานแปรรูปขนาดกลางอยู่ในเกณฑ์สูงเมื่อเทียบกับมาตรฐาน

จากการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเพื่อเป็นการเฝ้าระวังความปลอดภัยแสดงผลดังในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคที่ตรวจพบในตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตแหนม

ชนิดเชื้อจุลินทรีย์	ตัวอย่าง						มาตรฐาน
	1	2	3	4	5	6	กรมปศุสัตว์ (2544)
Coliform (MPN/g)	>1,100	<3	<3	<3	212.7	58	≤ 5,000 (CFU/g)
E. coli (MPN/g)	57.3	<3	<3	<3	<3	14.2	-
Fecal Streptococci (CFU/g)	$2.4x10^4$	$<1x10^2$	<1x10	$<1x10^2$	$9.0x10^2$	$>3x10^4$	≤ 1,000 (CFU/g)
Staph. aureus (CFU/g)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	<100 (CFU/g)
Salmonella spp. ในตัวอย่าง 25 กรัม	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ ใน 25 กรัม
B. cereus (CFU/g)	$<1x10^2$	$<1x10^2$	$<1x10^2$	$<1x10^2$	$<1x10^2$	$<1x10^2$	-
C. perfringens (CFU/g)	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	-

หมายเหตุ 1. หมูเนื้อแดงบด 2. หนังหมูสุกหั่น 3. ข้าวสุก
4. กระเทียมสับ 5. พริกขี้หนูสวน 6. เนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 พบว่าในตัวอย่างวัตถุดิบเนื้อหมูพบเชื้อ Coliform, *E. coli* และ Fecal Streptococci อยู่ในเกณฑ์สูง การปนเปื้อนของ Coliform ในเกณฑ์สูงนี้แสดงให้เห็นถึงการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะและขาดการสุขาภิบาลที่ดี ส่วน *E. coli* และ Fecal Streptococci แสดงให้เห็นถึงการปนเปื้อนจากมูลสัตว์ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2540) โดยธรรมชาติแล้วตัวสัตว์เองจะมีระบบป้องกันจุลินทรีย์ไม่ให้เข้าสู่ร่างกายโดยมีขน หนัง Mucous Membrane น้ำย่อย และ Antibody ดังนั้นสัตว์ที่มีสุขภาพสมบูรณ์จึงถือว่าภายในเนื้อควรปลอดภัยด้วย แต่การปนเปื้อนของจุลินทรีย์อาจมาจากขั้นตอนการฆ่า การเชือด การถลกหนังและการตัดแต่งได้เช่นกัน (สัญชัย จตุรสิทธา, 2543)

ทั้งนี้จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายๆ ท่าน ที่ผ่านมาระบุถึงสาเหตุของการตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ดังเช่น Varnam และ Sutherland (1995) กล่าวถึงแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสัตว์มาจากลำไส้และเครื่องใน การปนเปื้อนสู่เนื้ออาจเกิดโดยทางอ้อมจากอุจจาระและหนังสัตว์ ส่วนขั้นตอนการฆ่าสัตว์ สภาพแวดล้อมและอุปกรณ์เครื่องมือที่ไม่ถูกสุขลักษณะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนทางตรงได้ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล (2540) รายงานถึงโรงเชือดหมูซึ่งพบว่า ในขั้นตอนการลวกซาก (Scalding) ช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียได้บางส่วน แต่แบคทีเรียที่ทนความร้อนได้ดี เช่น *Clostridium* spp. และสปอร์ของ *Bacillus* spp. สามารถมีชีวิตรอดได้และเข้าสู่ซากทางบาดแผลที่ถูกแทงคอหรือจากผิวหนังที่ถูกทำลายเนื่องจากความร้อนของการลวกซาก น้ำลวกซากที่อุณหภูมิสูงจะทำลายผิวหนังชั้นนอก ดังนั้นภายหลังขั้นตอนการลวกซากจะพบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าเดิม Pearson และ Dutson (1986) รายงานถึงแหล่งของการปนเปื้อนจากหนังสัตว์มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียในระดับ $3.3x10^6$ colony/cm^2 แหล่งของการปนเปื้อนจากผิวดิน มูลสัตว์ และภายในกระเพาะรวมพบเชื้อแบคทีเรีย $1.1x10^8$ $9x10^7$ $5.3x10^7$ colony/g ตามลำดับ ในขั้นตอนการตัดแต่งและการเลาะกระดูก (Cutting and De-boning) พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สูงเช่นกัน เนื่องมาจากอุปกรณ์ไม่สะอาด การปนเปื้อนจากพนักงานและสภาวะการผลิตที่อุณหภูมิสูง Nel และคณะ (2004) กล่าวว่าขั้นตอนดังกล่าวถือว่ามีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อน และจากผลการศึกษาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสดโดยการสุ่มตัวอย่างในขั้นตอนการตัดแต่ง การเลาะกระดูก (De-boning) จากโรงฆ่าสัตว์ที่มีปริมาณการผลิตสูง พบปริมาณเชื้อ APC ในระดับ 1.7×10^7 cfu/g ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์สูง เช่นเดียวกับการศึกษาทดลองของ Surkiewicz และคณะ (1972) พบว่าปริมาณเชื้อ APC ในตัวอย่างเนื้อหมูตัดแต่งจะมีปริมาณสูงกว่าตัวอย่างจากซากที่เอาอวัยวะภายในออก ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มปริมาณเชื้อขึ้นในขั้นตอนการตัดแต่งและเลาะกระดูก ในด้านความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นและในผลิตภัณฑ์ พบว่ามีความสอดคล้องในทางเดียวกัน Surkiewicz และคณะ (1972) พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของไส้กรอกสดขึ้นกับวัตถุดิบเนื้อหมูตั้งต้น โดยไส้กรอกสดที่ผลิตจากเนื้อหมูที่มีปริมาณเชื้อ APC 100,000 cfu/g หรือต่ำกว่า จะมีปริมาณเชื้อ APC น้อยกว่า 200,000 cfu/g และน้อยกว่า 500,000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cfu/g คิดเป็น 75% และ 96.4% ตามลำดับ ส่วนไส้กรอกสดที่ผลิตจากเนื้อหมูที่มีปริมาณเชื้อ APC มากกว่า 100,000 cfu/g จะมีปริมาณเชื้อ APC มากกว่า 200,000 cfu/g และมากกว่า 500,000 cfu/g คิดเป็น 87% และ 49% ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าการคัดเลือกเนื้อสัตว์เพื่อใช้ในกระบวนการผลิต นับเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมบริโภคแหนมโดยไม่ผ่านความร้อน การจัดหาวัตถุดิบเนื้อสัตว์จึงต้องนำมาจากโรงฆ่าสัตว์ที่ได้มาตรฐานและมีการควบคุม เพื่อมิให้มีการปนเปื้อนและควบคุมการขนส่งในสภาวะที่ถูกสุขลักษณะ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2544)

ส่วนปริมาณเชื้อ APC ในวัตถุดิบอื่นๆ ในกระบวนการผลิตแหนม (ตารางที่ 4.2) ทั้ง กระเทียมสับ พริกขี้หนูสวน หนังหมูสุกหั่นเส้นพบเชื้อ APC อยู่ในช่วง 6.11-6.30 5.34-5.86 4.18-5.73 Log CFU/g ตามลำดับ โดยพบเชื้อ Fecal Streptococci ในทั้งสามตัวอย่าง และพบเชื้อ Coliform ในวัตถุดิบพริกขี้หนูสวน ส่วนวัตถุดิบข้าวสุกพบเชื้อ APC ในระดับต่ำสุด (อยู่ในช่วง 1.65 – 2.40 Log CFU/g) และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค สอดคล้องกับผลการศึกษาแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตแหนมของ Khieokhachee และคณะ (1996) พบว่าแหล่งของเชื้อมาจากวัตถุดิบตั้งต้นเป็นหลัก โดยพบเชื้อ APC อยู่ในช่วง 5.84-6.70 1.15-1.96 5.82-6.48 Log CFU/g ในวัตถุดิบกระเทียม ข้าวสุก และพริกขี้หนูตามลำดับ ส่วนในหนังหมูดิบพบปริมาณเชื้อในเกณฑ์สูงเท่ากับ 6.27-8.04 Log CFU/g ต่อมาอดิศร เสวตวิวัฒน์ (2548) รายงานว่าส่วนประกอบของวัตถุดิบในการผลิตแหนม เช่น หนังหมูหั่นเส้น กระเทียมสับ พริกขี้หนูสวน ข้าวสวย มีส่วนช่วยเพิ่มรสชาติ กลิ่น เนื้อสัมผัสแหนมให้ดีขึ้น และมีผลต่อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และโทษในระหว่างการหมัก การเตรียมที่ไม่ดีอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น การปนเปื้อนของ *Staph. aureus, Salmonella* spp., *C. perfringens* และ *B. cereus* ในระหว่างการเตรียมหนังหมูหั่นเส้น การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในข้าวเก่าเก็บค้างคืนในสภาพไม่เหมาะสม ทั้งนี้สามารถป้องกันโดยมีระบบการผลิตและการเตรียมที่ดีใช้หลัก GMP ในการผลิต ส่วนในมาตรฐานผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ตามที่ระบุไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับ 243 (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2544) เรื่องการควบคุมกระบวนการผลิต วัตถุดิบส่วนผสม กล่าวว่าควรคัดเลือกวัตถุดิบที่มีคุณภาพดีมีการล้างหรือทำความสะอาดตามความจำเป็น และเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่ป้องกันการปนเปื้อนได้ โดยมีการเสื่อมสภาพน้อยที่สุด

การเลือกปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป ควรเลือกจากปริมาณที่พบจริงในระดับสูง ซึ่งเป็นระดับที่เกิดอันตรายสูงสุด (Worst Case) โดยทั่วไปจะใช้เป็นค่าในการตรวจยืนยัน (Validation) กระบวนการว่าสามารถลดอันตรายลงให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยหรือไม่และเพื่อป้องกันความเสี่ยงของการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์อันเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น ปัญหาด้านโครงสร้างการผลิตที่ไม่สามารถควบคุมการปนเปื้อนได้ ความบกพร่องในการควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

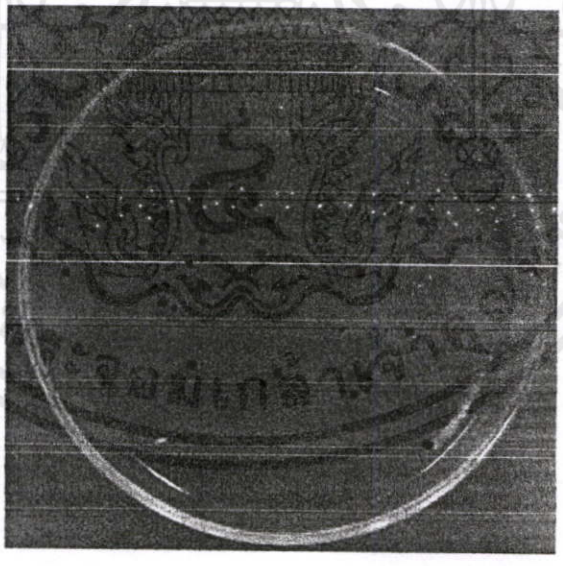
อุณหภูมิและเวลาในการผลิต ความไม่สะอาดของอุปกรณ์การผลิต สุขลักษณะการผลิตของพนักงาน และเครื่องมือเครื่องจักรอื่นๆ รวมไปถึงโอกาสของการปนเปื้อนข้ามในกระบวนการผลิต จึงควรทำการทดลองในระดับรุนแรงมากกว่าสถานการณ์จริง 1-2 Log CFU/g เพื่อให้มั่นใจว่าหากปริมาณเชื้อเบี่ยงเบนไปจากมาตรฐานที่กำหนดไว้จะยังคงสามารถควบคุมได้ (อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์, 2549)

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 4.2) สามารถสรุปได้ว่าปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบในตัวอย่างวัตถุดิบในกระบวนการผลิตแหนมที่ศึกษา ระดับต่ำสุดคือ 1.65 Log CFU/g ระดับสูงสุดคือ 7.83 Log CFU/g ดังนั้นปริมาณเชื้อ APC ที่เหมาะสมเพื่อใช้ศึกษาทดลองในขั้นตอนต่อไปคือ 6 Log CFU/g ซึ่งเป็นระดับทั่วไปที่พบการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์ และ 7 Log CFU/g เป็นระดับรุนแรงมากกว่าสถานการณ์จริง ส่วนการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับสูงกว่านี้จะมีผลต่อคุณภาพของเนื้อสัตว์และไม่เหมาะสมที่จะนำมาทำผลิตภัณฑ์ ดังจะเห็นได้จากการศึกษาอายุการเก็บวัตถุดิบเนื้อสัตว์ในสภาพแช่เย็นโดย Varnam และ Sutherland (1995) พบว่าคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของเนื้อสัตว์ถูกจำกัดด้วยปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ ที่ระดับของเชื้อจุลินทรีย์ 10^7 จะทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ (Off – odour) ที่ระดับ 10^8 จะเกิดลักษณะเป็นเมือก และที่ระดับ 10^{10} จะเกิดกลิ่นเน่าเหม็น (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

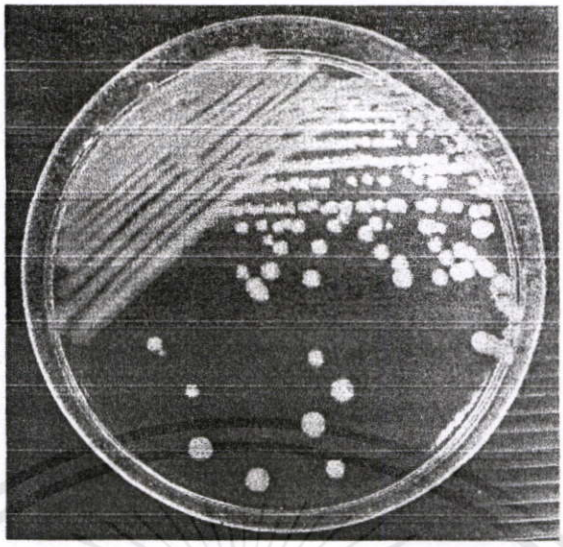
4.2 การศึกษาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแหนมที่ใช้ทดลอง

จากการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ APC ในตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) มีลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นสีแดงชมพูเนื่องจากการเติมสาร Triphenyltetra Zotium Chloride ซึ่งเป็นสารทำให้เกิดสีในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ดังแสดงในภาพที่ 4.1 จากนั้นทำการเก็บเชื้อ APC โดยเลือกโคโลนีที่กลมนูนขนาดสมบูรณ์ จากนั้นนำเชื้อดังกล่าวไป Streak และเลี้ยงบน Nutrient Agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นสีขาวขุ่น ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ทำการถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวจาก Nutrient Agar (NA) ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA Slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อเดือนละ 1 ครั้ง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.3 จากนั้นส่งตัวอย่างเชื้อไปตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่หน่วยงานศูนย์รวมบริการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

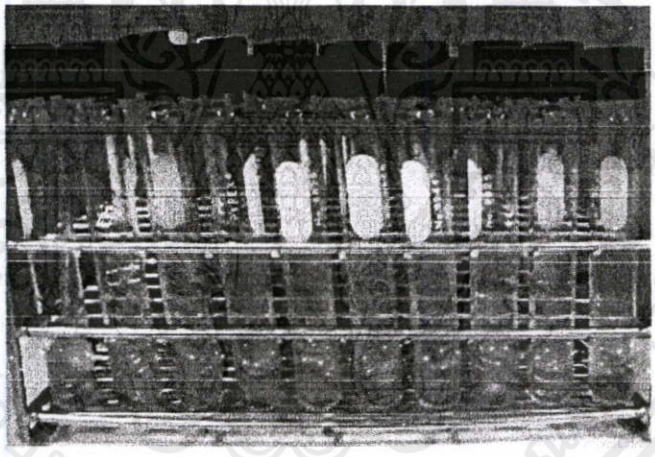


ภาพที่ 4.1 : โคโลนีสีชมพูแดงของเชื้อ APC จากตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 : โคโลนีสีขาวขุ่นของเชื้อ APC บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)



ภาพที่ 4.3 : Stock เชื้อ APC ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant

ผลการตรวจวินิจฉัยหาชนิดของเชื้อและสายพันธุ์ โดยหน่วยงานศูนย์รวมบริการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์พบเชื้อ *Pseudomonas cepacia (P. cepacia)* เป็นกลุ่มของเชื้อแบคทีเรีย เซลล์รูปท่อน ยาว 1.6-3.2 ไมโครเมตร ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส ติดสีแกรมลบ ไม่ทำให้เกิดการหมัก แบคทีเรียกลุ่มนี้พบในธรรมชาติ ดิน น้ำ พืช ดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นได้ ถูกค้นพบโดย Walter Burkholder ในปี ค.ศ. 1949 (Wikipedia, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมของการตรวจหาเชื้อ *P. cepacia* ที่บาดเจ็บหลังผ่านสภาวะจำลองของการหมัก

ผลของการหมักต่อปริมาณเชื้อ *P. cepacia* ที่ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 2 และ 3 วัน พบว่าปริมาณเชื้อที่เหลือรอดจะอยู่ในสภาพที่มีความบกพร่องทางกายภาพ หรือที่เรียกว่าเซลล์ที่บาดเจ็บ (Injured Cell) เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับ 4.5 ส่งผลกระทบต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับหลักการของเทคโนโลยีเฮอร์เดิล (Hurdle Technology) โดยLeistner (2000) ได้ศึกษาการนำปัจจัยต่างๆ มาใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร เช่น การใช้ความร้อนสูง (ค่า F) ในระหว่างการแปรรูป การใช้อุณหภูมิต่ำ (t) ในระหว่างการแช่เย็น การปรับค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w) การปรับความเป็นกรด (pH) และการปรับค่ารีดอกซ์โพเทนเชียล มีผลทำให้จุลินทรีย์สร้างกลไกเพื่อให้สามารถรอดชีวิตได้ เรียกกลไกเหล่านี้ว่า โฮมีโอสเตซิส (Homeostasis) ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้กิจกรรมและพารามิเตอร์ (Parameters) ทางสรีรวิทยาที่สำคัญของจุลินทรีย์ยังคงดำเนินต่อไปตามปกติ การที่ความเข้มของเฮอร์เดิลแต่ละชนิดเพิ่มขึ้นจะยิ่งทำให้จุลินทรีย์ใช้พลังงานมากขึ้นในการรักษาโฮมีโอสเตซิสภายในเซลล์ไว้ภายใต้สภาวะที่มีความเครียดเกิดขึ้น จนทำให้เกิดการอ่อนแรง (Metabolic Exhaustion)

ดังนั้นเพื่อที่จะได้ผลของการตรวจนับเชื้อเป็นที่ยอมรับ จึงจำเป็นต้องตรวจนับจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บเป็นลำดับแรก กล่าวคือ ต้องทำการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บโดยการบ่มเชื้อเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเสริม (Enrichment media) (อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์, 2549) สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ เช่น Zanetti และคณะ (2000) ศึกษาการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บของเชื้อ *P. cepacia* จากตัวอย่างน้ำดื่มสาธารณะและจากครัวเรือนในเมือง Bologna ประเทศอิตาลี โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas* CFC Agar, MacConkey Media และ Trypticase Soy Agar (TSA) ในการบ่มรักษาเซลล์ พบว่าค่าเฉลี่ยของเซลล์ที่ฟื้นตัวของเชื้อ *P. cepacia* อยู่ที่ <1 cfu/100 ml คิดเป็น 3.5% ของตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อในน้ำมีน้อย โดยพิจารณาได้จากปริมาณเชื้อ Heterotropic Plate Counts ที่ปนเปื้อนในน้ำมีค่า Min-Max อยู่ที่ 1-40000 cfu/ml

จากการศึกษางานวิจัยเกี่ยวกับการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บ โดยส่วนใหญ่นักวิจัยจะมุ่งศึกษากลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรครุนแรง ทั้งนี้เพื่อความมั่นใจในผลการวิเคราะห์ที่ส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังเห็นได้จากการทดลองของ Uyttendaele และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ในเนื้อบดเพื่อศึกษาปัจจัยการใช้ความร้อน การใช้อุณหภูมิแช่เย็นแช่แข็ง และการรอดชีวิตของเชื้อในไส้กรอกหมัก โดยเพิ่มขั้นตอนการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน พบว่า Modified Levine's Eosin Methylene Blue Agar (mEMB) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บ ส่วนอาหารเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือจำหน่ายเพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

เชื้อ TSA มีคุณสมบัติในการเป็น Selective Media ที่ดีแต่มีคุณสมบัติด้อยในการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บ Restaino และคณะ (2001) ได้ศึกษาการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 และ 50 นาที แช่แข็งที่ -25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Selective Enrichment Broths ชนิดต่างๆ 5 ชนิด พบว่า BCM *E. coli* Enrichment Broth (BCM-EB) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บหลังจากผ่านการให้ความร้อนและการแช่แข็ง โดยระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมคือ 3 ชั่วโมง Weaver และคณะ (2002) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บของเชื้อ *E. coli* กลุ่ม Enteropathogenic *E. coli*, Enterotoxigenic *E. coli*, Enteroinvasive *E. coli* และ Enterohaemorrhagic *E. coli* หลังผ่านความร้อนที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 31 นาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB พบว่าการใช้วิธีร่วมกันระหว่างการเขย่าอาหารเลี้ยงเชื้อและการปล่อยให้อยู่นิ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บของเชื้อ *E. coli* ทั้ง 5 ชนิด และพบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมในการตรวจนับเชื้อแบบง่าย ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเหมาะสมในการตรวจนับจำนวนเชื้อ ในขณะที่ Conner และ Hall (1997) ได้ศึกษาความมีประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อในการรักษาเซลล์ของ *E. coli* O157:H7 ที่บาดเจ็บหลังผ่านการแช่แข็งและเก็บรักษาที่สภาวะแข็งเป็นเวลา 18 เดือน โดยทดลองศึกษาในเนื้อไก่แช่แข็งซึ่งมี Sodium Chloride (NaCl) Sodium Lactate หรือ Polyphosphate เป็นส่วนประกอบ พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ร่วมกับ 1% Pyruvic Acid และ Phenol Red Sorbitol Sugar (PRSA) มีความเหมาะสมในใช้รักษาเซลล์ที่บาดเจ็บ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Sorbital Agar (MSA) มีคุณสมบัติที่ไม่เพียงพอในการรักษาเซลล์ของ *E. coli* O157:H7ที่บาดเจ็บหลังผ่านการแช่แข็ง

จากผลการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *P. cepacia* ที่ผ่านสภาวะการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB และ Pyruvic Acid 1% เพื่อให้เชื้อรักษาตัวเองในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก่อนที่จะสามารถเพิ่มจำนวนได้อีก ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อที่เวลาต่างๆ โดยทำการเจือจางเชื้อด้วยวิธี 10 Fold dilution จนได้ความเจือจางที่เหมาะสมต่อการนับจำนวน ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อด้วยวิธี Pour Plate Technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (Merck) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อและคัดเลือกเวลาที่เหมาะสมต่อการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บ โดยสังเกตว่าเชื้อเริ่มมีการเพิ่มจำนวนจากการตรวจนับไม่ได้เป็นตรวจนับได้แต่ต้องไม่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เพื่อนำมารายงานผลของจุลินทรีย์ที่เหลือรอด ที่ชั่วโมง Pre-Enrichment ต่างๆ (อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์, 2549) ดังแสดงในตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเชื้อ *P. cepacia* ภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส

สภาวะการทดลอง	จำนวนชั่วโมง	ปริมาณเชื้อ *P. cepacia* ที่รอดชีวิต (Log CFU/g)	
		Trt. ระดับเชื้อ 6 Log CFU/g	Trt. ระดับเชื้อ 7 Log CFU/g
- ก่อนการหมัก	0	NG	NG
	1	NG	NG
	2	5.75	5.71
	3	5.83	5.76
	5	5.97	5.82
- หลังการหมัก 1 วัน	0	NG	NG
	1	NG	NG
	2	5.67	5.73
	3	5.74	5.84
	5	5.89	5.93
- หลังการหมัก 2 วัน	0	NG	NG
	1	NG	NG
	2	4.94	4.79
	3	5.05	4.88
	5	5.11	5.03
- หลังการหมัก 3 วัน	0	NG	NG
	1	NG	NG
	2	NG	NG
	3	3.11	3.42
	5	3.28	3.77

หมายเหตุ : NG = No Growth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเชื้อ *P. cepacia* ที่ความเข้มข้น 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g หลังผ่านสภาวะจำลองของการหมักที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 2 และ 3 วัน พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บคือ 2 2 2 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ จากผลการทดลองผลต่างของปริมาณเชื้อที่เริ่มมีการเพิ่มจำนวนจากตรวจนับไม่ได้เป็นตรวจนับได้ ของทั้งสองตัวอย่างทดลองอยู่ในช่วง 0.04-0.31 Log CFU/g ซึ่งแตกต่างกันเล็กน้อย อาจเนื่องจากระยะเวลาดังกล่าว เชื้ออยู่ในช่วงเริ่มฟื้นตัว ทั้งนี้จากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องของ อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์ (2549) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น 3 Log CFU/g 4 Log CFU/g และ 5 Log CFU/g หลังการแช่แข็งและหลังการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งเป็นเวลา 1 ถึง 60 วัน พบว่าเชื้อเริ่มมีการเพิ่มจำนวนจากตรวจนับไม่ได้เป็นตรวจนับได้ ณ ชั่วโมงที่ 8 ถึง 12 โดยปริมาณเชื้อที่เริ่มตรวจนับได้ของตัวอย่างทดลองที่ระดับความเข้มข้น 3 Log CFU/g และ 4 Log CFU/g ต่างกันอยู่ในช่วง 0.03-1.16 Log CFU/g ขณะที่ตัวอย่างทดลอง 4 Log CFU/g และ 5 Log CFU/g ต่างกันอยู่ในช่วง 0.65-2.10 Log CFU/g ในการทดลองครั้งนี้ต้องการเพียงข้อมูลเบื้องต้นในการหาเวลาที่เหมาะสมเพื่อบ่มรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บ โดยอาศัยข้อมูลเวลาที่เชื้อเริ่มมีการเพิ่มจำนวนจากตรวจนับไม่ได้เป็นตรวจนับได้ สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับปริมาณเชื้อและอัตราการเจริญของเชื้อที่ผ่านการบ่มเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บ จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยควบคุมปัจจัยที่อาจมีผลกระทบ เช่น อายุการเก็บรักษาและความแข็งแรงของเชื้อมาตรฐาน การควบคุม Delay Time รวมทั้งการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติที่เพียงพอ

จากผลการทดลองที่ได้แสดงว่าการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บของเชื้อ *P. cepacia* ใช้เวลาไม่มากนักในการที่เชื้อจะเริ่มมีการเพิ่มจำนวนจากการตรวจนับไม่ได้เป็นตรวจนับได้ และการบ่มเพื่อรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บหลังจากผ่านสภาวะจำลองของการหมักที่ pH 4.5 ที่ 0 1 2 และ 3 วัน ใช้เวลาใกล้เคียงกันคือ 2 และ 3 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความทนทานของตัวเชื้อเอง ดังจะเห็นได้จากงานวิจัยต่างๆ ที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าว เช่น Gregory และ McNab(1986) ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *P. cepacia* Anderson และ คณะ (1991) ศึกษาธรรมชาติของเชื้อ *P. cepacia* ที่เกิดการปนเปื้อนในอุตสาหกรรมผลิตยาฆ่าเชื้อ Povidone-iodine Robert และคณะ (1998) ศึกษาความทนทานของเชื้อ *P. aeruginosa* และ Quinn (1998) ศึกษาปัญหาของสถานพยาบาลเกี่ยวกับความทนทานของเชื้อ *P. cepacia* ซึ่งจากงานวิจัยดังกล่าวทั้งหมดพบว่า ธรรมชาติของเชื้อ *P. cepacia* มีความทนทานต่อสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ และทนทานต่อสารปฏิชีวนะต่างๆ ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การเจริญของเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) และเชื้อ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในระหว่างกระบวนการหมักแหนม

1) ผลการติดตามการเจริญของเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในระหว่างกระบวนการหมักและผลการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค

จากการทดลองนำตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุ ที่เติมเชื้อ *Pseudomonas cepacia* เพื่อให้มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g ทำการหมักเป็นเวลา 0 ถึง 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิในการหมัก 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC และเชื้อ LAB ในแต่ละช่วงเวลาการหมัก ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าในชั่วโมงที่ 0 ของการหมักในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g มีปริมาณเชื้อ APC เท่ากับ 6.22 Log CFU/g และ 7.10 Log CFU/g ตามลำดับ และยังพบว่าตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 6 Log CFU/g จะมีปริมาณเชื้อ APC สูงกว่าเชื้อ LAB ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 12 ในขณะที่ตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 7 Log CFU/g จะมีปริมาณเชื้อ APC สูงกว่า LAB จนถึงชั่วโมงที่ 36 โดยปริมาณเชื้อ APC ที่มากกว่า LAB คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 3 ถึง 33 เปอร์เซ็นต์ หลังจากชั่วโมงดังกล่าวปริมาณเชื้อ APC ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ปริมาณ APC ณ ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 6.14 Log CFU/g และ 6.40 Log CFU/g ลดลงคิดเป็น 1.29 และ 9.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อ APC ตั้งต้น

ในการทดลองครั้งนี้ผู้ทดลองยังได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุ เพื่อให้มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g วัตถุประสงค์ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Pseudomonas* spp. เพื่อหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตหลังผ่านขั้นตอนการหมัก โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์แหนมที่ผ่านการหมัก 0 1 2 และ 3 วัน ตรวจวิเคราะห์เชื้อกลุ่ม *Pseudomonas* spp. ที่ห้องปฏิบัติการภายนอก บริษัท IQA Laboratory เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้น ในกรณีที่พบเชื้อ *Pseudomonas* spp. จึงจะทำการส่งตัวอย่างเชื้อที่ตรวจพบไปตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อ *Pseudomonas cepacia* ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดของห้องปฏิบัติการ IQA Laboratory รวมถึงห้องปฏิบัติการเอกชนอื่นๆ ที่ได้สอบถามเพื่อขอรับบริการ พบข้อจำกัดคือไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *P. cepacia* ได้ ส่วนข้อจำกัดของห้องปฏิบัติการกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือไม่รับบริการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ จะรับบริการเฉพาะการตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อในตัวอย่างที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นสารสนเทศที่ใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

จากผลวิเคราะห์พบว่าในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g ณ วันที่ 0 ของการหมัก พบปริมาณเชื้อ *Pseudomonas* spp. เท่ากับ 2.97 Log CFU/g และ 3.52 Log CFU/g ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างผลิตภัณฑ์แหนมที่ผ่านการหมัก 1 2 และ 3 วัน พบปริมาณเชื้อ *Pseudomonas* spp. น้อยกว่า 10 CFU/g ในทุกตัวอย่างทดลอง ทั้งนี้สอดคล้องกับงานศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ดังเช่น Todar (2004) กล่าวว่า *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียที่พบในดินและน้ำ เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและเป็นกลาง (Neutral Condition) ไม่พบการหมัก พบไม่มากนักในสภาวะแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจนและไม่ชอบอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงและมีสภาพเป็นกรด Silvia และ Karl (2004) ศึกษาการใช้ Organic Acid ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่ากลุ่มเชื้อ *Pseudomonas* spp. จะไม่เจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง โดยค่า pH ที่เหมาะสมของเชื้อ *P. aeruginosa* อยู่ที่ระดับ 6.8 (Gerhardt และคณะ, 1981) Buys และคณะ (2000) ทำการศึกษาทดลองพบว่าหากจัดเก็บชิ้นเนื้อในสภาวะแวดล้อมที่มีออกซิเจนเชื้อ *Pseudomonas* spp. จะชอบและเจริญเติบโตได้ดีทำให้เกิดการเสื่อมเสีย และพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อ *Pseudomonas* spp. ในปริมาณที่สูงจะทำให้อายุการเก็บรักษาสั้นลง ซึ่งแตกต่างจากกรณีที่จัดเก็บชิ้นเนื้อในสภาพที่ไม่มีอากาศพบว่าอายุการเก็บรักษาจะนานกว่า เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ไม่มีอากาศมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. บางส่วนหรือทั้งหมด (Gill และ Jones, 1999) Lawrie (1998) กล่าวว่า *Pseudomonas* spp. เป็นเชื้อจุลินทรีย์ท้องถิ่น (Microflora) ปริมาณที่พบขึ้นกับระดับการปนเปื้อนจากโรงเชือดและโรงตัดแต่ง ผลการศึกษาปริมาณการปนเปื้อนในเนื้อสัตว์พบอยู่ที่ระดับ 3.98-5.82 Log CFU/g วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2539) กล่าวว่ากลุ่มเชื้อ *Pseudomonas* spp. มีข้อจำกัด เช่น เติบโตได้เฉพาะในที่มีความชื้นสูง (a_w 0.97-0.98) ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน เติบโตได้ไม่ดีในที่มีออกซิเจนน้อย ส่วนใหญ่ไม่สามารถเติบโตในสภาพที่เป็นกรด (ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 หรือต่ำกว่า)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในระหว่างขั้นตอนการหมัก ปัจจัยด้านการลดปริมาณออกซิเจน การเพิ่มความเป็นกรดและการควบคุมค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ในระดับที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* spp. สอดคล้องกับ Hampikyan และ Ugur (2000) กล่าวว่าความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ Fermented Sausage ประกอบด้วยหลายปัจจัยร่วมกัน คือ ค่าเปอร์เซ็นต์เกลือ สารเมตาโบไลท์ที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน (Antimicrobial Metabolites) ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าวอเตอร์แอคติวิตีที่ต่ำ ซึ่งมีการพัฒนาขึ้นร่วมกันระหว่างกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์เชื้อ LAB โดยแหล่งของเชื้อมาจากวัตถุดิบเนื้อหมูตั้งต้นเป็นหลักพบว่าปริมาณเชื้อ LAB ในหมูเนื้อแดงบดมีค่าเท่ากับ 2.63 Log CFU/g และพบว่ามีการเจริญของเชื้อ LAB ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการหมัก มีค่าเท่ากับ 5.18 Log CFU/g และ 5.33 Log CFU/g ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Comi และคณะ (2005) ได้ศึกษาคุณลักษณะของไส้กรอกหมักตามธรรมชาติ ซึ่งผลิตทางตอนเหนือของอิตาลี พบว่าหลังจากทำการหมัก 0 และ 3 วัน พบเชื้อ LAB ที่ระดับ 4 - 5 Log CFU/g และ 7- 8 CFU/g ตามลำดับ และพบเชื้อ *Pseudomonas spp.* ที่ระดับ 2-4 Log CFU/g และ < 100 CFU/g ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อ LAB ณ. ชั่วโมงที่ 0 ของการหมัก อยู่ในเกณฑ์ที่สูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากผลการใช้ผงทำแหนมซึ่งมีส่วนประกอบสำคัญ คือ น้ำตาล Dextrose 38% และ Lactose 26% เป็นสารอาหารที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรีย เป็นคาร์โบไฮเดรตอยู่ในรูปที่มีโมเลกุลง่ายๆ เชื้อแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ทันที และทำให้ pH ลดลงได้อย่างรวดเร็ว (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) รวมถึง Delay Time ในขั้นตอนการผลิตแหนมใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง จึงมีผลทำให้เกิดการหมักอย่างต่อเนื่อง และยังพบว่าตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 6 Log CFU/g เริ่มมีเชื้อ LAB สูงกว่าเชื้อ APC ณ ชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ปริมาณเชื้อ LAB ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 7 Log CFU/g เริ่มมีค่าสูงกว่า APC ณ ชั่วโมงที่ 48 โดยปริมาณเชื้อ LAB ที่มากกว่า APC คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 8 ถึง 27 เปอร์เซ็นต์ หลังการหมัก 72 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ LAB เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ประมาณ 1-2 Log มีค่าเท่ากับ 9.00 Log CFU/g และ 8.77 Log CFU/g เพิ่มขึ้นคิดเป็น 73 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อตั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ที่ตรวจพบ (Log CFU/g) ระหว่างการหมักแหนม ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลาในการหมัก (ชั่วโมงที่)	ปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบ*		ปริมาณเชื้อ LAB ที่ตรวจพบ*	
	Trt. ระดับเชื้อ APC วัตถุดิบตั้งต้น 6 Log CFU/g	Trt. ระดับเชื้อ APC วัตถุดิบตั้งต้น 7 Log CFU/g	Trt. ระดับเชื้อ APC วัตถุดิบตั้งต้น 6 Log CFU/g	Trt. ระดับเชื้อ APC วัตถุดิบตั้งต้น 7 Log CFU/g
0	$6.22^{c} \pm 0.22$	$7.10^{c} \pm 0.18$	$5.18^{d} \pm 0.12$	$5.33^{e} \pm 0.27$
12	$6.52^{b} \pm 0.03$	$7.39^{b} \pm 0.17$	$6.31^{c} \pm 0.10$	$6.08^{d} \pm 0.19$
24	$6.94^{b} \pm 0.23$	$7.68^{a} \pm 0.07$	$7.10^{b} \pm 0.42$	$6.85^{c} \pm 0.35$
36	$7.42^{a} \pm 0.17$	$7.80^{a} \pm 0.11$	$7.50^{b} \pm 0.09$	$7.43^{b} \pm 0.12$
48	$6.71^{b} \pm 0.09$	$6.74^{d} \pm 0.32$	$7.78^{b} \pm 0.57$	$7.74^{b} \pm 0.43$
60	$6.54^{b} \pm 0.05$	$6.60^{d} \pm 0.18$	$8.73^{a} \pm 0.11$	$8.54^{a} \pm 0.13$
72	$6.14^{c} + 0.22$	$6.40^{d} + 0.16$	$9.00^{a} \pm 0.05$	$8.77^{a} \pm 0.20$

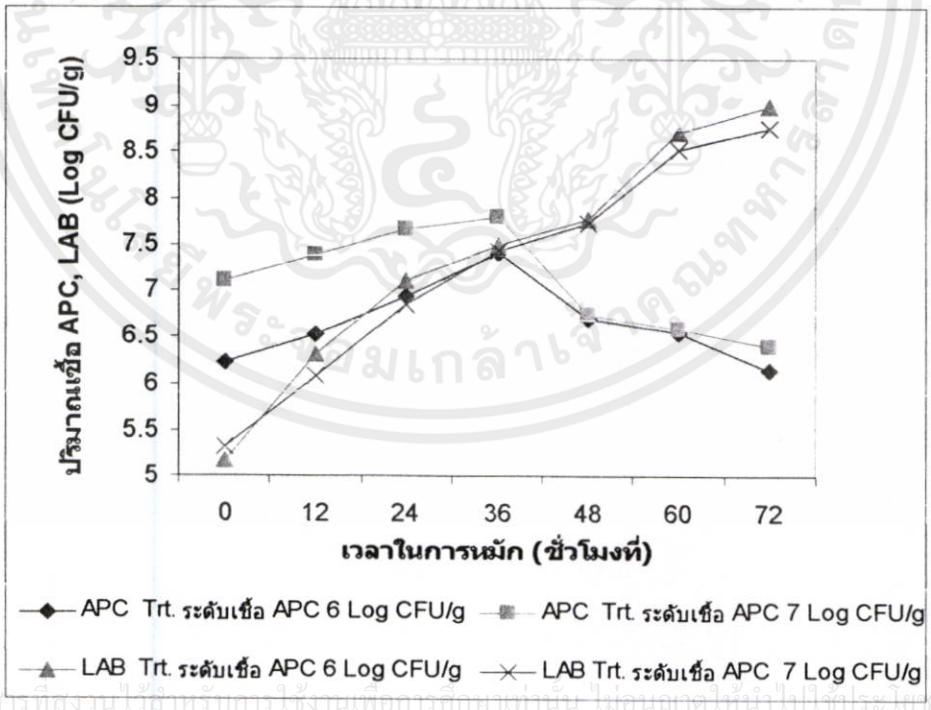
หมายเหตุ * ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวดิ่งเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย LSD

Visessanguan และคณะ (2006) ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ LAB ในระหว่างขั้นตอนการหมักแหนม โดยใช้ระดับเชื้อ Total Viable Count (TVC) ตั้งต้น 6-7 Log CFU/g พบเชื้อ LAB ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการหมักอยู่ในช่วง 6-7 Log CFU/g โดยที่แหล่งของเชื้อ LAB มาจากวัตถุดิบเนื้อหมูเป็นหลัก เพิ่มปริมาณจนถึงระดับ 8-9 Log CFU/g ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ LAB คงที่จนกระทั่งการหมักสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการศึกษาทดลองของ Khieokhachee และคณะ (1996) พบว่า ความสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างขั้นตอนการหมักแหนมโดยเชื้อตั้งต้นของส่วนคลุกผสมอยู่ที่ 6.7 Log CFU/g ในวันที่ 0 ของการหมักพบเชื้อ LAB เท่ากับ 7.48 Log CFU/g โดยที่แหล่งของเชื้อมาจากวัตถุดิบเนื้อหมูเป็นหลัก หลังทำการหมักเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ LAB เพิ่มขึ้นจนถึง 9.00 Log CFU/g และคงที่จนกระทั่งการหมักสมบูรณ์ จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความโดดเด่นของ LAB ในกระบวนการหมักที่ปริมาณเชื้อตั้งต้นระดับ 6-7 Log CFU/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นเดียวกับการศึกษาการเจริญของเชื้อ APC และ LAB ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g พบว่าปริมาณ APC ณ ชั่วโมงที่ 0 ของตัวอย่างทดลองทั้งสองแตกต่างกันประมาณ 1 Log CFU/g เนื่องจากปริมาณเชื้อที่

เติมเพิ่มตามวัตถุประสงค์การทดลอง ชั่วโมงที่ 0 ถึง 12 ปริมาณเชื้อ APC ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 6 Log CFU/g มีอัตราการเจริญสูงกว่าเชื้อ LAB และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Khieokhachee และคณะ (1996) ซึ่งพบว่าในช่วง 16 ชั่วโมงแรกของการหมักมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการอากาศอย่างรวดเร็วทำให้ปริมาณออกซิเจนเหลือน้อยส่งผลให้การเจริญของเชื้อดังกล่าวลดลง เนื่องจากสภาวะไม่เหมาะสมและเป็นโอกาสให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศหรือต้องการน้อยเจริญเติบโตต่อไป ในขณะที่ปริมาณเชื้อ APC ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 7 Log CFU/g มีอัตราการเจริญสูงกว่าเชื้อ LAB ตั้งแต่ 0 จนถึง 36 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเชื้อตั้งต้นที่สูงกว่าจึงทำให้เกิดภาวะการแข่งขันระหว่างเชื้อทั้งสอง ทั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยเกี่ยวกับ Fermented Sausage ที่ Cornell University (2006) กล่าวว่ากระบวนการหมักเป็นสภาวะที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นควรเลือกใช้วัตถุดิบตั้งต้นที่มีคุณภาพด้านจุลินทรีย์ที่ดีเพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสการเจริญของเชื้อที่ช่วยในการหมักและลดโอกาสเชื้อคู่แข่ง (Competitive Bacteria) อย่างไรก็ตามหลังจากชั่วโมงดังกล่าวจนกระทั่งการหมักสมบูรณ์ที่ชั่วโมงที่ 72 พบว่าปริมาณเชื้อ APC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.05$) ส่วนปริมาณเชื้อ LAB มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ ($p<0.05$) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนกระทั่งการหมักสมบูรณ์ ดังแสดงตามภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อ APC และปริมาณเชื้อ LAB ในระหว่างการหมักแหนมที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ

ศิวาพร ศิวเวชช (2542) กล่าวถึงปัจจัยที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมัก ประกอบด้วย เชื้อจุลินทรีย์ที่ช่วยให้เกิดสภาวะการหมัก วัตถุดิบ และการควบคุมสภาวะการหมัก จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ LAB มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักแหนม กิจกรรมหลักคือ การเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นน้ำตาลภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศหรือมีอากาศน้อย โดยการบรรจุในถุงพลาสติกรีดอากาศและรัดให้แน่นซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ LAB โดยช่วยจำกัดการเจริญของเชื้อชนิดอื่น สำหรับผลิตภัณฑ์หลักที่ได้คือกรดแลคติกเป็นสารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารต่ำ เป็นปัจจัยหลักในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ส่งผลให้เชื้อ APC มีปริมาณลดลงและเชื้อ LAB มีการเจริญเพิ่มขึ้นจนกระทั่งการหมักสมบูรณ์ ช่วยควบคุมการเจริญและสร้าง Toxin ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเพื่อเป็นการเฝ้าระวังความปลอดภัยได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าในชั่วโมงที่ 0 พบเชื้อ Coliform 30 MPN/g ในตัวอย่างทดลอง 6 Log CFU/g และพบเชื้อ Coliform 23 MPN/g และ *E. coli* 3.6 CFU/g ในตัวอย่างทดลอง 7 Log CFU/g ต่อมาหลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมงไม่พบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์แหนมทุกตัวอย่างทดลอง ทั้งนี้สอดคล้องกับการทดลองของ สุขใจ โสมะฐิติ (2525) พบว่าระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้นสามารถลดปริมาณ Coliform ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์แหนมได้ โดยสามารถลดปริมาณ Coliform จากปริมาณตั้งต้นที่ 7 LogCFU/g เหลือ 2 LogCFU /g ภายในระยะเวลา 5 วัน อย่างไรก็ตามผลวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในตัวอย่าง เป็นเพียงการเฝ้าระวังด้านความปลอดภัยเท่านั้น เนื่องจากการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในระหว่างสภาวะการหมักและความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อทั้งสองในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อตั้งต้นแตกต่างกัน 1 Log CFU/g จึงทำการควบคุมคุณภาพทางจุลินทรีย์ของวัตถุดิบตั้งต้นโดยเฉพาะเนื้อหมูซึ่งเป็นวัตถุดิบหลัก อาศัยการคัดเลือกจากแหล่งผลิตที่มีการควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ดี ควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นอยู่ที่ 5.54 Log CFU/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระหว่างการหมักแหนมที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส

ชนิดเชื้อจุลินทรีย์	Treatment ระดับเชื้อAPC (Log CFU/g)	เวลาในการหมัก (ชั่วโมงที่)						
		0	12	24	36	48	60	72
Coliform (MPN/g)	6	30	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	7	23	<3	<3	<3	<3	<3	<3
E. coli (MPN/g)	6	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3
	7	3.6	<3	<3	<3	<3	<3	<3
Staph. aureus (CFU/g)	6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
B. cereus (CFU/g)	6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
Salmonella spp. In 25 g	6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
C. perfringens (CFU/g)	6	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
	7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
C. botulinum (CFU/g)	6	-	-	-	-	-	-	ไม่พบ
	7	-	-	-	-	-	-	ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) คุณภาพทางด้านเคมีของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างกระบวนการหมัก

ผลการวิเคราะห์ค่าทางเคมีในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าคุณภาพทางด้านเคมีตั้งต้นมีค่า pH เท่ากับ 4.99 และ 4.87 เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเท่ากับ 0.34 และ 0.39 เปอร์เซ็นต์เกลือเท่ากับ 2.34 และ 2.27 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้เท่ากับ 0.935 และ 0.932 ตามลำดับ ปริมาณไนไตรต์ไม่เกิน 125 ppm หลังการหมัก 72 ชั่วโมง ค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เท่ากับ 4.44 และ 4.54 คิดเป็น 11 และ 6.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เท่ากับ 1.47 และ 1.25 เพิ่มขึ้น 4 และ 3 เท่า ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีค่าเปอร์เซ็นต์เกลือเท่ากับ 2.61 และ 2.33 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้เท่ากับ 0.963 และ 0.969 ตามลำดับ และมีปริมาณไนไตรต์ตกค้างเหลือในผลิตภัณฑ์สุดท้ายน้อยกว่า 3 ppm จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ดังเช่น Phithakpol และคณะ (1995) พบว่าโดยทั่วไปผลิตภัณฑ์แหนมมีค่า pH เท่ากับ 4.4 - 4.8 ปริมาณกรดแลคติกเท่ากับ 0.77 - 1.60 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเกลืออยู่ในช่วง 2-3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณโซเดียมไนไตรต์ ไม่เกิน 100-125 ppm ต่อมา อดิศร เสวตวิวัฒน์ (2548) รายงานว่าผลิตภัณฑ์แหนมมีค่า pH และ a_w หลังทำการหมักมีค่าเท่ากับ 4.5 และ 0.967-0.969 และแหนมหมักได้ 3-4 วัน มีค่า pH 4.55 - 4.77 จะเป็นรสชาติที่ผู้บริโภคชอบมากที่สุด

ผลวิเคราะห์ค่าทางเคมีที่ได้จากการทดลองเป็นดรรชนีชี้วัดคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แหนมได้ในระดับหนึ่ง ความเป็นกรดสูงและ pH ต่ำประมาณ 4.45 – 4.55 จะมีความปลอดภัยจากสารพิษที่ผลิตจากเชื้อ *C. botulinum* เนื่องจากสภาพผลิตภัณฑ์ที่หมักไม่เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างสารพิษ เปอร์เซ็นต์เกลือมีผลต่อการลดน้ำในผลิตภัณฑ์และทำให้แรงดันออสโมติค (Osmotic Pressure) ของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป ทำให้ค่า a_w ลดมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และป้องกันการเน่าเสียได้ (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536) ปกติการเติมเกลือในส่วนผสมประมาณ 2.4-3 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้ a_w เริ่มต้นเป็น 0.965-0.955 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณไขมันในสูตร จากผลการทดลองค่า a_w ของผลิตภัณฑ์แหนมหลังการหมัก 72 ชั่วโมง มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากผลของการใช้ฟิตคอตเป็นส่วนประกอบ ซึ่งฟิตคอตจัดเป็นสารประกอบฟอสเฟตในรูปของผสม ช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำทำให้เนื้อไม่สูญเสียน้ำหนักมากเกินไป เนื้อจะมีความนุ่มและชุ่มน้ำเพิ่มขึ้นและมีรสชาติดี (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536) อย่างไรก็ตามค่า a_w ของผลิตภัณฑ์แหนมของทั้งสองตัวอย่างทดลองเท่ากับ 0.967-0.969 ณ ระดับนี้มีผลยับยั้งหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและเอื้อต่อการเจริญของ LAB (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) ส่วนปริมาณไนไตรต์ ที่เติมลงไปตามมาตรฐานกำหนดไม่เกิน 150 ppm มีส่วนช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และป้องกันการงอกของสปอร์ของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ โดยเฉพาะเชื้อ *C. botulinum* (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536) สอดคล้องกับการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลองของ Davies และ Boari (1998) กล่าวว่าสภาวะที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ LAB ในระหว่างกระบวนการหมักคือระดับ pH น้อยกว่า 6 ปริมาณไนไตร์ต 100 ppm ปริมาณเกลืออยู่ในช่วง 2.5-3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะส่งผลให้ค่า a_w อยู่ในช่วง 0.96 สภาวะดังกล่าวเป็นระบบที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (Varnam และ Sutherland, 1995)

ตารางที่ 4.6 ผลวิเคราะห์ค่าทางเคมีของผลิตภัณฑ์แหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส

ผลวิเคราะห์	Trt.	เวลาในการหมัก (ชั่วโมงที่)*						
		0	12	24	36	48	60	72
ค่า pH	6	4.99^{a} ±0.09	4.82^{b} ±0.06	4.70^{c} ±0.08	4.63^{c} ±0.05	4.54^{d} ±0.03	4.46^{e} ±0.06	4.44^{e} ±0.03
	7	4.87^{a} ±0.03	4.76^{b} ±0.08	4.64^{c} ±0.13	4.60^{c} ±0.03	4.59^{c} ±0.05	4.56^{d} ±0.02	4.54^{d} ±0.03
กรดแลคติก (%w/v)	6	0.34^{e} ±0.01	0.66^{d} ±0.11	0.98^{c} ±0.03	1.17^{a} ±0.15	1.26^{a} ±0.13	1.38^{b} ±0.08	1.47^{b} ±0.05
	7	0.39^{d} ±0.07	0.71^{c} ±0.09	0.90^{b} ±0.10	0.98^{b} ±0.08	1.01^{b} ±0.08	1.23^{a} ±0.15	1.25^{a} ±0.12
เกลือ (%NaCl)	6	2.34^{b} ±0.08	2.36^{b} ±0.01	2.36^{b} ±0.05	2.45^{b} ±0.06	2.46^{b} ±0.06	2.56^{a} ±0.07	2.61^{a} ±0.13
	7	2.27^{b} ±0.10	2.37^{b} ±0.07	2.36^{b} ±0.03	2.55^{a} ±0.13	2.34^{b} ±0.13	2.40^{b} ±0.04	2.33^{b} ±0.03
วอเตอร์แอคติวิตี (a_w)	6	0.935^{d} ±0.021	0.945^{c} ±0.005	0.947^{c} ±0.001	0.952^{b} ±0.003	0.959^{a} ±0.011	0.965^{a} ±0.009	0.963^{a} ±0.005
	7	0.932^{d} ±0.002	0.945^{c} ±0.003	0.940^{c} ±0.005	0.960^{b} ±0.014	0.954^{b} ±0.003	0.968^{a} ±0.001	0.969^{a} ±0.025
ไนไตร์ต (ppm)	6	< 125	-	-	-	-	-	< 3
	7	< 125	-	-	-	-	-	< 3

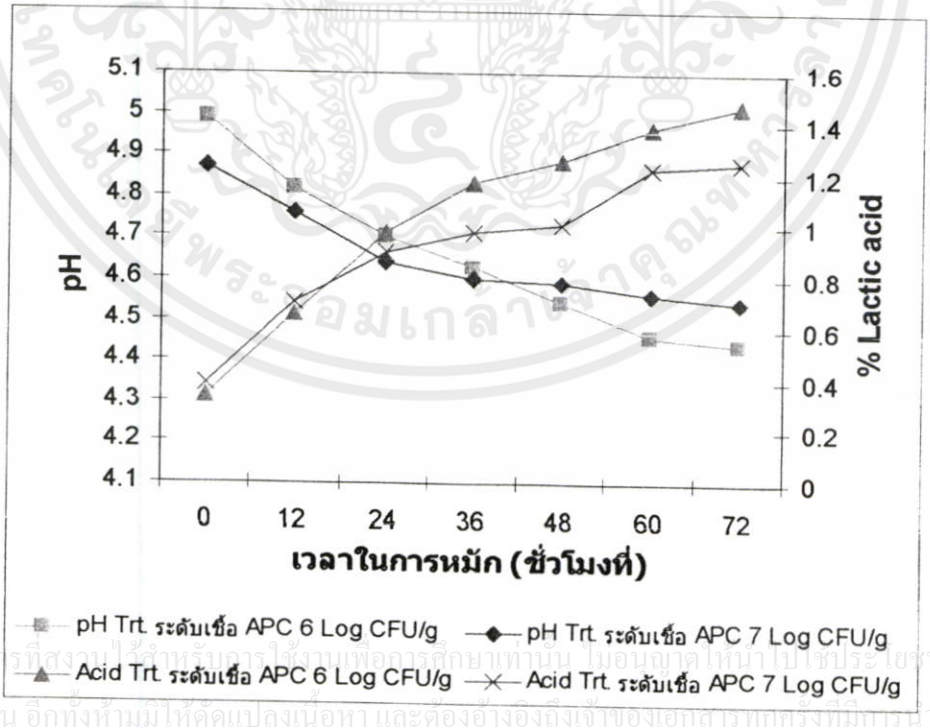
หมายเหตุ 1. Trt. 6 ตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 6 Log CFU/g

2. Trt. 7 ตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 7 Log CFU/g

*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย LSD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านความสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์และค่าทางเคมี จากผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าหลังทำการหมัก 72 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของทั้งสองตัวอย่างทดลองมีปริมาณเชื้อ LAB เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณเชื้อ APC ลดลง ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นและค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาตั้งแต่ Varnam และ Sutherland (1995) กล่าวว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเชื้อ LAB มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการผลิตกรดแลคติกและการลดลงของค่า pH สอดคล้องกับ Wood และ Holzapfel (1996) กล่าวถึงคุณสมบัติของเชื้อ LAB ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ (Non Motile) ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (Catalase Negative) ไม่สร้างสปอร์ (Non Spore Forming) ลักษณะสัณฐานพบว่ามีทั้งรูปร่างแท่งและกลม ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก เชื้อ LAB มีบทบาททำให้ pH ของอาหารลดต่ำลงอย่างรวดเร็วจนถึงจุดที่ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ โดยเชื้อ *Leuconostoc* sp. และเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่สร้างกรดแลคติกจะทำให้ pH ต่ำสุดที่ 4-4.5 ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* sp. และเชื้อ *Pediococcus* sp. บางสายพันธุ์จะทำให้ pH ต่ำประมาณ 3.5 ก่อนจะมีการยับยั้งการเติบโตของตัวเอง เชื้อ LAB ที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนมที่พบคือเชื้อ *Lactobacillus* sp. และเชื้อ *Pediococcus* sp. ทั้งสองสายพันธุ์ใช้เป็นกล้าเชื้อในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักในต่างประเทศด้วย (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2548)



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ของค่า pH และ เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ในระหว่างการหมักแหนมที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hampikyan และ Ugur (2000) กล่าวว่าความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ Fermented Sausage ประกอบด้วยหลายปัจจัยร่วมกัน คือ ค่าเปอร์เซ็นต์เกลือ สารเมตาโบไลท์ที่ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน (Antimicrobial Metabolites) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าวอเตอร์แอคติวิตี (a_w) ที่ต่ำ ซึ่งมีการพัฒนาขึ้นร่วมกันระหว่างกระบวนการหมัก สอดคล้องตามแนวคิดเฮอร์เดิลของ Leistner (2000) ที่กล่าวถึงปัจจัยที่ช่วยในการถนอมอาหารหรือยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เพื่อให้มีความปลอดภัยเกิดจากการใช้ปัจจัยหลายปัจจัยที่ให้ผลเรียงตามลำดับ (Sequencial Action) ดังแสดงในภาพภาคผนวก ค. ตัวอย่างหมายเลข 8 แสดงปัจจัยที่ให้ผลเรียงตามลำดับในไส้กรอกหมักประกอบด้วย การใช้สารกันเสีย การลดค่ารีดอกซ์โพเทนเชียลโดยการกำจัดออกซิเจน การใช้จุลินทรีย์คู่แข่ง การเพิ่มความเป็นกรด การลดค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ ปัจจัยดังกล่าวมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์สร้างกลไกเพื่อให้สามารถรอดชีวิตได้ เรียกกลไกเหล่านี้ว่า โฮมีโอสเตซิส (Homeostasis) เป็นกลไกที่ทำให้กิจกรรมและพารามิเตอร์ (Parameters) ทางสรีรวิทยาที่สำคัญของจุลินทรีย์ยังคงดำเนินต่อไปตามปกติ การที่ความเข้มของเฮอร์เดิลแต่ละชนิดเพิ่มขึ้นจะยิ่งทำให้จุลินทรีย์ใช้พลังงานมากขึ้นในการรักษาโฮมีโอสเตซิสภายในเซลล์ไว้ภายใต้สภาวะที่มีความเครียดเกิดขึ้นจนทำให้เกิดการอ่อนแรง (Metabolic Exhaustion)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) ศักยภาพในการนำค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนมเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร

โดยคุณสมบัติของเชื้อ APC และเชื้อ LAB สามารถใช้เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารเป็นแนวทางในการตรวจติดตามคุณภาพทางจุลินทรีย์ของวัตถุดิบเริ่มต้น และความมีประสิทธิภาพในการจัดการด้านสุขลักษณะการผลิต Smoot และ Pierson (1997) กล่าวถึงเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Aerobic Plate Count (APC) หรือ Standard Plate Count (SPC) ว่าเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ใช้ในการตรวจติดตามความสอดคล้องกับเกณฑ์กำหนด ใช้ในการตรวจติดตามความมีประสิทธิภาพในการจัดการด้านสุขลักษณะที่ดีในการผลิต

ด้านข้อจำกัดของเชื้อ APC ในการใช้เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร จะเห็นได้จากงานวิจัยต่างๆ ที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าว เช่น Angelidis และคณะ (2006) กล่าวว่าผลจากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ APC ไม่สามารถระบุชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษในอาหารได้โดยเฉพาะเมื่อใช้เป็นเกณฑ์กำหนดในอาหารหมัก ซึ่งปริมาณจุลินทรีย์ส่วนใหญ่คือ Lactic Acid Bacteria (LAB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดที่เป็นประโยชน์ในอาหารหมัก Davies และ Boari (1998) กล่าวว่าการวิเคราะห์เพียงเชื้อ APC อย่างเดียวอาจยังไม่เพียงพอในการชี้บ่งถึงปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค Smoot และ Pierson (1997) กล่าวว่าการวิเคราะห์เชื้อ APC มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตในอาหาร ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดในการแปลผลปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบในอาหารที่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อ การแช่แข็ง การหมักและการทำให้แห้ง ซึ่งกระบวนการดังกล่าวมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ APC ที่ปนเปื้อนจากวัตถุดิบตั้งต้นและระหว่างกระบวนการผลิตทำให้ปริมาณเชื้อลดลง

อย่างไรก็ตาม เชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC มักใช้เป็นดรรชนีจุลินทรีย์เพื่อสะท้อนให้เห็นถึงปริมาณเชื้อตั้งต้นในวัตถุดิบและความมีประสิทธิภาพในการควบคุมกระบวนการผลิต และเมื่อพบว่ามีปริมาณสูงจะต้องทำการตรวจสอบในแต่ละจุดควบคุมในกระบวนการผลิต ซึ่งจะต้องมีข้อมูลของปริมาณเชื้อ APC ปกติที่เคยพบในแต่ละจุดควบคุม ก่อนทำการพิจารณาปริมาณที่เกินเกณฑ์กำหนดและความจำเป็นในการสืบหาสาเหตุที่เกิน (Tortorello, 2002)

ในการทดลองครั้งนี้ผู้ทดลองพิจารณาเชื้อ APC เป็นดรรชนีจุลินทรีย์เพื่อสะท้อนให้เห็นผลของปริมาณเชื้อตั้งต้นในวัตถุดิบที่แตกต่างกัน (ตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g) ต่อประสิทธิภาพของกระบวนการหมักโดยพิจารณาจากคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และทางเคมีระหว่างกระบวนการหมักแหนม ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกัน 2 ระดับ รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC และเชื้อ LAB ในรูปค่าความต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์แหนมของทั้งสองตัวอย่างทดลองหลังผ่านการหมัก 72 ชั่วโมง เพื่อศึกษาศักยภาพในการเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารของผลิตภัณฑ์แหนม

เอกสารนี้เป็น ... ไม่ว่ากรณี ...

ส่วนปริมาณเชื้อ LAB และสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิที่เกิดขึ้นสามารถชี้บ่งถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหมักได้ ดังที่ Olympia และคณะ (1992) และ Ostergaard และคณะ (1998) กล่าวว่าโดยทั่วไปมักใช้การวัดค่า pH เป็นตัวชี้วัดอย่างง่ายในด้านรสชาติของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก การวัดปริมาณกรดแลคติกเพื่อชี้วัดประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติกในกระบวนการหมัก และการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ LAB เพื่อเป็นการยืนยันว่ามีปริมาณที่เพียงพอในการผลิตกรดแลคติกเพื่อลดค่า pH ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งโดยทั่วไปควรอยู่ที่ระดับ 8 Log CFU/g

ผู้ทดลองได้ทำการศึกษาศักยภาพในการนำปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนมเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร โดยพิจารณาจากค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดในผลิตภัณฑ์แหนมหลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC และเชื้อ LAB ของผลิตภัณฑ์แหนม ดังแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่าในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g มีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่าเชื้อ APC โดยค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองเท่ากับ 2.86 Log CFU/g และ 2.37 Log CFU/g ตามลำดับ เช่นเดียวกับตัวอย่างแหนมที่จำหน่ายในท้องตลาด พบว่าในตัวอย่างแหนมยี่ห้อที่ 1 ถึง 5 มีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่า APC ค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองเท่ากับ 2.68 2.72 2.59 2.77 2.63 Log CFU/g ตามลำดับ สอดคล้องกับค่า pH ของผลิตภัณฑ์สุดท้ายของทุกตัวอย่างมีค่า pH ต่ำกว่า 4.6 แสดงว่าผลิตภัณฑ์ผ่านกระบวนการหมักที่สมบูรณ์และพร้อมบริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 ค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในรูป Log CFU/g ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log เปรียบเทียบกับตัวอย่างแหนมที่จำหน่ายในท้องตลาด

ตัวอย่างแหนม	ปริมาณเชื้อ APC (Log CFU/g)	ปริมาณเชื้อ LAB (Log CFU/g)	ค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB (Log CFU/g)
1. Trt.ระดับเชื้อ APC 6 Log CFU/g	6.14	9.00	2.86
2. Trt.ระดับเชื้อ APC 7 Log CFU/g หลังหมัก 72 ชั่วโมง	6.40	8.77	2.37
3. แหนมยี่ห้อที่ 1	7.15	9.83	2.68
4. แหนมยี่ห้อที่ 2	6.28	9.00	2.72
5. แหนมยี่ห้อที่ 3	7.38	9.97	2.59
6. แหนมยี่ห้อที่ 4	7.26	10.03	2.77
7. แหนมยี่ห้อที่ 5	6.41	9.04	2.63

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การพิจารณาความสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองในรูปค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนม สามารถใช้เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารได้ในระดับหนึ่ง ทั้งนี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมที่ผ่านกระบวนการหมักสมบูรณ์ ควรมีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่าเชื้อ APC และค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองควรอยู่ที่ระดับ 2-3 Log CFU/g อาศัยข้อมูลสนับสนุนจากผลการทดลอง โดยเมื่อพิจารณาผลวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์ ความสัมพันธ์ในรูปค่าความต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC และเชื้อ LAB และผลวิเคราะห์ทางด้านเคมีของผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลองหลังจากทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายของทั้งสองตัวอย่างทดลองมีปริมาณเชื้อ LAB และปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณเชื้อ APC และค่า pH ลดลง อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่า APC ในทุกตัวอย่างทดลอง ค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และ LAB อยู่ที่ระดับ 2-3 Log CFU / g สอดคล้องกับคุณภาพทางเคมีกายภาพ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลองมีค่าไม่เกิน 4.6 ผ่านเกณฑ์คุณภาพอาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544) ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของทั้งสองตัวอย่างทดลองผ่านกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักที่สมบูรณ์และพร้อมบริโภค ด้านคุณภาพทางจุลินทรีย์พิจารณาจากปริมาณเชื้อ LAB ของผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลองอยู่ที่ระดับ 8 Log CFU/g ซึ่งมีปริมาณที่เพียงพอในการผลิตกรดแลคติกเพื่อลดค่า pH ของผลิตภัณฑ์ (Olympia และคณะ (1992) และ Ostergaard และคณะ (1998)) ปริมาณเชื้อ LAB ที่มากกว่าปริมาณเชื้อ APC แสดงถึงความเสี่ยงต่ำจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม APC หรือที่เรียกว่ากลุ่ม Non-LAB ซึ่งเกิดจากการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบเริ่มต้นและจากกระบวนการผลิต สอดคล้องกับผลการศึกษา Angelidis และคณะ (2006) พบว่าในทางทฤษฎีผลต่างของเชื้อ APC และเชื้อ LAB คือปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Non Lactic Acid Bacterial (Non-LAB) เป็นกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Coliforms, *Pseudomonas*, *Staph. aureus* และ yeasts (Birollo และคณะ, 2001) เกิดจากการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต Angelidis และคณะ (2006) ยังกล่าวอีกว่าชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ควรมีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปพร้อมบริโภคประเภทอาหารหมักควรมีชนิดเดียวคือเชื้อ LAB ดังนั้นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิด Non-LAB ในอาหารดังกล่าวโดยไม่ได้ตั้งใจคาดได้ว่าเกิดจากการปนเปื้อน (Contaminating Microflora) ในการทดลองนี้เลี่ยงการวิเคราะห์เชื้อ APC หรือที่เรียกว่ากลุ่ม Non-LAB โดยตรง เนื่องจากข้อจำกัดด้านอุปกรณ์ตู้อบเพาะเชื้อ 20 องศาเซลเซียส ทั้งนี้การพัฒนาเชื้อ Non-LAB เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ให้ง่าย สะดวกและรวดเร็ว ซึ่งเป็นคุณสมบัติข้อหนึ่งของดรรชนีจุลินทรีย์ และเมื่อพิจารณาด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แหนมจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค พบว่าหลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลอง ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Pseudomonas cepacia* ซึ่งเป็นเชื้อที่เติมลงในตัวอย่างเนื้อที่คลุกเคล้าก่อนบรรจุ เพื่อให้มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g พบว่าหลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อ *P. cepacia* ในผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลอง เช่นกัน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์แหนมในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log หลังจากทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส พบว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายของทั้งสองตัวอย่างทดลองมีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่า APC ในทุกตัวอย่าง ค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนมสามารถใช้เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารได้ในระดับหนึ่ง ทั้งนี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมที่ผ่านกระบวนการหมักที่สมบูรณ์มีความปลอดภัยและพร้อมบริโภค มีคุณภาพผ่านเกณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544) ควรมีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่าเชื้อ APC โดยค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และ LAB ควรอยู่ที่ระดับ 2-3 Log CFU/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น นอกจากนี้ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของตัวอย่างทดลองทั้งสองพบว่า ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 6 Log CFU/g มีเชื้อ LAB สูงกว่าเชื้อ APC ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีคุณลักษณะที่แสดงให้เห็นถึงสภาวะการหมักที่สมบูรณ์กว่าภายในระยะเวลาที่เท่ากันคือ มีปริมาณเชื้อ APC ต่ำกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อ LAB สูงกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH ต่ำกว่า 2.2 เปอร์เซ็นต์ และกรดแลคติกสูงกว่า 17.6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปริมาณเชื้อ LAB ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 7 Log CFU/g เริ่มมีค่าสูงกว่า APC ในชั่วโมงที่ 48 และมีคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ทางด้านจุลินทรีย์และทางเคมีที่ด้อยกว่า แสดงให้เห็นว่า คุณภาพด้านจุลินทรีย์ของวัตถุดิบตั้งต้นมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมโดยเฉพาะในวัตถุดิบเนื้อหมูซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักมักมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดทั้งกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคและกลุ่มที่ทำให้เสื่อมเสีย การควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นโดยการคัดเลือกวัตถุดิบที่มีคุณภาพด้านจุลินทรีย์จะช่วยลดภาวะการแข่งขันของเชื้อคู่แข่งได้ (Varnam และ Sutherland, 1995) ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก เนื่องจากการมีปริมาณเชื้อตั้งต้นสูงอาจทำให้เวลาการหมักปกติไม่เพียงพอ ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถเจริญก่อนแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจะทำให้เกิดสภาวะการหมักสมบูรณ์ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมีความเสี่ยงสูงในการบริโภคโดยไม่ปรุงสุก (Keith, 1992) และมีผลต่อความสม่ำเสมอของคุณภาพผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย (Varnam และ Sutherland, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาระดับของปริมาณเชื้อ APC ในตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตแหนม การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดลอง การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บ การศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และทางด้านเคมีในระหว่างกระบวนการหมักแหนมเป็นเวลา 0 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ Aerobic Plate Count (APC) ของวัตถุดิบตั้งต้นแตกต่างกันที่ระดับ 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g และการศึกษาศักยภาพในการนำผลต่างของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ชนิด APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนมเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาล สามารถสรุปได้ดังนี้

1) ผลการศึกษาระดับของปริมาณเชื้อ APC ในตัวอย่างวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตแหนม เพื่อหาปริมาณเชื้อ APC ที่เหมาะสม ใช้ศึกษาทดลองในขั้นตอนต่อไป พบว่าปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบระดับต่ำสุดคือ 1.65 Log CFU/g ระดับสูงสุดคือ 7.83 Log CFU/g ดังนั้นจึงสรุปว่าปริมาณเชื้อ APC ที่เหมาะสมเพื่อใช้ศึกษาทดลองในขั้นตอนต่อไปคือ 6 Log CFU/g ซึ่งเป็นระดับทั่วไปที่พบการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเนื้อสัตว์และ 7 Log CFU/g เป็นระดับรุนแรงมากกว่าสถานการณ์จริง

2) ผลการศึกษาสายพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาทดลอง จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในส่วนคลุกผสมรวมในขั้นตอนก่อนกระบวนการหมักแหนม และส่งไปตรวจวินิจฉัยหาชนิดของเชื้อและสายพันธุ์ที่หน่วยงานศูนย์รวมบริการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ผลการตรวจวินิจฉัยพบเชื้อ *Pseudomonas cepacia (P. cepacia)*

3) ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อ *P. cepacia* เพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บหลังผ่านสภาวะจำลองของการหมัก พบว่าปริมาณเชื้อ *P. cepacia* ที่ความเข้มข้น 6 Log CFU/g และ 7 Log CFU/g หลังผ่านสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 1 2 และ 3 วัน เวลาที่เหมาะสมในการบ่มเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บคือ 2 2 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ ณ อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 35±2 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth และ Pyruvic Acid 1%

4) ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในระหว่างกระบวนการหมักแหนม โดยการติดตามการเจริญของเชื้อ APC และ LAB ในระหว่างกระบวนการหมักและผลการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค พบว่าปริมาณเชื้อ APC ตั้งต้นในตัวอย่างทดลองที่มีการเติมเชื้อทั้งสองระดับเท่ากับ 6.22 Log CFU/g และ 7.10 Log CFU/g ปริมาณเชื้อ LAB ตั้งต้นเท่ากับ 5.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Log CFU/g และ 5.33 Log CFU/g คุณภาพทางด้านเคมีตั้งต้นมีค่า pH เท่ากับ 4.99 และ 4.87 เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกเท่ากับ 0.34 และ 0.39 เปอร์เซ็นต์เกลือเท่ากับ 2.34 และ 2.27 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้เท่ากับ 0.935 และ 0.932 ตามลำดับ ปริมาณไนไตร์ตไม่เกิน 125 ppm

หลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อ APC เท่ากับ 6.14 Log CFU/g และ 6.40 Log CFU/g ลดลงคิดเป็น 1.3 และ 9.9 % ปริมาณเชื้อ LAB เท่ากับ 9.00 Log CFU/g และ 8.77 Log CFU/g เพิ่มขึ้นคิดเป็น 73 และ 64 % ค่า pH ลดลงเท่ากับ 4.44 และ 4.54 ลดลงคิดเป็น 11 และ 6.8 % ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.47 และ 1.25 ซึ่งเพิ่มขึ้น 4 และ 3 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณตั้งต้น ค่าเปอร์เซ็นต์เกลือเท่ากับ 2.61 และ 2.33 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้เท่ากับ 0.963 และ 0.969 ตามลำดับ ปริมาณไนไตร์ตคงเหลือในผลิตภัณฑ์สุดท้ายน้อยกว่า 3 ppm และไม่พบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลอง

ผลการศึกษาศักยภาพในการนำค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนมเป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหาร พบว่าหลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง ปริมาณเชื้อ LAB ในตัวอย่างทดลองทั้งสองมีค่ามากกว่าปริมาณเชื้อ APC โดยค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองเท่ากับ 2.86 Log CFU/g และ 2.37 Log CFU/g ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์แหนมที่จำหน่ายในท้องตลาด พบว่า ในตัวอย่างแหนมยี่ห้อที่ 1 ถึง 5 มีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่าปริมาณเชื้อ APC โดยค่าความต่างของปริมาณเชื้อทั้งสองเท่ากับ 2.68 2.72 2.59 2.77 และ 2.63 Log CFU/g ตามลำดับ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การพิจารณาความสัมพันธ์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองในรูปค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ในกระบวนการผลิตแหนม สามารถใช้เป็นดรรชนีชี้วัดการสุขาภิบาลอาหารได้ในระดับหนึ่ง ทั้งนี้คุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนมที่ผ่านกระบวนการหมักที่สมบูรณ์มีความปลอดภัยและพร้อมบริโภค มีคุณภาพผ่านเกณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544) ควรมีปริมาณเชื้อ LAB มากกว่าเชื้อ APC โดยค่าความต่างของปริมาณเชื้อ APC และ LAB ควรอยู่ที่ระดับ 2-3 Log CFU/g อาศัยข้อมูลสนับสนุนจากผลการทดลอง ดังนี้ ด้านคุณภาพทางเคมีกายภาพ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลองมีค่าไม่เกิน 4.6 ผ่านเกณฑ์คุณภาพอาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2544) ด้านคุณภาพทางจุลินทรีย์พิจารณาจากปริมาณเชื้อ LAB ของผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลองอยู่ที่ระดับ 8-9 Log CFU/g ซึ่งมีปริมาณที่เพียงพอในการผลิตกรดแลคติกเพื่อลดค่า pH ของผลิตภัณฑ์ ปริมาณเชื้อ LAB ที่มากกว่าปริมาณเชื้อ APC แสดงถึงความเสี่ยงต่ำจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม APC หรือที่เรียกว่ากลุ่ม Non-LAB (Angelidis และคณะ, 2006) และเมื่อพิจารณาด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์แหนมจากกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค พบว่าหลังจากทำการหมัก 72 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อที่

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง ... เพื่อการค้า

ก่อให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลอง และไม่พบเชื้อ *Pseudomonas cepacia* ในผลิตภัณฑ์แหนมทั้งสองตัวอย่างทดลอง เช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบผลวิเคราะห์ของตัวอย่างทดลองทั้งสองพบว่า ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของตัวอย่างทดลองที่มีปริมาณเชื้อ APC ของวัตถุดิบตั้งต้นที่ระดับ 6 Log CFU/g มีคุณลักษณะที่แสดงให้เห็นถึงสภาวะการหมักที่สมบูรณ์กว่าภายในระยะเวลาที่เท่ากัน แสดงให้เห็นว่า คุณภาพด้านจุลินทรีย์ของวัตถุดิบตั้งต้นมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์แหนม ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งในการหาแนวทางควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นในวัตถุดิบ จากผลการทดลอง เสนอแนะให้ควบคุมที่ระดับไม่เกิน 6 Log CFU/g เนื่องจากมีความเหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์แหนม มีความเสี่ยงต่ำในด้านความไม่สมบูรณ์ของกระบวนการหมักและลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม Non-LAB และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมปศุสัตว์. 2544. มาตรฐานผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์. กรมปศุสัตว์. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. 13 หน้า.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2544. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะและผู้สัมผัสอาหาร. ในเอกสารคู่มือความรู้เกี่ยวกับสารเคมี/ จุลินทรีย์ในอาหาร กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ. 12 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. ม. ป. ป. 'แหนม.' ห้องสมุดความรู้การเกษตร เรื่อง การแปรรูปผลผลิต การถนอมอาหาร. [http://www.doae.go.th/library/html/detail/safefood/169.htm.] Accessed date 05/03/07.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2540. การจัดการโรงฆ่าสัตว์. ในเอกสารการสอนวิชา สาขาสัตวศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2547. "แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารคอง." *วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม.* 3 : 62-69.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. *เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.* กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 135 หน้า.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2548ก. Hurdle Technology. ในเอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2548ข. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Mean Comparison). ในเอกสารประกอบการสอนวิชาการวางแผนการทดลอง หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. *จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร.* กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 258 หน้า.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2542. *การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร.* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. 363 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุขใจ โสมะฐิติ. 2525. " การสำรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในผลิตภัณฑ์แหนม. " วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2543. *เทคโนโลยีเนื้อสัตว์.* เชียงใหม่ : โรงพิมพ์ธนบรรณการพิมพ์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 244 หน้า.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. *จุลชีววิทยาทางอาหาร.* กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 454 หน้า.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545. *ความปลอดภัยของอาหาร (การใช้ระบบ HACCP).* พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). 398 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2543. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข : เรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิตและการเก็บรักษาอาหาร.ฉบับ 193. พ.ศ. 2543. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ 7 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2544. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข : เรื่อง ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์. ฉบับ 243 พ.ศ. 2544. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ 2 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2545. การประยุกต์ใช้หลักเกณฑ์ GMP กฎหมายในการผลิตผลิตภัณฑ์จากสัตว์. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ. 41 หน้า.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2546. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน : แหนม มผช.145-2546. กระทรวงอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ. 5 หน้า.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2548. ภาพรวมงานวิจัยและพัฒนาในอุตสาหกรรมการผลิตแหนม. ในเอกสารการสอนวิชา ความปลอดภัยของอาหาร หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

อารีย์ วิบูลย์พงศ์ ทรงศักดิ์ ศรีบุญจิตต์ ประทานทิพย์ กระมล นัทธมน ธีระกุล และ พีรพงษ์ ปราบริปู. 2547. "พฤติกรรมการซื้อและความพอใจของผู้บริโภคแหนม." หน้า 1-5. ใน *การประชุมเชิงปฏิบัติการ ถ่ายทอดความรู้ด้านการตลาดและการผลิตแหนมสู่ผู้ประกอบการ.* เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์. 2549. "ผลการแช่เยือกแข็งและเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็งต่อการลดจำนวนของเชื้อ โคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกสดแช่เยือกแข็งพร้อมบริโภค."

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

American Public Health Association. 1985. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* 16th ed. Washington, D.C. : APHA.

Anderson, R.L., Vess, R.W., Carr, J.H., Bond, W.W., Panlilio, A.L. and Favero, M.S. 1991. "Investigations of intrinsic *Pseudomonas cepacia* contamination in commercially manufactured povidone-iodine." *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 12 : 297-302.

Angelidis, A.S., Chronis, E.N., Papageorgiou, D.K., Kazakis, I.I., Arsenoglou, K.C. and Stathopoulos, G.A. 2006. "Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods : A potential food-quality index." *J. Food Microbiol.* 23 : 95-100.

AOAC. 2000. ***Staphylococcus aureus*** in Fooods : Surface Plating Method for Isolation and Enumeration. 16th ed., Official Method of Analysis of Official Analytical Chemists (AOAC) Inc. Arlington, USA.

Banwart, G.J. 1979. *Basic Food Microbiology.* Westport, C.N. : AVI Publishing company. 215-388 pp.

Birollo, G.A., Reinheimer, J.A. and Vinderola, C.G. 2001. "Enterococci vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt." *J. Food Microbiol.* 18 : 597-604.

Buttiaux, R. 1959. "The value of the association Escherichiae-Groud D streptococci in the diagnosis of contamination in foods." *J. Appl. Bacteriol.* 22 : 153-158.

Buttiaux, R. and Mossel, D.A.A. 1961. "The significance of various organism of faecal origin in food and drinking water" *J. Appl. Bacteriol.* 24 : 353-364.

Buy, E.M., Nortje, G.L., Jooste, P.J. and Von Holy, A. 2000. "Bacterial populations associated with bulk packaged beef supplemented with dietary vitamin E." *Int. J. Food Microbiol.* 56 : 239-244.

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น... ให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Codex Alimentarius. 1993. **Recommended International Code of Hygienic Practice for Fresh Meat.** International Standard CAC/RCP 11-1976. 33 pp.

Comi, G. Urso, R. Iacumin, L. Rantsiou, K. Cattaneo, P. Cantoni, C. and Cocolin, L. 2005. " Characterisation of naturally fermented sausage produced in the North East of Italy." *J. Meat Science*. 69 : 381-392.

Conner, D. E. and Hall, G. S. 1997. "Efficacy of selected media for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 from frozen chicken meat containing sodium chloride, sodium lactate or polyphosphate." *J. Food Microbiol.* 14 : 617-626.

Cornell University. 2006. **Fermented Sausage Fact for the Small Scale Food Entrepreneur.** New York : The Northeast Center for Food Entrepreneurship.

Davies, A. and Boari, R. 1998. *The Microbiology of Meat and Poultry.* London : Blackie Acadamic & Professional. 327 pp.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nestr, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. and Phillips, G.B. 1981. **Manual of Methods for General Bacteriology.** UMI, Ann Arbor MI.

Gill, C.O. and Jones, T. 1999. " The microbiological effects of breaking operations on hanging beef carcass sides." *Food Research International.* 32 : 453-459.

Hales, B. A., Morgan, J. W., Hart, C. A. and Winstanley, C. 1998. "Variation in flagellin genes and proteins of *Burkholderia cepacia.* " *J. Bacteriol.* 180 : 1110-1118.

Hampikyan, H. and Ugur, M. 2000. "The effect of nisin on *L. monocytogenes* in Turkish fermented sausages (sucuks)." *J Meat Science*. 4 : 247-255.

ISO. 1991. Microbiology, General guidance for the enumeration of coliforms, Most probable number technique. *International Standard* 4831.

ISO. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal Method for the *Salmonella* spp. *International Standard* 6579.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Keith, H. S. 1992. ' Lactic Acid Fermentation ' Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods, Office of International Affairs National Research Council. [http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309046858] Accessed date 20/10/08.

Khieokhachee, T., Praphailong, W., Chowvalitnitithum, C., Kunawasenl, S., Kumphati, S., Chavasithl, V., Bhumiratana, S. and Valyasevi, R. 1996. *Microbial interaction in the fermentation of Thai pork sausage.* Bangkok, Thailand: National center for Genetic Engineering and Biotechnology, Mahidol University.

Lawrie, R.A. 1998. *Lawrie's meat science* (6^{th} ed). Cambridge : Woodhead Publishing Limited.

Leistner, L. 2000. "Basic aspects of foof preservation by hurdle technology." *Int. J. Food Microbiol.* 55 : 181-186.

Maturin, L.J. and Peeler, J.T. 2001. 'Bacteriological Analytical Manual Chapter 3, Aerobic Plate Count' Food and Drud Administration. [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-3.html] Accessed date 20/11/07.

Nel, S., Lues, J.F.R., Buys, E.M. and Venter, P. 2004. "Bacteria populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir." *J. Meat Science*. 66 : 667-674.

Olympia, O., Ono, H., Shinmyo, A. and Takano, M. 1992. "Lactic acid bateria in fermented fishery product." *J. Ferment. Bioeng.* 73 : 193-192.

Ostergaard, A., Ben Embarek, P.K., Yamprayoon, J., Wedell-Neergaard, C., Huss, H.H. and Gram, L. 1998. "Fermentation and spoilage of som-fak, a thai low-salt fish product." *Trop. Sci.* 38 : 105-112.

Pearson, A.M. and Dutson, T.R. 1986. *Advances in Meat Research, Vol. II.: Meat and Poultry Microbiology*. Conecticut : Avi Publishing Company. 436 pp.

Phithakpol, B., Varanyanond, W., Reunmaneepaitoon, S. and Wood, H. 1995. *The traditional fermented foods of Thailand.* Bongkok, Thailand: Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University.

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์

Quinn, J.P. 1998. "Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting Gram negative pathogens." *Infect. Dis.* 27 (Suppl. 1) : S117-S124.

Restaino, L., Frampton, E.W. and Spitz, H. 2001. "Repair and growth of heat-and freeze-injured *E. coli* O157:H7 in selective enrichment broths." *J. Food Microbiol.* 18 : 617-629.

Rhodehamel, E.J. and Harmon, S.M. 2001a. 'Bacteriological Analytical Manual Chapter 14, *Bacillus cereus* ' Food and Drud Administration. [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html] Accessed date 20/11/07.

Rhodehamel, E.J. and Harmon, S.M. 2001b. 'Bacteriological Analytical Manual Chapter 16, *Clostridium perfringens*' Food and Drud Administration. [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html] Accessed date 20/11/07.

Robert, E. W., Hancock, R.E. and David, P. S. 1998. "Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and impact on treatment." *Drug Resistance Updates*. 4 : 247-255.

Rogosa, D.M. and Sharpa, M. E. 2000. *Microbiology Manual : MRS Agar, Lactobacillus Agar*. Merck, Germany.

Silvia, A. N. and Karl, K.S. 2004. "Organic acid inhibit modles for *Listeria innocua, Listeria ivanovii, Pseudomonas aeruginosa* and *Oenococcus oeni*." *J. Food Microbiol.* 21 : 67-72.

Surkiewicz, B.F., Johnston, R.W., Elliott, R.P. and Simmons, E. R. 1972. "Bacteriological survey of fresh pork sausage produced at establishments under federal inspection." *J. Appl. Microbiol.* 23 : 515-520.

Schaffner, D.W. and Schaffner, S. 2004. 'Indicator Organisms.' Rutgers University Food Risk Analysis Institute. [http://foodsci.rutgers.edu/schaffner/pdf%20files/ Schaffner%20and% 20Smith%2 0EMS%202004.pdf.] Accessed date 10/01/07.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Smoot, M.L. and Pierson, M.D. 1997. 'Indicator Microorganism and Microbiological Criteria.' In Doyle, M.P. Beuchat,L.R. Montville, T.J. (ed). *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.* Washington D.C. ASM Press. 753 pp.

Solomon, H.M. and Lilly, T. 2001. 'Bacteriological Analytical Manual Chapter 17, Clostridium botulinum ' Food and Drud Administration. [http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html] Accessed date 20/11/07.

Surkiewicz, B.F., Johnston, R.W., Elliott, R.P. and Simmons, E. R. 1972. "Bacteriological survey of fresh pork sausage produced at establishments under federal inspection." *J. Appl. Microbiol.* 23 : 515-520.

The Nordic Committee on Food Analysis. 1992. **NMKL Method no 68 : Enterococcus Determination in foods.** 2nd ed., Germany.

Todar, K. 2004. '*Pseudoonas* and Related Bacteria.' Department of Bacteriology at the University of Wisconsin-Madison. [http.www. docs.ksu.edu.sa/PDF/Articles32/Article320023.pdf] Accessed date 25/01/08.

Tortorello, M.L. 2002. 'The Significance of Indicator Organisms.' U.S.Food&Drug Administration. National Center for Food Safety & Technology Summit-Argo, IL. [http.www.flworkshop.com/2002/tortorello.pdf.] Accessed date 10/01/07.

Uyttendaele, M., Vankeirsbilck, S. and Debevere, J. 2001. "Recovery of heat-stressed *E. coli* O157:H7 from ground beef and survival of *E. coli* O157:H7 in refrigerated and frozen ground beef and in fermented sausage kept at 7 °C and 22°C." *J. Food Microbiol 18 : 511-519.*

Varnam, A. H. and Sutherland, J. P. 1995. *Meat and Meat Products.* Great Britain : St.Edmundsbury Press. 430 pp.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S., Yarchai, M. and Tapingkae, W. 2006. "Changes in lipid composition and fatty acid profile of Nham, a Thai fermented pork sausage, during fermentation." *J. Food Chemistry.* 94 : 580-588.

Wikipedia. 2007. ' Burkholderia cepacia complex ' Wikimedia Foundation, Inc., a US-registered 501(C)(3) tax-deductible nonprofit charity. [http://www.wikipedia. Org/wiki/burkholderia_cepacia_complex.] Accessed date 18/06/07.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้นำไปดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Weaver, J. W., Kilpatrick, D. J. and Rowe, M. T. 2002. "Evaluation of recovery protocols for heat-stressed enterovirulent *Escherichia coli* ." *J. Food Microbiol.* 19 : 221-234.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1996. *The genera of Lactic acid bacteria*. 2. London : Blackie Academic and Professional. 398 pp.

Zanetti, F., Luca, D.G., Stampi, S. 2000. "Recovery of *Burkholderia. pseudomallei* and *B. cepacia* from drinking water." *Int. J. Food Microbiol.* 59 : 67-72.

Cunniff, P. 1998. 16th ed., Official Method of Analysis of Official Analytical Chemists (AOAC) Inc. Maryland, USA.

Barry, C. 2000. Fruit and fruit products: acidity (titratable) of fruit products. *Chapter 37*. 17th ed., Official Method of Analysis of Official Analytical Chemists (AOAC) Inc.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การเตรียมสารละลายเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายเชื้อ (Stock Culture Solution)

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Pseudomonas cepacia* (*P. cepacia*) เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากส่วนคลุกผสมรวมก่อนกระบวนการหมัก ส่งไปตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่หน่วยงานศูนย์รวมบริการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เชื้อดังกล่าวเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อโคโลนีเดี่ยวจาก Nutrient Agar (NA) ปริมาณ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA Slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการถ่ายเชื้อเดือนละ 1 ครั้ง

การเตรียมสารละลายเชื้อ ทำโดยการถ่ายเชื้อจาก NA Slant ปริมาณ 1 ลูป ลงในหลอดที่บรรจุ Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาณ 10 มิลลิลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลายที่มีเชื้อเจริญอยู่ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน TSB 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้อ 8 Log CFU/g จากนั้นนำไปเจือจางในสารละลาย Butterfield's Phosphate-Buffered (BPB) จนกระทั่งได้ปริมาณเชื้อ 7 Log CFU/g และ 6 Log CFU/g ในหลอดทดลอง 10 มิลลิลิตร (อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ และการเตรียม

1. Plate Count Agar (PCA) จากบริษัท Merck

ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Plate Count Agar 22.5 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

1.1 ขั้นตอนการเตรียมสำหรับ Pour Plate

1.1.1) ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 22.5 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนละลายโดยใช้แท่งแก้วคน นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย และส่วนผสมเข้ากันดีโดยใช้ Hot Plate Stirrer หรืออ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

1.1.2) เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้ว นำไปวัด pH โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1.1.1) ประมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในภาชนะที่เหมาะสม ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) บดวุ้นให้ละเอียดโดยใช้แท่งแก้วคนสาร ถ้า pH ไม่ได้ตามที่กำหนดให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดจาก ข้อ 1.1.1) มาปรับ pH ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH โดยให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 7.0 ± 0.2

1.1.3) ใช้กระบอกตวงแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1.1.2) ใส่ขวดตามขนาดที่เหมาะสมกับการใช้งาน ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อลักษณะปรากฏของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส และมีสีเหลืองอ่อน pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 7.0 ± 0.2

1.2 ขั้นตอนการเตรียม (สำหรับ Spread Plate หรือ Streak Plate)

1.2.1) นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1.1.2) ไปหลอมในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทำให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงโดยนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-46 องศาเซลเซียส

1.2.2) เทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ Sterile Plate โดยเท Plate ละ 15-20 มิลลิลิตร เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว Dry Plate เป็นเวลา 20 นาทีในตู้ Laminar Air Flow

2. MRS Agar จากบริษัท Merck จำกัด

ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

- MRS Agar 66.2 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1) ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar 66.2 กรัม ลงในภาชนะที่เหมาะสม เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้แท่งแก้วคน หรือนำไปปั่นเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี โดยใช้ Hot Plate Stirrer หรืออ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

2.2) เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้ว นำไปวัด pH โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.1) ประมาณ 30 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะที่เหมาะสม ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) บดวุ้นให้ละเอียดโดยใช้แท่งแก้วคนสาร ถ้า pH ไม่ได้ตามที่กำหนดให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดจากข้อ 2.1) มาปรับ pH ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH โดยให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 5.7 ± 0.2

2.3) ใช้กระบอกตวงแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.1) ใส่ขวดตามปริมาตรการใช้งาน ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อ ลักษณะปรากฏของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส และมีสีเหลืองเข้ม ค่า pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 5.7 ± 0.2

3. Nutrient Agar (NA) จากบริษัท Merck จำกัด

ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Nutrient Agar 20 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3.1 ขั้นตอนการเตรียม Base Medium

3.1.1) ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar 20 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 ผสมให้เข้ากันจนละลายโดยใช้แท่งแก้วคน นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้น ละลายและส่วนผสมเข้ากันดี โดยใช้ Hot Plate Stirrer หรืออ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100องศาเซลเซียส

3.1.2) เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้ว นำไปวัด pH โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.1.1) ประมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในภาชนะที่เหมาะสม ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ถ้า pH ไม่ได้ตามที่กำหนดให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดจาก ข้อ 3.1.1) มาปรับ pH ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH โดยให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 7.0 ± 0.2

3.1.3) ใช้กระบอกตวงแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.1.1) ใส่ขวดตามปริมาตรการใช้งาน ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อลักษณะปรากฏของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส และมีสีเหลืองอ่อน pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 7.0 ± 0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ขั้นตอนการเตรียม Complete Medium

3.2.1) นำอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.1.1) ไปหลอมละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ลดอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45-46 องศาเซลเซียส

3.2.2) ใช้ Sterile Pipette ขนาด 5 หรือ 10 มิลลิลิตร แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่หลอดทดลอง (ปลอดเชื้อ) ขนาด 13 × 100 มิลลิเมตร หลอดละ 3 มิลลิลิตร ปิดฝา หลังนึ่งฆ่าเชื้อให้นำหลอดอาหารมาวางเอียง (Slant) หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ต้องมีส่วน Butt

4. Trypticase Soy broth (TSB) จากบริษัท Merck

ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Tryptone Soya Broth (TSB) 30 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

4.1 ขั้นตอนการเตรียม

4.1.1) ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม ในภาชนะที่เหมาะสม เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนละลายโดยใช้แท่งแก้วคน หรือนำไปปั่นเพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดีโดยใช้ Hot Plate Stirrer

4.1.2) เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้ว นำไปวัด pH โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 4.1.1) ประมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในภาชนะที่เหมาะสม โดยอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ถ้า pH ไม่ได้ตามที่กำหนด ให้นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดจากข้อ 4.1.1) มาปรับ pH ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH โดยให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 7.3 ± 0.2

4.1.3) ใช้ Dispenser แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 4.1.1) ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังนึ่งฆ่าเชื้อลักษณะปรากฏของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส และมีสีเหลืองเข้ม ค่า pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 7.3 ± 0.2

5. Butterfield's Phosphate-Buffered (BPB) จากบริษัท Merck

การเตรียม stock solution มีส่วนประกอบดังนี้

- KH_2PO_4 34 กรัม
- น้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

5.1 ขั้นตอนการเตรียม Stock Solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1.1) ชั่ง KH_2PO_4 34 กรัม ลงในบีกเกอร์ แล้วเติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคน เพื่อให้ส่วนผสมละลายเข้ากัน หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนและใช้ Hot Plate Stirrer เพื่อให้ส่วนผสมเข้ากันดี

5.1.2) เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้ว นำไปวัด pH โดยแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 5.1.1) ประมาณ 30 มิลลิลิตร ใส่ในภาชนะที่เหมาะสม โดยอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ถ้า pH ไม่ได้ตามที่กำหนดให้นำอาหาร เลี้ยงเชื้อทั้งหมดจากข้อ 5.1.1) มาปรับ pH ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH โดยให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 7.2 ± 0.2

5.1.3) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส หลังนึ่งฆ่าเชื้อลักษณะปรากฏของอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส และไม่มีสี ค่า pH ที่ 25 องศาเซลเซียส 7.2 ± 0.2

5.2 การเตรียม Dilution Blanks

5.2.1) ใช้ Pipette ขนาด 2 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย Stock Solution มา 1.25 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ และปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1,000 มิลลิลิตร

5.2.2) ใช้ Dispenser แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 5.2.1) ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร หรือใช้กระบอกตวงแบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่ขวด ขวดละ 90 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

วิธีการทดสอบหาปริมาณเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การทดสอบหาปริมาณเชื้อ Aerbic Plate Count (APC) (Maturin and Peeler, 2001)

1.1 ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม เติม Butterfield's Phosphate-Buffered (BPB) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงในถุงบดตัวอย่าง นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 30 วินาที จะได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-1}

1.2 เปิดถุงตัวอย่างด้วยวิธี Aseptic Technique ทำการเขย่าถุงตัวอย่างเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดี เจือจางตัวอย่างแบบ Ten Fold Dilution โดยใช้ Pipette ปลอดเชื้อ ขนาด 1 หรือ 2 มิลลิลิตร ดูดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด BPB 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex Mixer จะได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-2} ทำการเจือจางตัวอย่างจนได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}

1.3 ใช้ Pipette ปลอดเชื้อขนาด 1 หรือ 2 มิลลิลิตร ดูดสารละลายตัวอย่างจาก Dilution สูงสุดไปต่ำสุด Dilution ละ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ

1.4 เพาะเชื้อโดยใช้เทคนิค Pour Plate โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมละลาย และอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 46±1 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อประมาณ 12-15 มิลลิลิตร ผสมให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากัน โดยการหมุนจานเพาะเชื้อกลับไปมา ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

1.5 เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวให้คว่ำจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง

1.6 เมื่อครบกำหนดเวลาการบ่มให้นำจานเพาะเชื้อออกมานับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การทดสอบหาปริมาณเชื้อ Lactic Acid Bacteria (LAB) (Rogosa and Sharpa, 2000)

2.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติม BPB ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุงบดตัวอย่าง นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเจือจางจนได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-5} 10^{-6}

2.2 ใช้ Pipette ดูดสารละลายตัวอย่าง Dilution ละ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อ เพาะเชื้อโดยใช้เทคนิค Pour Plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar

2.3 แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2.4 เมื่อครบกำหนดเวลาการบ่มให้นำจานเพาะเชื้อออกมานับจำนวนโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. การทดสอบหาปริมาณเชื้อ Coliforms, Fecal Coliform และ *E. coli* โดยวิธี MPN (ISO, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม เติม BPB ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงในถุงบดตัวอย่าง นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเจือจางจนได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3}

3.2 การทดสอบหา Coliforms

3.2.1) ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่าง ใส่ลงใน LSB ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร (ให้สังเกตุด้วยว่าไม่มีฟองอากาศอยู่ในหลอดดักแก๊ส)

3.2.2) นำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม นำออกมาอ่านผลการทดสอบ เลือกเฉพาะหลอดที่อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและมีฟองแก๊สเกิดขึ้นใน Durham's Tube (Positive Reaction(+)) บันทึกจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก

3.2.3) นำหลอดที่ให้ผลเป็น Positive Reaction(+) มาเขย่าเบา ๆ แล้วใช้ Loop ปลอดเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอด LSB ไปยังหลอด BGLB หลอดละ 1 Loopful นำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง

3.2.4) เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม นำออกมาอ่านผลการทดสอบ เลือกเฉพาะหลอดที่อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและมีฟองแก๊สเกิดขึ้นใน Durham's Tube (Positive Reaction(+)) โดยจะดูแต่ละความเข้มข้น และบันทึกผล

3.2.5) แปรผลการทดสอบโดยเปิดเทียบกับตาราง MPN (ตารางภาคผนวกที่ ค.1) รายงานผลการทดสอบเป็นจำนวน Coliforms MPN/g.

3.3 การทดสอบหา Fecal Coliform

3.3.1) นำหลอด LSB ที่ให้ผลเป็น Positive Reaction (+) จากข้อ 3.2.2 มาเขย่าเบา ๆ แล้วใช้ Loop ปลอดเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอด LSB ไปยังหลอด EC Broth ประมาณ 1 Loopful นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45.5 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม 24 $\pm$ 2 ชั่วโมง นำออกมาอ่านผลการทดสอบ โดยเลือกหลอดที่มีแก๊สเกิดขึ้นใน Durham' s Tube และ EC Broth ขุ่น (Positive Reaction(+)) แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ให้นำไปบ่มต่อที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45.5 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 $\pm$ 2 ชั่วโมง

3.3.2) แปรผลการทดสอบโดยเปิดเทียบกับตาราง MPN (ตารางภาคผนวกที่ ค.1) รายงานผลการทดสอบเป็นจำนวน Fecal Coliform MPN/g.

3.4 การทดสอบหา *E. coli*

3.4.1) ใช้ Loop ปลอดเชื้อ ถ่ายเชื้อจากหลอด EC Broth ที่ Positive(+)จากข้อ 3.2.2 Streak ลงบน EMB Plate โดยให้ได้ โคโลนีเดี่ยว ๆ

3.4.2) นำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบ่มนำ EMB Plate มาดูลักษณะโคโลนี โดยเลือกโคโลนีที่แบนและดำ โคโลนีมีหรือไม่มี Metallic Sheen Plate ละ 1 โคโลนี แล้วใช้ Loop ปลอดเชื้อ เขี่ยเชื้อลงบน PCA Slant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3) นำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง

เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม นำเชื้อที่ได้ไปทำการย้อมแกรม เพื่อดูการติดสีและรูปร่างลักษณะ ถ้าติดสีแดง (แกรมลบ) และรูปร่างเป็นท่อนสั้น ๆ (Short Rod) ให้นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

** ในกรณีที่ไม่มีเชื้อเกิดขึ้นให้เลือกโคโลนีใหม่จาก EMB Plate ทุกPlate เลือกมา Plate ละ 1 หรือมากกว่า 1 โคโลนี

3.4.4) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี(Biochemical Testing)

- Indole Production

ใช้ Loop ปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อจาก PCA Slant ลงใน Tryptone Broth แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบ่มนำมาเติม Kovac's Reagent 0.2 – 0.3 มิลลิลิตร

การอ่านผล : เกิดวงแหวนสีแดงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Positive (+)

เกิดวงแหวนสีเหลือง-น้ำตาลบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Negative (-)

- Voges-Proskauer (VP) Reactive Compounds

ใช้ Loop ปลอดเชื้อถ่ายเชื้อจาก PCA Slant ลงใน MR-VP Broth (1 มิลลิลิตร) แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม เติม 5% μ Naphthol 0.6 มิลลิลิตร และ 40%KOH 0.2 มิลลิลิตร เขย่า แล้วเติม Creatine Solution 0.2 มิลลิลิตร โดยหลังการเติม Reagent ให้ทำการเขย่าหลอด และตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำมาอ่านผล

การอ่านผล : สีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูถึงแดง Positive (+)

สีของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง Negative (-)

- Methyl Red Reactive Compounds

ใช้ Loop ปลอดเชื้อ เขี่ยเชื้อจาก PCA Slant ลงใน MR-VP Broth(3 มิลลิลิตร) นำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบ่มนำออกมาหยด Methyl Red Solution 5 หยด

การอ่านผล : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง Positive (+)

อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง Negative (-)

- Simmon's Citrate Reaction

ใช้ Loop ปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อจาก PCA Slant Streak ลงบน Simmon's Citrate Slant ระวังอย่าให้มีอาหารเลี้ยงเชื้อติด Loop ขณะเขี่ยเชื้อจาก PCA Slant Streak ไปบน Simmon's Citrate Slant แล้วนำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การอ่านผล : มีฟองแก๊สเกิดขึ้นในหลอด Durham's tube Positive (+)

ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นในหลอด Durham's tube Negative (-)

กรณีที่พบ *E. coli* ให้รายงานผลการทดสอบเป็นจำนวน MPN/g.

กรณีที่ไม่พบ *E. coli* ให้รายงานผลการทดสอบเป็น Not Detected in 0.3 g.

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 : ค่า MPN ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อใช้ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

หลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g.	หลอดที่ให้ผลบวก			MPN/g.
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	< 3.0	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6.1	2	3	0	29
0	2	0	6.2	2	3	1	36
0	3	0	9.4	3	0	0	23
1	0	0	3.6	3	0	1	38
1	0	1	7.2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7.4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	9.2	3	2	2	210
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1100
2	1	2	27	3	3	3	>1100

ที่มา ISO (1991)

เอกสารนี้เก็บรวบรวมไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การทดสอบหาปริมาณเชื้อ Fecal Streptococci (The Nordic Committee, 1992)

5.1 ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม เติม BPB ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงในถุงบดตัวอย่าง นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 30 วินาที ทำการเจือจางจนได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-1} 10^{-2}

5.2 ใช้ Pipette ปลอดเชื้อ ดูดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Slanetz and Bartley Agar (ที่ผ่านการทำให้แห้ง) จากนั้นใช้ Spreader ที่ปลอดเชื้อเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของ Agar จนแห้ง

5.3 นำไปบ่มที่ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมง

5.4 เมื่อครบเวลาบ่มให้นำจานเพาะเชื้อออกจากตู้บ่ม เลือกนับโคโลนีที่มีสีชมพูถึงสีน้ำตาลแดง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-3 มิลลิเมตร และมีโซนสีค่อนข้างขาว แคบ ๆ ล้อมรอบ โคโลนีซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ Fecal Streptococci จากนั้นนำมาทดสอบยืนยัน

5.5 การทดสอบยืนยันผล

เลือกโคโลนีที่สงสัยมาเขี่ยลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบดังต่อไปนี้

5.5.1) Catalase Test

- นำโคโลนีที่เป็น Pure Culture จาก TSA มาแตะลงบนแผ่น Slide ที่สะอาด หยด H_2O_2 1 หยดลงบนเชื้อ

- การบันทึกผล : มีฟองแก๊สเกิดขึ้น Positive (+)

ไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้น Negative (-)

5.5.2) Bile Aesculin Agar (Slant)

- นำโคโลนีที่เป็น Pure Culture จาก TSA มาเขี่ยบนผิวหน้า Bile Aesculin Agar (Slant)

- นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่ 37±1 องศาเซลเซียส 18 – 24 ชั่วโมง

- การบันทึกผล : Bile Aesculin Agar มีสีดำ Positive (+)

Bile Aesculin Agar ไม่มีการเปลี่ยนแปลง Negative (-)

5.5.3) Growth at 44.5 องศาเซลเซียส

- นำโคโลนีที่เป็น Pure Culture จาก TSA มาลงใน BHI

- นำไปบ่มใน Water Bath ที่ 44.5 ± 0.5 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง

- การบันทึกผล : BHI ขุ่น แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ Positive (+)

BHI ใส แสดงว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ Negative (-)

5.5.4) BHI + 6.5% NaCl

- นำโคโลนีที่เป็น Pure Culture จาก TSA มาลงใน BHI + 6.5% NaCl

- นำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่ 37±1 องศาเซลเซียส 72 ± 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การบันทึกผล : BHI+ 6.5% NaCl ขุ่น แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ Positive (+)

BHI+ 6.5% NaCl ใส แสดงว่าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ Negative (-)

6. การทดสอบหาปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* (AOAC, 2000)

6.1 ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม เติม BPB 225 มิลลิลิตร ลงในถุงบดตัวอย่าง นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 30 วินาที จะได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-1}

6.2 ใช้ Pipette ปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงใน Baird Parker Agar (BP) ที่ทำให้ผิวหน้าแห้งแล้ว จากนั้นใช้ Spreader เกลี่ยให้สารละลายตัวอย่างกระจายจนทั่วจานเพาะเชื้อ

6.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง

6.4 เลือกนับจำนวนโคโลนี สีเทา ดำ และมีโซนทึบแสงอยู่รอบ ๆ โคโลนีจากนั้นนำโคโลนีมาทดสอบต่อเพื่อยืนยัน ดังนี้

Coagulase test

6.4.1) ใช้ Inoculation Needle เขี่ยโคโลนีที่สงสัยใส่ลงใน Brain Heart Infusion Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง

6.4.2) นำ Rabbit Plasma ซึ่งเป็น Freeze Dried ใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่ หลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 13x100 มิลลิเมตร หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร

6.4.3) ดูด Broth จากข้อ 6.4.2) ปริมาตร 0.1 มิลลิเมตร ใส่ใน Rabbit Plasma นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-24 ชั่วโมง เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ให้สังเกตผล ถ้า Rabbit Plasma ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง

6.4.4) อ่านผลการทดสอบ

· Coagulase positive (+) : เกิดการแข็งตัวของ Rabbit Plasma ระดับ +3 ถึง +4

· Coagulase negative (-) : ไม่เกิดการแข็งตัวของ Rabbit Plasma

หมายเหตุ : การแข็งตัวของ Rabbit Plasma

+1 = Rabbit Plasma แข็งตัวไม่หมด ส่วนที่เป็นน้ำเหลว ๆ มีมากกว่าส่วนที่แข็งตัว

+2 = Rabbit Plasma แข็งตัวไม่หมด ส่วนที่เป็นน้ำเหลว ๆ มีเท่ากับส่วนที่แข็งตัว

+3 = Rabbit Plasma แข็งตัวไม่หมด ส่วนที่เป็นน้ำเหลว ๆ มีน้อยกว่าส่วนที่แข็งตัว

+4 = Rabbit Plasma แข็งตัวหมด ไม่มีส่วนที่เป็นน้ำเหลว ๆ เหลืออยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การทดสอบหาปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. (ISO, 2002)

7.1) การเตรียมตัวอย่าง และการ Pre-Enrichment

7.1.1) ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ถุงบดตัวอย่างปลอดเชื้อ เติม Buffered Peptone Water (BPW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำถุงตัวอย่างไปตีด้วยเครื่อง Stomacher 30 วินาที

7.1.2) นำตัวอย่างที่ได้ไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำไปทดสอบต่อตามข้อ 7.2

7.2 การทดสอบวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* spp.

7.2.1) Selective enrichment

7.2.1.1) เปิดถุงตัวอย่าง ด้วยวิธี Aseptic Technique ทำการเขย่าถุงตัวอย่างเพื่อให้ตัวอย่างผสมเข้ากันดี

7.2.1.2) ใช้ Pipette ปลอดเชื้อขนาด 1 มิลลิลิตร ถ่ายตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

- 0.1 มิลลิลิตร ลงใน RVS Broth นำไปบ่มเพาะในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 41.5±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±3 ชั่วโมง

- 1 มิลลิลิตร ลงใน MKTTn Broth นำไปบ่มเพาะในตู้บ่มเพาะเชื้อ อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24± 3 ชั่วโมง

7.2.2) Selective Plating

7.2.2.1) นำ RVS Broth และ MKTTn Broth ที่ครบกำหนดเวลาการบ่ม ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex Mixer

7.2.2.1) ใช้ลูปถ่ายตัวอย่างจาก RVS Broth และ MKTTn Broth 1 loop (10 มิลลิลิตร) Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ BGM นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำออกมาอ่านผลโดยพิจารณาลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อตามนี้

- XLD Agar ลักษณะเฉพาะ (Typical Colony) ของโคโลนีเชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่จะมีโคโลนีสีแดงใสกลางโคโลนี มีสีดำ

- BGM agar โคโลนีของ *Salmonella* spp. จะมีลักษณะสีขาวขุ่น-ชมพู (Pink White Opaque) และ รอบ ๆ โคโลนีจะมีสีแดง (Brilliant Red)

7.2.3) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical Testing)

เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *Salmonella* spp. ที่มีลักษณะตามข้อ 7.2.2 จาก XLD และ BGM โดยหากมีลักษณะโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *Salmonella* spp. มากกว่า 2 โคโลนี ให้สุ่มเลือกโคโลนีที่นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี 3-5 โคโลนี จากแต่ละ Plate มา Streak บน NA Plate นำไปบ่มในตู้อบเพาะเชื้ออุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง เพื่อนำไปทดสอบทางชีวเคมี และ Serology ต่อไป

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณี ...

8. การทดสอบหาปริมาณเชื้อ *B. cereus* (Rhodehamel and Harmon, 2001a)

8.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ถุงบดตัวอย่างปลอดเชื้อ เติม BPB 225 มิลลิลิตร นำถุงตัวอย่างไปตีด้วยเครื่อง Stomacher 30 วินาที จะได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-1}

8.2 ดูดตัวอย่างแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงใน จานเพาะเชื้อ MYP Agar ระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ จานเพาะเชื้อละ 0.1 มิลลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัว L เกลี่ยตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางให้ทั่วจาน

8.3 คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ให้ลักษณะดังนี้ คือ โคโลนีสีชมพู เกิดตะกอนขุ่น (Opaque Zone) รอบ ๆ โคโลนี

8.4 นำลักษณะโคโลนีดังกล่าวไปทำการตรวจยืนยันโดยดูปฏิกิริยา Hemolytic Activity Test เพื่อดูการสลายเม็ดเลือดแดงของแกะบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ (Blood Agar)

8.5 นับจำนวนโคโลนีที่ให้ผลการทดสอบ Hemolytic Positive ไปคำนวนหาปริมาตรของเชื้อ *B. cereus* ต่อกรัมของอาหาร

8.6 การทำปฏิกิริยา Hemolytic Activity Test

8.6.1แบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 6 หรือ 8 ส่วน เท่า ๆ กัน ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *B. cereus* บน MYP agar ให้เชื้อติดที่ปลายเข็มเพียงเล็กน้อย

8.6.2 นำเชื้อที่ติดอยู่ปลายเข็มไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเพาะเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Sheep Blood Agar โดยแตะเชื้อลงบนผิวของ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าว (1 ช่อง ต่อเชื้อ 1 โคโลนี) คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

8.6.3 ดูผลปฏิกิริยา Hemolytic Positive ซึ่ง *B. cereus* จะให้ผลดังนี้ คือ รอบ ๆ โคโลนีของเชื้อจะมีลักษณะที่เรียกว่า Clear Zone

9. การทดสอบหาปริมาณเชื้อ *C. perfringens* (Rhodehamel and Harmon, 2001b)

9.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ถุงบดตัวอย่างปลอดเชื้อ เติม Peptone Diluent 1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำถุงตัวอย่างไปตีด้วยเครื่อง Stomacher 30 วินาที จะได้ตัวอย่างที่ Dilution 10^{-1}

9.2 วิธีการทดสอบหา *Clostridium perfringens*

เทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC Agar ที่ไม่ต้องเติม Egg yolk Emulsion ประมาณ 6-7 มิลลิลิตร /plate ใช้ปิเปตปลอดเชื้อ ดูดสารละลายตัวอย่างใส่ลงใน TSC Agar ที่เตรียมไว้ จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้น เทอาหารเลี้ยงเชื้อ TSC Agar ลงในจานเพาะเชื้อ ประมาณ 12-15 มิลลิลิตร ผสมให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันโดยการหมุนจานเพาะเชื้อกลับไปมา ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณี...

9.3 คว่ำจานเลี้ยงเชื้อใส่ลงใน Anaerobic Jar พร้อมกับใส่ Gas Pack และ Anaerotest แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

9.4 เมื่อครบกำหนดเวลาบ่ม นำออกมาอ่านผลการทดสอบ เลือกเฉพาะ Plate ที่มีโคโลนีสีดำ

9.5 เขี่ยเชื้อจาก TSC Plate จำนวน 10 โคโลนี ลงในหลอด Thioglycollate Medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

9.6 เมื่อครบกำหนดเวลาให้ใช้ Inoculating Loop เขี่ยเชื้อจาก Thioglycollate Broth มาย้อมสีแกรม

- ถ้าผลที่ได้เชื้อไม่เป็น Pure Culture ให้นำโคโลนีที่ลักษณะตามข้อ 9.4 มาทำการ Streak ซ้ำเพื่อให้ได้โคโลนี เดี่ยวจากนั้น นำมาทดสอบตามข้อ 9.5

- ถ้าผลที่ได้เชื้อเป็น Pure Culture พบเฉพาะเซลล์ที่มีลักษณะเป็นท่อนสั้น หนา ติดสีแกรมบวก ให้นำเชื้อที่ได้ ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

วิธีการทดสอบทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. วิธีวัดค่า pH (คู่มือการใช้ pH METER ยี่ห้อ SCHOTT รุ่น CG 840)

1.1 เปิดเครื่องโดยกดปุ่ม " ON " ยก PROBE ขึ้น ใช้น้ำกลั่นฉีดล้างและซับด้วยทิชชูให้แห้ง

1.2 จุ่ม PROBE ลงในสารละลาย BUFFER pH 7.00 แล้วกดปุ่ม

6.87
7.00

รอจนเครื่องขึ้น "P2" แล้วยก PROBE ขึ้น

1.3 ฉีดล้างด้วยน้ำกลั่นและซับด้วยทิชชูให้แห้ง

1.4 จุ่ม PROBE ลงในสารละลาย BUFFER pH 4.00 แล้วกดปุ่ม

4.01
4.00

รอจนเครื่องขึ้น "OK" แล้วยก PROBE ขึ้น

1.5 จุ่ม PROBE ลงในสารละลาย Buffer pH 7.00 อีกครั้ง รอจนค่าคงที่ ถ้าค่าใกล้เคียง 7.00 แสดงว่าเครื่องพร้อมใช้งาน แต่ถ้า ค่าไม่ใกล้เคียง 7.00 ให้ SET เครื่องใหม่อีกครั้ง

1.6 ฉีดล้างด้วยน้ำกลั่นและซับด้วยทิชชูให้แห้ง

1.7 จุ่ม PROBE ลงในตัวอย่างที่ต้องการวัดโดยให้ PROBE อยู่กึ่งกลางตัวอย่าง รอจนตัวเลขบนหน้าปัทม์หยุดนิ่งประมาณ 3 นาที อ่านค่าที่วัดได้

1.8 เมื่อทำการวัดเรียบร้อยแล้วให้ทำการเช็ด PROBE ให้แห้ง และจุ่ม PROBE ลงในสารละลาย Potassium Chloride

2. วิธีวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์เกลือ (% NaCl) (Cunniff, 1998)

2.1 วิธีเตรียมสารเคมี

2.1.1 สารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมเฟอร์รัสซัลเฟต (ใช้เป็น Indicator)

ใช้ $FeNH_4(SO_4)_2.12H_2O$ ละลายในน้ำกลั่นจนอิ่มตัวและตกตะกอน นำส่วนใสมาใช้เป็น Indicator เก็บสารละลายในขวดสีชา

2.2 วิธีวิเคราะห์

2.2.1 ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ใน Beaker ขนาด 250 ml.

2.2.2 เติม 0.1 N $AgNO_3$ ลงไป 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.2.3 เติม 65% Nitric Acid ลงไป 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.4 ต้มให้เดือดเบา ๆ บน Hot Plate ประมาณ 15 นาที

2.2.5 ตั้งให้เย็น

2.2.6 เติมน้ำ 50 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร Indicator เขย่าให้เข้ากัน

2.2.7 ไตเตรทด้วย 0.1 N NH_4SCN นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็น % NaCl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การคำนวณ

$$\%\ NaCl\ (\text{กรัม} / 100\ \text{มล.}) = \frac{(B - S) \times N\ NH4SCN \times MW\ of\ NaCl \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง} \times 1000}$$

B = ปริมาตรของ 0.1 N $AgNO_3$ ที่ใช้

S = ปริมาตรของ 0.1 N NH_4SCN ที่ใช้ไป

N NH_4SCN = 0.1 N

MW of NaCl = 58.443

3. วิธีวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์กรด (% Acidity) (Barry, 2000)

3.1 การเตรียมสารเคมี

3.1.1 0.1 N NaOH เตรียมโดย นำ Sodium Hydroxide Solution 0.1 N (Ampoule: MERCK) เทในขวด Volumetric flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

3.1.2 % Phenopthalein ชั่ง Phenopthalein 1 กรัม ละลายใน Ethanol 95 % 100 มิลลิลิตร

3.2 การหาค่ามาตรฐานของ 0.1 N NaOH โดยใช้ succinic acid 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer Flask ขนาด 500 มิลลิลิตรแล้วนำมาไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH ที่ต้องการหา

$$\text{N ของ NaOH} = \frac{\text{กรัมของ Succinic Acid ที่ใช้ X 100}}{\text{มิลลิลิตร NaOH ที่ใช้ X 59.03}}$$

3.3 วิธีวิเคราะห์

3.3.1 ชั่งตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร (5 กรัม) ลงใน Erlenmeyer Flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.3.2 เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ลงใน Flask ที่มีตัวอย่าง

3.3.3 เติม 1% phenopthalein 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.4 ไตเตรทด้วย 0.1N NaOH จนสารละลายเป็นสีชมพูคงที่

3.4.5 บันทึกปริมาตรของ NaOH ที่ได้และนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรด

3.4 การคำนวณ

$$\% \text{ Acid} = \frac{V \times N \times 100 \times \text{Cofactor of acid}}{W}$$

หมายเหตุ %Acid = เปอร์เซ็นต์กรด

V = ปริมาตรของ NaOH (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของ NaOH ที่ใช้

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

Cofactor of acid

Malic Acid = 0.067, Oxalic Acid = 0.045, Citric Acid Monohydrate = 0.070, Tartaric Acid=0.075, Sulfuric Acid=0.049, Acetic Acid = 0.060, Lactic Acid = 0.090

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วิธีวิเคราะห์ค่า a_w (คู่มือการใช้เครื่องวัด a_w รุ่น Novasina IC-500)

4.1 การ Calibrate ก่อนการใช้งาน

4.1.1 เปิด Switch ON หลังเครื่องหน้า จอจะแสดง

```
Sensor
Warming up :
```

รอเวลาตามที่แสดงในหน้าจอ

4.1.2 หน้าจอจะแสดง เช่น

```
** NOVASINA **
* 0.753 Aw 25.0 0C
```

แสดงว่าพร้อมใช้งาน

4.1.3 ใส่ตัว SAL-T Humidity Standard ตามที่ต้องการ Calibrate ในช่องใส่ตัวอย่าง ซึ่งมีค่าต่างๆ ดังนี้คือ SAL-T 11, 33, 53, 75, 90, 98

4.1.4 ปิดฝา Sensor โดยหมุนไปที่ตำแหน่ง Close (สมมุติ Calibrate ที่ SAL-T 75)

4.1.5 กดปุ่ม Stop 1 ครั้งจากหน้าจอปกติ (ข้อ 4.1.2) หน้าจอจะแสดง

```
# 01 : Stab.options
submenu...
```

4.1.6 กดปุ่มลูกศร ▽ (Stable) 1 ครั้งหน้าจอจะแสดงเมนูที่ 2

```
# 02 : Enable
YES → NO
```

4.1.7 กดปุ่ม Enter 1 ครั้ง จะขึ้นคำว่า Set จากนั้นกดปุ่มลูกศร ▽ (Stable) 1 ครั้ง เพื่อให้ลูกศรชี้ที่ YES กดปุ่ม Enter อีกครั้งเพื่อยืนยัน หน้าจอจะแสดงตามลำดับดังรูป

```
# 02 : Enable          # 02 : Enable
Set  YES  NO    →      → YES  NO
```

4.1.8 กดปุ่ม Stop 1 ครั้งหน้าจอจะกลับมาที่หน้าจอปกติ (ข้อ 4.1.2) จากนั้นกดปุ่ม Start ค้างไว้จนกว่าจะมีไฟสีส้มขึ้นที่ปุ่ม Analyzing หน้าจอจะแสดงเช่น

```
Actual 00:00:00
→ 0.753 Aw 25.0 °C
```

4.1.9 เมื่อเครื่องอ่านค่าแสร็จสมบูรณ์จะมีไฟสีเขียวขึ้นที่ปุ่ม OK และเครื่องพิมพ์จะพิมพ์ค่าที่อ่านได้หน้าจอจะแสดงเช่น

```
Stable 00:12:15
* 0.753 Aw 25.0 °C
```

4.1.10 กดปุ่ม Stop 1 ครั้งหน้าจอจะกลับมาที่หน้าจอปกติ (ข้อ 4.1.2)

4.1.11 กดปุ่ม Stop อีก 1 ครั้งหน้าจอจะแสดง

```
# 01 : Stab.options
submenu...
```

4.1.12 กดปุ่มลูกศร▽ (Stable) 2 ครั้งหน้าจอจะแสดงเมนูที่ 3

```
# 03 : Calibration
submenu...
```

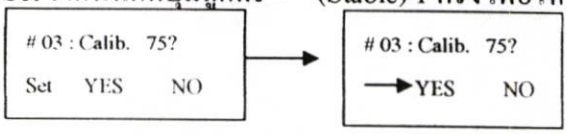
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.13 กดปุ่ม Enter 1 ครั้ง หน้าจอจะแสดง

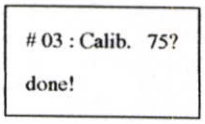
```
# 03 : Calib. 75?
YES → NO
```

ซึ่งต้องเช็คว่าตรงตามที่ Calibrate จริงหรือไม่

4.1.14 กดปุ่ม Enter 1 ครั้ง จะขึ้นคำว่า Set จากนั้นกดปุ่มลูกศร ▽ (Stable) 1 ครั้ง เพื่อให้ลูกศรชี้ที่ YES หน้าจอจะแสดงตามลำดับดังรูป



4.1.15 กดปุ่ม Enter อีก 1 ครั้งเพื่อยืนยันการ Cal. หน้าจอจะแสดง จากนั้นหน้าจอจะกลับสู่หน้าจอปกติ



4.1.16 กดปุ่ม Start ค้างไว้จนกว่าจะมีไฟสีส้มขึ้นที่ปุ่ม Analyzing และปฏิบัติตามข้อ (4.1.9-4.1.10)

4.1.17 ใส่ SAL-T Humidity Standard ตัวที่ 2 ที่จะทำการ Calibrate แล้วปฏิบัติตามข้อ (4.1.8-4.1.16)

4.2 การใช้งาน

4.2.1 ใส่ตัวอย่างประมาณ 2/3ของถ้วยใส่ตัวอย่าง

4.2.2 ปิดฝา Sensor โดยหมุนไปที่ตำแหน่ง Close

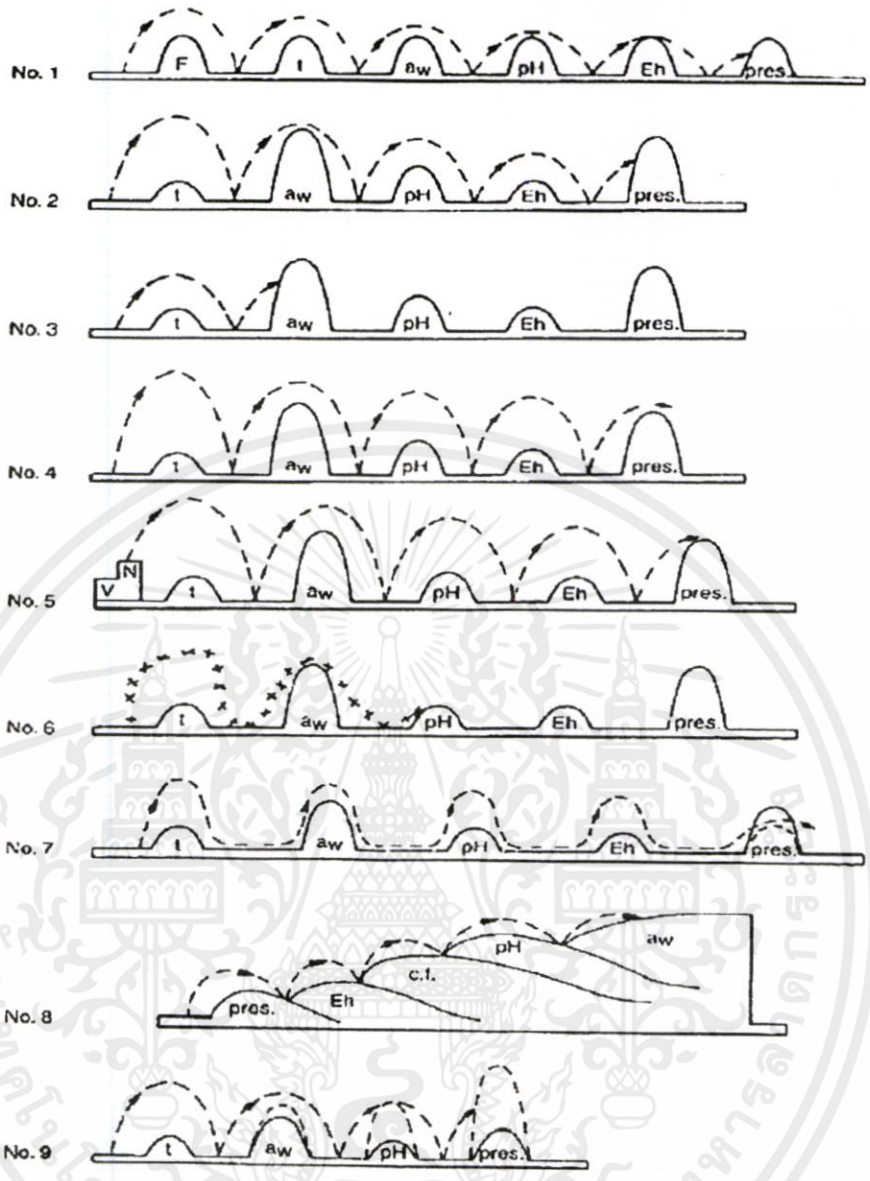
4.2.3 กดปุ่ม Start ค้างไว้จนกว่าจะมีไฟสีส้มขึ้นที่ปุ่ม Analyzing และปฏิบัติตามข้อ (4.1.9-4.1.10) บันทึกผลในกระดาษพิมพ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.

ภาพผลกระทบของเฮอร์เดิลต่อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 : ตัวอย่างผลของเฮอร์เดิลต่อจุลินทรีย์ (F-การใช้ความร้อน, t – การแช่เย็น, a_w- วอเตอร์แอคติวิตี้, pH – ความเป็นกรด, Eh – รีดอกซ์โพเทนเชียล, pres. – การใช้สารกันเสีย, c.f. – จุลินทรีย์คู่แข่ง)

ที่มา : Leistner (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ.

ข้อมูลผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ฉ.1 ปริมาณเชื้อ Aerobic Plate Count ที่ตรวจพบในตัวอย่างวัตถุดิบเนื้อหมู

ตัวอย่างที่	ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบ (Log CFU/g)
1	7.83
2	7.8
3	7.43
4	7.04
5	6.86
6	6.8
7	6.79
8	6.5
9	6.45
10	6.42
11	6.41
12	6.36
13	6.28
14	6.28
15	6.23
16	6.23
17	6.04
18	5.38
19	5.23
20	5.20
ค่าเฉลี่ย	6.48 ± 0.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ฉ.2 ปริมาณเชื้อ APC และเชื้อ LAB ที่ตรวจพบ (Log CFU/g) ระหว่างการหมักแหนม ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส

เวลาในการหมัก (ชั่วโมงที่)	จำนวนซ้ำ	ปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบ		ปริมาณเชื้อ LAB ที่ตรวจพบ	
		Trt.ระดับเชื้อ 6 Log CFU/g	Trt.ระดับเชื้อ 7 Log CFU/g	Trt.ระดับเชื้อ 6 Log CFU/g	Trt.ระดับเชื้อ 7 Log CFU/g
0	1	5.95	7.04	5.33	5.24
	2	6.3	7.3	5.16	5.48
	3	6.41	6.96	5.05	5.27
	ค่าเฉลี่ย	6.22±0.22	7.10±0.18	5.18±0.12	5.33±0.27
12	1	6.48	7.52	6.22	6.3
	2	6.54	7.2	6.42	6
	3	6.54	7.45	6.29	5.94
	ค่าเฉลี่ย	6.52±0.03	7.39±0.17	6.31±0.10	6.08±0.19
24	1	7.2	7.68	6.88	6.75
	2	6.86	7.61	7.24	6.68
	3	6.76	7.75	7.18	7.12
	ค่าเฉลี่ย	6.94±0.23	7.68±0.07	7.10±0.42	6.85±0.35
36	1	7.57	7.88	7.51	7.52
	2	7.23	7.67	7.59	7.29
	3	7.46	7.85	7.4	7.48
	ค่าเฉลี่ย	7.42±0.17	7.80±0.11	7.50±0.09	7.43±0.12
48	1	6.76	6.7	8.1	7.45
	2	6.76	6.86	8.12	8.04
	3	6.61	6.66	7.12	7.73
	ค่าเฉลี่ย	6.71±0.09	6.74±0.32	7.78±0.57	7.74±0.43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ฉ.2 (ต่อ)

เวลาในการหมัก (ชั่วโมงที่)	จำนวนซ้ำ	ปริมาณเชื้อ APC ที่ตรวจพบ		ปริมาณเชื้อ LAB ที่ตรวจพบ	
		Trt.ระดับเชื้อ 6 Log CFU/g	Trt.ระดับเชื้อ 7 Log CFU/g	Trt.ระดับเชื้อ 6 Log CFU/g	Trt.ระดับเชื้อ 7 Log CFU/g
60	1	6.57	6.62	8.74	8.53
	2	6.48	6.41	8.84	8.68
	3	6.57	6.77	8.61	8.41
	ค่าเฉลี่ย	6.54±0.05	6.60±0.18	8.73±0.11	8.54±0.13
72	1	5.88	6.38	9	8.67
	2	6.25	6.57	9.05	8.84
	3	6.29	6.25	8.95	8.8
	ค่าเฉลี่ย	6.14+0.22	6.40+0.16	9.00+0.05	8.77+0.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพรรณี ศิริโสม เกิดวันที่ 20 มกราคม 2516 ที่จังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีอาหาร) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีการศึกษา 2539 ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาสุขาภิบาลอาหาร ปี พ.ศ. 2548

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2539	หัวหน้าแผนกประกันคุณภาพ
	บริษัทยูเนี่ยนโฟรเซ่นโปรดักส์ จำกัด (มหาชน) สมุทรสาคร
พ.ศ. 2542	หัวหน้าแผนกผลิต
	บริษัทจันทบุรี ซีฟูดส์ จังหวัดจันทบุรี
พ.ศ. 2544	ผู้ช่วยผู้จัดการแผนกผลิต
	บริษัทเอส แอนด์ พี ซินดิเคท จำกัด (มหาชน) สายการผลิตอาหาร นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง
พ.ศ. 2546	ผู้ช่วยผู้จัดการแผนกประกันคุณภาพ
	บริษัทเอส แอนด์ พี ซินดิเคท จำกัด (มหาชน) สายการผลิตอาหาร นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง
พ.ศ. 2548-2550	ผู้จัดการแผนกประกันคุณภาพ
	บริษัทเอส แอนด์ พี ซินดิเคท จำกัด (มหาชน) สายการผลิตอาหาร นิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้