

ผลของการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง ต่อการลดจำนวน
ของเชื้อโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกสดแช่เยือกแข็งพร้อมบริโภค

EFFECTS OF FREEZING AND FROZEN STORAGING PERIOD ON
COLIFORMS REDUCTION IN FROZEN READY TO EAT CUTTLEFISH

อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์
AREERUT PHAREEPAIRIT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2457-9

ผลของการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง ต่อการลดจำนวน
ของเชื้อโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกสดแช่เยือกแข็งพร้อมบริโภค

EFFECTS OF FREEZING AND FROZEN STORAGING PERIOD ON
COLIFORMS REDUCTION IN FROZEN READY TO EAT CUTTLEFISH



อารีรัตน์ ไพรีพายฤทธิ

AREERUT PHAIREEPAIRIT

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 61628
วัน,เดือน,ปี..... 19 ก.พ. 2549

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2549

ISBN 974-15-2457-9

**EFFECTS OF FREEZING AND FROZEN STORAGING PERIOD ON
COLIFORMS REDUCTION IN FROZEN READY TO EAT CUTTLEFISH**

AREERUT PHAIREPAIRIT

**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 TECHNOLOGY LADKRABANG

2006

ISBN 974-15-2457-9

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็งต่อการลดจำนวนเชื้อโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกสดแช่เยือกแข็งพร้อมบริโภค
EFFECTS OF FREEZING AND FROZEN STORAGING PERIOD ON COLIFORMS REDUCTION IN FROZEN READY TO EAT CUTTLEFISH




ชื่อนักศึกษา นางอารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์

รหัสประจำตัว 46067905

ปริญญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขากิจบาลอาหาร

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.วราวุฒิ กรูตัง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.วราวุฒิ	กรูตัง	
ผศ.ดร.ประภาพร	ขอไพบุลย์	
ผศ.ดร.อดิศร	เสวตวิวัฒน์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 22 พฤษภาคม 2549 เวลา 9.00 น. เป็นต้นไป
สถานที่สอบ ณ ห้องสัมมนา D213 อาคารเจ้าคุณทหาร


บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่...๒๖...เดือน...มิถุนายน...พ.ศ. ๒๕๔๙

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการแช่เยือกแข็ง และการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง ต่อการลดจำนวนของเชื้อโคลิฟอร์ม ในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกสด แช่เยือกแข็งพร้อมบริโภค
นักศึกษา	นางอารีรัตน์ ไพร์พ่ายฤทธิ
รหัสประจำตัว	46067905
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2548
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ. ดร. วราวุฒิ Круตัง

บทคัดย่อ

ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงานตลอดปี 2547 พบการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์มอยู่ในระดับ $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ถึง $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ เชื้อโคลิฟอร์มที่ระบุได้จากการทดลองคือ เชื้อ *Pantoea agglomerans* ซึ่งเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บภายหลังจากการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็ง 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน คือ 8 8 8 8 8 8 8 10 10 12 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

กระบวนการแช่แข็งแบบอากาศเย็น (Air Blast) ที่อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส ให้อุณหภูมิใจกลางชิ้นปลาหมึกกระดองสดได้ (-) 18 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 90 นาที ทำให้เชื้อ *P. agglomerans* ที่เดิมลงในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดก่อนการแช่เยือกแข็งที่ระดับ $3 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g}$ ลดปริมาณลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ลดลงหลังการแช่แข็งเท่ากับ $0.39 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $0.36 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $0.35 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ตามลำดับ และผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดที่ผ่านการแช่แข็งแล้วในห้องเย็นควบคุมอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่เดิมทั้งสามระดับลดลง โดยในวันที่ 1 3 และ 5 ปริมาณเชื้อลดลงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับปริมาณเชื้อหลังการแช่แข็ง ขณะที่วันที่ 7 9 11 และ 14 ปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับปริมาณเชื้อหลังการแช่แข็ง สำหรับวันที่ 21 30 และ 60 ปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยวันที่ 30 ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ปนเปื้อน $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ลดลงเท่ากับ $1.44 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $1.25 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $1.21 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ หรือ 40.5 เปอร์เซ็นต์ 27.1 เปอร์เซ็นต์ และ 22.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในวันที่ 60 ปริมาณเชื้อลดลงเท่ากับ $2.20 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $2.11 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $2.05 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ หรือ 61.8 เปอร์เซ็นต์ 45.8 เปอร์เซ็นต์ และ 37.7

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สรุปว่าการลดลงของเชื้อ 1 Log cycle ใช้เวลาประมาณ 30 วัน เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของเชื้อ *P. agglomerans* หลังการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสถานะแช่แข็งพบว่าปริมาณเชื้อตั้งต้น 3 Log₁₀ CFU/g ลดลงมากกว่าตัวอย่างที่มีระดับเชื้อตั้งต้น 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g ตามลำดับ

ผลการเก็บผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดที่เดิมเชื้อ *P. agglomerans* 5 Log₁₀ CFU/g ที่ไม่ผ่านการแช่เยือกแข็งในห้องเย็นควบคุมอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับปริมาณตั้งต้น โดยปริมาณการลดลงเท่ากับ 0.29 Log₁₀ CFU/g หรือ 5.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่วันที่ 3 5 7 9 และ 11 ปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่องแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับปริมาณเชื้อในวันที่ 1 สำหรับวันที่ 14 21 30 และ 60 ปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ผลการทดลองในวันที่ 30 เชื้อ *P. agglomerans* ลดลงจากเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 1.37 Log₁₀ CFU/g หรือ 25.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อครบ 60 วัน เชื้อ *P. agglomerans* ลดลงจากตั้งต้นเท่ากับ 2.64 Log₁₀ CFU/g หรือ 48.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบผลการลดลงของเชื้อ *P. agglomerans* ที่ผ่านการแช่แข็งและไม่ผ่านการแช่แข็งแต่เก็บรักษาในห้องเย็น พบว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการแช่แข็งมีปริมาณการลดลงมากกว่าประมาณ 0.5 Log cycle

Thesis Title	Effects of Freezing and Frozen Storing Period on Coliforms Reduction in Frozen Ready to Eat Cuttlefish
Student	Miss Areerut Phairecpairit
Student ID	46067905
Degree	Master of Science
Programme	Food Sanitation
Year	2005
Thesis Advisor	Asso. Prof. Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

The average level of coliform contamination in receiving raw cuttlefish to manufacturing plant in 2004 was between 3 Log₁₀ CFU/g and 5 Log₁₀ CFU/g. The detected coliform was *Pantoea agglomerans*. The incubation time for recovering bacterial injured cells from freezing process and keeping in cold storage during 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21, 30 and 60 days were 8, 8, 8, 8, 8, 8, 8, 10, 10, 12 and 12 hours, respectively.

Air Blast freezing at (-) 30 degree Celsius for 90 minutes (core temperature (-)18 degree Celsius) could significantly (P<0.05) reduce coliform level in raw cuttlefish before freezing from 3 Log₁₀ CFU/g, 4 Log₁₀ CFU/g and 5 Log₁₀ CFU/g to 0.39 Log₁₀ CFU/g, 0.36 Log₁₀ CFU/g and 0.35 Log₁₀ CFU/g after freezing. The level of coliform in frozen cuttlefish after keeping in coldstorage (-22 degree Celsius) of all three beginning levels also decreased. As in day 1, 3 and 5, the level has decreased insignificantly (P<0.05) compared to coliform after freezing, and decreased significantly (P<0.05) after then. After day 30, coliform of all three levels reduced to 1.44 Log₁₀ CFU/g, 1.25 Log₁₀ CFU/g and 1.21 Log₁₀ CFU/g or 40.5%, 27.1% and 22.1%, respectively. After day 60, coliform has decreased to 2.20 Log₁₀ CFU/g, 2.11 Log₁₀ CFU/g and 2.05 Log₁₀ CFU/g or 61.8%, 45.8% and 37.7%, respectively. In conclusion, reduction 1 Log cycle of coliforms spent around 30 days. Compared to the reduction of *P. agglomerans* after freezing and keeping in cold storage, the beginning level at 3 Log₁₀ CFU/g has decreased more than 4 Log₁₀ CFU/g and 5 Log₁₀ CFU/g, respectively.

The result after keeping fresh cuttlefish which has contaminated coliform at beginning level $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ in cold storage showed that the level has decreased significantly ($P < 0.05$) to $0.29 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ or 5.4% in day 1, then, continued decreasing insignificantly in day 3, 5, 7, 9, and 11, but decreased significantly ($P < 0.05$) in day 14, 21, 30 and 60. Coliform decreased to $1.37 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ or 25.2% after 30 days and $2.64 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ or 48.4% after 60 days. In comparison with the reduction of *P. agglomerans* in frozen and unfrozen products after keeping in cold storage, coliforms level in unfrozen products decreased more than 0.5 Log cycle.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร. วราวุฒิ คุรุสง์ ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ และผศ.ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำอันมีค่า มีประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนเสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คุณไพบูลย์ กังวลกิจ ผู้จัดการทั่วไป บริษัทสุรพลฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน) สาขาการบินบุรีรัมย์ และบริษัทสุรพลฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน) ที่เปิดโอกาสให้เข้าศึกษาในช่วงของการทำงาน รวมถึงสนับสนุนทรัพยากรต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ คุณอรทัย เสียงไพรัตน์ คุณดวงใจ ยี่งู และคุณทองจันทร์ ประวรรณโน พนักงานประจำห้องปฏิบัติการทดสอบ บริษัทสุรพลฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน) สาขาการบินบุรีรัมย์ ที่ช่วยทำการทดลองและตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ คุณนพดล เมตตามณี และเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท สาขาสุขภาพอาหารทุกท่านที่คอยให้การช่วยเหลือด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณ คุณประเสริฐ เรืองสิน และคช. ปวริศร เรืองสิน สมาชิกในครอบครัวที่อบอุ่น ซึ่งเป็นแรงใจและเป็นกำลังสำคัญให้เพียรพยายามในการศึกษาครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่จินดา ไพรีพ่ายฤทธิ์ พี่สาวทั้งสองท่าน และญาติมิตรที่คอยห่วงใยและเป็นกำลังใจอย่างสม่ำเสมอ

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

อารีรัตน์ ไพรีพ่ายฤทธิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.3 วัตถุประสงค์.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 มาตรฐานเชื้อจุลินทรีย์ของอาหารรับประทานดิบของประเทศญี่ปุ่น.....	3
2.2 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ โคลิฟอร์ม.....	5
2.3 อัตราการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์ม.....	8
2.4 การถนอมอาหาร โดยใช้ความเย็น.....	9
2.5 ความสัมพันธ์ของกระบวนการแช่แข็งอาหารกับอัตราการรอดของ เชื้อจุลินทรีย์.....	13
2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำลายจุลินทรีย์ในอาหารแช่เยือกแข็ง.....	15
2.7 ความทนทานของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง.....	22
2.8 การแช่แข็งแบบใช้อากาศเย็น.....	26
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	28
3.1 วัตถุประสงค์.....	28
3.2 อุปกรณ์ในการทดลอง.....	28
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	28
3.4 สถานที่ทำการทดลอง.....	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 วิธีการทดลอง.....	29
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	36
4.1 ผลการศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์มในวัดฤทธิ และ ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หมักกระดองสดแช่แข็ง.....	36
4.2 การคัดเลือกเชื้อมาตรฐาน.....	38
4.3 ผลการเตรียมตัวอย่างปลาหมักกระดองที่ใช้ในการทดลอง.....	44
4.4 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่บาดเจ็บ.....	46
4.5 ผลของการแช่แข็งแบบอากาศเย็น (Air Blast) และการเก็บ รักษาในสภาวะแช่แข็งของผลิตภัณฑ์ปลาหมักสดแช่แข็งต่อ การลดปริมาณของเชื้อ <i>P. agglomerans</i>	51
4.6 ผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาหมักสดซึ่งไม่ผ่านกระบวนการ การแช่แข็งในสภาวะแช่แข็งต่อการลดปริมาณของ เชื้อ <i>P. agglomerans</i>	57
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	61
บรรณานุกรม.....	64
ภาคผนวก.....	68
ก. การเตรียมสารละลายบริสุทธิ์.....	68
ข. การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	70
ค. การตรวจนับเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่เหลือรอด.....	73
ง. ข้อมูลผลการทดลอง.....	75
ประวัติผู้เขียน.....	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	มาตรฐานทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งของประเทศญี่ปุ่น.....4
2.2	มาตรฐานทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งของประเทศญี่ปุ่น.....4
2.3	การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มของเชื้อโคลิฟอร์ม.....6
2.4	คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโคลิฟอร์มในแต่ละสายพันธุ์.....7
2.5	ปริมาณการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่พบในวัตถุดิบกุ้งกุลาดำ ในปี 1994/1995.....9
2.6	ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์.....12
2.7	ค่า Water Activity (a_w) ของเนื้อที่อุณหภูมิแช่แข็งต่างๆ.....15
2.8	การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ และเวลาต่างกัน.....17
2.9	การเปรียบเทียบข้อดี - ข้อเสีย ของการแช่แข็งแบบเร็ว (Quick Freezing) และแบบช้า (Slow Freezing)..... 19
2.10	การตายและการบาดเจ็บของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> ในสารละลาย ต่างๆ ที่มีผลต่อความทนทานของเชื้อจุลินทรีย์.....21
2.11	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มและอีโคไลที่ตรวจพบในแต่ละกระบวนการผลิต กุ้งกุลาดำแช่แข็ง.....22
2.12	ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ <i>Salmonella</i> ในเนื้อไก่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ (-) 25.5 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ24
2.13	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มและอีโคไลของตัวอย่างกุ้งระหว่างการเก็บรักษา ในสภาพแช่แข็งตามระยะเวลาต่างๆ.....24
3.1	ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการทดลองในสภาวะต่างๆ.....34
4.1	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับ เข้าโรงงานตั้งแต่เดือน มกราคม - ธันวาคม 2547.....36
4.2	ผลการวิเคราะห์คุณลักษณะของเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ใช้ใน การทดลอง.....41
4.3	ปริมาณสารคลอรีนตกค้างในตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังผ่านการล้าง.....45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.4 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น 3 Log ₁₀ CFU/g 4 Log ₁₀ CFU/g และ 5 Log ₁₀ CFU/g ที่รอดชีวิตเมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็ง และเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ.....	47
4.5 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ในปลาหมึกกระดองสดที่รอดชีวิตหลัง ผ่านกระบวนการแช่แข็ง.....	51
ง.1 ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ <i>P. agglomerans</i> ในตัวอย่างปลาหมึก กระดองสดหลังจากการทดลองในสถานะต่างๆ.....	76
ง.2 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวมและเชื้อ โคลิฟอร์มหลังผ่านกระบวนการล้าง.....	87
ง.3 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น 3 Log ₁₀ CFU/g ใน ปลาหมึกกระดองสดที่รอดชีวิตหลังผ่านการแช่แข็งด้วยระบบ Air Blast และเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ	88
ง.4 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น 4 Log ₁₀ CFU/g ใน ปลาหมึกกระดองสดที่รอดชีวิตหลังผ่านการแช่แข็งด้วยระบบ Air Blast และเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ.....	89
ง.5 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น 5 Log ₁₀ CFU/g ใน ปลาหมึกกระดองสดที่รอดชีวิตหลังผ่านการแช่แข็งด้วยระบบ Air Blast และเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ.....	90
6. ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น 5 Log ₁₀ CFU/g ใน ปลาหมึกกระดองสด ที่รอดชีวิตหลังจากเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลา ต่างๆ.....	91

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์เชื้อ โคลิฟอร์ม.....	8
2.2 ผลของ Water Activity (a_w) และอุณหภูมิต่อจุดเยือกแข็ง (Freezing Point).....	14
2.3 ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในไถ่วงสดที่นำเครื่องในออกแล้วแช่เย็น และแช่แข็ง.....	16
2.4 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อ <i>Pseudomonas</i> ในตัวอย่างที่แช่แข็งด้วย วิธีที่แตกต่างกัน.....	19
2.5 ปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ก่อนการแช่แข็ง หลังการแช่แข็งและหลังจาก เก็บรักษาไว้ในสภาวะแช่แข็ง.....	23
2.6 ปริมาณเชื้อ <i>Staphylococci</i> ก่อนการแช่แข็ง หลังการแช่แข็ง และหลังจากเก็บ ไว้ในสภาพแช่แข็ง.....	23
2.7 ผลของการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งต่อการลดจำนวนเชื้อ <i>Salmonella kentucky</i> ในเนื้อวัว เนื้อหมู และ เนื้อแกะ.....	25
2.8 ผลของการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งต่อการลดจำนวนเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ในเนื้อวัว เนื้อหมู และ เนื้อแกะ.....	25
2.9 เครื่องแช่แข็งแบบแอร์บลาสในลักษณะที่เป็นสายพานลำเลียง.....	26
2.10 เครื่องแช่แข็งแบบแอร์บลาสในลักษณะที่เป็นห้องและมีชั้นวางบนรางลำเลียง.....	27
3.1 ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสด.....	30
(ก) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ผ่านกระบวนการผลิต.....	30
(ข) ลักษณะขึ้นของตัวอย่างปลาหมึกกระดองสด.....	30
3.2 การล้างปลาหมึกกระดองสดให้ปราศจากเชื้อ โคลิฟอร์ม.....	31
(ก) ปลาหมึกกระดองสดในน้ำคลอรีนความเข้มข้น 50 PPM.....	31
(ข) การล้างปลาหมึกกระดองสดในน้ำคลอรีนความเข้มข้น 50 PPM.....	31
(ค) แสดงการล้างปลาหมึกกระดองสดในน้ำสะอาด.....	31
(ง) ปลาหมึกกระดองสดหลังล้าง.....	31

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.3 ขั้นตอนการถ่ายเชื้อ โคลิฟอร์มลงในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดก่อนแช่แข็ง.....	32
(ก) อุปกรณ์การเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ปนเปื้อนเชื้อ โคลิฟอร์ม.....	32
(ข) การตัดตัวอย่าง ในการเตรียมตัวอย่างทดลองก่อนนำไปแช่แข็ง.....	32
(ค) การชั่งตัวอย่าง ในการเตรียมตัวอย่างทดลองก่อนนำไปแช่แข็ง.....	32
(ง) การเตรียมเชื้อ โคลิฟอร์มในแต่ละความเข้มข้นเพื่อใช้เติมบนตัวอย่างทดลอง.....	32
(จ) การเติมเชื้อ โคลิฟอร์มลงในตัวอย่างปลาหมึกกระดอง.....	32
(ฉ) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ผ่านการเติมเชื้อ โคลิฟอร์ม.....	32
3.4 ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดในถุงพลาสติก.....	33
(ก) ลักษณะของตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดในถุงพลาสติกก่อนการแช่แข็ง.....	33
(ข) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดภายหลังการแช่แข็ง.....	33
4.1 Stock เชื้อ <i>P. agglomerans</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient slant.....	39
4.2 เชื้อ <i>P. agglomerans</i> บนกล้องจุลทรรศน์.....	39
4.3 เชื้อ <i>P. agglomerans</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform Agar.....	40
4.4 เชื้อ <i>P. agglomerans</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar.....	40
4.5 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวมที่ลดลงหลังผ่านการล้าง.....	44
4.6 ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่ลดลงหลังผ่านการล้าง.....	45
4.7 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ในปลาหมึกกระดองที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังแช่แข็งและ เก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ.....	56
4.8 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ในปลาหมึกกระดองที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังแช่แข็งและ เก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ.....	56
4.9 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ในปลาหมึกกระดองที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังแช่แข็งและ เก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ.....	57
4.10 ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่ระดับความเข้มข้น $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ในปลาหมึกกระดองที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังเก็บรักษาใน สภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ.....	60

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ผลิตภัณฑ์อาหารประเภทรับประทานดิบ เช่น ปลาดิบ ปลาหมึกดิบ กุ้งดิบ หอยดิบ และอื่นๆ เป็นที่ได้รับความนิยมอย่างมากในประเทศญี่ปุ่น และกำลังแพร่หลายในประเทศอื่นๆ รวมถึงประเทศไทย ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์อาหารกลุ่มนี้มีความเชื่อว่า คุณค่าของอาหารที่รับประทานดิบนั้นมีสูงกว่าอาหารที่ปรุงสุกแล้ว รวมทั้งได้รสชาติตามธรรมชาติที่น่าลิ้มลอง และเป็นที่น่าสนใจ

การปรุงและผลิตอาหารประเภทรับประทานดิบนั้นมีขั้นตอนกรรมวิธีผลิตไม่ยุ่งยากนัก เพราะไม่ต้องปรุงแต่งรสชาติอะไรมากมาย เพียงแต่จัดรูปแบบให้มีความสวยงาม มีศิลปะ ก็เป็นที่น่าสนใจแล้ว แต่สิ่งที่สำคัญที่สุดซึ่งเป็นหัวใจสำคัญของการผลิตอาหารประเภทนี้ คือการคัดเลือกวัตถุดิบที่มีความสด สะอาด เพียงพอที่จะรับประทานแบบดิบ ๆ ได้ ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดในการผลิตและจำหน่ายอาหารประเภทนี้ เนื่องจากวัตถุดิบที่สดนั้นมีอัตราการเสื่อมคุณภาพเร็ว รวด อย่างไรก็ตามยังมีวิธีการถนอมรักษาให้วัตถุดิบดังกล่าวคงความสดและคุณภาพตามธรรมชาติของอาหารนั้นๆ ไว้ได้ วิธีการแช่แข็งเป็นวิธีที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์ยังคงมีความสดและลักษณะคล้ายคลึงของสดมากที่สุด อีกทั้งยังคงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไว้ได้อย่างครบถ้วน สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ยาวนาน รวมถึงช่วยให้อาหารมีความปลอดภัยในการบริโภคมากยิ่งขึ้น เนื่องจากมีส่วนช่วยทำลายและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้

ในปัจจุบันการส่งออกอาหารทะเลแช่แข็งประเภทรับประทานดิบไปยังประเทศญี่ปุ่นมีแนวโน้มการส่งออกสูงขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากประเทศญี่ปุ่นค่อนข้างขาดแคลนทรัพยากรทางการเกษตรและอาหาร ซึ่งจำเป็นต้องสั่งซื้ออาหารจากประเทศอื่นๆ จำนวนมาก เพื่อให้เพียงพอต่อประชากรในประเทศ

เนื่องจากลักษณะการบริโภคอาหารดิบของชาวญี่ปุ่นเป็นลักษณะการบริโภคที่มีความเสี่ยงสูงมาก ดังนั้นกฎหมายหรือข้อกำหนดของประเทศญี่ปุ่นจึงเข้มงวดมากกว่าประเทศอื่นๆ โดยกำหนดไม่ให้พบเชื้อโคลิฟอร์มปนเปื้อนในอาหารที่ทำการตรวจวิเคราะห์ 0.01 กรัม เนื่องจากเชื้อโคลิฟอร์มเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้โดยทั่วไปในสภาพแวดล้อม ทั้งในน้ำ ดิน และอากาศ จึงทำให้สามารถปนเปื้อนลงในอาหารได้ง่ายและสามารถตรวจพบได้ง่ายด้วยเช่นกัน สาเหตุของการเลือกเชื้อโคลิฟอร์มเป็นข้อกำหนดของมาตรฐานอาหารดังกล่าว น่าจะมาจากการที่เชื้อโคลิฟอร์มเป็นเชื้อดัชนี

แสดงถึงสัญลักษณ์การผลิต บ่งชี้ถึงความสะอาด สามารถตรวจพบได้ง่าย และมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการพบเชื้อก่อโรค หากมีการพบเชื้อในกลุ่มนี้อาจมีโอกาที่จะพบเชื้อก่อโรคด้วยเช่นกัน

กระบวนการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง เป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่สำคัญในการช่วยลดอันตรายจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารทะเลประเภทรับประทานดิบได้ เนื่องจากกระบวนการดังกล่าวมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในด้านต่างๆ เช่น สามารถทำลายเนื้อเยื่อของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์เกิดความเครียดเมื่ออยู่ในสภาวะเยือกแข็งเป็นต้น ดังนั้นการศึกษาถึงประสิทธิภาพความสามารถที่จะลดเชื้อจุลินทรีย์ในขั้นตอนดังกล่าว จะเป็นข้อมูลสำคัญในการวิเคราะห์ความเสี่ยงของการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารแช่แข็ง และช่วยให้การควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์เป็นไปในทิศทางที่กำหนด รวมถึงทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อการบริโภค และสอดคล้องตามข้อกำหนดกฎหมายของประเทศคู่ค้า ส่งผลให้ธุรกิจการส่งออกดำเนินต่อไป

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการแช่แข็งแบบอากาศเย็น (Air Blast) และการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งผลิตภัณฑ์หมีกระดองสดต่อการลดปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่ปนเปื้อนมา กับผลิตภัณฑ์ให้รับทราบถึงประสิทธิภาพในการลดเชื้อของกระบวนการดังกล่าว เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตให้นำมาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ และมีความปลอดภัยต่อการบริโภค

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์มในวัตถุดิบ และในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมีกระดองสดแช่แข็ง
2. เพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งแบบอากาศเย็น (Air Blast) ต่อการลดปริมาณของเชื้อ โคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์ปลาหมีกระดองสดแช่แข็ง
3. เพื่อศึกษาผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาหมีกระดองสดแช่แข็ง ต่อการลดปริมาณของเชื้อ โคลิฟอร์ม

บทที่ 2

ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 มาตรฐานอาหารรับประทานดิบของประเทศญี่ปุ่น

ชาวญี่ปุ่นมีความเชื่อว่าอาหารต้องมีความสดใหม่ และรสชาติใกล้เคียงธรรมชาติมากที่สุด อาหารประเภทหนึ่งที่เป็นขอยอดนิยมในประเทศญี่ปุ่น คือ ซูชิ (sushi) เป็นอาหารที่ประกอบด้วยข้าวที่ปั้นเป็นก้อนพอดีคำ และวางชิ้นอาหารทะเลดิบปกด้านบนข้าวอีกชั้นหนึ่ง การรับประทานอาหารประเภทนี้ถึงแม้จะมีความเสี่ยงสูง แต่ก็ยังเป็นอาหารที่เปี่ยมด้วยคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากปลาดิบและอาหารทะเลเป็นแหล่งของโปรตีนและวิตามินมากมาย รวมไปถึงแร่ธาตุที่ร่างกายต้องการ มีกรดไขมันโอเมก้า-3 และมีคลอโรฟิลล์ที่ต่ำอีกด้วย (เรียวอิชิ, 2541)

การบริโภคอาหารดิบมีความเสี่ยงในการเกิดอันตรายจากการบริโภคค่อนข้างมาก เนื่องจากไม่ผ่านกระบวนการลดหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ประเทศญี่ปุ่นตั้งมาตรการการป้องกันปัญหานี้ โดยการกำหนดมาตรฐานการยอมรับผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ให้มีความเข้มงวด มากกว่าผลิตภัณฑ์อื่นๆ

มาตรฐานการยอมรับผลิตภัณฑ์ของประเทศญี่ปุ่นนั้นจะระบุอยู่ในกฎหมายทางด้านอาหารที่ชื่อว่า “Food Sanitation Law ” โดยในกฎหมายดังกล่าวระบุถึงผลิตภัณฑ์อาหารที่สามารถและไม่สามารถนำเข้าประเทศญี่ปุ่นได้ มาตรฐานเกณฑ์การยอมรับของสารปรุงแต่งอาหารแต่ละชนิด (Food additive) รวมไปถึงมาตรฐานการยอมรับผลิตภัณฑ์สำเร็จทางเคมี และ จุลินทรีย์ร่วมด้วย เพื่อเป็นข้อกำหนดในการตรวจสอบสินค้าก่อนนำเข้าประเทศ (Brown , 1999)

ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่แข็งประเภทรับประทานนั้น ถูกจัดอยู่กลุ่มอาหารแช่แข็งทั่วไปประเภทพร้อมรับประทาน (Frozen food products : Products not requiring heating) ซึ่งกำหนดมาตรฐานปริมาณจุลินทรีย์รวมต่ำกว่า 100,000 ตัวต่อกรัม และกำหนดไม่ให้พบเชื้อโคลิฟอร์มและเชื้อโรคเป็นพิษอื่นๆ (Japan Food Hygiene Association , 1997) ทั้งนี้ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และ ตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.1 : มาตรฐานทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งของประเทศญี่ปุ่น

Frozen Food	Specifications of composition	<p>(Frozen food served without heating)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacteria count: Not more than 100,000/g. • Coliform group: Negative. <p>(Frozen food served after heating (those heated immediately before freezing))</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacteria count: Not more than 100,000/g. • Coliform group: Negative. <p>(Frozen food served after heating (other than those heated immediately before freezing))</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacteria count: Not more than 3,000,000/g. (Bacteria count does not apply to the foods manufactured using the function of microorganisms such as plain bread, fermented soybeans, and pies containing natural cheese, which are frozen and packed in a container-packages). • <i>Escherichia coli</i>: Negative. <p>(Frozen fresh fish and shellfish for raw consumption)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bacterial count: Not more than 100,000/g. • Coliform group: Negative. 	<p>"Frozen food" means manufactured or processed food (except soft drinks, meat products and whale meat products, fish-paste products and boiled octopus), and filleted fresh fish or shucked shellfish (except raw oysters) which has been frozen and packed in a container-package.</p> <p>"Frozen food served without heating" means, out of frozen foods, manufactured or processed food which has been frozen and does not require heating upon consumption.</p> <p>"Frozen food served after heating" means, out of frozen foods, manufactured or processed food which has been frozen and is other than frozen food</p>
	Standards of processing (limited to)	<ul style="list-style-type: none"> • Water used for processing shall be potable water, pasteurized sea water or artificial sea water made of potable water. 	

ที่มา : Japan Food Hygiene Association (1997)

ตารางที่ 2.2 : มาตรฐานทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็งของประเทศญี่ปุ่น

Products	Bacterial counts (per g)	Coliform	E. coli (MPN per 100 g)	Enterococcus	Pseudomonas aeruginosa
Oyster for raw eating	$\leq 50 \times 10^3$		≤ 230		
Soft drink		Negative		Negative*	Negative*
Frozen food products					
Products not requiring heating	$< 100 \times 10^3$	Negative			
Products heated just before freezing	$\leq 100 \times 10^3$	Negative			
Raw, edible fresh-frozen fishery products	$\leq 100 \times 10^3$				
Products requiring heating before being served	$\leq 3 \times 10^4$		Negative		
Boiled octopus	$\leq 100 \times 10^3$	Negative			

*For mineral water (soft drinks made only from water) packaged in the container under the pressure of CO₂ at less than 1.0 kgf/cm² at 20°C and that have not undergone pasteurization or removal of microorganisms (by filtration, etc.)
MPN, most probable number.

ที่มา : Brown, (1999)

2.2 ลักษณะ และคุณสมบัติของเชื้อโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria)

เชื้อโคลิฟอร์มเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ดิคคีแกรมลบ ลักษณะรูปร่างเป็นท่อนหรือแท่ง (rod shape) ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน มีคุณสมบัติเฉพาะที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้กรดและก๊าซภายในเวลา 24 -48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส วิชาชีโนไทรโทให้เป็นไนไทรท์ ให้ผลลบเมื่อทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase negative) และที่สำคัญคือมีความทนทานต่อ Bile salt เจริญได้ดีที่อุณหภูมิตั้งแต่ -2 ถึง 50 องศาเซลเซียส สามารถเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (pH) ตั้งแต่ 4.4 ถึง 9.0 โดยแบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่สกุล Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella (มัทนา, 2538) ซึ่งแบ่งแยกสายพันธุ์ในแต่ละสกุลตามตารางที่ 2.3

ส่วน Fecal coliform เป็นแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์ม ที่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสแล้วให้กรดและก๊าซที่อุณหภูมิประมาณ 44.5 - 45.5 องศาเซลเซียสได้ แบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่สกุล Escherichia และ Klebsiella บางชนิด (มัทนา, 2538)

โครงสร้างของเซลล์เชื้อโคลิฟอร์มประกอบด้วยส่วนของตัวเซลล์, ผนังเซลล์ชั้นต่างๆ และแฟกเจลล่า รวมถึง Antigen ต่างๆ (<http://www-e.medtools.com>, 15/2/06) ดังแสดงดังภาพที่ 2.1 และคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโคลิฟอร์มในแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันออกไป แสดงดังตารางที่ 2.4 ซึ่งสามารถใช้คุณสมบัติดังกล่าวจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโคลิฟอร์มแต่ละสายพันธุ์ได้

การเจริญเติบโตของเชื้อโคลิฟอร์มเหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่ทำให้เกิดโรคทั้งหลาย สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด และในอาหารต่างๆ เคยมีรายงานว่าแบคทีเรียชนิดนี้เจริญที่อุณหภูมิต่ำเพียง -2 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส ในอาหารแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ไม่คืนกที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แม้ว่านักวิจัยหลายคนจะรายงานว่ามีการเจริญที่อุณหภูมิ 3 - 6 องศาเซลเซียส ก็ตาม (สุมณฑา(ก), 2545)

คุณสมบัติที่เด่นของเชื้อโคลิฟอร์มคือความง่ายและความชัดเจนในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อเป็นผลทำให้ถูกคัดเลือกให้เป็นแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นครรชนชี้บ่งความปลอดภัยและการสุขาภิบาลอาหาร ในปี ค.ศ.1920 สมาคมสาธารณสุขอเมริกันแนะนำให้ใช้เชื้อโคลิฟอร์มประเมินความเพียงพอของการพาสเจอร์ไรซ์ และประมาณปี ค.ศ 1930 เทคนิคเพื่อการนี้ก็ได้รับการจัดทำขึ้นสำหรับใช้เป็นแนวปฏิบัติเพื่อทดลองกระบวนการดังกล่าว การตรวจหาโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์นมไม่ได้ตั้งใจที่จะชี้บ่งการปนเปื้อนของอุจจาระ แต่ประสงค์ที่จะสะท้อนถึงการสุขาภิบาลอาหารของฟาร์มโคนม และโรงงานผลิตนมเป็นสำคัญ (สุมณฑา(ก), 2545)

ตารางที่ 2.3 : การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มของเชื้อโคลิฟอร์ม

Organism	Other and Older Designations
<i>Escherichia</i> (6 species in Bergeys Manual) ^a	
<i>E. coli</i> ^b	
<i>E. coli</i> inactive	<i>E. coli</i> (lucose negative, nonmotile, anaerogenic)
<i>E. fergusonii</i>	
<i>E. hermannii</i>	
<i>E. vulneris</i>	
<i>Klebsiella</i> (7 species)	
<i>K. pneumoniae</i> ^c	Friedlander's bacillus
<i>K. oxytoca</i>	Indole positive <i>K. pneumoniae</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>K. ornithinolytica</i>	Ornithine-positive <i>K. oxytoca</i>
<i>K. planticola</i>	
<i>Enterobacter</i> (13 species)	
<i>E. aerogenes</i> ^c	
<i>E. cloacae</i> ^b	
<i>E. agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Erwinia herbicola</i>
<i>E. sakazakii</i>	<i>E. cloacae</i> (yellow pigmented)
<i>E. gergoviae</i>	
<i>Serratia</i> (11 species)	
<i>S. marcescens</i> ^b	
<i>S. rubidaea</i>	
<i>S. liquefaciens</i> group	<i>S. liquefaciens</i> , <i>S. grimesii</i> , <i>S. proteamaculans</i>
<i>S. ficaria</i>	
<i>S. fonticola</i>	
<i>S. odorifera</i>	
<i>S. plymuthica</i>	
<i>Citrobacter</i> (3 species)	
<i>C. freundii</i>	
<i>C. diversus</i>	<i>C. koseri</i>
<i>C. amalonaticus</i>	<i>C. intermedius</i> biotype
<i>Proteus</i> ^c (4 species)	
<i>P. mirabilis</i> ^b	
<i>P. vulgaris</i>	
<i>P. penneri</i>	

ที่มา : <http://www-e.medtools.com>.(15/2/06)

ตารางที่ 2.4 : คุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อโกลิฟอร์มในแต่ละสายพันธุ์

Organism	Motility	Lactose	Indole	Urease	H ₂ S	Other
<i>Escherichia</i>						
<i>E coli</i>	+	+	+	—	—	
<i>Klebsiella</i>						
<i>K pneumoniae</i>	—	+	—	+	—	large mucoid colonies
<i>K oxytoca</i>	—	+	+	+	—	large mucoid colonies
<i>Enterobacter</i>						
<i>E aerogenes</i>	+	+	—	—	—	some strains mucoid, LD+, AD—
<i>E cloacae</i>	+	+	—	d	—	LD—, AD+
<i>E sakazakii</i>	+	+	[—]	—	—	yellow pigment, LD—, AD+
<i>E gergoviae</i>	+	d	—	+	—	LD+, AD—
<i>Pantoea</i>						
<i>P agglomerans</i>	+	d	[—]	[—]	—	some strains yellow pigment, LD—, AD—
<i>Serratia</i>						
<i>S marcescens</i> ^a	+	—	—	—	—	some strains red pigment
<i>S rubideae</i> ^b	+	+	—	—	—	red pigment
<i>Citrobacter</i>						
<i>C freundii</i>	+	d	—	d	+	
<i>C koseri</i> ^c	+	d	+	d	—	
<i>Proteus</i>						
<i>P mirabilis</i>	+	—	—	+	+	"swarming" motility
<i>P vulgaris</i>	+	—	+	+	+	"swarming" motility

+ (≥ 90% strains positive), d (26-75% strains positive), [—] (11-25% strains positive), — (0-10% strains positive)

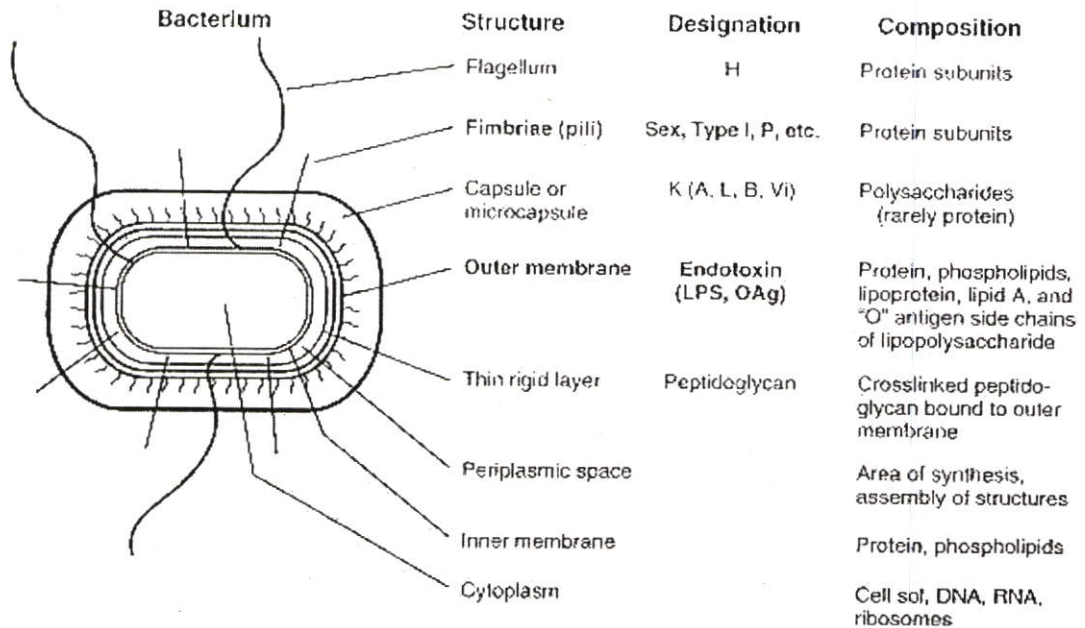
LD (lysine decarboxylase), AD (arginine dihydrolase)

^a *S liquefaciens* group and *S ficaria* have same five reactions shown.

^b *S fonticola*, *S odorifera*, and *S plymuthica* have same five reactions shown.

^c *C amaloneticus* and other *Citrobacter* have same five reactions shown.

ที่มา : <http://www-e.medtools.com>.(15/2/06)



ภาพที่ 2.1 : โครงสร้างและส่วนประกอบของเซลล์เชื้อโคลิฟอร์ม

ที่มา : <http://www-e.medtools.com>.(15/2/06)

2.3 อัตราการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์ม

Hatha และคณะ (1998) ได้ศึกษาปริมาณการพบเชื้อจุลินทรีย์ในวัดตฤคิบทุงกุลาคำ เพื่อแสดงให้เห็นถึงอัตราการปนเปื้อน และการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงต่างๆ โดยเก็บตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อตลอดทั้งปี สรุปผลว่าเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณสูงมากในช่วงหน้าร้อนและหน้าฝน ตั้งแต่เดือน เมษายน - กรกฎาคม ซึ่งช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ รวมถึงมีฝนตก สามารถทำให้เชื้อเกิดการแพร่กระจายตัวไปในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดีด้วย ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 : ปริมาณการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในวัดคูขี้กุ่มภูคำดำในปี 1994 และ 1995

Year & month	Samples analysed	Percent of samples with indicated count levels/gm						<i>Staphylo coccus</i> ^a	<i>E. coli</i>	<i>Salmo nella</i>
		APC			Coliforms					
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²			
1994 Jan	42	43	43	14	0.0	0.0	0.0	13	0.0	0.0
Feb	69	41	49	10	0.0	0.0	0.0	5	1	0.0
Mar	73	59	27	12	1	10	1	1	3	0.0
Apr	70	29	37	33	1	27	0.0	3	9	0.0
May	75	39	43	18	0.0	55	0.0	0.0	7	0.0
Jun	41	22	37	41	0.0	54	0.0	2	3	0.0
Jul	62	26	32	39	3	32	0.0	0.0	0.0	0.0
Aug	73	37	34	21	8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sep	45	38	33	18	11	7	0.0	0.0	0.0	0.0
Oct	86	15	49	19	22	15	1	0.0	1	0.0
Nov	56	20	34	34	12	9	0.0	1	1	0.0
Dec	72	29	42	15	4	3	0.0	3	0.0	0.0
1995 Jan	59	71	22	7	0.0	2	0.0	0.0	2	0.0
Feb	61	51	41	8	0.0	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Mar	47	49	40	11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2
Apr	18	22	50	22	6	0.0	0.0	0.0	6	0.0
May	33	58	39	3	0.0	12	0.0	0.0	0.0	0.0
Jun	13	31	54	15	0.0	8	0.0	0.0	0.0	0.0
Jul	16	50	38	12	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Aug	27	41	37	19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Sep	57	25	39	33	3	7	0.0	1	0.0	0.0
Oct	50	14	36	42	8	4	0.0	0.0	0.0	0.0
Nov	61	10	49	33	8	13	3	0.0	0.0	0.0
Dec	58	28	50	17	5	16	0.0	0.0	2	0.0

^aCoagulase positive staphylococci

ที่มา : Hatha และคณะ (1998)

2.4 การถนอมอาหารโดยใช้ความเย็น (บุหั่นและทักษิณี, 2538)

2.4.1 การให้ความเย็น (Refrigeration) หมายถึง กรรมวิธีการกำจัดความร้อนออกจากสิ่งของหรือพื้นที่ที่ต้องการทำให้เย็นหรือต้องการให้มีอุณหภูมิลดลงซึ่งการทำให้เย็นลงนี้ แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ

- การแช่เย็น (Chilling) หมายถึง การทำให้อุณหภูมิจากสิ่งของนั้นลดลง แต่อยู่เหนือจุดเยือกแข็งของสิ่งนั้น โดยของสิ่งนั้นยังคงสภาพเดิมอยู่ เช่น การแช่เย็นอาหารเป็นการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำลงที่ (-) 1 องศาเซลเซียส แต่ต้องไม่ทำให้น้ำหรือองค์ประกอบในอาหารนั้นแปรสภาพหรือแข็งเป็นน้ำแข็ง

- การแช่แข็ง (Freezing) หมายถึง การทำให้อุณหภูมิจากสิ่งของนั้นลดต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของสิ่งนั้น (-1 ถึง -40° ซ.) การแช่แข็งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพขององค์ประกอบในสิ่งของ เช่นในกรณีที่เป็นอาหาร ความเย็นจัดจะทำให้น้ำในเนื้อเยื่อของอาหารแปรสภาพเป็นน้ำแข็ง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่อาจนำไปใช้ได้ แต่ความเย็นจัดไม่ได้ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ให้ตาย

2.4.2 การถนอมอาหารด้วยความเย็นมีหลายวิธี

1) การใช้น้ำแข็ง ความเย็นของน้ำแข็งที่ใช้ในการแช่อาหารจะลดอุณหภูมิของอาหารได้เร็ว และถ้ามีปริมาณน้ำแข็งเพียงพอก็จะทำให้อาหารนั้นเย็นลงจนอุณหภูมิลดลงใกล้เคียงกับ 0°C .

2) การใช้สารผสมแช่แข็ง การใช้น้ำแข็งผสมเกลือแกงหรือเกลืออนินทรีย์อื่นๆ จะทำให้อุณหภูมิของสารผสมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

3) การใช้น้ำแข็งแห้ง น้ำแข็งแห้งคือคาร์บอน ไดออกไซด์ที่เย็นจนแข็ง มีอุณหภูมิต่ำกว่า (-80) องศาเซลเซียส ใช้ในการเก็บรักษาอาหารที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว เหมาะสำหรับการขนส่งในเวลา 2-3 วัน

4) การใช้ไนโตรเจนเหลว ไนโตรเจนเหลวที่ความดันปกติจะระเหยกลายเป็นไอที่อุณหภูมิต่ำกว่า (-196) องศาเซลเซียส อุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถทำให้อาหารเย็นลงได้อย่างรวดเร็ว และเนื่องจากไนโตรเจนเป็นแก๊สเฉื่อยจึงไม่เป็นอันตรายกับอาหารและผู้บริโภค

5) การใช้เครื่องทำความเย็น เครื่องทำความเย็นที่ใช้กันโดยทั่วไป โดยเฉพาะตามบ้านเรือนคือ ตู้เย็น หรือตู้แช่แข็ง

2.4.3 ชนิดของเครื่องทำความเย็น

1) ระบบคอนแทค (Contact system) ระบบการให้ความเย็นเป็นแบบเพลท (plate) หรือคอนแทค (contact) เครื่องทำความเย็นในระบบนี้มักทำเป็นตู้ ไม่ทำเป็นห้อง ตู้แช่แข็งชนิดนี้เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารบรรจุกล่องที่มีความสูงเท่า ๆ กัน การถ่ายเทความร้อนระหว่างผลิตภัณฑ์กับขวดทำความเย็นเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว อาหารที่แช่แข็งในตู้จึงมีคุณภาพดี

2) ระบบชาร์พ (Sharp system) ประกอบด้วยขวดทำความเย็น ตู้ทำเป็นชั้นสำหรับวางอาหารที่ต้องการแช่แข็งเรียงลงบนถาด แล้วนำไปวางบนชั้นของขวดทำความเย็น การถ่ายเทความร้อนระหว่างอาหารกับขวดทำความเย็นเป็นไปได้ช้าๆ เนื่องจากพื้นที่ผิวสัมผัสมีเพียงด้านเดียว การให้ความเย็นแบบนี้เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน

3) ระบบบลาส (Blast system) ระบบนี้ให้ความเย็นด้วยพัดลม นิยมทำเป็นห้องมีชุดขวดทำความเย็นวางอยู่ด้านหนึ่ง พัดลมทำหน้าที่พัดพาความเย็นไปสู่ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์จะเย็นเร็วแต่ก็มีปัญหาเกี่ยวกับผิวหน้าของอาหารแห้ง เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้นาน ๆ โดยเฉพาะถ้าพัดลมมีความเร็วสูงเกินไป จึงควรป้องกันด้วยการบรรจุอาหารในภาชนะบรรจุ หรือมีการหุ้ม ห่อเรียบร้อยแล้ว

4) ระบบอิมเมอร์ส หรือ ระบบจุ่มแช่ (Immersion system) เป็นการให้ความเย็นด้วยการแช่ผลิตภัณฑ์ลงในของเหลวที่เย็นจัด เครื่องทำความเย็นทำเป็นรูปถัง มีขวดทำความเย็นวางรอบถังของเหลวที่ใช้แช่ผลิตภัณฑ์ ต้องเป็นของเหลวที่มีจุดเยือกแข็งต่ำกว่าอุณหภูมิที่ต้องการ การแช่แข็งวิธีนี้เหมาะสำหรับแช่แข็งสัตว์น้ำที่มีขนาดใหญ่และแช่ทั้งตัว

ในปี 1929 Clarence Birdseye ได้พัฒนาและแนะนำเทคโนโลยีการแช่แข็งอาหารให้เป็นที่รู้จักกันในอุตสาหกรรมอาหาร(Erickson and Hung,1997) ซึ่งกระบวนการแช่แข็งอาหารได้รับความสำเร็จอย่างมาก เนื่องจากสามารถยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้นาน และคงคุณค่าทางโภชนาการไว้ครบถ้วน รวมถึงคงสภาพใกล้เคียงกับของสดมากที่สุดอีกด้วย สำหรับในประเทศไทยผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง (Frozen Products) เริ่มมีการผลิตตั้งแต่ปี พ.ศ.2505 (มัทนา, 2538)

หลักการของวิธีถนอมอาหาร โดยการแช่แข็งมีพื้นฐานมาจากการลดอุณหภูมิเพื่อให้ปฏิกิริยาทางเคมี และทางชีวภาพลดลง รวมถึงยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต การพัฒนาการแช่แข็งในอาหารนั้น เริ่มต้นจากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ คืออุณหภูมิ ซึ่งสามารถส่งเสริมและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นจะเกิดขึ้นเฉพาะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับตัวเองเท่านั้น สามารถแบ่งกลุ่มของจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้ดังนี้

1. Psychrophile หมายถึง จุลินทรีย์ที่ชอบความเย็น เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ (-) 5 ถึง 5 องศาเซลเซียส และเจริญอย่างรวดเร็วที่ 12 - 15 องศาเซลเซียส โดยจุลินทรีย์จำพวกนี้จะไม่ทนความร้อน ตัวอย่างจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Listeria monocytogenes*

2. Mesophile หมายถึง จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิในสภาวะปกติ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส พบว่าจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของอาหารและการเกิดโรคอาหารเป็นพิษส่วนใหญ่มักอยู่ในกลุ่มนี้ ตัวอย่างจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Staphylococcus aureus* , *Salmonella spp.* และ รวมถึงจุลินทรีย์ในกลุ่มของเชื้อ โคลิฟอร์มด้วย

3. Thermophile หมายถึง จุลินทรีย์ที่สามารถทนความร้อนได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์พวกนี้ส่วนใหญ่จะสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ดี ตัวอย่างจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Bacillus cereus*

ในตารางที่ 2.6 แสดงความสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะเห็นว่า อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เชื้อจุลินทรีย์จะใช้เวลาในการเพิ่มจำนวน 30 นาที แต่เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง การเพิ่มจำนวนก็จะใช้เวลานานขึ้นตามไปด้วย เช่น ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เชื้อจุลินทรีย์จะใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเพิ่มขึ้นถึง 40 เท่า หรือ 1200 นาที

ตารางที่ 2.6 : ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับเวลาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Generation time (min)
25	30
20	75
15	120
10	200
5	1200

ที่มา : สุวิมล (2543)

การแช่เยือกแข็งมีผลในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหาร แต่ไม่ใช่เป็นการทำให้อาหารปราศจากเชื้อ (Sterilization) ปริมาณร้อยละของจุลินทรีย์ที่ถูกทำลายในระหว่างการแช่เยือกแข็งจะแตกต่างกันตามปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้อง แต่อย่างน้อยการแช่แข็งจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 50 ถึง 80 ถ้าใช้กระบวนการ Quick freezing process ปัจจัยที่เกี่ยวข้องนอกจากวิธีการแช่เยือกแข็งแล้วยังขึ้นอยู่กับ Substrate (สารที่เอ็นไซม์มีฤทธิ์ต่อ) และความเร็วของการแช่เยือกแข็ง นอกจากนี้ อุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งก็มีผลในการหยุดยั้งหรือทำลายกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ด้วย (มัทนา , 2538)

ความเย็นจะช่วยป้องกันการเจริญและชะลอกิจกรรมเกี่ยวกับเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์ การทำให้อาหารเย็นกว่าปกติจะมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร ซึ่งถ้าลดอุณหภูมิในอาหารให้ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียสจะทำให้จุลินทรีย์บางชนิดไม่เจริญและบางชนิดเจริญได้ช้าลง (สุมาลี ,2527)

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น ไม่เพียงแต่จะถูกขัดขวางด้วยอุณหภูมิที่เย็นจัดเท่านั้น ยังถูกขัดขวางจากการขาดน้ำอีกด้วย เพราะเมื่อเราแช่แข็งอาหารส่วนน้ำนั้นจะกลายเป็นน้ำแข็งไป เอ็นไซม์จะทำงานได้ช้าที่อุณหภูมิแช่แข็ง ทำให้กระบวนการต่างๆที่ทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพหยุดชะงักได้ทั้งหมด (มาลัย, 2539)

2.5 ความสัมพันธ์ของกระบวนการแช่แข็งอาหารกับอัตราการรอดของเชื้อจุลินทรีย์

เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิให้ลดต่ำลงในกระบวนการแช่แข็งนั้นจะส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ดังนี้ (บุษกร, 2545)

1. การทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์ (Catalytic activity of microbial enzyme) ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิลดลง ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลงด้วย โดยเฉพาะเอนไซม์โปรตีนเอสและไลเปสที่ทนความร้อน (Heat - Stable proteinases และ lipases) เอนไซม์ถูกทำลาย โปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ (Denature) และเกิดการตกตะกอน (Coagulate) องค์ประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ หรือ outer membrane ของผนังเซลล์ รวมทั้งเยื่อเซลล์ หรือ inner membrane ได้รับความเจ็บ เส้นสายดีเอ็นเอแตกหัก ribosomal RNA แตกแยกออกจากกัน

2. อุณหภูมิต่ำทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็ง ทำให้อาหารมีปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ได้ลดลง โดย a_w ของอาหารลดลง มีผลทำให้จุลินทรีย์ขาดอาหารและอาจตายได้ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นมีผลทำลายเซลล์ โดยจะไปทิ่มตำเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์และเยื่อเซลล์เกิดการฉีกขาด สารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ จะรั่วไหลออกนอกเซลล์ ในที่สุดจุลินทรีย์จะตาย

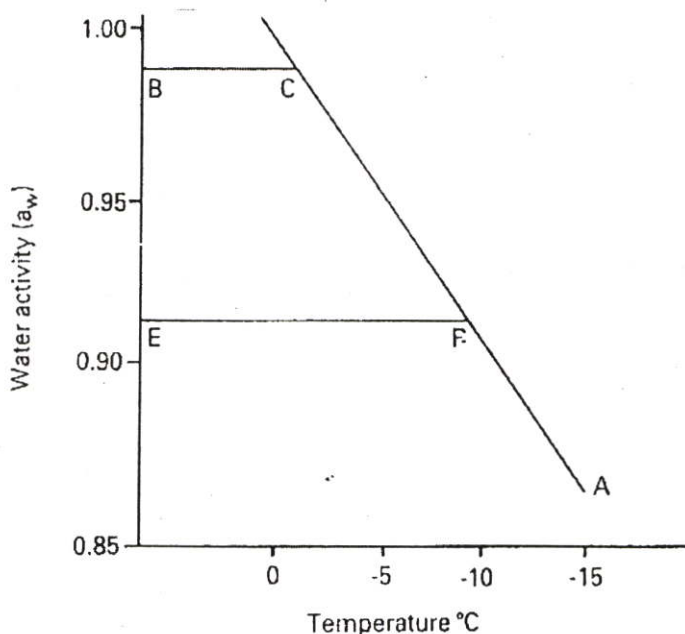
เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะเครียด เช่น การได้รับความเย็น (Freezing) เซลล์บางเซลล์จะยังคงสภาพอยู่ได้ โดยที่บางเซลล์อาจถูกทำลายจนบาดเจ็บหรือตาย ทั้งนี้อันตรายของกระบวนการแช่แข็งที่เกิดขึ้นกับเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดเนื่องมาจาก Thermal cold Shock, Concentration of extracellular solutes, Toxicity of concentrated intracellular solutes และ Cell dehydration เป็นผลทำให้ค่า a_w ลดต่ำลง (Calcott and Macleod, 1974)

การแช่เยือกแข็งมักจะลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ในอาหาร เนื่องจากผลของการทำลาย (Lethal effect) หรือกึ่งทำลาย (Sublethal effect) ก็ได้ โดย Lethal effect นั้นเซลล์หลายเซลล์อาจถูกทำลายได้โดยการแช่เยือกแข็งแต่ไม่ใช่วิธีการทั่วไปที่ใช้ฆ่าเชื้อทั้งหมดในอาหาร

ผลของ Lethal effect เกิดจากการที่โปรตีน หรือเอนไซม์ที่จำเป็นในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเป็นผลจากความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่เพิ่มขึ้นจากเดิมก่อนแช่แข็ง หรือเป็นเพราะสภาพทางกายภาพเกิดความเสียหายเนื่องจากผลึกน้ำแข็ง รวมถึงการให้ความเย็นกับเซลล์อย่างรวดเร็วจากอุณหภูมิที่เหมาะสมจนถึง 0 องศาเซลเซียส ก็อาจทำให้เซลล์ตายได้เฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มเทอร์โมไฟล์และมิโซไฟล์ เรียกกระบวนการนี้ว่าการช็อกด้วยความเย็น (Coldshock) นอกจากนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดเซลล์เกิดการรั่วหรือทำให้การปล่อยสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เกิดความเสียหาย (วรวิฑูริ, 2538)

ในขณะที่ Sublethal effect พบว่าจำนวนของจุลินทรีย์ที่ลดลงนั้นอาจจะไม่ใช่จุลินทรีย์ที่ตายแล้วทั้งหมด แต่จะมีบางเซลล์ที่เกิดความเสียหายเพียงบางส่วนเท่านั้น แต่ถ้าทิ้งระยะเวลาให้นานพอสมควรให้มีการซ่อมแซมความเสียหาย หรือมีการเติมสารอาหารให้เซลล์ ก็อาจจะเจริญต่อไปได้อีก (วราวุฒิ,2538)

การแช่เยือกแข็งไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิที่ลดต่ำลงเท่านั้นยังส่งผลต่อเนื่องกับปัจจัยของการใช้น้ำอิสระหรือที่เรียกว่าค่า a_w คือเมื่อน้ำในเซลล์ได้รับความเย็นจนกลายเป็นน้ำแข็ง ทำให้ปริมาณน้ำในเซลล์ลดต่ำลง หมายความว่าค่า a_w จะลดต่ำลงด้วย ซึ่งค่า a_w ดังกล่าวเป็นอีกปัจจัยหนึ่งของการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นเมื่อค่า a_w ลดต่ำลง เชื้อจุลินทรีย์จึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ทั้งนี้ดังแสดงในภาพที่ 2.2 และ ตารางที่ 2.7



ภาพที่ 2.2 : ผลของ Water activity (a_w) และอุณหภูมิต่อจุดเยือกแข็ง (Freezing Point)

ที่มา : Bald (1991)

ตารางที่ 2.7 : ค่า Water activity (a_w) ของเนื้อที่อุณหภูมิแช่แข็งต่างๆ

Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	a_w
25	0.993
-1	0.990
-3	0.971
-5	0.953
-7	0.934
-9	0.916
-11	0.899
-13	0.881
-15	0.864
-17	0.847
-19	0.831
-21	0.815
-25	0.784
-30	0.746

ที่มา : Singhal and Kulkarni (1999)

2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำลายจุลินทรีย์ในอาหารแช่เยือกแข็ง

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำลายจุลินทรีย์ในอาหารแช่เยือกแข็งนั้นประกอบด้วย ชนิดของแบคทีเรียแกรมลบหรือแกรมบวก อายุและช่วงเวลาการเจริญเติบโต สภาวะแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโต ลักษณะจำเพาะของอาหาร รูปแบบและอุณหภูมิในการแช่แข็ง ระยะเวลาในการจัดเก็บในสภาพแช่แข็ง ซึ่งในแต่ละปัจจัยนั้นส่งผลให้เกิดการทำลายจุลินทรีย์ในกระบวนการแช่แข็งมากหรือน้อยต่างกันในรายละเอียดดังต่อไปนี้ (Erickson and Hung, 1997)

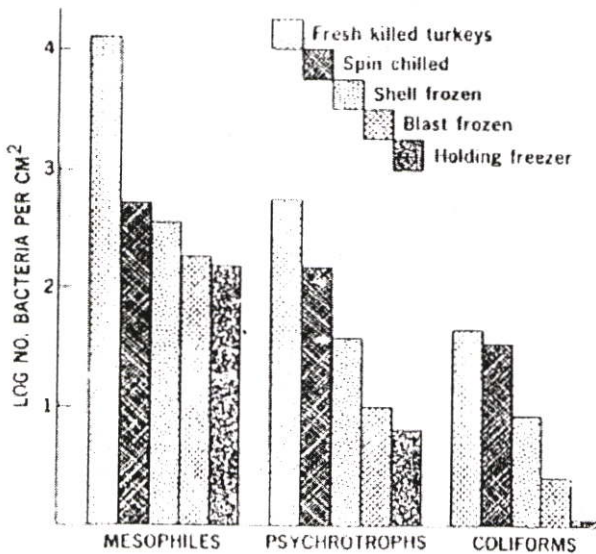
2.6.1 ชนิดของจุลินทรีย์และภาวะในขณะนั้น (The kind of microorganism and its state)

แบคทีเรียที่กำลังอยู่ในสภาวะสร้างสปอร์หรืออยู่ในลักษณะเป็นเซลล์ปกติ (Vegetative cell) และคาดกันว่าถ้าแบคทีเรียกำลังอยู่ในระยะแบ่งเซลล์ (logarithmic phase or exponential growth phase) จะถูกทำลายได้ง่ายกว่าระยะอื่นๆ โดยเฉพาะถ้าแบคทีเรียสร้างสปอร์จะมีความทนทานมากกว่าพวก Vegetative cells จากข้อมูลซึ่งมีผู้ทดลองแช่แข็งอาหารที่ -70°C องศาเซลเซียสภายในเวลาน้อยกว่า 15 วินาที พบสปอร์ของแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* และเซลล์แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ยังมีชีวิตอยู่ในขณะที่เซลล์ของพวก *E. coli* รอดอยู่ได้ร้อยละ 70 และ *Pseudomonas aeruginosa* รอดเพียงร้อยละ 20 ส่วนพวกเซลล์ของยีสต์ถูกทำลายเป็นจำนวนมากในขณะที่สปอร์ของเชื้อรามีความทนทานปานกลางต่ออุณหภูมิแช่เยือกแข็ง (มัทนา, 2538)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะทนต่ออุณหภูมิแช่เยือกแข็งได้แตกต่างกัน โดยพบว่า (บุญกร ,2545)

- แบคทีเรียแกรมบวกจะทนต่อการแช่แข็งได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน
- ในระหว่างการแช่เยือกแข็งอาหารพบว่าจุลินทรีย์ในอาหารจะค่อยๆ ลดลงโดยแบคทีเรียแกรมบวกจะรอดชีวิตมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ
- แบคทีเรียแกรมบวกจะทนต่อการแช่เยือกแข็งได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยทนการแช่เยือกแข็งสลับการละลายน้ำแข็งการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในที่เย็นจัดจะมีมากกว่าในที่แช่เยือกแข็ง
- การแช่เยือกแข็งสามารถทำลายเชื้อ *Yersinia enterocolitica* ได้มากกว่าการฉายรังสี
- เซลล์จุลินทรีย์ที่มีไข่เชื้อในกลุ่มไซโครฟายล์ เมื่ออยู่ในที่มีอุณหภูมิต่ำ เช่น การแช่เย็นเชื้อจะเติบโตช้าลง หรือแม้จะเป็นเชื้อไซโครฟายล์ก็ตาม หากอยู่ในอาหารแช่เยือกแข็งที่มีอุณหภูมิต่ำมาก เซลล์จะได้รับบาดเจ็บหรือตาย เซลล์ที่บาดเจ็บอาจสามารถซ่อมแซมตัวเองใหม่ได้ ส่วนเซลล์ที่ตายไปแล้วไม่มีโอกาสจะฟื้นหรือซ่อมแซมตัวเองได้อีก

ในภาพที่ 2.3 แสดงถึงชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในไก่วงสดที่นำเครื่องในออกแล้วแช่เย็นและแช่แข็ง ซึ่งจะเห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่มของโคลิฟอร์มมีการลดจำนวนลงมากเมื่อผ่านการแช่แข็งและการเก็บรักษาไว้ในสภาพแช่แข็ง สำหรับตารางที่ 2.8 แสดงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน ผลจากการทดลองจะเห็นว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแกรมลบจะมีความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำน้อยกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ



ภาพที่ 2.3 : ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในไก่วงสดที่นำเครื่องในออกแล้วแช่เย็นและแช่แข็ง

ที่มา : Kraft (1992)

ตารางที่ 2.8 : การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ

Storage temperature °C	Storage period (weeks)			
	2	4	8	12
+5	Gm -	spoiled	-	-
+2	Gm -	Gm -	spoiled	-
0	Gm- and Gm+	Gm - and Gm+	Gm- and Gm+	-
-2 (aw =0.98)	Gm+,Gm - and Y	Gm+,Gm - and Y	Y	Y and M
-5 (aw =0.95)	Gm+ and Gm -	Gm+, Gm -, Y and M	Y	Y and M
-7/-8 (aw =0.92)	Gm+,Gm - and Y	Gm+, Gm -, Y and M	Y and M	Y and M

Gm+ = Gram positive species

Gm- = Gram negative species

Y = Yeasts

M = Moulds

Notes

Yeast detectable in -3 dilution, if not overgrown

Freezing point of meat -5°C to -8 °C

ที่มา : Bald (1991)

2.6.2 วิธีการแช่แข็ง (Freezing methods)

อาหารที่ถูกแช่แข็งแบบเร็วและแบบช้ามีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน การแช่แข็งแบบเร็ว (Quick freezing) จะสามารถลดอุณหภูมิของอาหารลงไปที่ (-)20 องศาเซลเซียส ได้ภายในเวลา 15-30 นาที แต่สำหรับการแช่แข็งแบบช้า (Slow freezing) จะใช้เวลาถึง 3 - 72 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของอาหารที่ทำการแช่แข็งด้วย

Brown (1999) กล่าวว่า การแช่แข็งแบบเร็ว (Quick freezing) สามารถลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ลงไปได้ถึง 50 องศาเซลเซียส ต่อชั่วโมง และการแช่แข็งแบบช้า (Slow freezing) สามารถลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ลงไปได้เพียง 1 - 10 องศาเซลเซียส ต่อชั่วโมงเท่านั้น

ระบบทำความเย็นมีหลายประเภทแตกต่างกันออกไป การเลือกใช้ต้องคำนึงถึง ประเภทและลักษณะของอาหาร ต้นทุนการผลิต รวมไปถึงระดับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ในปัจจุบันระบบทำความเย็นมีรูปแบบต่างๆ ดังนี้

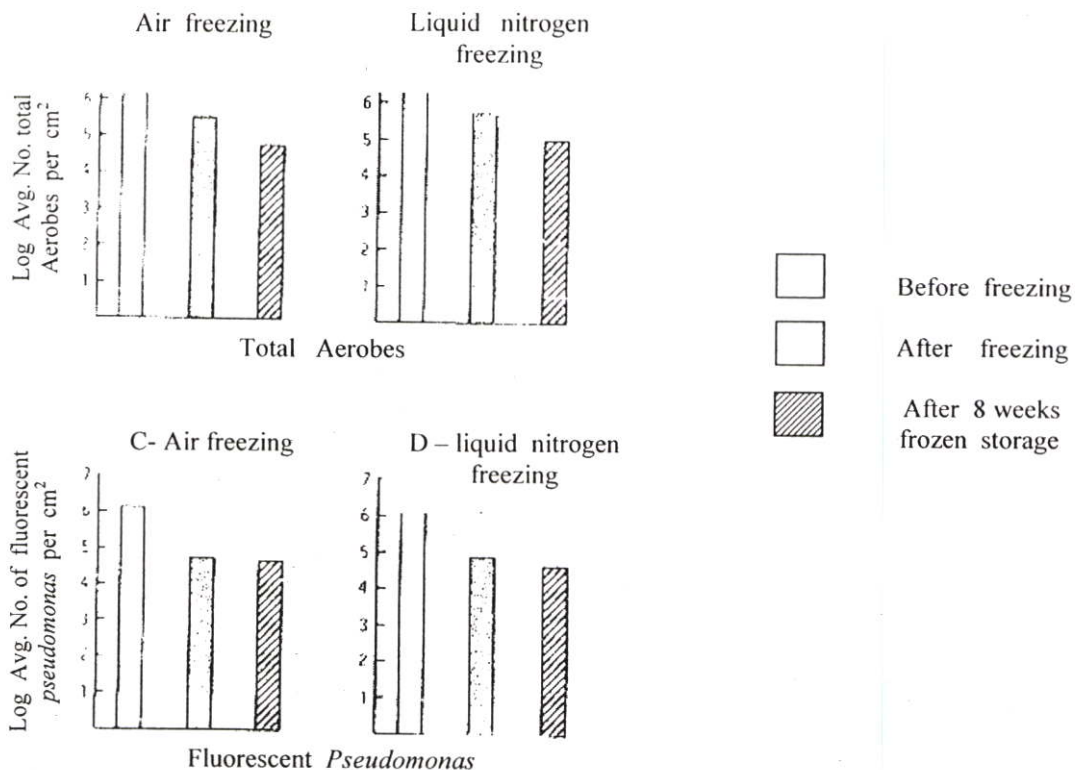
1) ระบบคอนแทค (Contact system) ระบบการให้ความเย็นเป็นแบบเพลท (plate) หรือคอนแทค (contact) เครื่องทำความเย็นในระบบนี้มักทำเป็นตู้ไม่ทำเป็นห้อง ตู้แช่แข็งชนิดนี้เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารบรรจุกล่องที่มีความสูงเท่า ๆ กัน การถ่ายเทความร้อนระหว่างผลิตภัณฑ์กับชุดทำความเย็นเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว อาหารที่แช่แข็งในตู้นี้จึงมีคุณภาพดี

2) ระบบชาร์พ (Sharp system) ประกอบด้วยขดท่อทำความเย็น ผู้ทำเป็นชั้นสำหรับอาหารที่ต้องการแช่แข็งเรียงบนถาด แล้วนำไปวางบนชั้นของขดท่อทำความเย็น การถ่ายเทความร้อนระหว่างอาหารกับขดท่อทำความเย็นเป็นไปอย่างช้าๆ เนื่องจากพื้นที่ผิวสัมผัสมีเพียงด้านเดียว การให้ความเย็นแบบนี้เหมาะสำหรับผลิตภัณฑ์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน

3) ระบบบลาส (Blast system) ระบบนี้ให้ความเย็นด้วยพัดลมจึงนิยมทำเป็นห้อง มีชุดขดท่อทำความเย็นวางอยู่ด้านหนึ่ง พัดลมทำหน้าที่พัดพาความเย็นไปสู่ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์จะเย็นเร็วแต่ก็มีปัญหาเกี่ยวกับผิวหน้าของอาหารแห้งเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้นานๆ โดยเฉพาะถ้าพัดลมมีความเร็วสูงเกินไป จึงควรป้องกันด้วยการบรรจุอาหารในภาชนะบรรจุ หรือมีการหุ้มท่อระบาย

4) ระบบอิมเมอร์ส หรือ ระบบจุ่มแช่ (Immersion system) เป็นการให้ความเย็นด้วยการแช่ผลิตภัณฑ์ลงในของเหลวที่เย็นจัด เครื่องทำความเย็นทำเป็นรูปถังมีขดท่อทำความเย็นวางรอบถังของเหลวที่ใช้แช่ผลิตภัณฑ์ต้องเป็นของเหลวที่มีจุดเยือกแข็งต่ำกว่าอุณหภูมิที่ต้องการ การแช่แข็งวิธีนี้เหมาะสำหรับแช่แข็งสัตว์น้ำที่มีขนาดใหญ่และแช่ทั้งตัว

อย่างไรก็ตามการแช่แข็งในแต่ละวิธีนั้นล้วนสามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์ลดลง ดังการทดลองของ Kraft (1992) ในภาพที่ 2.4 แสดงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในตัวอย่างเนื้อที่แช่แข็งด้วยวิธีที่แตกต่างกัน สรุปได้ว่าการแช่แข็งทั้งแบบ Air freezing และ Liquid nitrogen freezing ทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อ *Pseudomonas* sp. ลดปริมาณลงหลังจากผ่านการแช่แข็งและลดลงมากขึ้น ในขณะที่เก็บไว้ในสภาวะแช่แข็ง ส่วนตารางที่ 2.9 แสดงการเปรียบเทียบข้อดี - ข้อเสียของการแช่แข็งแบบเร็ว (Quick freezing) และแบบช้า (Slow freezing)



ภาพที่ 2.4 : จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อ *Pseudomonas* sp. ในตัวอย่างเนื้อที่แช่แข็งด้วยวิธีที่แตกต่างกัน

ที่มา : Kraft (1992)

ตารางที่ 2.9 : การเปรียบเทียบข้อดี- ข้อเสียของการแช่แข็งแบบเร็ว (Quick or fast freezing) และแบบช้า(Slow Freezing)

Quick freezing	Slow freezing
<i>Advantages</i>	<i>Disadvantages</i>
Small ice crystals are formed	Large ice crystals are formed
Metabolism is blocked or formed	Breakdown of metabolic rapport
Brief exposure of microorganisms to concentration of adverse constituents	Longer exposure of microorganisms to concentration of adverse constituents
<i>Disadvantages</i>	<i>Advantages</i>
No adaptation to low temperature	Gradual adaptation to reduced temperature
Cold shock from rapid transition	No cold shock effect
No protective effect	Protective effect from accumulation of concentration solutes

ที่มา : Erickson and Hung (1997)

2.6.3 อุณหภูมิระหว่างการผลิตและการเก็บรักษา (The temperature during freezing and storage)

เชื้อจุลินทรีย์จะตายอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการแช่แข็งที่อุณหภูมิ (-)1 ถึง (-)5 องศาเซลเซียส ดังนั้นในกระบวนการผลิตอาหารแช่เยือกแข็ง ระดับของการทำลายจะสูงสุดเมื่ออาหารเริ่มแข็งตัวและถ้า Freezing process ใช้เวลานานเชื้อจุลินทรีย์จะถูกฆ่าตายมากขึ้น แต่ถ้า Freezing process ใช้เวลาสั้นเชื้อจุลินทรีย์ก็จะรอดตายมากขึ้นด้วย โดยปกติถ้าทำให้อาหารเย็นจัดอย่างรวดเร็วกลไกต่างๆของจุลินทรีย์จะหยุดทันที การทำอาหารให้เย็นจัดช้าๆมีผลในการทำลายสูงแต่อาหารจะเสื่อมคุณภาพมากกว่า แต่หากอาหารผ่านจุดวิกฤติ (Critical zone) ได้เร็วมากเท่าไรอาหารจะมีลักษณะสด และ คุณภาพดี

2.6.4 ระยะเวลาในการเก็บอาหารแช่เยือกแข็ง (The time of storage in the frozen condition)

จำนวนของเชื้อจุลินทรีย์จะลดลง ถ้าเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นานขึ้น แต่เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดจะมีชีวิตอยู่ได้หลังจากเก็บอาหารไว้หลาย ๆ ปี การตายของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับการทำให้อออดอาหารตาย (starvation)

2.6.5 ชนิดของอาหาร (The kind of food)

ส่วนประกอบของอาหารมีอิทธิพลต่ออัตราการตายของเชื้อจุลินทรีย์ ระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาอาหารแช่เยือกแข็ง พบว่าน้ำตาล เกลือไขมันและสารเจือปนอื่นๆ อาจทำหน้าที่ในการป้องกัน แต่ถ้าความชื้นสูง และ ค่า pH ต่ำจะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในค่า pH ที่เป็นกลาง หรือค่อนข้างเป็นด่างเล็กน้อย เมื่อนำอาหารไปแช่แข็งส่วนที่เป็นน้ำ หรือส่วนที่มีความชื้นสูงจะเป็นน้ำแข็ง ทำให้ solute เพิ่มมากขึ้น pH จึงเริ่มเปลี่ยนเมื่อค่าลงจะมีฤทธิ์เป็นกรด สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ เช่นในตารางที่ 2.10 แสดงถึงการตายและการบาดเจ็บของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในสารละลายต่างๆ ที่มีผลต่อความทนทานของเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 2.10 : การตายและการบาดเจ็บของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในสารละลายต่างๆ ที่มีผลต่อความทนทานของเชื้อจุลินทรีย์

Suspending fluid	Additive (%)	Dead cell (% of initial population) after frozen storage			Injured cells (% of remaining viable population) after frozen storage		
		1 day	4 weeks	20 weeks	1 day	4 weeks	20 weeks
Phosphate buffer (PB)	--	55	88	95	65	78	90
PB + glycerol	2	10	14	4	31	20	29
	4	0	0	0	23	12	12
PB + milk fat	2	3	85	100	12	61	--
	4	17	83	100	0	34	--
PB + lactose	2	15	88	98	14	22	67
	4	25	36	85	5	42	54
PB + casein	2	10	29	72	15	44	73

ที่มา : Erickson and Hung (1997)

อรัญ (2518) ได้ทำการศึกษาปริมาณของเชื้อ โคลิฟอร์มและ *E.coli* ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตกึ่งอุตสาหกรรมแช่แข็ง โดยการเก็บตัวอย่างกึ่งในแต่ละกระบวนการผลิตเริ่มตั้งแต่รับวัตถุดิบเข้าโรงงาน ก่อนเค็ดหัว หลังคัดขนาดและสภาพ ก่อนการแช่แข็ง และ หลังการแช่แข็ง มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 2.11 พบว่าในวัตถุดิบรับเข้าโรงงานมีปริมาณการปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์มสูงมากและมีการพบเชื้อ *E.coli* แต่เมื่อผ่านกระบวนการผลิตต่างๆ มีบางกระบวนการที่ทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้น อาจเนื่องมาจากการควบคุมสุขลักษณะการผลิตที่ไม่เพียงพอต่อการควบคุมการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามมีบางกระบวนการที่ทำให้ปริมาณเชื้อลดลง ได้แก่ กระบวนการแช่แข็ง ในการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มและ *E.coli* ลดลงเมื่อผ่านกระบวนการดังกล่าว

ตารางที่ 2.11 : ปริมาณของเชื้อ โคลิฟอร์มและ *E.coli* ที่ตรวจพบในแต่ละกระบวนการผลิตกุ้ง
กุลาคำแช่แข็ง

Shrimp sample at different processing step	Most probable number / g	
	Coliforms	<i>Escherichia coli</i>
raw whole material	> 1100	9
after deheading	> 1100	28
after grading	460	9
before freezing	> 1100	9
after freezing	460	0

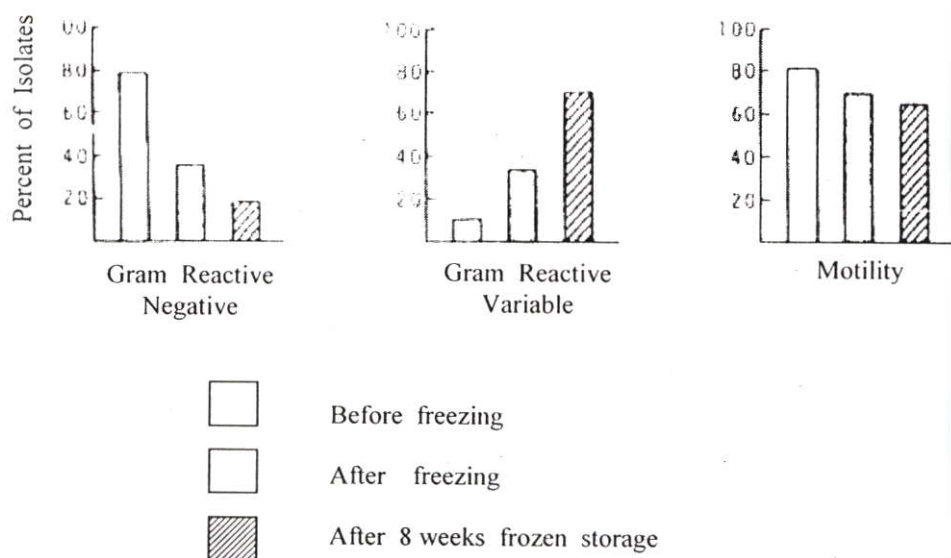
ที่มา : อรัญ(2518)

2.7 ความทนทานของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง

การนำอาหารที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง ที่ต่ำกว่า (-) 20 องศาเซลเซียส จะทำให้จุลินทรีย์ที่ยังรอดชีวิตอยู่ถูกทำลายและอยู่ในสภาพบาดเจ็บมากยิ่งขึ้น จนทำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวตายลงได้ในระหว่างการเก็บรักษา

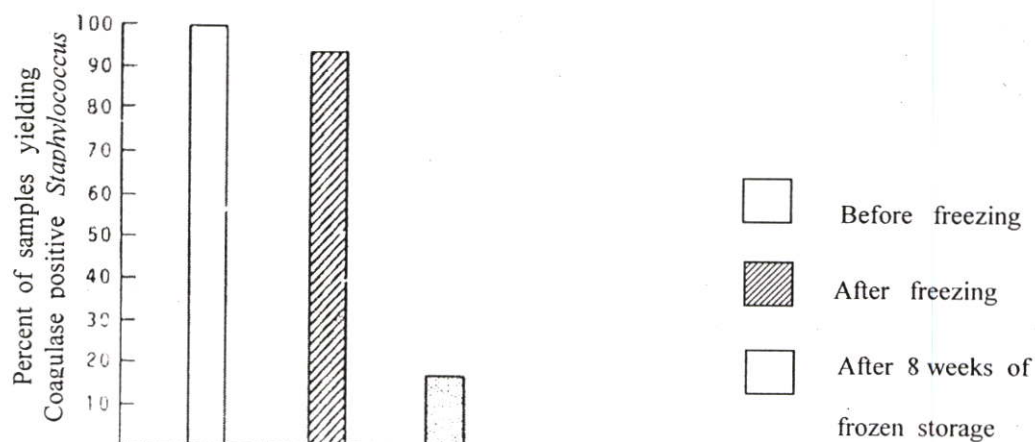
Kraft (1992) พบว่า เชื้อในกลุ่ม Gram negative bacteria นั้นมีความต้านทานต่อการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งต่ำกว่าเชื้อในกลุ่มอื่น ๆ ตามภาพที่ 2.6 ในกรณีของการแช่แข็งและเก็บรักษาเชื้อ *Staphylococcus* sp. พบว่าการแช่แข็งทำให้ปริมาณเชื้อลดลงก่อนการแช่แข็ง เพียง 10 % แต่การเก็บรักษาไว้หลังจากการแช่แข็งในสภาวะแช่แข็งที่ (-) 29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์นั้น ทำให้ปริมาณเชื้อลดลงไปถึง 80 % ตามภาพที่ 2.7

Singhal and Kulkarni (1999) ได้ทดลองแยกเชื้อ *Salmonella* spp. จากผลิตภัณฑ์ไก่ ที่เก็บรักษาไว้ที่ (-) 25.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0- 270 วัน ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกัน กล่าวคือ ปริมาณของเชื้อลดลงจากปริมาณเชื้อตั้งต้นอย่างมาก ดังแสดงในตารางที่ 2.12



ภาพที่ 2.5 : ปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ก่อนการแช่แข็ง หลังการแช่แข็ง และหลังจากเก็บไว้ในสภาพแช่แข็ง

ที่มา : Kraft (1992)



ภาพที่ 2.6 : ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* sp. ก่อนการแช่แข็ง หลังจากแช่แข็ง และหลังเก็บในสภาพแช่แข็ง

ที่มา : Erickson and Hung (1997)

ตารางที่ 2.12 : ปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อไก่ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 25.5 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างๆ

Organism	Bacterial count (10^5 /g) after storage for (days)								
	0	2	5	9	14	28	50	92	270
<i>Salmonella Newington</i>	7.5	56.0	27.0	21.7	11.1	11.1	3.2	5.0	2.2
<i>S.typhimurium</i>	167.0	245.0	134.0	118.0	11.0	95.5	31.0	90.0	34.0
<i>S.typhi</i>	128.5	45.5	21.8	17.3	10.6	4.5	2.6	2.3	0.86
<i>S.gallinarum</i>	68.5	87.0	45.0	36.5	29.0	17.9	14.9	8.3	4.8
<i>S.anatum</i>	100.0	79.0	55.0	52.5	33.5	29.4	22.6	16.2	4.2
<i>S.paratyphi B</i>	23.0	205.0	118.0	93.0	92.0	42.8	23.3	38.8	19.0

ที่มา : Singhal and Kulkarni (1999)

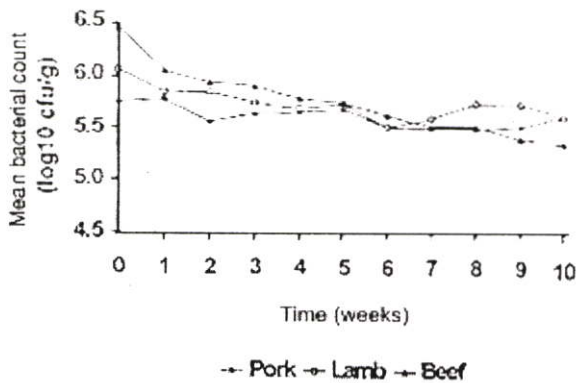
อรัญ (2518) ได้ทำการทดลองเก็บกึ่งกูลาค้าแช่แข็งในห้องเย็นควบคุมอุณหภูมิ (-) 18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 14 28 42 56 และ 70 วัน แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม และ *E.coli* ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2.13 พบว่าปริมาณของเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาเก็บที่นานขึ้น จึงแสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งนั้นเป็นอีกกระบวนการหนึ่งที่สามารถทำให้เชื้อลดปริมาณลงได้

ตารางที่ 2.13 : แสดงปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์ม และ *E.coli* ของตัวอย่างกึ่งระหว่างกาเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งตามระยะเวลาต่างๆ

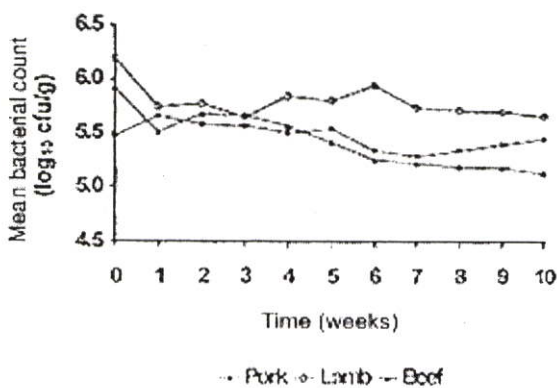
Storage time at (-)18 °C	Most probable number / g	
	Coliforms	<i>Escherichia coli</i>
1 day	460	0
14 day	93	9
28 day	75	14
42 day	240	0
56 day	43	0
70 day	23	9

ที่มา : อรัญ (2518)

จากการทดลองของ Sheridan (1997) พบว่าการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งของเนื้อสัตว์ 3 ชนิดได้แก่ เนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อแกะ ที่อุณหภูมิ (-) 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ทำให้เชื้อ *Salmonella kentucky* และ *Staphylococcus aureus* ลดปริมาณ 1-1.5 log₁₀ CFU/g ตามผลการทดลองในภาพที่ 2.7 และ 2.8



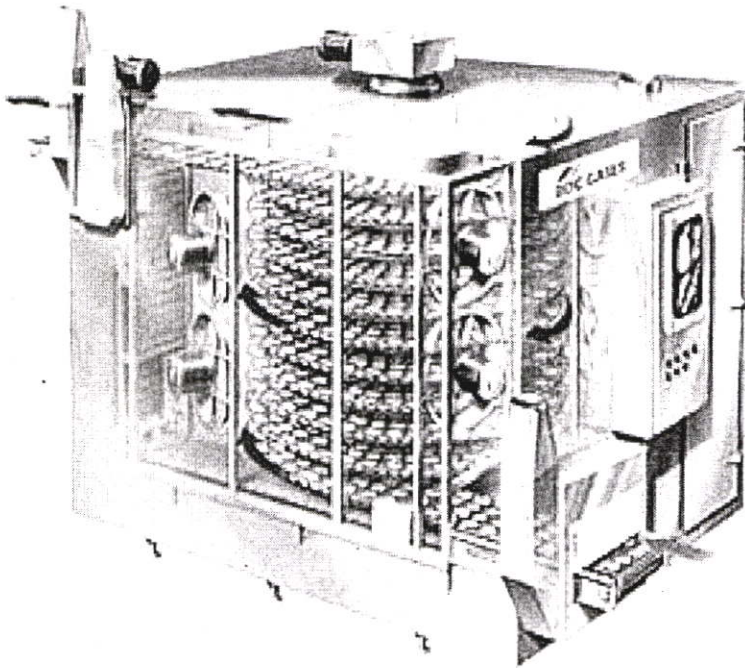
ภาพที่ 2.7 : ผลของการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งต่อการลดจำนวนของเชื้อ *Salmonella kentucky* ในเนื้อวัว, เนื้อหมู และ เนื้อแกะ
ที่มา : Sheridan (1997)



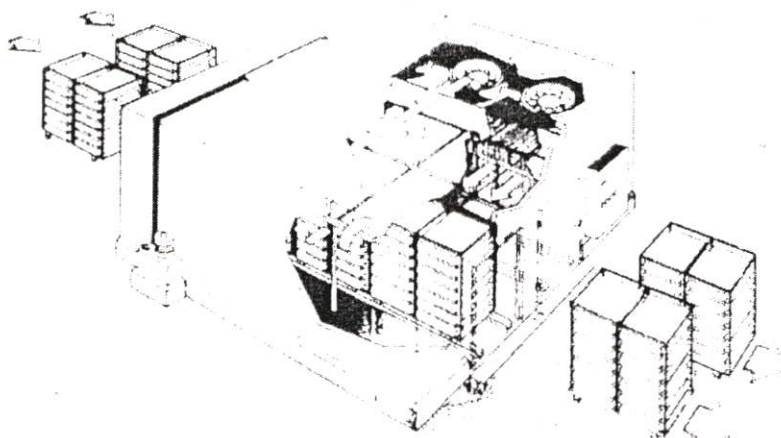
ภาพที่ 2.8 : ผลของการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งต่อการลดจำนวนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อวัว, เนื้อหมู และ เนื้อแกะ
ที่มา : Sheridan (1997)

2.8 การแช่แข็งแบบใช้อากาศเย็น (Air - blast freezer)

ระบบการแช่แข็งแบบแอร์บลาส (Air - blast freezer) ระบบนี้ใช้หลักการให้ความเย็นด้วยพัดลมเป่าลมเย็นออกมา ซึ่งการติดตั้งนิยมทำเป็นห้อง มีชุดขดท่อทำความเย็นวางอยู่ด้านหนึ่ง พัดลมทำหน้าที่พัดพาความเย็นไปสู่ผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์จะเย็นเร็วแต่ก็มีปัญหาเกี่ยวกับผิวหน้าของอาหารแห้ง เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้นานๆ โดยเฉพาะถ้าใช้พัดลมมีความเร็วลมสูงเกินไป จึงควรป้องกันด้วยการบรรจุอาหารในภาชนะบรรจุ หรือมีการหุ้มห่อเรียบร้อยแล้ว สำหรับภาพที่ 2.9 และ 2.10 แสดงลักษณะของเครื่องแช่แข็งแบบแอร์บลาส



ภาพที่ 2.9 : เครื่องแช่แข็งแบบแอร์บลาสในลักษณะที่เป็นสายพานลำเลียง
ที่มา : Erickson and Hung (1997)



ภาพที่ 2.10 : เครื่องแซ่แข็งแบบแอร์บลาสในลักษณะที่เป็นห้องและมีชั้นวางบนรางลำเลียง
ที่มา : Bald (1991)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุดิบ

3.1.1 ปลาหมึกกระดองสด

ใช้ปลาหมึกกระดองสดที่ได้มาจากการแปรรูปในโรงงานอาหารแช่เยือกแข็ง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารรับประทานดิบตามแบบของประเทศญี่ปุ่น โดยก่อนนำมาในการทดลองใช้ต้องทำให้ปราศจากเชื้อโคลิฟอร์ม

3.2 อุปกรณ์การทดลอง

3.2.1 ห้องแช่แข็งแบบใช้อากาศเย็น

3.2.2	Water Bath Memmert อุณหภูมิ $45.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$	รุ่น WB /OB 22	เยอรมันนี
3.2.3	Incubator Memmert อุณหภูมิ $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$	รุ่น BE400	เยอรมันนี
3.2.4	Stomacher ความเร็ว 250 รอบต่อนาที	รุ่น 1 IUL 0400	อเมริกา
3.2.5	Vortex Genie 2	รุ่น 1SCI G560E	จีน
3.2.6	pH Meter ORION	รุ่น Model 91-20	อเมริกา
3.2.7	Hot Air Oven Memmert อุณหภูมิ $170 \pm 5^{\circ}\text{C}$	รุ่น UM500	เยอรมันนี
3.2.8	Autoclave Hirayama	รุ่น 1HIRHA300D	ญี่ปุ่น
3.2.9	Loop Platinum – Iridium or Nickel – Chromium diameter 3 mm		
3.2.10	Petridish 16 mm x 160 mm		
3.2.11	Total Delivery Pipettes Capacities 1 และ 10 มิลลิลิตร		

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 3.3.1 Chromocult Coliform Agar (CCA) จากบริษัท Merck
- 3.3.2 Nutrient Agar (NA) จากบริษัท Merck
- 3.3.3 Trypticase Soy Broth (TSB) จากบริษัท Merck

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

3.4.1 บริษัทสุรพลฟู๊ดส์ จำกัด (มหาชน) สาขาการบินบุรี

3.4.2 ห้องปฏิบัติการทดสอบบริษัทสุรพลฟู๊ดส์ จำกัด (มหาชน) สาขาการบินบุรี

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์มในกระบวนการผลิตปลาหมึกกระดองสดแช่แข็ง

3.5.1.1 สุ่มตัวอย่างวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าในโรงงานมาทำการตรวจสอบเชื้อโคลิฟอร์มด้วยวิธี Rapid Method โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform Agar จากบริษัท Merck โดยเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นระยะเวลา 12 เดือน

3.5.1.2 นำผลการตรวจมาวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่ใช้ศึกษาทดลอง โดยอาศัยสถิติการหาค่ามากที่สุด (Maximum) ค่ากลาง (Medium) และค่าน้อยที่สุด (Minimum)

3.5.2 การศึกษาสายพันธุ์เชื้อโคลิฟอร์มที่ใช้ในการทดลอง

3.5.2.1 เก็บเชื้อโคลิฟอร์มจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform Agar จากบริษัท Merck ที่ให้ผลบวก (โคโลนีเป็นสีชมพู) โดย Streak ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

3.5.2.2 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีลักษณะกลมแบนใหญ่ ขนาดใกล้เคียงกัน 3 โคโลนี และนำมา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA โดยแต่ละโคโลนีให้แยกคนละจาน

3.5.2.3 ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.5.2.2 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

3.5.2.4 เชื้อเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA Slant และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่งไปตรวจวินิจฉัยเพื่อจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.5.3 การเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่ใช้ในการทดลอง

3.5.3.1 ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ใช้ในการทดลองเป็นตัวอย่างที่เก็บจากกระบวนการผลิตจริงในขั้นตอนหลังเรียงใส่ ถาดโฟมพร้อมจะนำไปแช่แข็ง ในภาพที่ 3.1 (ก) คือตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ผ่านกระบวนการผลิต และภาพที่ 3.1 (ข) แสดงลักษณะชิ้นของตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ใช้ในการทดลอง



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3.1 : ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดโดยที่ (ก) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ผ่านกระบวนการผลิต (ข) ลักษณะชิ้นของตัวอย่างปลาหมึกกระดองสด

3.5.3.2 นำตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดมาทำให้ปราศจากเชื้อโคลิฟอร์มโดยการล้างด้วยน้ำคลอรีนความเข้มข้น 50 PPM 2 ครั้ง (ภาพที่ 3.2 ก ข) และล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 3 ครั้ง (ภาพที่ 3.2 ค) เก็บตัวอย่างหลังจากการล้างไปตรวจยืนยันว่าปราศจากเชื้อจริงโดยการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์รวมและเชื้อโคลิฟอร์ม และส่งตัวอย่างไปตรวจสอบสารคลอรีนตกค้างเพื่อทวนสอบการตกค้างของสารคลอรีนในตัวอย่างที่ใช้ทดลอง ทั้งนี้ลักษณะของปลาหมึกกระดองสดหลังจากการล้างแสดงอยู่ในภาพที่ 3.2 ง



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 3.2 : การล้างปลาหมึกกระดองสดให้ปราศจากเชื้อโคลิฟอร์ม

(ก) ปลาหมึกกระดองสดในน้ำคลอรีนความเข้มข้น 50 PPM

(ข) การล้างปลาหมึกกระดองสดในน้ำคลอรีนความเข้มข้น 50 PPM

(ค) การล้างปลาหมึกกระดองสดในน้ำสะอาด

(ง) ปลาหมึกกระดองสดหลังล้าง

3.5.3.3 นำตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ล้างทำความสะอาดแล้ว 3 ชั้น ชั้นละ ประมาณ 8-9 กรัม ทั้งหมด 3 ชั้น วางบนถาดโฟม แล้วเติมเชื้อมาตรฐานให้ได้ความเข้มข้นในระดับ $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ลงในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดทั้ง 3 ชั้น ภาพที่ 3.3 (ก) ถึง (จ) แสดงขั้นตอนการถ่ายเชื้อโคลิฟอร์มลงในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดก่อนแช่แข็ง



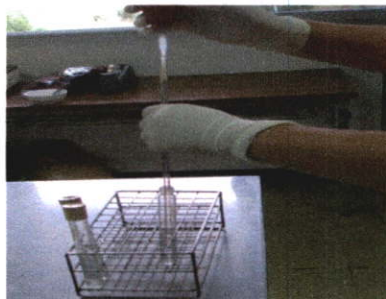
(ก)



(ข)



(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 3.3 : แสดงขั้นตอนการถ่ายเชื้อโคลิฟอร์มลงในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดก่อนแช่แข็ง

(ก) อุปกรณ์การเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ปนเปื้อนเชื้อโคลิฟอร์ม

(ข) การตัดตัวอย่าง ในการเตรียมตัวอย่างทดลองก่อนนำไปแช่แข็ง

(ค) การชั่งตัวอย่าง ในการเตรียมตัวอย่างทดลองก่อนนำไปแช่แข็ง

(ง) การเตรียมเชื้อโคลิฟอร์มในแต่ละความเข้มข้นเพื่อใช้เติมบนตัวอย่างทดลอง

(จ) การเติมเชื้อโคลิฟอร์มลงในตัวอย่างปลาหมึกกระดอง

(ฉ) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ผ่านการเติมเชื้อโคลิฟอร์ม

3.5.3.4 นำธาตุโพรที่บรรจุตัวอย่างแล้ว ใส่ในถุงพลาสติก และนำไปปิดปากถุงด้วยเครื่องปิดผนึก ลักษณะของตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดในถุงพลาสติกก่อนการแช่แข็งแสดงอยู่ในภาพที่ 3.4(ก) ส่วนภาพที่ 3.4(ข) เป็นลักษณะของตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดภายหลังการแช่แข็ง



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3.4 : ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดในถุงพลาสติก

(ก) ลักษณะของตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดในถุงพลาสติกก่อนการแช่แข็ง

(ข) ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดภายหลังการแช่แข็ง

3.5.4 การศึกษาระยะเวลาการบ่มที่เหมาะสมของการตรวจหาเชื้อ *P. agglomerans* ที่ขาดเจ็บหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง และการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง

เตรียมสารละลายเชื้อ *P. agglomerans* (ภาคผนวก ก) ที่มีปริมาณเชื้อ $3 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$, $4 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ ในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดไปแช่แข็งในห้องแช่แข็งแบบอากาศเย็นที่อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียสและนำไปเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งในห้องเย็นอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน สภาวะละ 5 หลอด จากนั้นทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่เหลือรอดโดยวิธี Spread plate technique โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform Agar โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy broth เป็นอาหารที่ใช้ในการ pre-enrichment และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ทำการตรวจนับเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งและการเก็บรักษาในแต่สภาวะภายหลังการบ่มดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 : ระยะเวลาในการบ่มเชื้อ *P. agglomerans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายหลังจากการทดลองในสภาวะต่างๆ

สภาวะการทดลอง	ปริมาณเชื้อ ($\text{Log}_{10} \text{CFU/g}$)	ระยะเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 35°C
ก่อนแช่แข็ง	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
หลังแช่แข็ง	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
เก็บ 1 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
เก็บ 3 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
เก็บ 5 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
เก็บ 7 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
เก็บ 9 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
เก็บ 11 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
เก็บ 14 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12
เก็บ 21 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12 14 16
เก็บ 30 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12 14 16
เก็บ 60 วัน	3 4 5	0 2 4 6 8 10 12 14 16

3.5.5 การแช่แข็งและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดแช่แข็งในสภาพแช่แข็งต่อการลดปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม

3.5.5.1 นำถุงตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ได้เติมเชื้อโคลิฟอร์มความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ตามการเตรียมตัวอย่างทดลองในข้อ 3.5.4 ไปแช่แข็งในห้องแช่แข็งแบบ Air Blast ที่อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส ให้อุณหภูมิใจกลางของตัวอย่างไม่ต่ำกว่า (-) 18 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองในแต่ละความเข้มข้นครั้งละ 5 ตัวอย่าง และทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.5.5.2 นำถุงตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ได้เติมเชื้อโคลิฟอร์มความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และผ่านการแช่แข็งไปเก็บในห้องเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน โดยทำการทดลองในแต่ละความเข้มข้นครั้งละ 2 ตัวอย่าง และทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.5.5.3 นำตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดหลังจากผ่านการทดลองตามข้อ 3.5.5.1 และหลังจากการเก็บรักษาในสถานะแช่แข็งในห้องเย็นตามข้อ 3.5.5.2 ไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่บาดเจ็บ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform Agar จากบริษัท Merck (ตามภาคผนวก ข.)

3.5.5.4 วางแผนการทดลองแบบ RCBD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan

3.5.6 การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาหมึกสดในห้องเย็น (แช่แข็ง) ต่อการลดปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม

3.5.6.1 นำถุงตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ได้เติมเชื้อโคลิฟอร์มความเข้มข้น $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ไปเก็บในห้องเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน โดยทำการทดลองในแต่ละความเข้มข้นครั้งละ 2 ตัวอย่าง และทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

3.5.6.2 นำตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดหลังจากการเก็บรักษาในห้องเย็น (แช่แข็ง) ตามข้อ 3.5.6.1 ไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่บาดเจ็บ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform Agar จากบริษัท Merck (ตามภาคผนวก ข.)

3.5.6.3 วางแผนการทดลองแบบ RCBD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

4.1 ผลการศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อโคลิฟอร์มในวัตถุดิบและในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หมักกระดองสดแช่เยือกแข็ง

จากการสุ่มตัวอย่างวัตถุดิบปลาหมักกระดองสดรับเข้าในโรงงานมาตรวจสอบเชื้อโคลิฟอร์มด้วยวิธี Rapid Method โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform Agar จากบริษัท Merck (Thailand) โดยเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นระยะเวลา 12 เดือน และนำผลการตรวจมาวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาทดลองต้องอาศัยสถิติในการหาค่ามากที่สุด (Maximum) ค่ากลาง (Medium) และ ค่าน้อยที่สุด (Minimum) ซึ่งได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 : ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในวัตถุดิบปลาหมักกระดองสดที่รับเข้าโรงงาน ตั้งแต่เดือน มกราคม – ธันวาคม 2547

เดือน	ปริมาณเชื้อ (Log_{10} CFU/g)		
	Maximun	Medium	Minimun
มกราคม	1.7	1.2	0.7
กุมภาพันธ์	3.3	2.7	0.7
มีนาคม	2.9	2.7	0.7
เมษายน	3.6	2.8	0.7
พฤษภาคม	3.6	2.7	0.7
มิถุนายน	3.0	2.4	0.7
กรกฎาคม	3.0	2.9	0.7
สิงหาคม	3.1	2.0	0.7
กันยายน	3.6	2.6	0.7
ตุลาคม	3.0	2.6	0.7
พฤศจิกายน	2.2	1.7	0.7
ธันวาคม	1.0	1.2	0.7

จากผลการทดลองตามตารางที่ 4.1 พบว่าปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่ตรวจพบในวัตถุดิบ ปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงานระดับต่ำสุดคือ $0.7 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ หรือประมาณ $1 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ระดับกลางที่พบประมาณ $2 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และระดับสูง $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ซึ่งในเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคมเป็นช่วงหน้าหนาวที่อุณหภูมิภายนอกค่อนข้างต่ำการพบเชื้อจึงน้อยกว่าช่วงเดือนอื่น ๆ

อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต เชื้อ โคลิฟอร์มอยู่ในกลุ่ม Mesophile อุณหภูมิเหมาะสมของการเจริญเติบโตคือ 35-37 องศาเซลเซียส (มัทนา, 2538) ดังนั้นในช่วงหน้าร้อนอุณหภูมิอยู่ในช่วง 30 – 35 องศาเซลเซียส จึงเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้ปริมาณการพบจึงสูง สำหรับช่วงหน้าฝนเกิดการแพร่กระจายของเชื้อจุลินทรีย์ได้มาก ปริมาณเชื้อที่ตรวจพบจึงสูงมากขึ้นด้วยเช่นกัน

การเลือกปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลองควรเลือกปริมาณที่พบจริงในระดับสูงคือ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ เป็นระดับที่เกิดอันตรายสูงสุด (Worst case) ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เป็นค่าในการตรวจยืนยัน(validation) กระบวนการว่าสามารถลดอันตรายลงให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยหรือไม่ และเพื่อป้องกันความเสี่ยงของการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์อันเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น ปัญหา ด้านโครงสร้างการผลิตที่ไม่สามารถควบคุมการปนเปื้อนได้ ความบกพร่องในการควบคุมอุณหภูมิและเวลาการผลิต ความไม่สะอาดของอุปกรณ์การผลิต สุขลักษณะการผลิตของพนักงาน และเครื่องมือเครื่องจักรอื่นๆ รวมไปถึงโอกาสของการปนเปื้อนข้ามในกระบวนการผลิต(กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ (ก), 2547) จึงควรทำการทดลองในระดับรุนแรงมากกว่าสถานการณ์จริง $1- 2 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g}$ เพื่อให้มั่นใจว่าหากปริมาณเชื้อเบี่ยงเบนไปจากมาตรฐานที่กำหนดไว้ จะสามารถควบคุมได้โดยใช้กระบวนการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็ง

ดังนั้นจึงสรุปว่าปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่เหมาะสมจะใช้ในการทดลองนี้ แบ่งเป็น 3 ระดับคือ $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$

4.2 การคัดเลือกเชื้อมาตรฐาน

ผลการคัดแยกเชื้อโคลิฟอร์มที่พบจริงในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสด และส่งไปตรวจวินิจฉัยหาชนิดของเชื้อและสายพันธุ์ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ คือ เชื้อ *Pantoea agglomerans* โดยมีรายละเอียดของเชื้อดังนี้

ชื่อเดิม *Enterobacter agglomerans*

ชื่อเรียกอื่นๆ *Bacillus agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*

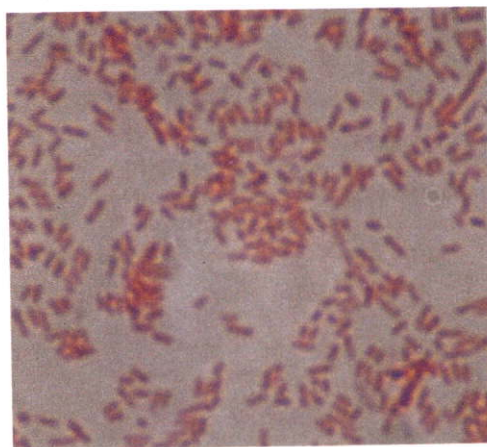
ประวัติเชื้อ (<http://www.thelabrat.com>, 14/12/05)

Ewing และ Fite ทำการศึกษาครั้งแรกและพิมพ์เผยแพร่ในชื่อ *B. agglomerans* ในปี 1888 และได้เปลี่ยนเป็น *E. agglomerans* ในปี 1972 และได้ถูกรวมเข้าในบัญชีรายชื่อของ Bacterial Names Omitted Beijerinck ในปี 1980 ต่อมาในปี 1989 Gavini จึงได้เปลี่ยนเป็น *Pantoea agglomerans* (<http://www.thelabrat.com>, 14/12/05)

P. agglomerans เป็นสมาชิกใน Enterobacteriaceae พบกระจายทั่วไปในธรรมชาติ ผิวของพืชและเมล็ดพืชหลายชนิดซึ่งมีลักษณะเป็น endophyte ดิน น้ำ รวมทั้งในสัตว์ และคน (บาดแผล เลือด ปัสสาวะ) โดยทั่วไปเชื้อสายพันธุ์นี้ไม่เป็นสาเหตุของการก่อโรค พบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการก่อโรคน้อยกว่า *E. aerogenes* และ *E. cloacae* แต่เชื้อนี้ยังแสดงลักษณะการเป็น Secondary opportunistic pathogen แต่ก็ยังไม่มีหลักฐานชัดเจนที่บ่งชี้ว่า เป็นเชื้อที่มีความเสี่ยงต่อสุขภาพหรือเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ เคยมีรายงานถึงการเสียชีวิตของผู้ที่ได้รับการถ่ายเลือดจากโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในต่างประเทศ เนื่องจากมีสาเหตุมาจากเลือดถูกปนเปื้อนจากเชื้อ *P. agglomerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในพืชที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในลำไส้ของมนุษย์ ถึงแม้แต่ธนาคารเลือดจะเก็บรักษาเลือดไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ *P. agglomerans* กลับเป็นแบคทีเรีย 1 ใน 2 ชนิดที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิอากาศเย็น สำหรับ Stock ของเชื้อ *P. agglomerans* บน NA Slant แสดงในภาพที่ 4.1 ลักษณะเชื้อ *P. agglomerans* บนกล้องจุลทรรศน์แสดงในภาพที่ 4.2 ในขณะที่ลักษณะโคโลนี *P. agglomerans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chormocult Coliform agar และ Nutrient Agar แสดงอยู่ในภาพที่ 4.3 และภาพที่ 4.4 ตามลำดับ



ภาพที่ 4.1 : Stock เชื้อ *P. agglomerans* ในอาหาร NA slant



ภาพที่ 4.2 : เชื้อ *P. agglomerans* บนกล้องจุลทรรศน์



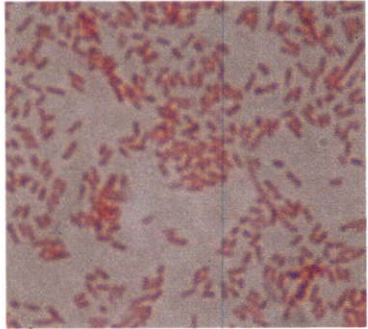

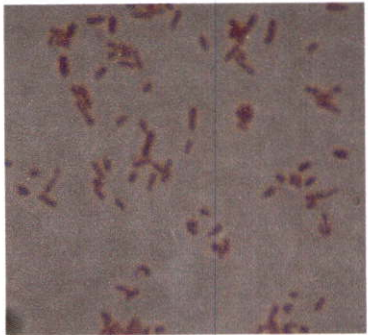
ภาพที่ 4.3 : เชื้อ *P. agglomerans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult Coliform Agar





ภาพที่ 4.4 : เชื้อ *P. agglomerans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar

4.2.1 ลักษณะของเชื้อ *P. agglomerans* แสดงอยู่ในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 : ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติลักษณะของเชื้อ *P. agglomerans*

ลักษณะ		ผลการทดลอง	
ลักษณะ	ตามทฤษฎี	ตามการทดลอง	รูปถ่าย
1. Gram	negative	Negative	
2. สภาพความต้องการอากาศ	Facultative anaerobic	Facultative anaerobic	
4. รูปร่าง	เป็นท่อนตรง (Straight rods)	เป็นท่อนตรง (Straight rods)	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ลักษณะ		ผลการทดลอง	
ลักษณะ	ตามทฤษฎี	ตามการทดลอง	
5. เคลื่อนที่	Motile ด้วยflagella	Motile ด้วยflagella	
6. ลักษณะโคโลนีบน nutrient agar	มีลักษณะเรียบ โปร่งแสงมีความ หนูนมากหรือน้อย และอาจเป็นหรือ ไม่เป็นสีเหลือง	มีลักษณะเรียบ โปร่งแสงมีความ หนูนเล็กน้อยและ เป็นสีเหลือง	

4.2.2 การนำเชื้อ *P. agglomerans* ไปใช้ประโยชน์ (<http://www.thelabrat.com> , 14/12/05)

การนำเชื้อ *P. agglomerans* สายพันธุ์นี้ไปใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่จะใช้กับอุตสาหกรรมหรือผลผลิตทางการเกษตร โดยเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ 2 ชนิด คือ Pantocin A และ Pantocin B ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Erwinia amylovora* ที่เป็นสาเหตุของโรคราไฟทั้งยังสามารถใช้ *P. agglomerans* ร่วมกับ *Candida sake* ผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม ใช้เคลือบผิวผลไม้ตระกูลส้ม เพื่อยับยั้งเชื้อรา *Penicillium expansum* และ *P. digitatum* บนผิวของผลไม้ตระกูลส้มได้

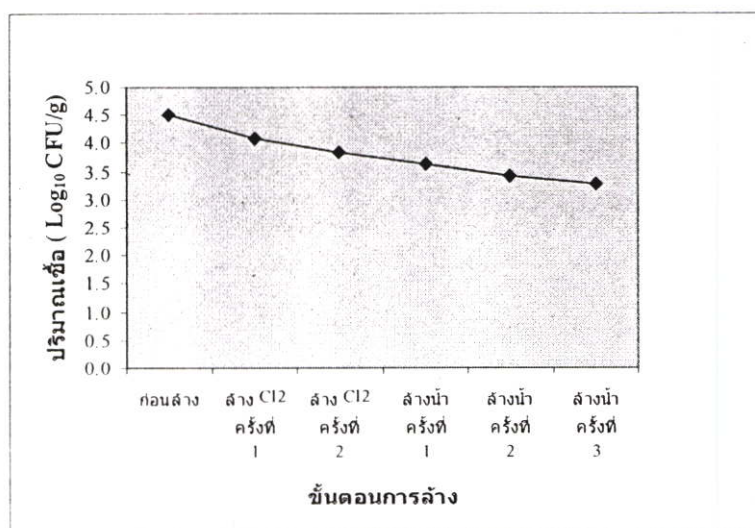
บริษัท Molson Breweries of Canada Limited ได้นำเชื้อสายพันธุ์นี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ โดยนำไปใช้เป็นส่วนสำคัญในการหมัก ทำให้ได้เบียร์ที่แตกต่างกัน 3 ชนิดซึ่งแต่ละสัดส่วนจะมีความแตกต่างกันในด้านการใช้คาร์โบไฮเดรต ระบบเอนไซม์ในการหมัก อุณหภูมิในการเจริญ ชนิดและปริมาณของสารเมตาบอไลต์ โดยจากการศึกษาพบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถรีดิวซ์ dimethyl sulfoxide (DMSO) ให้เป็น dimethyl sulfide (DMS) ได้ถึง 55-70% สามารถย่อยสลาย s-methylmethionine (DMSP) ให้เป็น DMS ได้ในอัตราที่ต่ำเพียง 20% โดยที่การเจริญของเชื้อในระหว่างการหมักจะไม่ทำให้ค่า pH เปลี่ยนแปลง ทำให้มีรสชาติจำเพาะ และไม่มีผลต่อยีสต์หลักที่ใช้รวมทั้งไม่มีผลต่อความเข้มข้นของ DMSP

P. agglomerans เป็นเชื้อโคลิฟอร์มชนิดหนึ่ง ซึ่งโดยปกติเชื่อนี้จะใช้เป็นเครื่องชี้วัดถึงสุขลักษณะในการผลิตซึ่งมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนข้ามตั้งแต่การเก็บเกี่ยวผลผลิตจนกระทั่งถึงมือผู้บริโภค

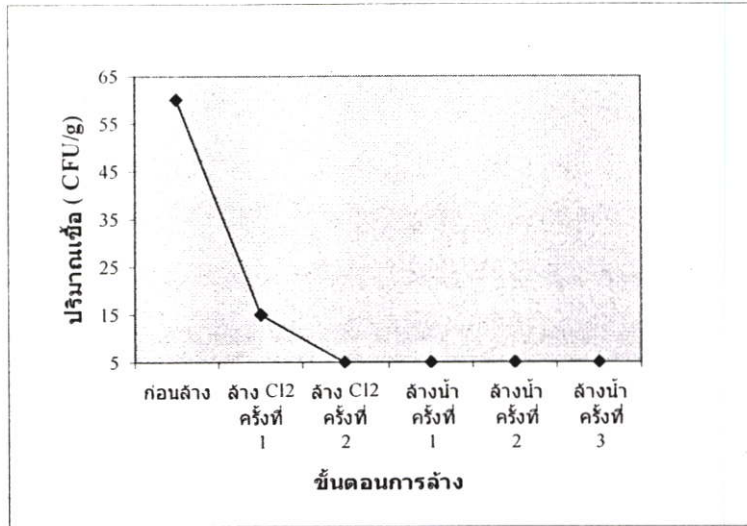
4.3 ผลการเตรียมตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่ใช้ในการทดลอง

การทำให้ปลาหมึกกระดองสดปราศจากเชื้อโคลิฟอร์มจะใช้สารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้มากที่สุด ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร คือ สารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ หรือคลอรีนเหลว ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของ แก๊สคลอรีนกับด่าง (โซเดียมไฮดรอกไซด์) เป็นสารที่ไม่มีสี ไม่ทำให้เกิดคราบ สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ทุกชนิดและไม่ทำให้เกิดพิษเมื่อใช้ในปริมาณที่เหมาะสม โดยสารฆ่าเชื้อ กลุ่มนี้มีผลทำให้เชื้อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลาย คลอรีนเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์หรือส่วนที่เป็นโปรตีนของเซลล์ทำให้เซลล์ทำงานผิดปกติ หรืออาจเกิดปฏิกิริยารบกวนการทำงานของเอนไซม์ ทำให้โปรตีนตกตะกอนเป็นต้น (กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ (ข) , 2547)

จากการนำตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดมาทำให้ปราศจากเชื้อโคลิฟอร์ม โดยการล้างด้วยน้ำคลอรีนความเข้มข้น 50 PPM 2 ครั้งและล้างด้วยน้ำสะอาดอีก 3 ครั้ง เก็บตัวอย่างหลังจากการล้างไปตรวจยืนยันว่าปราศจากเชื้อโคลิฟอร์มและตรวจสอบสารคลอรีนตกค้างเพื่อทวนสอบการตกค้างของสารคลอรีนในตัวอย่างที่ใช้ทดลอง ประสิทธิภาพของกระบวนการล้างดังกล่าวสามารถทำให้ตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดมีเชื้อโคลิฟอร์มที่น้อยมาก ในขณะที่ยังคงมีเชื้อจุลินทรีย์รวมปริมาณ $3.3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ลดลงจากปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ $1.2 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g}$ ผลแสดงดังภาพที่ 4.3 และ 4.4 และปราศจากสารคลอรีนตกค้างดังตารางที่ 4.4



ภาพที่ 4.5 : ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวมที่ลดลงหลังผ่านการล้าง



ภาพที่ 4.6 : ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่ลดลงหลังผ่านการล้าง

ตารางที่ 4.3 : ปริมาณสารคลอรีนตกค้างในตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังผ่านการล้าง

ตัวอย่าง	ปริมาณสารคลอรีนตกค้าง (PPM)
ปลาหมึกกระดองหลังล้างครั้งที่ 1	ไม่พบ
ปลาหมึกกระดองหลังล้างครั้งที่ 2	ไม่พบ
ปลาหมึกกระดองหลังล้างครั้งที่ 3	ไม่พบ

* วิธีการทดสอบ AOAC (2000)

4.4 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่บาดเจ็บ

ผลของการแช่แข็งต่อปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มสายพันธุ์ *P. agglomerans* ที่อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาในห้องเย็นที่อุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน พบว่าปริมาณเชื้อที่เหลือรอดนี้จะอยู่ในสภาพที่มีความบกพร่องทางกายภาพหรือที่เรียกว่าเซลล์ที่บาดเจ็บ (Injured cell) เนื่องจากผลการลดอุณหภูมิจะส่งผลกระทบต่อเซลล์แต่ละเซลล์ ดังนั้นเพื่อที่จะได้ผลของการตรวจนับจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นที่ยอมรับ จึงจำเป็นต้องตรวจนับจุลินทรีย์ที่ได้รับบาดเจ็บเป็นลำดับแรกกล่าวคือ ต้องมีการรักษาเซลล์บาดเจ็บด้วยการบ่มเชื้อเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเสริม (enrichment media) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) เพื่อให้เชื้อสามารถรักษาตัวเองในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ก่อนที่จะสามารถเพิ่มจำนวนได้อีกครั้ง (รัตนภัทร, 2544) ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อที่เวลาต่างๆ แล้วจึงทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ โดยทำการเจือจางด้วยวิธี 10 Fold dilution จนได้ความเจือจางที่เหมาะสมต่อการนับจำนวน ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวิธี spread plate technique บนอาหาร Chlomocult coliform agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อและคัดเลือกเวลาที่เหมาะสมต่อการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บ โดยสังเกตว่าเชื้อเริ่มมีการเพิ่มจำนวนจากการตรวจนับไม่ได้มาเป็นตรวจนับได้ แต่ต้องไม่มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เพื่อนำมารายงานผลของจุลินทรีย์ที่เหลือรอด

จากผลการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *P. agglomerans* ที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาในห้องเย็นที่อุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ ที่ชั่วโมง pre - enrichment ต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า

ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หลังการแช่แข็งและหลังการเก็บรักษาในสถานะแช่แข็ง 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บคือ 8 8 8 8 8 8 8 10 10 12 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ

ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ความเข้มข้น $5 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หลังการเก็บรักษาในสถานะแช่แข็ง 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บคือ 8 8 8 8 8 8 10 10 12 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น 3 Log₁₀ CFU/g 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g ที่รอดชีวิตเมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็งและเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ

กระบวนการ	จำนวนชั่วโมง	ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่รอดชีวิต (Log ₁₀ CFU/g)			
		3 Log ₁₀ CFU/g	4 Log ₁₀ CFU/g	5 Log ₁₀ CFU/g	5 Log ₁₀ CFU/g*
หลังแช่แข็ง	0	NG	NG	NG	-
	2	NG	NG	NG	-
	4	NG	NG	NG	-
	6	NG	NG	NG	-
	8	3.71	3.68	5.67	-
	10	3.86	3.00	5.75	-
	12	3.97	3.48	5.80	-
หลังเก็บรักษา 1 วัน	0	NG	NG	NG	NG
	2	NG	NG	NG	NG
	4	NG	NG	NG	NG
	6	NG	NG	NG	NG
	8	3.72	3.62	5.72	5.68
	10	3.93	3.75	5.79	5.77
	12	4.00	4.15	5.85	5.83
หลังเก็บรักษา 3 วัน	0	NG	NG	NG	NG
	2	NG	NG	NG	NG
	4	NG	NG	NG	NG
	6	NG	NG	NG	NG
	8	3.67	3.71	5.62	5.61
	10	3.93	3.89	5.76	5.75
	12	4.08	3.91	5.81	5.86
หลังเก็บรักษา 5 วัน	0	NG	NG	NG	NG
	2	NG	NG	NG	NG
	4	NG	NG	NG	NG

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

กระบวนการ	จำนวนชั่วโมง	ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่รอดชีวิต ($\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$)				
		3 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	4 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	5 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	5 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}^{**}$	
หลังเก็บรักษา 7 วัน	6	NG	NG	NG	NG	
	8	3.69	3.54	5.59	5.56	
	10	3.80	3.84	5.66	5.68	
	12	3.95	4.00	5.71	5.79	
	0	NG	NG	NG	NG	
	2	NG	NG	NG	NG	
	4	NG	NG	NG	NG	
	6	NG	NG	NG	NG	
	8	3.51	3.41	5.41	5.40	
	10	3.68	3.70	5.51	5.51	
หลังเก็บรักษา 9 วัน	12	3.71	3.89	5.61	5.63	
	0	NG	NG	NG	NG	
	2	NG	NG	NG	NG	
	4	NG	NG	NG	NG	
	6	NG	NG	NG	NG	
	8	3.45	3.30	4.93	5.41	
	10	3.49	3.68	5.11	5.58	
	12	3.81	3.71	5.34	5.72	
	หลังเก็บรักษา 11 วัน	0	NG	NG	NG	NG
		2	NG	NG	NG	NG
4		NG	NG	NG	NG	
6		NG	NG	NG	NG	
8		3.63	3.36	4.83	4.94	
10		3.80	3.56	4.88	4.98	
12		3.91	3.72	4.94	5.32	

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

กระบวนการ	จำนวนชั่วโมง	ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่รอดชีวิต ($\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$)			
		3 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	4 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	5 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	5 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}^{**}$
หลังเก็บรักษา 14 วัน	0	NG	NG	NG	NG
	2	NG	NG	NG	NG
	4	NG	NG	NG	NG
	6	NG	NG	NG	NG
	8	NG	NG	NG	NG
	10	3.40	3.23	4.66	5.75
	12	3.77	3.40	4.79	5.91
	14	3.89	2.84	3.72	4.00
หลังเก็บรักษา 21 วัน	0	NG	NG	NG	NG
	2	NG	NG	NG	NG
	4	NG	NG	NG	NG
	6	NG	NG	NG	NG
	8	NG	NG	NG	NG
	10	3.89	2.84	3.72	4.00
	12	3.40	3.08	3.88	4.38
	14	3.58	3.24	4.09	4.56
หลังเก็บรักษา 30 วัน	0	NG	NG	NG	NG
	2	NG	NG	NG	NG
	4	NG	NG	NG	NG
	6	NG	NG	NG	NG
	8	NG	NG	NG	NG
	10	NG	NG	NG	NG
	12	3.62	2.46	3.18	3.94
	14	3.20	2.59	3.34	3.98
16	3.72	2.72	3.61	4.34	

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

กระบวนการ	จำนวนชั่วโมง	ปริมาณเชื้อ <i>P. agglomerans</i> ที่รอดชีวิต ($\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$)			
		3 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	4 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	5 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}$	5 $\text{Log}_{10}\text{CFU/g}^{**}$
หลังเก็บรักษา 60 วัน	0	NG	NG	NG	NG
	2	NG	NG	NG	NG
	4	NG	NG	NG	NG
	6	NG	NG	NG	NG
	8	NG	NG	NG	NG
	10	NG	NG	NG	NG
	12	1.95	2.26	2.91	3.51
	14	2.04	2.53	2.20	3.66
	16	2.51	2.69	2.48	3.77

หมายเหตุ : NG = No Growth

** = เชื้อที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง

4.5 ผลของการแช่แข็งแบบอากาศเย็น (Air Blast) และการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดแช่แข็งต่อการลดปริมาณเชื้อ *P. agglomerans*

จากการทดลองนำตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่เดิมเชื้อ *P. agglomerans* ปริมาณความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ แช่แข็งแบบอากาศเย็น (Air Blast) อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส จนอุณหภูมิใจกลางของปลาหมึกกระดอง (-) 18 องศาเซลเซียส ใช้เวลาการแช่แข็งประมาณ 90 นาที ทำให้ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ ($P < 0.05$) โดยปริมาณที่ลดลงเท่ากับ $0.39 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $0.36 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $0.35 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ หรือ 10.8 7.8 และ 6.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงตามตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ในปลาหมึกกระดองสดที่รอดชีวิตหลังแช่แข็งแบบอากาศเย็นที่อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส

สภาวะการทดลอง	ก่อนการแช่แข็ง		หลังการแช่แข็ง	
	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$)	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$)	อัตราการตาย %	
การปนเปื้อน $3 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g}$	3.56 ± 0.32	3.17 ± 0.32	10.8	
การปนเปื้อน $4 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g}$	4.61 ± 0.24	4.25 ± 0.16	7.8	
การปนเปื้อน $5 \text{ log}_{10} \text{ CFU/g}$	5.44 ± 0.32	5.07 ± 0.32	6.9	

การถนอมอาหารโดยการแช่แข็งมีผลต่อการลดปริมาณของจุลินทรีย์ในอาหาร แต่ไม่ใช้ในการทำให้อาหารปราศจากเชื้อ หลักการของวิธีการถนอมอาหารมีพื้นฐานมาจากการลดอุณหภูมิเพื่อให้ปฏิกิริยาทางเคมีและทางชีวภาพลดลง ยับยั้งกระบวนการ metabolic ของสิ่งมีชีวิต (มัทนา, 2538) เมื่ออุณหภูมิลดลงจากการแช่แข็งจุลินทรีย์จะอยู่ในสภาพเครียด เซลล์จะได้รับอันตรายจากกระบวนการดังกล่าวจนทำให้ตายหรือบาดเจ็บ อันตรายของกระบวนการแช่แข็งที่เกิดขึ้นกับเซลล์ของจุลินทรีย์นั้นเกิดจาก Thermal cold shock , Concentration of extracellular solutes , toxicity of concentration intercellular solutes , Cell dehydration , Internal ice formation (Erickson และ Hang , 1997)

Erickson และ Hang (1997) พบว่าเชื้อ Staphylococci มีปริมาณลดลง 8-10 % หลังจากการแช่แข็ง และ Kraft (1992) กล่าวว่าปริมาณของจุลินทรีย์รวมในไก่วงสดที่นำเครื่องในออกแล้วและเนื้อสดที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี Air blast สามารถลดปริมาณเชื้อตั้งต้นลงได้ประมาณ

1 Log Cycle ทั้งนี้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของลักษณะจำเพาะของตัวอย่างทดลองแต่ละชนิด รูปแบบการแช่แข็ง รวมไปถึงสภาวะอื่นๆ อย่างไรก็ตามการทดลองทั้งสองแสดงให้เห็นว่ากระบวนการแช่แข็งนั้นทำให้เชื้อถูกทำลายและลดปริมาณลง เช่นเดียวกับการแช่แข็งตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่เติมเชื้อ *P. agglomerans* 3 Log₁₀ CFU/g 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g พบว่าปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* มีอัตราการลดลงของเชื้อค่อนข้างต่ำเพียง 8-10 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 0.2-0.5 Log Cycle อัตราการบาดเจ็บ และการตายของเชื้อที่ลดน้อยลงหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง เป็นผลมาจากการควบคุมอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดในกระบวนการผลิต ที่กำหนดให้อุณหภูมิตั้งแต่รับวัตถุดิบจนถึงก่อนการแช่แข็งต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิผลิตภัณฑ์ให้ลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เชื้อส่วนหนึ่งได้รับผลกระทบจากการเกิดอาการ Cold shock คือ การทำให้อุณหภูมิลดลงจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว สามารถทำให้เซลล์ตายได้ สาเหตุอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของไขมันที่ผนังเมมเบรนของเซลล์ ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของสารต่างๆ ที่เข้าหรือออกเซลล์เปลี่ยนแปลงหรือถูกทำลายไป หรืออาจเนื่องจากการปลดปล่อยสารยับยั้ง (inhibitor) การทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการรักษาเซลล์ (repair enzyme) เช่น สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) เป็นต้น (วราวุฒิ, 2538) และพบว่าเชื้อ *E. coli* ที่ผ่านกระบวนการ Cold shock ก่อนการแช่แข็งจะบาดเจ็บและตายน้อยกว่าเชื้อ *E. coli* ที่ไม่ผ่านกระบวนการ Cold shock ก่อนการแช่แข็ง และเชื้อจะสามารถเพิ่มจำนวนหลังจากแช่แข็งได้ดีกว่าด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อ *E. coli* ที่ผ่านกระบวนการ Cold shock ที่ 13 องศาเซลเซียส จะสร้างโปรตีนขึ้นมาปกป้องตัวเองจากสภาวะดังกล่าวที่เรียกว่า "Cold Shock Protein (Csps)" โดยทำให้เซลล์เสื่อมสภาพน้อยลงและยับยั้งการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Recrystallization and growth of ice crystals) ในระหว่างเก็บรักษาด้วย (Bollman และคณะ, 2001)

กระบวนการแช่เยือกแข็งทำให้เซลล์ของเชื้อ *P. agglomerans* ได้รับผลกระทบ โดยเริ่มตั้งแต่ช่วงเริ่มต้นของการแช่แข็งขณะอุณหภูมิลดลงจนกระทั่งน้ำกลายเป็นน้ำแข็ง ผลการทำลายจากการแช่แข็งนี้มีสาเหตุโปรตีนหรือเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ หรือโปรตีนภายในหรือเอนไซม์ตกตะกอน ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายในน้ำส่วนที่ไม่แข็งตัวหรือเรียกว่าผลของความเข้มข้น (concentration effect) เมื่อมีการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงน้ำเปลี่ยนสภาพเป็นน้ำแข็งมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันน้ำที่เหลืออยู่หรือน้ำที่ไม่เกิดการแข็งตัวจะถูกทำให้เข้มข้นยิ่งขึ้นด้วยความเข้มข้นของตัวทำละลายต่างๆ (เช่น เกลือ โปรตีน กรดนิวคลีอิก เป็นต้น) ซึ่งจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพีเอชบางส่วนประกอบภายในเซลล์หรือทำให้สาร electrolytes มีความเข้มข้นสูงขึ้นหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารแวนดอลอย หรือการทำโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ หรือเพิ่มความหนืด นอกจากนี้ ยังมีการสร้างผลึกน้ำแข็ง โดยผลึกน้ำแข็งที่ถูกสร้างขึ้นภายนอกเซลล์

(extracellular) จะดึงน้ำออกมาจากเซลล์ทำให้เซลล์แห้งหรือเกิดผลของความเข้มข้นขึ้นมา ในขณะที่ผลึกน้ำแข็งที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์ (intracellular crystals) จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการซึมสารของเซลล์เมมเบรน (permeability) หรือทำให้เกิดรูขึ้นที่เซลล์เมมเบรนหรือผนังเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถกล่าวได้ว่า ผลึกน้ำแข็งที่ถูกสร้างขึ้นภายในเซลล์จะเป็นอันตรายต่อเซลล์มากกว่าผลึกน้ำแข็งที่ถูกสร้างขึ้นภายนอกเซลล์ (วราวุฒิ, 2538) และเมื่อน้ำเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็งมากขึ้นเชื้อจะตายหรือได้รับบาดเจ็บมีจำนวนเพิ่มขึ้นเนื่องจากการแข็งตัวของน้ำในเซลล์ จะทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ปริมาณน้ำอิสระที่จำเป็นต่อการเจริญจะลดลง ทำให้เซลล์ขาดน้ำ โครงสร้างและหน้าที่ขององค์ประกอบที่จำเป็นและสารโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์ถูกทำลาย หรือแม้แต่การไปมีผลต่อไขมันที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ทำให้การทำหน้าที่ของผนังเซลล์ถูกรบกวน ลักษณะดังกล่าวนี้ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะเครียดที่รุนแรง (Lethal effect) จนถูกทำลายจนตายลงได้ หรือเซลล์อาจจะที่ได้รับสภาวะเครียดในระดับถึงตายหรือบาดเจ็บ (Sublethal effect) อย่างไรก็ตามหากเซลล์อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมอีกครั้ง เซลล์จะสามารถซ่อมแซม และเจริญเพิ่มจำนวนได้ในภายหลัง หรือเซลล์บางชนิดมีกลไกตอบสนองต่อสภาวะเครียดได้ดี จึงกระตุ้นให้เกิดการปรับตัวและเพิ่มความต้านทานต่อความเครียดนั้นได้ (ศศิกันต์, 2546)

อุณหภูมิต่ำยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (catalytic activity of microbial enzyme) ในจุลินทรีย์ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิลดลงปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลงด้วย โดยเฉพาะเอนไซม์โปรตีนเนสและไลเปสที่ทนความร้อน (heat stable proteinase และ lipase) เอนไซม์ถูกทำลาย โปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ (denature) และเกิดการตกตะกอน(coagulate) องค์ประกอบต่างๆ ของผนังเซลล์ หรือ outer membrane ของผนังเซลล์ รวมทั้งเยื่อเซลล์ หรือ inner membrane ได้รับบาดเจ็บ เส้นสายดีเอ็นเอแตกหัก ribosomal RNA แตกแยกออกจากกัน (บุษกร, 2545)

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *P. agglomerans* ปริมาณความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ มีอัตราการรอดชีวิตหลังจากการแช่แข็งอยู่ประมาณ 90-93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการรอดชีวิตในแต่ละความเข้มข้น พบว่าปริมาณความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตน้อยกว่าปริมาณเชื้อที่ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ โดยอัตราการรอดชีวิตในแต่ละความเข้มข้นเท่ากับ 89 92 และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กล่าวได้ว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *P. agglomerans* แปรผกผันตรงกับปริมาณเชื้อตั้งต้น คืออัตราการรอดชีวิตจะมากขึ้นตามปริมาณเชื้อที่สูงขึ้น สาเหตุมาจากการแพร่กระจายและความหนาแน่นของเชือบนผิวของผลิตภัณฑ์เป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อรอดชีวิต ซึ่งเชื้อ *P. agglomerans* ปริมาณความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ เชื้อมีการแพร่กระจายมากและหนาแน่นน้อยกว่าปริมาณเชื้อ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ปริมาณเชื้อเพิ่มมากขึ้นทำให้การแพร่กระจายน้อย ความหนาแน่นสูง เชื้อจะเกาะรวมตัวกัน เป็นผลให้เชื้อที่อยู่ภายนอกเป็นเกราะป้องกันให้เชื้อที่อยู่ภายใน การเข้าถึงของอุณหภูมิที่จะเกิดผลกระทบบกับเชื้อใน

ส่วนนั้นๆ จึงเป็นได้ยาก เชื้อจึงสามารถรอดชีวิตและได้รับการบาดเจ็บน้อยลง ซึ่งปัจจัยการแพร่กระจายของเชื้อนี้เป็นปัจจัยสำคัญต่อการทำลายเชื้อในการแช่แข็งแบบเร็ว ซึ่งเชื้อจะได้รับผลกระทบจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้น ต่างจากการแช่แข็งแบบช้าใช้ระยะเวลายาว ทำให้เชื้อได้รับผลกระทบจากการลดอุณหภูมิอย่างทั่วถึงและยาวนาน สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้มากกว่าการแช่แข็งแบบเร็ว (Bald, 1991)

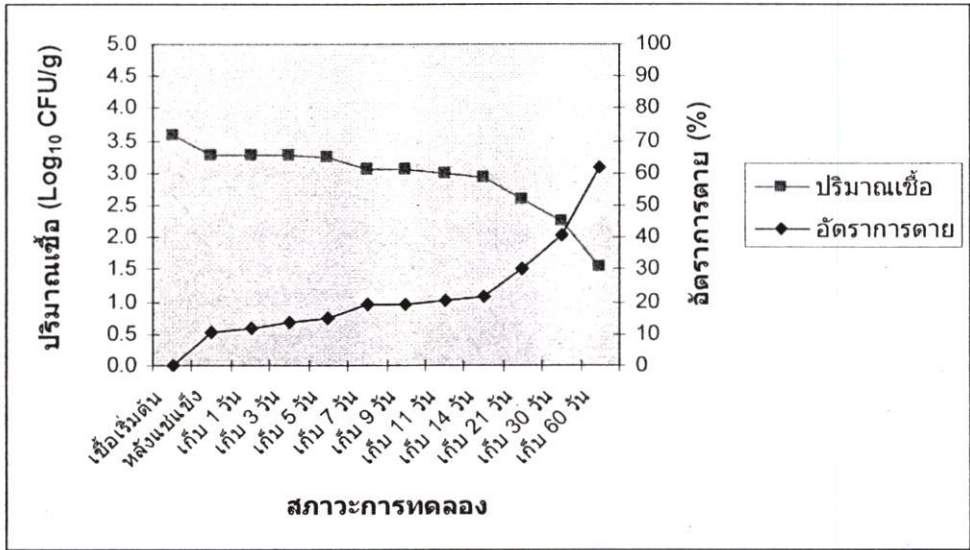
การเก็บรักษาตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่เดิมเชื้อ *P. agglomerans* 3 Log₁₀ CFU/g, 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบอากาศเย็น (Air Blast) อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส จนอุณหภูมิใจกลางของปลาหมึกกระดอง (-) 18 องศาเซลเซียส ในห้องเย็นอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน พบว่าจำนวนเชื้อ *P. agglomerans* บาดเจ็บและเหลือรอดในปลาหมึกกระดองสดช่วงสัปดาห์แรก ปริมาณเชื้อลดลงไม่เห็นเด่นชัด โดยในวันที่ 1 3 และ 5 ปริมาณที่ลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับปริมาณเชื้อในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง ในช่วงสัปดาห์ที่สองปริมาณการลดลงของเชื้อเด่นชัดมากขึ้น โดยในวันที่ 7 9 11 และ 14 มีปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่อง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับปริมาณเชื้อหลังแช่แข็งวันที่ 1 3 และ 5 สำหรับในวันที่ 21 30 และ 60 ปริมาณเชื้อมีอัตราการลดลงมากจนเห็นได้ชัดเจน และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยที่เมื่อครบ 1 เดือน เชื้อลดปริมาณลงไปประมาณ 1 Log cycle จากผลการทดลองในวันที่ 30 อัตราการลดลงของเชื้อ *P. agglomerans* ปนเปื้อนเริ่มต้นที่ 3 Log₁₀ CFU/g 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g เท่ากับ 1.44 1.25 และ 1.21 Log cycle หรือ 40.5 27.1 และ 22.1 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อครบ 2 เดือน เชื้อลดปริมาณลงไปประมาณ 2 Log cycle โดยเท่ากับ 2.20 2.11 และ 2.05 หรือ 61.8 45.8 และ 37.7 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการลดลงของเชื้อ 1 Log cycle ใช้เวลาประมาณ 30 วัน ใกล้เคียงกับการทดลองของ Sheridan (1997) ที่เก็บรักษาเนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อแกะ ปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในห้องเย็นอุณหภูมิ (-) 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบปริมาณเชื้อลดลง 0.6 – 0.8 Log₁₀ CFU/g และการทดลองของอรัญ (2518) ที่เก็บกุ้งกุลาดำแช่แข็งในห้องเย็น อุณหภูมิ (-) 18 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อโคลิฟอร์มลดปริมาณลง 1 Log cycle ในระยะเวลา 28 วัน

อย่างไรก็ตาม การศึกษา Erickson และ Hang (1997) ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อ *Staphylococci* มีปริมาณลดลง 8-10 % หลังจากการแช่แข็ง และ ลดลงไปถึง 80-85 % หลังจากเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งนาน 8 สัปดาห์ ที่ห้องเย็นอุณหภูมิ (-) 29 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ อาจเนื่องจากความแตกต่างของลักษณะผลิตภัณฑ์และอุณหภูมิในการเก็บรักษา ซึ่ง Singhal และ

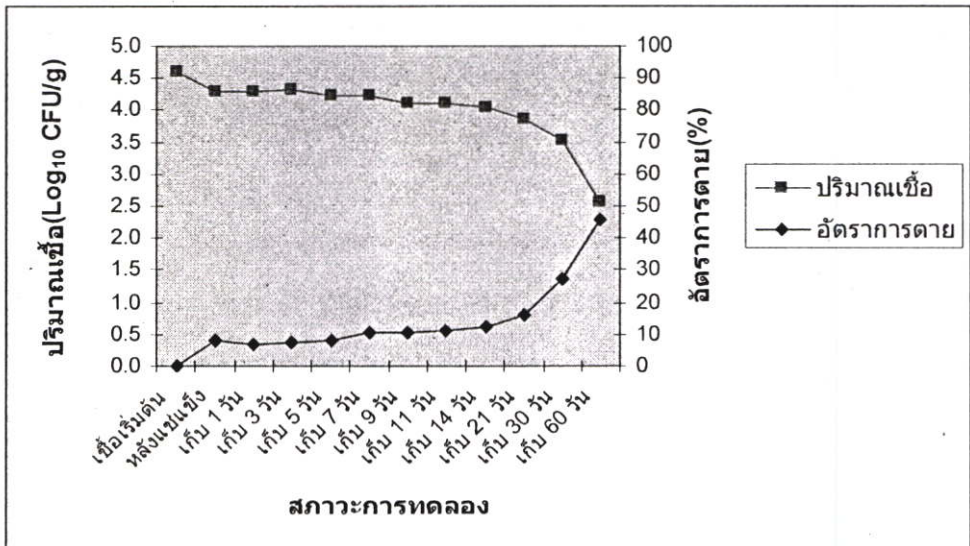
Kulkarni (1999) กล่าวว่า อุณหภูมิที่ต่ำลงทำให้ค่า a_w ลดต่ำลงไปด้วย ค่า a_w เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโต หากค่า a_w ลดต่ำลงทำให้เชื้อถูกทำลายได้ด้วยเช่นกัน

เมื่อทำการเก็บรักษาปลาหมึกกระดองสดที่ผ่านการแช่แข็งแบบอากาศเย็น (Air blast) ที่อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส จนอุณหภูมิปลาหมึกกระดองสด (-) 18 องศาเซลเซียส ในห้องเย็น (แช่แข็ง) (-) 22 องศาเซลเซียส พบว่าจำนวนเชื้อ *P. agglomerans* ที่รอดชีวิตมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ดังภาพที่ 4.7 4.8 และ 4.9 ทั้งนี้เป็นผลมาจาก เชื้อ *P. agglomerans* ที่ใช้ในการทดลองได้จากการเพาะเลี้ยงในเจริญเจริญเติบโตซึ่งอยู่ในช่วง growth phase ไว (sensitive) ต่อการถูกทำลายจากการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งมากกว่าจุลินทรีย์ในช่วง stationary phase และ lag phase ซึ่งจุลินทรีย์ในช่วง slower growth rates สามารถเพิ่ม unsaturated fatty acid ภายในเซลล์และเป็นเหตุให้เพิ่มความทนทานต่อการแช่แข็งมากขึ้นกว่าปกติ และ *P. agglomerans* เป็นแบคทีเรียแกรมลบเช่นเดียวกับ *E coli*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Maraxella* และ *Vibrio spp.* จะไว (Sensitive) มากทั้งในการแช่แข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง (Erickson และ Hang , 1997)

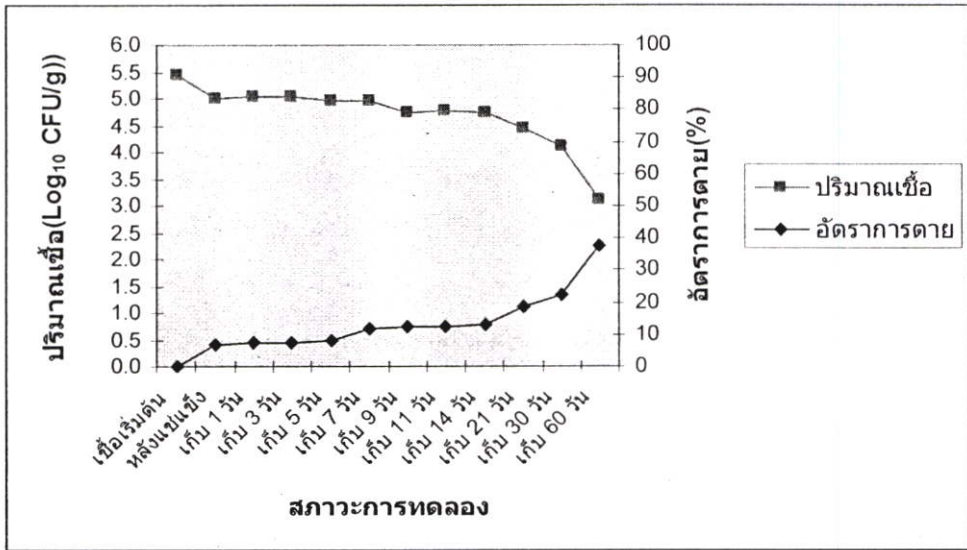
Schwartzberg (2000) กล่าวว่าอัตราการตายของจุลินทรีย์เกิดขึ้นในสองช่วงของกระบวนการแช่แข็งคือการแช่แข็งอย่างรวดเร็วและการเก็บในขณะเก็บรักษา (frozen storage) และ Erickson และ Hang (1997) กล่าวว่าอัตราการตายของจุลินทรีย์มากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งเป็นผลจากการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งทำให้น้ำในผลิตภัณฑ์อาหารกลายเป็นน้ำแข็ง ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ลดลง โดย a_w ของอาหารลดลงมีผลทำให้จุลินทรีย์ขาดอาหารและอาจตายได้ รวมถึงการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ทำลายเซลล์โดยจะไปทิ่มตำเซลล์ทำให้ผนังเซลล์และเยื่อเซลล์เกิดการฉีกขาด สารต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์จะรั่วไหลออกนอกเซลล์ ในที่สุดจุลินทรีย์จะตาย (บุษกร, 2545) ระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้นจะทำให้ผนังน้ำแข็งขยายตัวเพิ่มขนาดมากขึ้น ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายมากขึ้นตามไปด้วย แต่ปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งนั้นไม่เห็นเด่นชัดและเฉียบพันเหมือนอย่างการผ่านกระบวนการแช่เยือกแข็งซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว สร้างความเครียดอย่างรุนแรงแก่เซลล์และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำนั้นเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อย่างยิ่ง เซลล์ของเชื้อที่บาดเจ็บหลังจากการแช่เยือกแข็งไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ เซลล์ถูกทำลายและตายลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น (Calcott และ Macleod, 1974) ดังแสดงตามภาพที่ 4.7 4.8 และ 4.9



ภาพที่ 4.7 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น 3 Log₁₀ CFU/g ในปลาหมึกกระดองที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังแช่แข็งและเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 4.8 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น 4 Log₁₀ CFU/g ในปลาหมึกกระดองที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังแช่แข็งและเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 4.9 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น 5 Log₁₀ CFU/g ในปลาหมึกกระดองที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังจากแช่แข็งและเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ

4.6 ผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดที่ไม่ผ่านกระบวนการแช่แข็งในสภาวะแช่แข็งต่อการลดปริมาณของ เชื้อ *P. agglomerans*

หลังจากการทดลองนำตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดที่เดิมเชื้อ *P. agglomerans* ปริมาณ 5 Log₁₀ CFU/g ไปเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งในห้องเย็นอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่รอดชีวิต ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4.10

การเลือกปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มที่ใช้ในการทดลองนี้ เลือกที่ระดับสูงสุด 5 Log₁₀ CFU/g เนื่องจากหากผลการเก็บรักษาสามารถลดจำนวนเชื้อในระดับนี้ลงได้ จะระบุได้ว่าเชื้อที่ระดับต่ำกว่านี้มีโอกาสลดลงได้เช่นกัน การเก็บรักษาปลาหมึกกระดองสดที่ไม่ผ่านกระบวนการแช่เยือกแข็งนี้เป็นการศึกษาผลของการเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็งในห้องเย็นโดยตรง ไม่ให้เชื้อได้รับภาวะเครียดจากกระบวนการแช่แข็งมาก่อน จากผลการศึกษาพบว่าหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ

เชื้อโคลิฟอร์มดั้งเดิม โดยปริมาณการลดลงเท่ากับ $0.29 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หรือ 5.4 เปอร์เซ็นต์ วันที่ 3 5 7 9 และ 11 ปริมาณเชื้อลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับปริมาณเชื้อในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสดหลังจากเก็บรักษาในวันที่ 1 ในขณะที่วันที่ 14 21 30 และ 60 ปริมาณเชื้อลดลงอย่างชัดเจนและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับปริมาณเชื้อในวันที่ 1 3 5 7 9 และ 11 เมื่อครบ 1 เดือน เชื้อ *P. agglomerans* ลดจำนวนลงจากเชื้อตั้งต้นเท่ากับ $1.37 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หรือ 25.2 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อครบ 2 เดือน จะลดลงจากเชื้อตั้งต้นเท่ากับ $2.64 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หรือ 48.4 เปอร์เซ็นต์

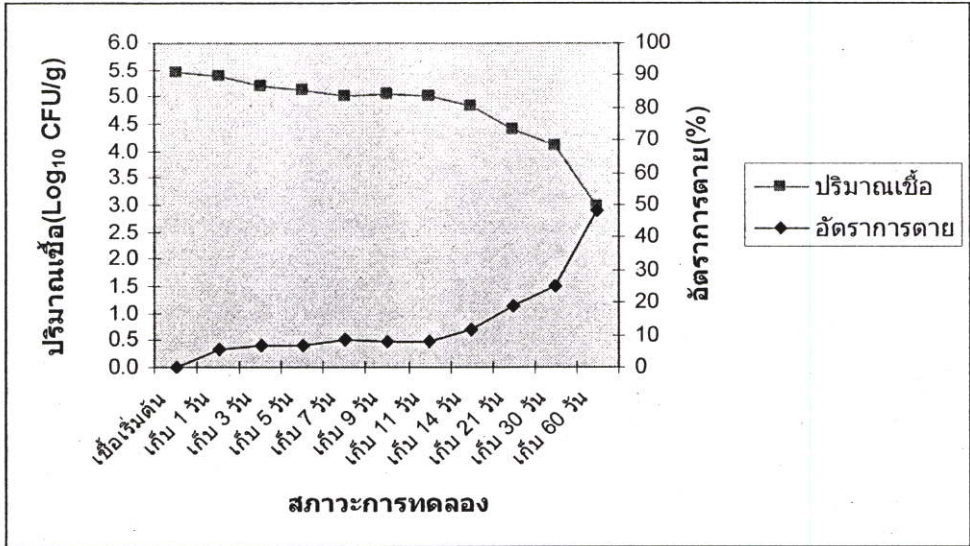
การเก็บรักษาปลาหมึกกระดองสดที่ไม่ผ่านกระบวนการแช่เยือกแข็งเป็นการศึกษาผลของการเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็งโดยตรงไม่ให้เชื้อได้รับภาวะเครียดจากกระบวนการแช่แข็งมาก่อนเรียกว่าเชื้อปกติ (Active cell) กับการนำปลาหมึกกระดองสดไปแช่แข็งก่อนการเก็บรักษาที่เชื้อได้รับความเครียดจากกระบวนการแช่เยือกแข็ง เซลล์เกิดการบาดเจ็บ และอยู่ในสภาพไม่สมบูรณ์เรียกว่าเชื้อบาดเจ็บ (Injure cell) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการลดลงของเชื้อทั้งสองการทดลอง พบว่าในช่วงแรกของการเก็บรักษา อัตราการลดลงของเชื้อบาดเจ็บลดปริมาณลงมากกว่าเชื้อปกติ คือผลการทดลองในการเก็บรักษาวันที่ 1 เชื้อบาดเจ็บลดลง $0.41 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หรือ 7.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อปกติ ลดลง 0.29 หรือ 5.4 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ในสัปดาห์ที่สองและสาม พบว่าเชื้อบาดเจ็บมีอัตราการลดลงใกล้เคียงกันกับเชื้อปกติ แต่เมื่อครบ 30 และ 60 วัน พบว่าอัตราการลดลงของเชื้อบาดเจ็บต่ำกว่าเชื้อปกติมาก ในวันที่ 30 เชื้อที่บาดเจ็บลดลง $1.20 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หรือ 22.1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อปกติลดลง $1.37 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หรือ 25.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในวันที่ 60 เชื้อที่บาดเจ็บลดลง $2.05 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หรือ 37.7 เปอร์เซ็นต์ เชื้อปกติลดลง $2.64 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ หรือ 48.4 เปอร์เซ็นต์

เนื่องจากเชื้อบาดเจ็บจำเป็นต้องได้รับสภาวะที่เหมาะสมในการซ่อมแซมตัวเองให้รอดชีวิตอยู่ได้ เมื่อถูกนำไปเก็บรักษาในห้องเย็นเป็นการเพิ่มความเครียดให้เชื้อ สภาวะในห้องเย็นอุณหภูมิต่ำไม่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *P. agglomerans* ที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Mesophile ซึ่งชอบอุณหภูมิปกติและไว (sensitive) ต่ออุณหภูมิแช่แข็ง (สมณฑา (ก), 2545) เมื่อเชื้อไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ก็จะตายลงอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามเมื่อเวลาการเก็บนานมากขึ้น เชื้อจะสามารถปรับตัวเข้ากับสภาวะดังกล่าวได้ (Bollman และคณะ, 2001) ทำให้อัตราการลดลงของเชื้อในการเก็บรักษาช่วงหลังต่ำกว่าช่วงแรก สำหรับเชื้อปกติที่สภาพสมบูรณ์ แข็งแรง เมื่อได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิต่ำที่ (-) 22 องศาเซลเซียส เป็นระดับความเย็นที่สูงกว่าความเย็นที่ใช้แช่แข็งที่ (-) 30 องศาเซลเซียส เชื้อจะได้รับความเครียดน้อยกว่าการบาดเจ็บลดน้อยลงเช่นเดียวกัน ดังนั้นในระยะแรกเชื้อปกติจึงลดปริมาณลงอย่างช้า แต่เมื่อเก็บเป็นเวลานานขึ้นเชื้อมีอัตราการลดลงอย่างรวดเร็วขึ้นจากขนาดของผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่เนื่องจากการแช่แข็งที่ใช้เวลานาน

การเก็บปลาหมึกกระดองสดไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเชื้อหลังจากเก็บรักษาลดลงต่ำกว่าในกรณีนำปลาหมึกกระดองไปผ่านการแช่แข็งแล้วเก็บรักษา ซึ่งเป็นไปได้ว่าการนำตัวอย่างปลาหมึกกระดองเก็บรักษาในห้องเย็นทันทีนั้นเป็นการแช่แข็งแบบช้า (slow freezing) การลดอุณหภูมิแบบช้าๆ อุณหภูมิของตัวอย่างอาหารจะอยู่ที่อุณหภูมิสมดุลของน้ำและน้ำแข็งหรือใกล้เคียงอุณหภูมิสมดุลนี้ ทำให้เกิดนิวเคลียสในจำนวนไม่มากและนิวเคลียสเหล่านี้จะค่อยๆ โตขึ้นทำให้ได้ผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ แต่ถ้าวการลดอุณหภูมิเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจะเกิดนิวเคลียสในปริมาณมากและจะ โตขึ้นในขนาดที่จำกัดเท่านั้น ขนาดเฉลี่ยของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจะแปรผันกับปริมาณนิวเคลียส ปริมาณนิวเคลียสที่เกิดขึ้นนี้สามารถควบคุมได้โดยการควบคุมอัตราการถ่ายเทความร้อนจากอาหาร รวมถึงเวลาที่ใช้ในการเกิดผลึกจะมีผลต่อรูปร่างของผลึกที่เกิดขึ้น ถ้าโมเลกุลน้ำมีเวลามากในการเกิดผลึก นั่นคือการลดอุณหภูมิเกิดขึ้นอย่างช้าๆผลึกที่เกิดขึ้นจะเป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal unit) แต่ถ้าใช้เวลาที่สั้นลงการจัดเรียงตัวจะเริ่มไม่เป็นระเบียบทำให้ไม่ได้ผลึกรูปหกเหลี่ยมแต่จะเกิดเป็นกิ่งก้านคล้ายต้นไม้ที่ไม่เป็นระเบียบ (irregular dendrites) เรียงตัวเป็นเป็นแนวรัศมีจากจุดกึ่งกลางของผลึก ยิ่งอัตราการลดอุณหภูมิสูงขึ้นผลึกที่เกิดขึ้นจะยิ่งบางขึ้นจนในที่สุดตัวอย่างจะมีลักษณะ โปร่งแสงมองไม่เห็นผลึกอีกต่อไป (กิตติพงษ์, 2545) การแช่แข็งแบบช้าทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่จะ ไปที่มเทงผนังเซลล์ให้ฉีกขาดและทำให้จุลินทรีย์ขาดเจ็บและตายได้มากกว่า โดยเฉพาะเชื้อ โคลิฟอร์มเซลล์ปกติ (vegetative cell) จุลินทรีย์ในกลุ่มของมิโซไฟลัสจะทนทานต่อการลดอุณหภูมิน้อย เมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำเป็นเวลานานผลของอุณหภูมิทำให้จุลินทรีย์ถูกทำลายจนลดปริมาณลง รวมถึงระยะเวลาการเก็บรักษาที่ยาวนานทำให้จุลินทรีย์ขาดอาหาร (บุญกร, 545)

ถึงแม้ว่าการนำปลาหมึกกระดองสดไปเก็บรักษาในห้องเย็นโดยไม่ผ่านกระบวนการแช่แข็งสามารถทำให้ปริมาณของเชื้อ *P. agglomerans* ลดลงได้มากกว่าการนำปลาหมึกกระดองสดไปแช่แข็งก่อนเก็บรักษาในห้องเย็น เป็นผลดีต่อความปลอดภัยในการนำไปบริโภค แต่หากพิจารณาถึงคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดพร้อมบริโภค พบว่าการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและเก็บรักษาเป็นเวลานานเกิดผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ด้านกายภาพ ทั้งลักษณะเนื้อสัมผัส สี กลิ่น และ รสชาติ การเกิดลักษณะเช่นนี้เนื่องมาจากการแช่แข็งแบบช้า (Slow Freezing) ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ และเป็นผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ เซลล์จะเกิดการหดตัว คุณภาพของอาหารจะต่ำลงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความสดมากแตกต่างจากการแช่แข็งแบบเร็ว (Fast Freezing) ที่ทำให้ได้ผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านกายภาพและเคมีน้อยกว่าทำให้คุณภาพของอาหารดีกว่า (กิตติพงษ์, 2545) นอกจากนี้ อาจส่งผลต่ออายุการเก็บรักษา จากการทดลองหลังจากนำปลาหมึกกระดองสดที่เก็บไว้ในห้องเย็นเป็นเวลา 60 วัน มาละลายตรวจสอบคุณภาพพบว่าเนื้อสัมผัสของปลาหมึกกระดองสดมีลักษณะ

หยาบกระด้าง สีเหลืองขุ่น มีกลิ่นคาว และพบการไหลเยิ้มของน้ำ (Drip loss) มากกว่าปลาหมึก กระดองสดที่ผ่านการแช่แข็งแล้วในไปเก็บรักษา ซึ่งคุณภาพทางกายภาพปกติ ใกล้เคียงกับปลาหมึก กระดองสดมาก จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาปฏิบัติจริงในอุตสาหกรรมอาหาร



ภาพที่ 4.10 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น 5 Log₁₀CFU/g ในปลาหมึกกระดองที่รอดชีวิตและอัตราการตายภายหลังเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อ โคลิฟอร์มในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองรับเข้าโรงงาน การจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อโคลิฟอร์มที่พบจริงในโรงงาน ผลของการแช่แข็งด้วยอากาศเย็น (Air Blast) และการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งในห้องเย็นต่อการลดจำนวนเชื้อโคลิฟอร์มในผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดที่เป็นอาหารรับประทานดิบ เพื่อลดและป้องกันความเสี่ยงของผู้บริโภคที่จะได้รับอันตรายจากอาหารเมื่อบริโภคเข้าไป รวมถึงให้ผลิตภัณฑ์ได้มาตรฐานทางการค้าสามารถสรุปได้ดังนี้

1. พบว่าปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มที่ตรวจพบในวัตถุดิบปลาหมึกกระดองสดที่รับเข้าโรงงานในปี 2547 ระดับต่ำสุดคือ $0.7 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ หรือประมาณ $1 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ระดับกลางที่พบประมาณ $2 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และระดับสูง $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ซึ่งในเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนมกราคมนั้นเป็นช่วงหน้าหนาวที่อุณหภูมิภายนอกค่อนข้างต่ำการพบเชื้อจึงน้อยกว่าช่วงเดือนอื่น

2. ชนิดและสายพันธุ์เชื้อโคลิฟอร์มที่จำแนกจากการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดในห้องปฏิบัติการภายในโรงงาน คือ เชื้อ *Pantoea agglomerans*

3. การรอดชีวิตของเชื้อ *P. agglomerans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยอากาศเย็น (Air Blast) อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งในห้องเย็น อุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน ที่ชั่วโมงที่ pre-enrichment ต่างๆ พบว่า

ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ และ $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ หลังการแช่แข็ง หลังการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็ง 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บคือ 8 8 8 8 8 8 8 10 10 12 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ

ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ความเข้มข้น $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ หลังการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็ง 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บคือ 8 8 8 8 8 8 10 10 12 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ

4. ผลของการแช่แข็งปลาหมึกกระดองสดด้วยอากาศเย็น (Air Blast) อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งในห้องเย็น อุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 นาที ที่ผ่านการเติมเชื้อ *P. agglomerans* 3 Log₁₀ CFU/g 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g พบว่า

หลังการแช่แข็งด้วยอากาศเย็น (Air Blast) อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่เติม 3 Log₁₀ CFU/g 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g ลดลงเท่ากับ 0.39 Log₁₀ CFU/g 0.36 Log₁₀ CFU/g และ 0.35 Log₁₀ CFU/g หรือ 10.8 เปอร์เซ็นต์ 7.8 เปอร์เซ็นต์ และ 6.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

หลังเก็บรักษาปลาหมึกกระดองที่ผ่านการแช่แข็งในห้องเย็นอุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. agglomerans* ที่เติมในปลาหมึกกระดองทั้ง 3 ระดับ 3 Log₁₀ CFU/g 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g มีการลดลงปริมาณลงอย่างต่อเนื่อง โดยการลดปริมาณที่เห็นผลเด่นชัดใช้เวลาประมาณ 30 วัน สามารถลดปริมาณเชื้อตั้งต้นลงได้ประมาณ 1 Log cycle หลังการเก็บรักษาเท่ากับ 1.44 Log₁₀ CFU/g 1.25 Log₁₀ CFU/g และ 1.21 Log₁₀ CFU/g และผลการทดลองวันที่ 60 ปริมาณเชื้อลดลงหลังการเก็บรักษาเท่ากับ 2.20 Log₁₀ CFU/g 2.11 Log₁₀ CFU/g และ 2.05 Log₁₀ CFU/g

5. ผลของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดที่เติมเชื้อ *P. agglomerans* 5 Log₁₀ CFU/g ในสภาวะแช่แข็งในห้องเย็น อุณหภูมิ (-) 22 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน พบว่าปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ลดลงปริมาณลงอย่างต่อเนื่อง โดยการลดปริมาณที่เห็นผลเด่นชัดใช้เวลาประมาณ 30 วัน สามารถลดปริมาณเชื้อตั้งต้นลงได้ประมาณ 1.3 Log cycle ปริมาณเชื้อลดลงหลังการเก็บรักษาเท่ากับ 1.37 Log₁₀ CFU/g และผลการทดลองวันที่ 60 ปริมาณเชื้อลดลงหลังการเก็บรักษาเท่ากับ 2.64 Log₁₀ CFU/g ซึ่งสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้มากกว่าผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองที่ผ่านการแช่แข็งมาก่อน

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าประสิทธิภาพการลดเชื้อโคลิฟอร์มของกระบวนการแช่แข็งด้วยอากาศเย็น (Air Blast) อุณหภูมิ (-) 30 องศาเซลเซียส โดยประมาณ 0.3 -0.4 Log₁₀ CFU/g หรือประมาณ 7-11 เปอร์เซ็นต์นั้น ไม่เพียงพอที่จะลดเชื้อโคลิฟอร์มลงให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยตามมาตรฐานของญี่ปุ่น คือ ไม่พบ (Japan Food Hygiene Association, 1997) ส่วนการเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็งในห้องเย็นจะมีประสิทธิภาพในการลดเชื้อมากกว่า โดยอัตราการลดลงขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บรักษา การเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นไม่สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ถึงระดับที่ทำให้เกิดความปลอดภัยในการบริโภคได้ การเก็บรักษาในระยะเวลายาวสามารถทำได้ แต่การใช้เวลานานไม่เหมาะต่อการนำไปประยุกต์ใช้จริง ซึ่งจะเกิดผลเสียหลายประการ เช่น ค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา ไม่สามารถจ่ายของตามลำดับก่อนหลังและเกิดปัญหาอายุสินค้า ซึ่งลูกค้าเห็นว่าเป็นสินค้า

เก่า ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาแนวทางควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นในวัตถุดิบ และการป้องกันไม่ให้เชื้อเกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน รวมไปถึงการป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมอื่นๆ โดยอาศัยเครื่องมือการประกันคุณภาพ ไม่ว่าจะเป็นการคัดเลือกว่าวัตถุดิบ การควบคุมสุขลักษณะของเรือจับ การขนส่ง และภาชนะอุปกรณ์ต่างๆ ตั้งแต่ต้นทางจนถึงโรงงาน จะต้องปฏิบัติตามระบบสุขลักษณะพื้นฐานการผลิตอาหาร (GMP) เข้มงวดในการควบคุมอุณหภูมิ และ เวลาในการผลิต เฝ้ารวังและทวนสอบเชื้อโดยตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาอย่างสม่ำเสมอ เป็นแนวทางที่สำคัญในการช่วยลดอันตรายในการบริโภคผลิตภัณฑ์ปลาหมึกกระดองสดแช่เยือกแข็งให้สามารถควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ได้ตามมาตรฐานของสินค้ารับประทานดิบ

บรรณานุกรม

- กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ (ก). กรมประมง . 2547 .
คู่มือสุขลักษณะในการผลิตผลิตภัณฑ์ประมง. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
 กรุงเทพฯ.
- กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ (ข). กรมประมง.2547.
*ข้อกำหนดสุขลักษณะในการผลิตผลิตภัณฑ์ประมง และการจัดระบบวิเคราะห์อันตรายและ
 ความคุมจุดวิกฤตในการผลิตผลิตภัณฑ์ประมง*. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.
 กรุงเทพฯ.
- กิตติพงษ์ ห่วงรัศมี. 2545. *กระบวนการแปรรูปอาหาร*. เอกสารประกอบการสอน. ภาควิชา
 อุตสาหกรรมเกษตร.คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ
 ทหารลาดกระบัง.
- ดวงพร คันธโชติ. 2531. *อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ*. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- บุษกร อุดรภิชาดิ . 2545. *จุลชีววิทยาทางอาหาร* . ภาควิชาชีววิทยา . คณะวิทยาศาสตร์.มหาวิทยาลัย
 ทักษิณ.
- บุหพันธ์ พิทักษ์ผล และ ทศนี สรสุชาติ. 2538. *การถนอมอาหารในปัจจุบัน*. Available at
<http://www.ku.ac.th/e-magazine/february44/agri/food.html>. 17 กุมภาพันธ์ 2549 .
- มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2538. *จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง*. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง.
 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มาลัย บุญรัตนกรกิจ. 2539. *จุลินทรีย์ในอาหารแช่เย็นและแช่เยือกแข็ง*. เอกสารการฝึกอบรมเรื่อง
 เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหารแช่เย็นและแช่เยือกแข็ง : การควบคุมและตรวจวินิจฉัย.
 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รัตนภัทร เทียงมิตร. 2544. *การลดปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคบางชนิดในกระบวนการผลิต
 ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
 ลาดกระบัง
- เรียววิชิ โยชิอิ. 2541. *ซูชิ-ข้าวปั้น* . เพชรกระรัตสตูดิโอ. กรุงเทพฯ.
- วราวุฒิ ครุสง. 2538. *จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร*. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- วราวุฒิ ครุสง ประภาพร ขอไพบุลย์ และ อติสร เสวตวิวัฒน์. 2539. *มารู้จักการตรวจสอบระบบ
 HACCP กัน*. วารสารจารย์พา , ฉบับที่ 27 (กค 2539) .หน้า 41-44

- ศศิกานต์ อึ้งนิภากุล. 2546. การใช้สารผสมเปอร์ออกซีแอซติกแอซิดในการลดปริมาณ *Listeria monocytogenes* บนเปลือกในกุ้งสดก่อนกระบวนการแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมาลี เหลืองสกุล. 2527. จุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (ก). 2545. จุลชีววิทยาในอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (ข). 2545. ความปลอดภัยของอาหาร. สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). กรุงเทพฯ.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์ (ค). 2545. การสุขาภิบาลอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุวิมล กীরติพิบูล. 2543. GMP ระบบการจัดการและควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัย. สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). กรุงเทพฯ.
- สุวิมล กীরติพิบูล. 2544. GMP ระบบประกันคุณภาพด้านความปลอดภัยของอาหาร HACCP. สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). กรุงเทพฯ.
- อรัญ หันพงษ์กิตติกุล. 2518. การศึกษานักเตรียมวิทยาของกุ้งระหว่างกรรมวิธีการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Amos Nussinovitch and Micha Peleg. 2000. Analysis of the fluctuating patterns of microbial counts in frozen industrial food product. *J. Food Research International*. 33 : 53-62.
- Bald, W.B. 1991. In *Food Freezing : Today and Tomorrow* . Springer-Verlag. New York.
- Banwart, G.J. 1989. *Basic Food Microbiology*. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Bollman, J., Ismond, A., and Blank, G. 2001. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in frozen foods : impact of the cold shock response. *J. Food Microbiology* , 64 : 127-138.
- Brown, B.E. 1999. *Nation Legislation , Guideline & Standards Governing Microbiology*. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. New York : 1549 – 1570.
- Calcott, P.H. and Macleod, R.A. 1974. Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage : a theoretical and practical study. *Can. J. Microbiol.* 20: 671-681.
- El-Kest, S. E. and Marth, E. H. 1992. *Freezing of Listeria monocytogenes and other microorganisms: A review*. *J. Food Protection*, 55 : 639-64
- Enterobacter agglomerans* . Available at <http://www.thelabrat.com>. 14 December 05.
- Erickson, M.G. and Hung, Y.C. 1997. *Quality in Frozen Food*. Chapman & Hall. Washington D.C.
- Escherichia , Klebsiella , Enterobacter , Serratia , Citrobacter , and Proteus*. Available at <http://www-e.medtools.com>. 15 February 06 .

- Farrell, G. M. and Upton, M. E., 1978. *The effect of low temperature on the growth and survival of Staphylococcus aureus and Salmonella typhimurium when inoculated on to bacon*. J. Food Technology, 13 : 15-23.
- Fennema, O.R, Power, W.D. and Marth, E.H., 1973. *Low – Temperature Preservation of Foods and living matter*. Marcel Dekker.Inc., New York.
- Food and Drug Administration. 1998. *Bacteriological Analytical Manual*. 8 th. Gaithersburg, USA.
- Forysthe, S.J. 2000. *The Microbiology of safe Food*. Black Well Science. London.
- Frazier, W. C. and Westhoff, D. C., 1988. *Food Microbiology*. McGraw Hill. New York.
- Hatha, A.A. M, Paul, N. and Rao, B. 1998. Bacteriological quality of individually quick- frozen (IQF) raw and Cooked ready-to-eat shrimp produced from farm raised black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Microbiol.* 15 : 177-183.
- ISO 4831. 1991. *Microbiology – General Guidance for the Enumeration of Coliforms – Most Probable Number Technique*. 2 nd. London. English.
- Japan Food Hygiene Association. 1997. *Food Sanitation Law. Tokyo: Japan Food Hygiene Association*. Japan Food Hygiene Association. Tokyo.
- Kraft, A.A., 1992. *Psychrotrophic Bacteria in Food : Disease and Spoilage*. CRC Press. Florida.
- Mackey, B.M., Derrick, C.M. and Thomas J.A. 1980. *The recovery of sub-lethally injured Escherichia coli from frozen meat*. Journal of Applied Bacteriology, 48 : 315-324.
- Meryman, H. T., 1966. *Review of biological freezing*. In: Cryobiology London and New York: Academic Press.
- Palumbo, S. A. and Williams, A. C. 1991. *Resistance of Listeria monocytogenes to freezing in foods*. Food Microbiol, 8 : 63-68.
- Pandey, A. 1999. *Enterobacteriaceae, Coliform and E.coli*. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. New York. PP. 604 – 617.
- Piersan, M.D. and Smoot, L.M. 2001. *Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria*. Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers. 2nd Ed. 71-85. ASM Press. Washington D.C.
- Ray, B. and Speck, M.L. 1972. *Enumeration of Escherichia coli in Frozen Sample After Recovery from Injury*. Available at <http://www.pubmedcentral.nih.gov>.
15 February 06.

- Russell, S.M.1997. *The Effect of Refrigerated and Frozen Storage on Population of Mesophilic and Coliform Bacteria on Fresh Broiler Chicken Carcasses* . Department of Poultry Science. University of Georgia, USA.
- Schwartzberg, H. 2000. *Freezing Systems for the Food Industry*. Encyclopedia of Foodscience and Technology, 2 nd.Ed. John Wiley & Sons.inc, New York. PP.1112 – 1138.
- Sheridan ,J.J.1997. *The effect of freezing on the survival of pathogens in different Meat types And the effect of varying lean fat ratios*. Available at <http://www-e.medtools.com>. 15 February 06.
- Sheryl, A. and Linda, J.2001.The effects of freezing and thawing on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice. *J. Food Microbiology* ,67 :89-96.
- Singhal,R.S. and Kulkarni , P.R.1999. *Freezing of foods* . Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. New York. PP.840-849.
- Suwansonthichai,S. and Rengpipat, S.2003.Enumeration of coliform and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp *Penaeus monodon* by conventional and rapid methods. *J. Food Microbiology* ,81 :113-121.
- Uyttendaele, M.,Vankeirsbilck, S. and Debevere , J.2001. *Recovery of heat – stressed E.coli 0157:H 7 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 21 °C*. *J. Food Microbiology*, 18 : 511-519.

ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์

การเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ (Stock culture solution)

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ *Pantoea agglomerans* เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์หมักกระดองที่ผลิตจริงในโรงงานซึ่งตรวจวิเคราะห์ภายในห้องปฏิบัติการทดสอบและโดยส่งไปจำแนก (Identify) ชนิดของเชื้อที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

เชื้อดังกล่าวเลี้ยงบน Nutrient Agar (NA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อเดือนละครั้ง

การเตรียมสารละลายบริสุทธิ์ทำโดยการถ่ายเชื้อจาก Nutrient Agar (NA) ปริมาณ 1 ลูกปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA Slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายเชื้อจาก TSA Slant ปริมาณ 1 ลูกปลงในหลอดที่บรรจุ Trypticase soy broth (TSB) ปริมาณ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูดสารละลายที่มีเชื้อเจริญอยู่นี้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงใน TSB 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อโดย 10^8 CFU/ml จากนั้นนำไปเจือจางในสารละลาย phosphate – buffered dilution water จนกระทั่งได้ปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/ml 10^4 CFU/ml และ 10^3 CFU/ml เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ภาคผนวก ข.
การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ และการเตรียม

1.1 Butterfield 's phosphate – buffered dilution water

การเตรียม stock solution มีส่วนประกอบดังนี้

- KH_2PO_4 34 กรัม
- น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

หลังจากสาร KH_2PO_4 ละลายหมดแล้วปรับค่า pH ให้ได้ 7.2 ± 0.2 และนำไปทำการฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บรักษาในตู้เย็น อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer นำสารละลาย stock solution มา 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับค่า pH อีกครั้งให้ได้ 7.2 ± 0.2 และบรรจุลงในขวดแก้วขนาด 300 มิลลิลิตร ในปริมาตร 225 มิลลิลิตร และหลอดทดลองขนาด 20 x 200 มิลลิเมตร ปริมาณ 9 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.2 Chromocult Coliform Agar (CC) จากบริษัท Merck

การเตรียมมีส่วนประกอบดังนี้

- Chromocult Coliform Agar 26.5 กรัม
- น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ก่อนการฆ่าเชื้อ ให้ได้ 6.8 ± 0.2 ละลายให้เข้ากันโดยใช้เครื่องไมโครเวฟให้ความร้อนช่วยในการละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ใน Water bath อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส รอการใช้งาน

1.3 Nutrient Agar (NA) จากบริษัท Merck

การเตรียมมีส่วนประกอบดังนี้

- Nutrient Agar 20.0 กรัม
- น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ก่อนการฆ่าเชื้อให้ได้ 7.0 ± 0.2 คนจนละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.4 Trypticase soy broth (TSB) จากบริษัท Merck

การเตรียมมีส่วนประกอบดังนี้

- | | | |
|------------------------|------|-----------|
| - Trypticase soy broth | 30 | กรัม |
| - น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดลงในน้ำกลั่น ปรับค่า pH ก่อนการฆ่าเชื้อให้ได้ 7.3 ± 0.2 คนจนละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ค.

การตรวจนับเชื้อ *P. agglomerans* ที่เหลือรอด

1. การเตรียมตัวอย่าง

3.5.2.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก โดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) แล้วเติมสารละลาย Butterfield's Phosphate Buffer ลงไป 225 มิลลิลิตร

3.5.2.2 นำไปตีปั่นด้วย เครื่อง Stomacher นาน 1 นาที หลังจากขั้นตอนนี้จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้น 1 : 10 เท่า

3.5.2.3 ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่าง โดยปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้น 1 : 10 มา 1 มิลลิลิตรใส่ในสารละลาย Butterfield's Phosphate Buffer ปริมาณ 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีค่าความเจือจาง 1:100 เท่า ทำการผสมสารละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่อง Vortex นาน 15 วินาที

2. การดำเนินการทดสอบ

3.5.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ค่าความเข้มข้น คือ 1 : 100 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มตามอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาดังนี้

- ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ความเข้มข้น 3 Log₁₀ CFU/g 4 Log₁₀ CFU/g และ 5 Log₁₀ CFU/g หลังการแช่แข็ง หลังการเก็บรักษาในสถานะแช่แข็ง 1 3 5 7 9 11 14 21 30 และ 60 วัน พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บคือ 8, 8, 8, 8, 8, 8, 8, 10, 10, 12, 12 ชั่วโมงตามลำดับ
- ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ความเข้มข้น 5 Log₁₀ CFU/g หลังการเก็บรักษาในสถานะแช่แข็ง 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21, 30 และ 60 วัน พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเชื้อเพื่อรักษาเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บคือ 8, 8, 8, 8, 8, 8, 8, 10, 10, 12, 12 ชั่วโมงตามลำดับ

3.5.3.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างหลังจากการบ่มในข้อ 3.5.3.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เทอาหารเชื้อ Chromocult Coliform Agar จากบริษัท Merck (Thailand) ลงไปในจานเพาะเชื้อปริมาณ 15- 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มที่ 35 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

3.5.3.3 อ่านผลการทดสอบ โดยลักษณะจำเพาะของเชื้อโคลิฟอร์ม คือ เกิดโคโลนีชมพู นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด แล้วคูณด้วยค่าความเจือจาง 100 บันทึกผลการทดสอบเป็นจำนวนของเชื้อโคลิฟอร์มทั้งหมดที่พบ

ภาคผนวก ง.

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางภาคผนวก ง.1 : ผลการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *P. agglomerans* ในตัวอย่างปลาหมึกกระดองสด
หลังจากการทดลองในสภาวะต่างๆ

Code	รายละเอียดตัวอย่าง	Log ₁₀ CFU/g
A001	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 1	3.79
A002	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 1	3.86
A003	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 2	3.12
A004	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 2	3.18
A005	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 3	3.67
A006	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 3	3.72
A007	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 1	3.48
A008	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 1	3.42
A009	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 2	2.79
A010	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 2	2.75
A011	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 3	3.31
A012	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 3	3.29
A013	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 1	3.53
A014	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 1	3.48
A015	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 2	2.75
A016	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 2	2.70
A017	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 3	3.18
A018	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 3	3.16
A019	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 1	3.48
A020	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 1	3.43
A021	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 2	2.62
A022	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 2	2.66
A023	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻³ cfu/g ครั้งที่ 3	3.11

Code	รายละเอียดตัวอย่าง	Log ₁₀ CFU/g
B002	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.52
B003	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	4.31
B004	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	4.39
B005	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.91
B006	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.86
B007	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.33
B008	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.40
B009	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	4.01
B010	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	4.08
B011	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.35
B012	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.30
B013	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.26
B014	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.18
B015	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	4.21
B016	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	4.18
B017	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.43
B018	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.48
B019	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.20
B020	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.15
B021	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	4.16
B022	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	4.22
B023	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.42
B024	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.38
B025	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 5 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.18
B026	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 5 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	4.10

Code	รายละเอียดตัวอย่าง	Log ₁₀ CFU/g
B052	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 14 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	3.98
B053	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 14 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.08
B054	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 14 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.12
B055	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	3.89
B056	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	3.81
B057	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	3.68
B058	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	3.72
B059	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.08
B060	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	4.00
B061	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	3.38
B062	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	3.32
B063	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	3.16
B064	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	3.12
B065	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	3.60
B066	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	3.55
B067	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	2.50
B068	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 1	2.43
B069	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	2.37
B070	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 2	2.30
B071	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	2.65
B072	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁴ cfu/g ครั้งที่ 3	2.72
C001	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.36
C002	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.46
C003	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.71
C004	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.78

Code	รายละเอียดตัวอย่าง	Log ₁₀ CFU/g
C005	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	5.15
C006	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	5.20
C007	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.04
C008	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.08
C009	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.35
C010	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.31
C011	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.85
C012	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังการแช่แข็ง 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.77
C013	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	4.96
C014	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.04
C015	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.27
C016	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.33
C017	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.76
C018	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.81
C019	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	4.96
C020	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.04
C021	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.31
C022	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.40
C023	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.79
C024	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 3 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.70
C025	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 5 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.08
C026	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 5 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.05
C027	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 5 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.22
C028	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 5 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.21
C029	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 5 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.73

Code	รายละเอียดตัวอย่าง	Log ₁₀ CFU/g
C055	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	4.50
C056	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	4.43
C057	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	4.78
C058	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	4.72
C059	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.08
C060	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 21 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.14
C061	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	4.38
C062	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	4.35
C063	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	4.49
C064	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	4.51
C065	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	3.82
C066	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	3.88
C067	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	3.55
C068	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	3.62
C069	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	3.60
C070	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	3.52
C071	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	3.01
C072	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	3.05
D001	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.15
D002	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.11
D003	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.72
D004	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	5.61
D005	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	5.59
D006	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองที่เติมเชื้อ 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	5.60
D007	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 1 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	5.00

Code	รายละเอียดตัวอย่าง	Log ₁₀ CFU/g
D058	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	4.03
D059	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.33
D060	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 30 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	4.29
D061	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	2.60
D061	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 1	2.65
D062	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	2.82
D061	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 2	2.86
D061	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	2.98
D061	ตัวอย่างปลาหมึกกระดองหลังเก็บ 60 วัน 10 ⁻⁵ cfu/g ครั้งที่ 3	3.01

ตารางภาคผนวก ง.2 : ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวมและเชื้อ โคลิฟอร์มล์หลังผ่านกระบวนการล้าง

กระบวนการ	ปริมาณเชื้อ จุลินทรีย์รวม (Log ₁₀ CFU/g)	ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์มล์ (CFU/g)	ความเข้มข้น ของน้ำคลอรีน (PPM)
ปลาหมึกกระดองก่อนล้าง	4.5	60	50
ปลาหมึกกระดองหลังล้างน้ำคลอรีน 50 PPM ครั้งที่ 1	4.1	15	50
ปลาหมึกกระดองหลังล้างน้ำคลอรีน 50 PPM ครั้งที่ 2	3.8	< 5	50
ปลาหมึกกระดองหลังล้างน้ำสะอาด ครั้งที่ 1	3.6	< 5	0
ปลาหมึกกระดองหลังล้างน้ำสะอาด ครั้งที่ 2	3.4	< 5	0
ปลาหมึกกระดองหลังล้างน้ำสะอาด ครั้งที่ 3	3.3	< 5	0

ตารางภาคผนวก ง.3 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น $3 \text{ Log}_{10} \text{CFU/g}$ ในปลาหมึกกระดองสดที่รอดชีวิตหลังผ่านการแช่แข็งด้วยระบบ Air Blast และเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ

สภาวะการทดลองกระบวนการ	ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์ม ($\text{Log}_{10} \text{CFU/g}$)	อัตราการตาย %
การสร้างปริมาณการปนเปื้อนเริ่มต้น	3.56 ± 0.32^f	-
หลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง	3.17 ± 0.32^c	10.8
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 1 วัน	3.13 ± 0.35^c	11.9
“ ----- ” 3 วัน	3.08 ± 0.37^c	13.5
“ ----- ” 5 วัน	3.03 ± 0.37^c	14.8
“ ----- ” 7 วัน	2.89 ± 0.32^d	18.9
“ ----- ” 9 วัน	2.87 ± 0.33^d	19.4
“ ----- ” 11 วัน	2.83 ± 0.28^d	20.4
“ ----- ” 14 วัน	2.79 ± 0.18^d	21.6
“ ----- ” 21 วัน	2.48 ± 0.19^c	30.2
“ ----- ” 30 วัน	2.12 ± 0.13^b	40.5
“ ----- ” 60 วัน	1.36 ± 0.23^a	61.8

* ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

^f ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางภาคผนวกที่ ง.4 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น $4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ในปลาหมึกกระดองสดที่รอดชีวิตหลังผ่านการแช่แข็งด้วยระบบ Air Blast และเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ

สถานะการทดลองกระบวนการ	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$)	อัตราการตาย (%)
การสร้างปริมาณการปนเปื้อนเริ่มต้น	4.61 ± 0.24^f	-
หลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง	4.25 ± 0.16^e	7.8
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 1 วัน	4.29 ± 0.13^e	6.8
“ ----- ” 3 วัน	4.26 ± 0.12^e	7.6
“ ----- ” 5 วัน	4.24 ± 0.12^e	7.8
“ ----- ” 7 วัน	4.13 ± 0.12^d	10.3
“ ----- ” 9 วัน	4.11 ± 0.08^d	10.8
“ ----- ” 11 วัน	4.11 ± 0.04^d	10.8
“ ----- ” 14 วัน	4.05 ± 0.05^d	12.1
“ ----- ” 21 วัน	3.86 ± 0.16^c	16.1
“ ----- ” 30 วัน	3.36 ± 0.20^b	27.1
“ ----- ” 60 วัน	2.50 ± 0.16^a	45.8

* ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

¹ ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางภาคผนวกที่ ง.5 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ในปลาหมึกกระดองสดที่รอดชีวิตหลังผ่านการแช่แข็งด้วยระบบ Air Blast และเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ

สภาวะการทดลองกระบวนการ	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$)	อัตราการตาย (%)
การสร้างปริมาณการปนเปื้อนเริ่มต้น	5.44 ± 0.26^f	-
หลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง	5.07 ± 0.23^c	6.9
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 1 วัน	5.03 ± 0.23^c	7.6
“ ----- ” 3 วัน	5.03 ± 0.28^c	7.5
“ ----- ” 5 วัน	5.00 ± 0.23^c	8.1
“ ----- ” 7 วัน	4.80 ± 0.34^d	11.9
“ ----- ” 9 วัน	4.74 ± 0.19^d	12.2
“ ----- ” 11 วัน	4.76 ± 0.24^d	12.6
“ ----- ” 14 วัน	4.74 ± 0.19^d	12.9
“ ----- ” 21 วัน	4.44 ± 0.29^c	18.4
“ ----- ” 30 วัน	4.24 ± 0.31^b	22.1
“ ----- ” 60 วัน	3.39 ± 0.28^a	37.7

* ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

[†] ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ตารางภาคผนวกที่ ง.6 : ปริมาณเชื้อ *P. agglomerans* ที่ระดับความเข้มข้น $5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ ในปลาหมึกกระดองสด ที่รอดชีวิตหลังจากเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งที่เวลาต่างๆ

สภาวะการทดลองกระบวนการ	ปริมาณเชื้อโคลิฟอร์ม ($\text{Log}_{10} \text{ CFU/g}$)	อัตราการตาย (%)
การสร้างปริมาณการปนเปื้อนเริ่มต้น	5.46 ± 0.26^f	-
หลังจากการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเป็นเวลา 1 วัน	5.17 ± 0.16^c	5.0
“ ----- ” 3 วัน	5.09 ± 0.18^c	6.9
“ ----- ” 5 วัน	5.11 ± 0.21^c	6.5
“ ----- ” 7 วัน	5.01 ± 0.19^c	8.2
“ ----- ” 9 วัน	5.04 ± 0.18^c	7.8
“ ----- ” 11 วัน	5.03 ± 0.15^c	8.0
“ ----- ” 14 วัน	4.84 ± 0.11^d	11.4
“ ----- ” 21 วัน	4.39 ± 0.36^c	19.6
“ ----- ” 30 วัน	4.09 ± 0.18^b	25.2
“ ----- ” 60 วัน	2.82 ± 0.17^a	48.4

* ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

¹ ตัวอักษรเหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ประวัติผู้เขียน

นางอารีรัตน์ ไพรีพายฤทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 16 มิถุนายน 2520 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาวិทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีการศึกษา 2542 ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร ปี พ.ศ. 2546 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2548

ประวัติการทำงาน

- | | |
|-----------|---|
| พ.ศ. 2542 | อาจารย์ช่วยสอนภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร
สถาบันราชภัฏนครราชสีมา |
| พ.ศ. 2542 | หัวหน้าส่วนห้องปฏิบัติการทดสอบ
บริษัทสุรพลฟู๊ดส์ จำกัด (มหาชน) สาขาการบินบุรี |
| พ.ศ. 2544 | หัวหน้าส่วนประกันคุณภาพ
บริษัทสุรพลฟู๊ดส์ จำกัด (มหาชน) สาขาการบินบุรี |
| พ.ศ. 2547 | ผู้จัดการฝ่ายประกันคุณภาพ
บริษัทสุรพลฟู๊ดส์ จำกัด (มหาชน) สาขาการบินบุรี |
| พ.ศ. 2549 | Project Specialist
บริษัทสุรพลฟู๊ดส์ จำกัด (ในเครือ บริษัทสุรพลฟู๊ดส์ จำกัด (มหาชน)) |