# การลด *Salmonella* Enteritidis บนเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก

# Reduction of *Salmonella* Enteritidis on Surface of Eggshell by Fermented Vinegar

นางสาวจิราวรรณ ยี่สิบแสน
JIRAWAN YEESIBSAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีวาภิบาลอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2552
KMITL-2009-AT-M-054-50

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การลด *Salmonella* Enteritidis บนผิวเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก

# Reduction of *Salmonella* Enteritidis on Surface of Eggshell by Fermented Vinegar

นางสาวจิราวรรณ ยี่สิบแสน

JIRAWAN YEESIBSAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-AT-M-054-50

# Reduction of *Salmonella* Enteritidis on Surface of Eggshell by Fermented Vinegar

JIRAWAN YEESIBSAN

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

2009

KMITL-2009-AT-M-054-50

**COPYRIGHT 2009**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การลด *Salmonella* Enteritidis บนผิวเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก |
| **นักศึกษา** | นางสาวจิราวรรณ ยี่สิบแสน |
| **รหัสประจำตัว** | 49068769 |
| **ปริญญา** | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต |
| **สาขาวิชา** | สุขาภิบาลอาหาร |
| **พ.ศ.** | 2552 |
| **อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** | รศ.ดร. วราวุฒิ ครูส่ง |


## บทคัดย่อ

การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Enteritidis (SE) บนเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก โดยการศึกษาเบื้องต้นด้วยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion Method ทำการทดสอบโซนยับยั้งที่เกิดจากน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 1% ถึง 5% (v/v) บนอาหารแข็ง Mueller Hinton พบว่า โซนยับยั้งมีขนาดกว้างขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อความเข้มข้นของกรดในน้ำส้มสายชูหมักเพิ่มขึ้น และมีค่า pH ในช่วง 2.3-4.9 เมื่อพิจารณาค่า pH ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE ได้คือ 4.9-3.5 พบว่าน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 1% 2% และ 3% (v/v) มีค่า pH อยู่ในช่วงดังกล่าว ทั้งนี้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 2% และ 3% (v/v) ทำให้เกิดขนาดโซนยับยั้งที่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เพื่อการพิจารณาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE จึงทำการทดลองอย่างละเอียดในระดับหลอดทดลอง โดยทดสอบจากน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นในช่วง 1%-3% (v/v) เชื้อ SE ลดจำนวนลงอย่างสมบูรณ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) และใช้เวลาสัมผัสกรด 5 นาที นอกจากนี้ผลของการใช้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) เพื่อลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยวิธีจุ่ม สเปรย์ และรมไอน้ำส้มสายชูหมัก พบว่า การฆ่าเชื้อโดยวิธีการจุ่มไข่ในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) สามารถฆ่าเชื้อได้ภายในระยะเวลา 10 นาที และที่ความเข้มข้นกรด 10% (v/v) สามารถฆ่าเชื้อได้ภายในเวลา 5 นาทีแต่การฆ่าเชื้อโดยวิธีนี้มีผลกระทบต่อการทำลายชั้น Cuticle และเปลือกไข่อย่างมาก ในขณะที่การสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักบนเปลือกไข่ต้องใช้เวลาในการสัมผัสกรดที่นานขึ้น (น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ใช้เวลา 120 นาทีและ 80 นาทีตามลำดับโดยอาศัยการสเปรย์ 5 ครั้งและ 3 ครั้งตามลำดับ โดยแต่ละครั้งสเปรย์ห่างกัน 30 นาที) อีกทั้งก่อให้เกิดความเสียหายให้แก่เปลือกไข่ที่ชั้น Cuticle เท่านั้น ซึ่งแตกต่างกับการฆ่าเชื้อโดยวิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมัก ซึ่งไม่ทำให้ลักษณะทางกายภาพของไข่เสียหาย แต่ใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อนานที่สุด การฆ่าเชื้อโดยวิธีรมไอ

น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ใช้เวลา 6.0 ชั่วโมง และ 5.0 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ SE ที่เปลือกไข่และภายในไข่ ในการเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน

| | |
|---|---|
| **Thesis Title** | Reduction of *Salmonella* Enteritidis on Surface of Eggshell by Fermented Vinegar |
| Student | Miss Jirawan Yeesibsan |
| Student ID | 49068769 |
| **Degree** | Master of Science |
| **Program** | Food Sanitation |
| **Year** | 2009 |
| **Thesis Advisor** | Asso. Prof. Dr. Warawut Krusong |


## ABSTRACT

The inhibition of *Salmonella* Enteritidis (SE) on surface of eggshell by fermented vinegar was investigated. Preliminary study by Agar Overlay Disc Diffusion Method on Mueller Hinton agar media using fermented vinegar (FV) containing different acetic acid concentration (1% to 5%v/v) showed that more acetic concentration used, more significant inhibition of SE was found. Therefore, the confirmation of SE inhibition by FV containing different acetic acid concentration (1% to 3% v/v) at 5 min of contact time was further studied in vitro in Tryptic Soy Broth. At minimum 2% acetic acid concentration showed more significant efficiency in reduction of SE. The effect of methodology consisting of dipping, spraying and vaporizing of FV at 2% and 10% acetic acid concentration on SE inoculated on eggshell surface were investigated. Dipping method with FV containing 2% (v/v) acetic acid concentration reduced SE on eggshell within 10 min of contact time. Viable SE cells were reduced completely at 5 min when dipped in FV containing 10% (v/v) acetic acid concentration. Not only SE cells on eggshell were destroyed but cuticle layer and eggshell also were damaged. On the other hand, the more contact time of spraying FV on eggshell was needed. The results revealed that it required 120 min spraying time of 2% (v/v) acetic acid or 80 min of 10% (v/v) acetic acid. When egg was sprayed with FV for 5 and 3 times, respectively. Each FV spraying was 30 min time interval. The effect of eggshell quality was found less than dipping method. Only cuticle on eggshell was blighted. Comparison with the effect of vaporizing method, there was contrast from dipping and spraying method. The physical characteristics of eggshell were invariable. Vaporizing method needed the longest contact time. It required 6.0 and 5.0 hr when eggshells were vaporized with FV containing

2% and 10% (v/v) acetic acid concentration, respectively. Considering microbial quality on egg treated with vaporizing with FV containing 2% and 10% (v/v) acetic acid concentration fermented vinegar. The results showed no detection of SE on both eggshell and egg content when kept all samples at 4°C and room temperature (31± 1°C) within 28 days.

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจาก รศ.ดร. วรวุฒิ ครูส่ง ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ และ ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ ที่กรุณาให้ความรู้คำปรึกษาและคำแนะนำอันมีค่ามีประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องจนเสร็จสมบรูณ์ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ดร.ณัฐพล ฟ้าภิญโญ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกที่ช่วยตรวจทาน

ขอขอบคุณ คุณอนิทัต ทองจันทร์ และ คุณพยอม เกียรติกำจอม เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทดสอบภาควิชาชีววิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำการทดลอง

ขอขอบคุณ คุณวนา ขำสวัสดิ์ ผจก. แผนกห้องปฏิบัติการบริษัทอาร์เบอร์ เอเคอร์ส ประเทศไทยจำกัด ที่เปิดโอกาสให้เข้าศึกษาในช่วงของการทำงาน ให้คำปรึกษาแนะนำรวมถึงสนับสนุนทรัพยากรต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ บริษัทอาร์เบอร์ เอเคอร์ส ประเทศไทย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ที่ใช้ทำการทดลอง ประกอบงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่และญาติมิตร อาจารย์ที่คอยให้กำลังใจและคำปรึกษาสม่ำเสมอ

จิราวรรณ ยี่สิบแสน

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... III

กิตติกรรมประกาศ ..... V

สารบัญ ..... VI

สารบัญตาราง ..... VIII

สารบัญภาพ ..... IX

บทที่ 1 บทนำ ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย ..... 1

1.2 ขอบเขตของงานวิจัย ..... 3

1.3 วัตถุประสงค์ ..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง ..... 4

2.1 ไข่และส่วนประกอบของไข่ ..... 4

2.2 ความสำคัญของเชื้อ *Salmonella* ..... 9

2.3 การทำความสะอาดไข่ ..... 15

2.4 กรดแอซีติก ..... 18

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย ..... 24

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย ..... 24

3.2 อุปกรณ์การทดลอง ..... 24

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 25

3.4 สารเคมี ..... 25

3.5 เชื้อจุลินทรีย์ ..... 25

3.6 วิธีการทดลอง ..... 26

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า


บทที่ 4 ผลการทดลองและวิธีการ ..... 32

4.1 ผลของน้ำส้มสายชูหมักต่อการลดลงของเชื้อ S. Enteritidis (SE) ในระดับหลอดทดลอง ..... 32

4.2 ผลของการใช้น้ำส้มสายชูหมักในการลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ ..... 39

4.3 การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาใช้ที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (31± 1 องศาเซลเซียส) ..... 46

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ ..... 50

5.1 สรุปผลการทดลอง ..... 50

5.2 ข้อเสนอแนะ ..... 51

เอกสารอ้างอิง ..... 52

ภาคผนวก ..... 59

ก. สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ..... 59

ข. สารละลายที่ใช้ในการทดลอง ..... 66

ค. ข้อมูลวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ..... 69

ประวัติผู้วิจัย ..... 77

# สารบัญตาราง


ตารางที่ หน้า

2.1 แบคทีเรียที่แยกได้จากเปลือกไข่ซึ่งทำการสุ่มจากไข่ที่ไม่ผ่านกระบวนการทำความสะอาดและที่ผ่านกระบวนการทำความสะอาด ..... 6

2.2 ค่ากรด-เบส ต่ำสุดที่ *Salmonella* เจริญได้ในกรดแต่ละชนิดภายใต้สภาวะที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ..... 10

2.3 สัดส่วน (เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ของเชื้อที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537-2546 ..... 13

2.4 ค่า $pK_a$ ของกรดแต่ละชนิด ..... 20

4.1 ค่าความเป็นกรด – เบส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ SE ด้วยน้ำส้มสายชูหมักที่ระดับความเข้มข้น 0%-5% (v/v) ทดสอบโดย Agar Overlay disc diffusion method ..... 33

4.2 ค่ากรด – เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเข้มข้นของกรดในน้ำส้มสายชูหมักระดับต่างๆเมื่อบ่มเชื้อ SE ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที ..... 36

4.3 จำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่หลังการเตรียมไข่ปลอดเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ที่เวลาต่างกันและการนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ ..... 38

4.4 จำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ..... 47

4.4 ผลการตรวจหาเชื้อ SE บนเปลือกไข่และภายในไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% เมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ..... 48

4.5 ผลการตรวจหาเชื้อ SE บนเปลือกไข่และภายในไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% เมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ..... 49

ค.1 ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งจากการทำน้ำส้มสายชูหมักยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE โดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion ..... 70

ค.2 การวิเคราะห์ทางสถิติขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE ..... 70

# สารบัญตาราง (ต่อ)


ตารางที่ หน้า

ค.3 ค่าการดูดกลืนแสงและผลของน้ำส้มสายชูหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ต่อจำนวนเซลล์ SE ที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ..... 71

ค.4 จำนวนเชื้อ SE ที่เหลือรอดชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 2% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ..... 72

ค.5 การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยจุ่มในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v)ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ..... 72

ค.6 การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยวิธีสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ..... 73

ค.7 การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยวิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v)ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ..... 75

ค.8 การวิเคราะห์ทางสถิติจำนวนเชื้อ SE โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0-28 วัน ..... 76

ค.9 การวิเคราะห์ทางสถิติจำนวนเชื้อ SE โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0-28 วัน ..... 76

# สารบัญภาพ


ภาพที่ หน้า

2.1 ความถี่ของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในอาหารที่ไม่ได้มาตรฐาน จาก 42 สายการบิน ..... 12

2.2 ผิวของเปลือกไข่ที่ถูกทำลายโดยการล้างด้วยโซเดียมคาร์บอร์เนต ..... 16

2.3 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยกรดแก่ ..... 21

4.1 ขนาดของโซนใสของการยับยั้ง SE ด้วยน้ำส้มสายชูหมักเมื่อทดสอบโดย Agar Overlay Disc Diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 1%-5% (v/v) ..... 34

4.2 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง ($OD_{625\ nm}$) และจำนวนเชื้อ SE ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นต่างกัน โดยบ่มเชื้อ SE ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที ..... 36

4.3 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ SE ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมัก 2% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ..... 37

4.4 การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยการจุ่มในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) และ 10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0 ถึง 30 นาที ..... 40

4.5 ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ ..... 42

(ก) ไข่ควบคุม ..... 42

(ข) ไข่ที่ผ่านการจุ่มฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) เป็นเวลา 10 นาที ..... 42

(ค) ไข่ที่ผ่านการจุ่มฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) เป็นเวลา 5 นาที ..... 42

4.5 การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยการสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) และ10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0 ถึง 30 นาที ..... 43

# สารบัญภาพ (ต่อ)


ภาพที่ หน้า

4.7 ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ 44

(ก) ไข่ควบคุม 44

(ข) ไข่ที่ผ่านการสเปรย์ฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) เป็นเวลา 120 นาที โดยอาศัยการสเปรย์ 5 ครั้ง 44

(ค) ไข่ที่ผ่านการสเปรย์ฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) เป็นเวลา 80 นาที โดยอาศัยการสเปรย์ 3 ครั้ง 44

4.8 การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยการรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) และ10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0 ถึง 6 ชั่วโมง 45

4.9 ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ 46

(ก) ไข่ควบคุม 46

(ข) ไข่ที่ผ่านการรมไอฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง 46

(ค) ไข่ที่ผ่านการรมไอฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) เป็นเวลา 5 ชั่วโมง 46

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ไข่เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสารอาหารหลายชนิดอยู่ภายในไข่ นอกจากนี้ยังเป็นอาหารที่หาบริโภคได้ง่าย ราคาถูก สามารถประกอบอาหารได้หลายอย่าง (กนกอร อินทราพิเชษฐ, 2538) การรับประทานไข่ที่มีคุณภาพและมีความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภค ไข่ที่สกปรกและมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนมีอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยเนื่องจากอาหารเป็นพิษ ดังที่พบในประเทศอังกฤษและหลายประเทศทั่วโลก สาเหตุสำคัญมาจากการบริโภคไข่ อาหารที่มีไข่เป็นส่วนประกอบ และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (Braden, 2006) เชื้อ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่จำนวนมาก (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539) จากข้อมูลสถาบันอาหาร (2550) ที่มีการสุ่มตรวจเชื้อ *Salmonella* บนเปลือกไข่ไก่สด จากย่านการค้าในกรุงเทพฯ พบการปนเปื้อนของเชื้อจำนวน 4 ตัวอย่าง และการสำรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในไข่เขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ พบอัตราการปนเปื้อนของเชื้อบนเปลือกไข่ที่สกปรก 5.8%(ชุลีพร ศักดิ์สง่าวงษ์ และคณะ, 2550) รวมถึงการรายงานของเสกสม อาตมางกูรและคณะ (2548) พบว่ามีเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนที่เปลือกไข่ไก่สด 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.4% ณ ฟาร์มและศูนย์รวบรวมไข่ไก่ในเขตภาคกลางและตะวันออกของประเทศไทย จากข้อมูลดังกล่าวผู้บริโภคมีโอกาสที่จะได้รับเชื้อ *Salmonella* เข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากความนิยมในการบริโภคไข่แบบไม่สุก เช่น ไข่ลวก ไข่ดาว รวมถึงการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของไข่ดิบ เช่น โจ๊กใส่ไข่ เอแคลร์ และเค้ก เชื้อ *Salmonella* ที่พบบนเปลือกไข่มีเพียง 10-20 CFU (ชุลีพร ศักดิ์สง่าวงษ์ และคณะ, 2550) ซึ่งน้อยกว่าจำนวนที่ทำให้เกิดโรคได้กับคนจึงไม่น่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอันตรายจากโรคอาหารเป็นพิษ แต่อันตรายเนื่องจากการเพิ่มจำนวนของเชื้อเมื่อมีการตอกไข่เพื่อปรุงอาหารรวมกันมาก ๆ หลายใบ และทิ้งไว้นานก่อนปรุงแบบกึ่งสุก จะทำให้เชื้อเพิ่มจำนวนและมีเชื้อที่มีชีวิตรอดมากพอที่จะเกิดโรคได้

เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* เป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคทางเดินอาหาร การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* บนไข่ส่วนใหญ่เกิดจาก การปนเปื้อนเนื่องจากอุจจาระที่ติดมากับเปลือกไข่ (Greenwood และคณะ, 2002) หรืออาจมีสาเหตุจากการติดเชื้อจากแม่พันธุ์ในระหว่างที่ไข่อยู่ในท่อนำไข่ (จิโรจน์ ศศิปรียจันทร์, 2547Ebel และSchlosser, 2000; Gast และ Beard, 1990) เชื้อ *Salmonella* 4 สายพันธุ์ที่เพาะแยกได้จากมนุษย์มากที่สุดจากจำนวนเชื้อมากกว่า 2500 สายพันธุ์ คือ *S.* Typhimurium (19%),

*S.* Enteritidis (14%), *S.* Newport (9%) และ *S.* Javiana (5%) (Brenner และ McWhortar-Murlin, 1998) จากข้อมูลย้อนหลัง 25 ปี มีการรายงานโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Salmonella* ในประเทศอังกฤษ พบว่า *S.* Enteritidis (SE) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคและยังเป็นปัญหาสำคัญทางการค้าผลิตภัณฑ์ไข่ในหลายประเทศทั่วโลก (Braden, 2006) จากการสุ่มตรวจไข่ไก่ในประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรป (European Union: EU) พบว่าไข่ไก่มีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* สูงถึง 31.7% ดังนั้น EU จึงมีเป้าหมายให้ไข่ไก่ในประเทศกลุ่มสมาชิกปลอดเชื้อ *Salmonella* โดยจะประกาศเป็นมาตรการในปี 2010 (สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำสหภาพยุโรป, 2549) ส่วนในประเทศไทยพบผู้ป่วยโรคทางเดินอาหารเป็นพิษจากเชื้อ SE สัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อ SE ในผลิตภัณฑ์ไก่ และไข่ (Bangtrakulnonth และคณะ, 2004)

จากข้อมูลข้างต้น การลดจำนวนเชื้อ SE ที่ปนเปื้อนมากับเปลือกไข่จะช่วยลดความเสี่ยงต่อผู้บริโภคได้ ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การล้างไข่ด้วยน้ำอุ่นหรือสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น Sanitizer เช่น Quaternary Ammonium Compound (QAC), Sodium Hypoclorite (NaOCl), Sodium-Carbonate ($Na_2CO_3$) และ Sodium Hydroxide (NaOH) (Wang และ Slavik, 1997) การนำกรดหรือด่างมาใช้ ซึ่งสามารถลดจำนวนเชื้อได้เนื่องจากสภาวะ pH ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ กรดแอซีติกหรือน้ำส้มสายชูเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา และคณะ (2006) ยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อไก่สดโดยใช้น้ำส้มสายชูความเข้มข้น 2% ยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE ได้ นอกจากนี้ Kilonzo-Nthenge และคณะ (2006) รายงานวิธีลดจำนวนเชื้อที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารสด เช่น แอปเปิ้ล มะเขือเทศ และผักกาดหอม โดยใช้น้ำส้มสายชูหมัก 5% หรือ น้ำมะนาว 13% ล้างทำความสะอาดหลังจากการล้างด้วยน้ำประปา สำหรับการทำความสะอาดเปลือกไข่ในเชิงอุตสาหกรรม นิยมใช้สารเปอร์ออกซีแอซีติกแอซิด (Peroxyacetic Acid) เป็นสารทำความสะอาด เพื่อลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเปลือกไข่ โดยวิธีที่กล่าวมานี้สามารถทำได้ยากในระดับครัวเรือน เนื่องจากการผสมสารละลายสองชนิด คือ กรดแอซีติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำให้เกษตรกรที่ทำฟาร์มไข่ปฏิบัติงานได้ยากขึ้น รวมถึงการใช้สารเปอร์ออกซีแอซีติกแอซิดทางการค้าที่มีราคาสูงไม่คุ้มกับต้นทุน อีกทั้งผู้บริโภคในยุคปัจจุบันยังต้องการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีสารเคมีตกค้าง หรือ ต้องการบริโภคอาหารที่ใช้สารทำลายจุลินทรีย์มาจากธรรมชาติ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อลดจำนวนเชื้อ SE ที่ปนเปื้อนมากับเปลือกไข่โดยใช้กรดแอซีติกจากน้ำส้มสายชูหมักเป็นสารทำความสะอาด และสามารถนำไปปฏิบัติได้ในระดับครัวเรือน

## 1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาผลของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 1%-5% ต่อการลดจำนวนเชื้อ *S.* Enteritidis ในระดับหลอดทดลอง รวมถึงระยะเวลา (1-10 นาที) ที่มีผลต่อการสัมผัสของเซลล์และน้ำส้มสายชูหมัก แล้วนำข้อมูลที่ได้เบื้องต้นมาประกอบการศึกษาการฆ่าเชื้อ SE บนเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมักโดยวิธีการจุ่ม การสเปรย์ และการรมไอ โดยใช้การประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางกายภาพ เพื่อสรุปการการฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ด้วยวิธีที่เหมาะสม แล้วศึกษาอายุการเก็บรักษาไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่เลือกใช้ ทำการประเมินคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางกายภาพในการเก็บรักษาระหว่าง 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน

## 1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของน้ำส้มสายชูหมักต่อการลดลงของเชื้อ SE ในระดับหลอดทดลอง
2. เพื่อศึกษาผลของน้ำส้มสายชูหมักต่อการลดลงของเชื้อ SE ที่ปนเปื้อนบนผิวของเปลือกไข่
3. ศึกษาวิธีการควบคุมจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่
4. ศึกษาอายุการเก็บรักษาไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยน้ำส้มสายชู

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ที่ปนเปื้อนบนเปลือกไข่ ทำให้เกิดความปลอดภัยในการบริโภคไข่ รวมถึงการนำน้ำส้มสายชูหมักไปประยุกต์ใช้ลดจำนวนเชื้อก่อโรคในระดับอุตสาหกรรมและอุตสาหกรรมครัวเรือน

# บทที่ 2
# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 ไข่และส่วนประกอบของไข่

ไข่ เป็นอาหารสมบูรณ์ที่มนุษย์และสัตว์จะนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม แม้กระทั่งเชื้อจุลินทรีย์ก็สามารถจะเจริญด้วยอาหารที่ประกอบด้วยไข่ได้ เพราะฉะนั้นบางโอกาสไข่จึงกลายเป็นที่อยู่หรือเป็นพาหะของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในไข่บางสายพันธุ์ทำให้ไข่เสีย บางสายพันธุ์เป็นเชื้อก่อโรคที่แพร่ไปยังผู้บริโภค หรือแพร่ไปยังลูกหลานเป็ดไก่ และกระจายทำลายฝูงสัตว์ โดยทั่วไปไข่ที่ออกจากแม่ที่สมบูรณ์ใหม่ๆ ประมาณ 90% จะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ (Carter, 1968) เพราะไข่มีด่านป้องกันต่างๆ ตามธรรมชาติหลายอย่าง เช่น เปลือก เยื่อหุ้มเปลือก และองค์ประกอบทางเคมีของไข่ขาว ไข่เสียส่วนใหญ่มาเริ่มติดเชื้อจุลินทรีย์เมื่อก่อนหรือหลังออกจากก้นแม่พันธุ์ (Varnam และ Evans, 1991) โครงสร้างของไข่แบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ไข่แดง ไข่ขาว และเปลือกไข่ ไข่แต่ละฟองมีสัดส่วน คือ ไข่ขาว 6 ส่วน ไข่แดง 3 ส่วน และเปลือกไข่ 1 ส่วน เปลือกไข่เป็นส่วนที่ห่อหุ้มไข่ ถือได้ว่าเป็นส่วนที่ป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์สามารถเข้าสู่ภายในไข่ได้ด้วย

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ (2544) รายงานว่าภายในไข่สดมักจะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ จึงค่อนข้างเน่าเสียยากกว่าอาหารอื่นๆ เพราะมีเปลือกไข่ที่แข็งแรงห่อหุ้มและมีสารเคลือบเปลือกไข่อีกชั้นหนึ่ง แต่อาจตรวจพบจุลินทรีย์ในภายหลังเนื่องมาจากสภาพการเก็บรักษาไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น แบคทีเรียและเชื้อราจะเข้าไปได้เมื่อชั้นโปรตีนบางๆ ที่หุ้มเปลือกไข่ถูกทำลายหรือเปลือกไข่แตก แบคทีเรียที่พบในไข่อาจมาจากเป็ดหรือไก่ที่เป็นโรคโดยเฉพาะเกี่ยวกับอวัยวะสืบพันธุ์ แบคทีเรียที่พบ เช่น *Micrococcus* spp., *Lactobacillus* spp. พบตามรังไข่หรือท่อนำไข่ ส่วนที่ทวารหนักจะพบเชื้อ *Micrococcus* spp., *Enterococcus* spp. และ *Escherichia coli* เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังได้รับแบคทีเรียจากภายนอกโดยติดมาจากดินหรืออุจจาระ ไข่ที่มีดินหรืออุจจาระติดอยู่จะพบแบคทีเรียพวก *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp. และ *Salmonella* spp. ส่วนไข่ใหม่ที่ไม่มีดินหรืออุจจาระติดอยู่จะพบเชื้อพวก *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. และ *Streptococcus* มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

Carter (1968) รายงานการเน่าเสียของไข่ส่วนมากเกิดจากไข่ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุจจาระ น้ำ อากาศ ดิน อุปกรณ์ต่างๆในโรงเรือนและตู้ฟัก ซึ่งการติดเชื้อแบบนี้เรียกว่า Extragenital Contamination ส่วนการติดเชื้อจากรังไข่ (Ovary) และจากท่อไข่ (Oviduct) เรียกว่า Congenital Contamination ซึ่งการติดเชื้อแบบหลังนี้พบน้อยกว่าแบบแรก เพราะโรคเกี่ยวกับระบบ

สืบพันธุ์เป็นโรคเฉพาะตัวไม่พบบ่อยนัก และชนิดของแบคทีเรียที่พบในไข่ซึ่งติดเชื้อแบบ Congenital นี้ก็ต่างจากแบคทีเรียที่พบในไข่ที่เน่าเสียจากการติดเชื้อจากสิ่งแวดล้อม

**2.1.1 การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียบนไข่** (ฐิติรัตน โรจนไพฑูลย์, 2518)

Congenital Contamination เป็ดไก่ที่มีสุขภาพดีมักมีเชื้อแบคทีเรียที่อวัยวะสืบพันธุ์น้อย แบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่ตามรังไข่ ท่อไข่ และไข่ที่ออกจากแม่ใหม่ๆ ได้แก่สายพันธุ์ *Micrococcus* spp. และ *Lactobacillus* spp. โดยเฉพาะที่รังไข่มีแบคทีเรียมากกว่าท่อไข่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าที่ท่อไข่มีการสร้างไข่ขาว ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนบางอย่างที่มีคุณสมบัติต่อต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ มีผู้ทดลองฉีดแบคทีเรียเข้าไปในท่อไข่ พบว่าแบคทีเรียมีชีวิตอยู่ในท่อไข่เพียง 48-72 ชั่วโมง ก็ถูกทำลายที่มดลูก (Uterus) ช่องคลอด (Vagina) มีแบคทีเรียสายพันธุ์ Coliform และ Enterococci เป็นส่วนใหญ่ ส่วนที่ทวารหนัก (Cloaca) พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากกว่าส่วนอื่นๆ ของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยแบคทีเรียซึ่งพบมากที่ทวารหนักเป็นพวก Micrococci, Enterococci และColi-aerogenes โดยเฉพาะ *E. coli* พบมากที่สุด

แบคทีเรียที่พบในไข่แดง (Oval) และตามท่อไข่อาจมาจาก 2 แหล่ง แหล่งแรกเป็นแบคทีเรียที่อยู่บริเวณทวารหนัก ที่ถูกบีบย้อนขึ้นมาเมื่อท่อไข่หดหัวย้อนกลับ (Antiperistaltic Contraction) ส่วนแหล่งที่สองคือมาทางเลือด (Blood Borne Organism) เช่นเชื้อ *Mycobacterium* spp. และ *Salmonella* spp. โดยเฉพาะ *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *E. coli*, Streptococci และ Micrococci สามารถเล็ดลอดผ่านออกจากทางเดินอาหารเข้าไปอยู่ภายในช่องท้อง หรือแทรกตัวเข้ามาในเส้นเลือดแล้วเข้าไปในไข่ได้

Extragenital Contamination เป็นวิธีที่แบคทีเรียแทรกตัวผ่านเปลือกไข่เข้าไปภายในฟองไข่ ทั้งนี้แบคทีเรียจะผ่านเข้าไปเจริญภายในฟองไข่ได้ต้องผ่านด่านป้องกันตามธรรมชาติของไข่ นับตั้งแต่ Cuticle, เปลือกไข่, Lysozyme, Conalbumin และโปรตีนอื่นๆในไข่ขาว รวมทั้งค่ากรด-เบสที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

De Reu และคณะ (2008) รายงานว่า แบคทีเรียประจำถิ่น (microflora) ที่อาศัยอยู่บนเปลือกไข่ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Micrococcus, Achromobacter, Alcaligenes, Pseudomonas* และ *Proteus* เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถทนทานอยู่ในสภาวะที่มีความชื้นต่ำบริเวณผิวเปลือกไข่ นอกจากนี้อาจจะพบแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์อื่นๆที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นบนเปลือกไข่ ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพของภูมิอากาศ และภูมิประเทศของฟาร์มที่เลี้ยงไก่ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบที่ปนเปื้อนบน

เปลือกไข่ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียที่พบว่ามีการซึมผ่านเข้าไปในชั้นของเยื่อเปลือกไข่มากที่สุด (ตารางที่ 2.1)

**ตารางที่ 2.1** แบคทีเรียที่แยกได้จากเปลือกไข่ซึ่งทำการสุ่มจากไข่ที่ไม่ผ่านกระบวนการทำความสะอาดและที่ผ่านกระบวนการทำความสะอาด

| Genus | Occurrence | Genus | Occurrence | Genus | Occurrence |
|---|---|---|---|---|---|
| *Aeromonas* | 5/9 | *Klebsiella* | 8/9 | *Rahnella* | 1/9 |
| *Cedecea* | 2/9 | *Kluyvera* | 2/9 | *Salmonella* | 7/9 |
| *Chryseomonas* | 1/9 | *Leclercia* | 3/9 | *Serratia* | 3/9 |
| *Citrobacter* | 8/9 | *Listonella* | 6/9 | *Sphingobacterium* | 1/9 |
| *Enterobacter* | 9/9 | *Morganella* | 2/9 | *Vibrio* | 2/9 |
| *Erwinia* | 1/9 | *Proteus* | 1/9 | *Xanthomonas* | 2/9 |
| *Escherichaia* | 9/9 | *Providencia* | 5/9 | | |
| *Hafnia* | 5/9 | *Pseudomonas* | 5/9 | | |

ที่มา : De Reu และคณะ (2008)

2.1.2 องค์ประกอบของไข่

Cuticle เมื่อไข่ออกจากก้นแม่ใหม่ๆ จะมีสารพวก Cuticle ซึ่งเป็นสารจำพวก Mucin เคลือบอย่างแน่นกับผิวนอกของเปลือก ปิดรูบนเปลือกหมด อุณหภูมิของไข่จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อไข่ออกจากตัวแม่ จึงทำให้ไข่หดตัว แต่เปลือกไข่หดตัวได้น้อยกว่าเนื้อไข่ จึงเกิดช่องว่างในไข่ อากาศจากภายนอกซึ่งมีความดันสูงกว่าจะเข้าไปอยู่ในช่องว่างดังกล่าว เกิดเป็นโพรงอากาศ (Air Sac) ความแรงของอากาศที่ดันเข้าไปในช่องว่างนี้มีความแรงพอที่จะดันแบคทีเรียเข้าไปตามรูของเปลือกไข่ได้ แต่ถ้ามี Cuticle ไปอุดรูบนเปลือกไข่ไว้ แบคทีเรียก็ไม่สามารถถูกดันให้ผ่านเปลือกไข่ไปได้ ทำให้ไข่เสียช้าลง การล้างและขัดถูเปลือกไข่มากๆจะทำให้ Cuticle หลุดออกไป ไข่ก็จะเสียเร็วขึ้น ตามธรรมชาติ Cuticle เคลือบอยู่ไม่นาน ซึ่งจะทำหน้าที่ป้องกันได้อย่างเต็มที่ประมาณ 100 ชั่วโมงแรกที่ไข่ออกจากแม่ จากนั้น Cuticle จะเริ่มแห้งร้าว ปริออก และค่อยๆหลุดไปที่สุด ดังนั้น Cuticle จึงเป็นด่านที่สำคัญในการช่วยกั้นแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นๆได้เพียงระยะ 3-4 วันแรกที่ไข่ออกจากแม่ (Baker, 1974)

เปลือกไข่ (Egg Shell) ประกอบด้วยหินปูน เป็นส่วนใหญ่ ที่เปลือกไข่มีรูมากมาย จำนวนรูบนเปลือกไข่เป็นทางเดียวที่เชื้อแบคทีเรียจากภายนอกไข่จะผ่านเปลือกไข่เข้าไปภายในฟองไข่ได้ ในไข่

ไก่ปกติจะมีรูประมาณ 7,000-17,000 รูต่อหนึ่งฟอง ขนาดของรูประมาณ 9-35ไมครอน ซึ่งโตพอที่แบคทีเรียจะสามารถผ่านเข้าไปได้ การผ่านของแบคทีเรียเข้าไปภายในเปลือกไข่ พบว่าน้ำและอุณหภูมิของน้ำที่ต่ำกว่าไข่ เป็นตัวสำคัญที่ช่วยนำแบคทีเรียผ่านเปลือกไข่เข้าไปในตัวไข่ได้ง่ายขึ้น (Board และ Ayres, 1965) ในไข่ที่เปลือกสะอาดและอยู่ในที่ที่มีความชื้นไม่มาก แบคทีเรียที่ผิวเปลือกจะตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากที่เปลือกมีปริมาณน้ำไม่พอแก่การดำรงชีวิตของแบคทีเรีย แบคทีเรียที่ทำให้ไข่เน่าเสียต้องการ Available Water ($a_w$) 0.98 แต่ที่เปลือกมีค่า $a_w$ ไม่ถึง แบคทีเรียต้องเข้าไปอยู่ที่ผิวชั้นในของเปลือกไข่จึงจะมีปริมาณน้ำเพียงพอ แต่ถ้าเปลือกไข่สัมผัสกับน้ำ โดยเฉพาะน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่าไข่ แบคทีเรียจะเข้าไปภายในเปลือกได้ง่ายและเร็วขึ้น ดังเช่น การทดลองจุ่มไข่ในสารละลายเซลล์ ที่เย็นกว่าไข่ของเชื้อ *Streptococcus faecalis, Proteus morganii, P. vulgaris* และ *Pseudomonas* โดยพบแบคทีเรียเหล่านี้ที่ผิวด้านในของเปลือกถึง 90-100% และพบที่เยื่อเปลือกไข่ (Shell Membrane) 5-90% เชื้อบางชนิดสามารถผ่านเปลือกได้โดยไม่ต้องอาศัยอุณหภูมิที่ต่างกันระหว่างไข่กับสารละลายเซลล์ ดังการทดลองจุ่มไข่ในสารละลายเซลล์ของเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Pullorum ของเชื้อทั้งสองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที พบว่าเชื้อทั้งสองสามารถผ่านเข้าไปในเปลือกไข่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า *S.* Enteritidis เป็นเชื้อจุลินทรีย์ตัวแรกที่สามารถลุกลามเข้าไปภายในไข่ได้โดยคิดเป็น 37% เมื่อทำการทดลองจุ่มไข่ในสารละลายของเชื้อ *Staphylococcus warneri, Acinetobacter baumannii, Alcaligenes* spp., *Serratia marcescens, Carnobacterium* spp. และ *S.* Enteritidis (De Rue และคณะ, 2006)

<u>เยื่อเปลือกไข่</u> (Shell Membrane) เยื่อนี้ประกอบด้วยเส้นใยโปรตีนประสานและยึดกันให้แข็งแรงด้วย Albuminous Cementing Material เยื่อเปลือกไข่นี้มีความหนามากทางด้านป้านของไข่ เยื่อนี้แบ่งเป็น 2 ชั้น เยื่อทั้งสองชั้นติดกันและหุ้มตลอดฟองไข่ จะแยกออกเฉพาะตอนที่เป็นโพรงอากาศชั้นนอกเท่านั้น

<u>เยื่อเปลือกไข่ชั้นนอก</u> (Membrane Testae or Outer Shell Membrane) อยู่ติดกับผิวในของเปลือก มีความหนามากกว่าเยื่อชั้นในถึง 5 เท่า แต่มีรูซึ่งอาจมีขนาดใหญ่ถึง 0.028 มิลลิเมตร และมี Lysozyme น้อยกว่าเยื่อชั้นใน ทำให้เยื่อชั้นนอกนี้มีความสามารถป้องกันจุลินทรีย์ได้น้อยกว่าเยื่อชั้นใน (Bean และMc Laury, 1959)

<u>เยื่อเปลือกไข่ชั้นใน</u> (Membrane Putaminis or Inner Shell Membrane) เยื่อนี้อยู่ติดกับไข่ขาว และมี Lysozyme มาก ซึ่ง Lysozyme นี้มีคุณสมบัติทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะผนังเซลล์

ของแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่จะถูกทำลายมากกว่าพวกแกรมลบ เพราะไม่มีพวก Lipid มาคลุมชั้น Murein อีกทั้งเยื่อชั้นในนี้ไม่มีรูเลย แม้จะดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แต่แบคทีเรียก็สามารถผ่านเยื่อนี้ไปได้ การทดลองระยะแรกๆ เชื่อว่าแบคทีเรียสามารถสร้างน้ำย่อยมาทำลายเยื่อนี้ แต่จากการทดลองใช้ Proteolytic และ Lipolytic enzyme ทุกชนิดก็ไม่สามารถทำลายเยื่อชั้นในได้ (Board และคณะ, 1968) การศึกษาในระยะต่อมาจึงเชื่อว่า การรุกรานของเชื้อแบคทีเรียเกิดเนื่องจากเยื่อเปลือกไข่ชั้นใน ประกอบด้วยเส้นใยโปรตีนมาประสานกันเป็นร่างแหสลับไปมาจำนวนมาก ดังนั้นเส้นใยที่เกิดขึ้นจึงไม่มีรูที่ตรงกันได้ ถ้าแบคทีเรียมีความแข็งแรงพอก็สามารถเล็ดลอดผ่านชั้นต่างๆ ของร่างแหไปได้ โดยเฉพาะเชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้เช่น *Salmonella* spp. ก็จะมีโอกาสผ่านได้ง่ายขึ้น

แบคทีเรียต้องใช้เวลาประมาณ 2-6 วัน อยู่ที่เยื่อเปลือกไข่ เพื่อให้มีจำนวนมากพอ ก่อนที่จะเข้าไปในไข่ขาวและไข่แดงต่อไป และจำนวนที่เพิ่มขึ้นนี้มากจนสามารถสังเกตเห็นเป็นโคโลนีได้ แต่ถ้าเก็บไข่ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิห้องหรือ 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียต้องอยู่ที่เยื่อเปลือกไข่นานถึง 14-20 วัน จึงจะเข้าไปเจริญในไข่ขาวและไข่แดง (สุเจตน์ ชื่นชม และคณะ, 2547)

จากส่วนประกอบภายนอกของไข่ที่กล่าวมา เห็นได้ว่าไข่มีการป้องกันตัวเองจากเชื้อจุลินทรีย์โดยธรรมชาติ หากมีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อมก็อาจทำให้ปนเปื้อนถึงภายในไข่ได้ สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในไข่จำนวนมาก คือ เชื้อ *Salmonella* spp. (White และคณะ, 2007) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงและการผลิตสัตว์ปีก ทั้งไก่เนื้อและไก่ไข่ โดยมีรายงานการปนเปื้อนเชื้อในไก่ ถึง 46.9% ในการสำรวจในปี 2540 (สถาบันสุขภาพสัตว์, รายงานประจำปี 2540) และมากกว่า 70% ในการสำรวจในปี 2543 (อินทิรา กระหม่อมทอง, 2543) สำหรับแบคทีเรีย *Salmonella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ที่สามารถก่อโรคได้ในคนและสัตว์เกือบทุกชนิด โดยพบเชื้อนี้มากกว่า 2,500 ซีโรวาร์

ผลจากการสุ่มตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella*ในฟาร์มไก่ไข่ของหน่วยงานความปลอดภัยด้านอาหารของสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority) พบว่า ไก่ไข่ในประเทศกลุ่มสหภาพยุโรป 31.7% มีการติดเชื้อ *Salmonella* ในระดับสูงโดย โปรตุเกสเป็นประเทศที่มีการติดเชื้อ *Salmonella* มากที่สุดถึง77.6% สเปน สาธารณรัฐเช็ก โปแลนด์เป็นกลุ่มประเทศที่มีการติดเชื้อ *Salmonella* เป็นลำดับรองลงมา คือ อยู่ในระดับ 51% ถึง 62% สหราชอาณาจักร มีการติดเชื้อ *Salmonella* 11.9% ลักเซมเบิร์ค สวีเดน และสโลวัก เป็นกลุ่มประเทศที่ปลอดจากเชื้อ *Salmonella* (สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำสหภาพยุโรป, 2549)

ชุลีพร ศักดิ์สง่าวงษ์ และคณะ (2550) สำรวจเชื้อ *Salmonella* ในไข่จำนวน 100 ตัวอย่าง โดย

เลือกตัวอย่างไข่ด้วยวิธีสุ่มแบบบังเอิญจากสถานที่จำหน่ายไข่ เป็นไข่ไก่จำนวน 66 ตัวอย่าง ไข่เป็ดจำนวน 19 ตัวอย่าง และไข่นกกระทาจำนวน 15 ตัวอย่าง จากแผงลอยจำนวน 73 แผง และร้านค้าจำนวน 16 ร้านในตลาดสดจำนวน 9 แห่ง ห้างสรรพสินค้าจำนวน 4 แห่ง และร้านค้าสะดวกซื้อจำนวน 4 ร้าน ช่วงระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม พ.ศ. 2550 ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ พบเชื้อ *Salmonella* ที่เปลือกและส่วนเนื้อไข่เป็ดในตัวอย่างเดียวกัน จำนวน 1 ตัวอย่างจากแผงลอยตลาดสด พบเชื้อที่เปลือกไข่แต่ไม่พบในเนื้อไข่เป็ดจำนวน 1 ตัวอย่าง จากแผงลอยในตลาดสด และพบเชื้อที่เปลือกไข่ไก่จำนวน 2 ตัวอย่าง จากร้านค้าในตลาดสดและร้านค้าสะดวกซื้อ แต่ไม่พบเชื้อในไข่นกกระทา อัตราการพบเชื้อบนเปลือกไข่ที่สกปรก 5.8% เชื้อ *Salmonella* บนเปลือกไข่ไม่มีความสัมพันธ์กับการพบเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* ในเนื้อไข่อย่างมีนัยสำคัญ

## 2.2 ความสำคัญของเชื้อ *Salmonella*

### 2.2.1 ลักษณะทั่วไปของ *Salmonella*

*Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae รูปท่อนสั้น มีขนาดกว้าง 0.5-0.7 ไมโครเมตร (Davis และคณะ, 1968) ไม่สามารถสร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมลบ การเคลื่อนที่อาศัยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบเซลล์ (Banwart, 1979) สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส และให้ก๊าซ สามารถสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ พร้อมทั้งสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคส แมนนิทอล มอลโตส และซอร์บิทอล ในขณะที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส และซูโครส ทดสอบ Oxidase ให้ผลลบ และให้ผลบวกสำหรับการทดสอบ Catalase พบได้ทั่วไปในทางเดินอาหาร และของเสียจากการขับถ่ายของสัตว์เลือดอุ่น (Tartakow และ Vorperian, 1981) สามารถเจริญได้ในอาหารทั่วไป สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน และสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการอยู่รอด การตาย รวมถึงการเจริญของ *Salmonella* การควบคุมสภาวะแวดล้อม เช่น การควบคุมอุณหภูมิ ค่ากรด-เบส ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ในอาหาร ($a_w$) หรือปัจจัยหลายอย่างร่วมกัน สามารถควบคุมการเจริญ และการเก็บรักษาอาหารให้ปลอดภัยจาก *Salmonella* ได้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Robinson และคณะ, 2000)

เชื้อ *Salmonella* เจริญได้ดีในช่วงของกรด-เบส ระหว่าง 4.0-9.0 สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีค่ากรด-เบสสูงถึง 9.5 และอาจต่ำถึง 4.05 สำหรับบางสายพันธุ์ Chung และ Goepfert (1970) พบว่าเชื้อ *Salmonella* สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของกรด-เบสเมื่อใช้กรดไฮโดรคลอริกและกรดซิตริกเพื่อปรับค่ากรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ มากกว่าการใช้กรดแอซีติกเพื่อปรับค่ากรด-เบส กล่าวคือเชื้อ *Salmonella* ถูกยับยั้งด้วยกรดแอซีติกมากกว่ากรดไฮโดรคลอริกและซิตริก ความสามารถของเชื้อ

*Salmonella* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้กรดแต่ละชนิดเป็นตัวปรับค่ากรด-เบส แสดงดังตารางที่ 2.2

สำหรับค่า $a_w$ ที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ประมาณ 0.995-0.999 ในอาหารที่มีความชื้นต่ำ เช่น เนยถั่ว ช็อกโกแลต หากมีการปนเปื้อนด้วย *Salmonella* พบว่าเซลล์สามารถรอดชีวิตได้นานเกิน 30 วัน นอกจากนั้นการเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 3.0% - 4.0% เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ได้ (Robinson และคณะ, 2000)

**ตารางที่ 2.2** ค่า กรด-เบสต่ำสุดที่ *Salmonella* เจริญได้ในกรดแต่ละชนิดภายใต้สภาวะที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

| ชนิดกรด | ค่ากรด-เบส |
|---|---|
| กรดไฮโดรคลอริก | 4.05 |
| กรดซิตริก | 4.05 |
| กรดตาร์ตาริก | 4.10 |
| กรดกลูโคนิก | 4.20 |
| กรดฟูมาลิก | 4.30 |
| กรดมาลิก | 4.30 |
| กรดแลกติก | 4.40 |
| กรดซัคซินิก | 4.60 |
| กรดกลูทาริก | 4.70 |
| กรดอะดิพิก | 5.10 |
| กรดพิเมริก | 5.10 |
| กรดแอซีติก | 5.40 |
| กรดโพรพิโอนิก | 5.50 |

ที่มา : Chung และ Goepfert (1970)

หมายเหตุ : ศึกษาในเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ *S.* Anatum, *S.* Tennessee และ *S.* Senftenberg

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อ *Salmonella* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง คือ 5-47 องศาเซลเซียส *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนความร้อน สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ภายใน 15-20 นาที และ

อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สามารถเจริญได้ (Tartakow และ Vorperian, 1981) เชื้อ*Salmonella* บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมินี้เอง เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์ปกติ ในสภาวะที่อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมสูงกว่าอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อ *Salmonella* สามารถเจริญได้เชื้อ *Salmonella* จะตายอย่างรวดเร็ว เซลล์มักจะถูกทำลายได้อย่างรวดเร็วโดยกระบวนการแปรรูปอาหารโดยใช้ความร้อน เช่น พาสเจอไรซ์ อย่างไรก็ตามในอาหารที่มีโปรตีนและไขมันสูง $a_w$ ของอาหารจะช่วยป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายได้ (Robinson และคณะ, 2000)

**2.2.2 ความสามารถในการทำให้เกิดโรค**

เมื่อเชื้อ *Salmonella* ที่มีอาหารเป็นพาหนะรอดชีวิตจากการย่อยของระบบทางเดินอาหาร และมีจำนวนเซลล์มากพอที่จะก่อให้เกิดโรค การติดเชื้อโดยทั่วไปต้องการจำนวนเซลล์ประมาณ $10^6$-$10^8$ cfu แต่จากหลักฐานทางระบาดวิทยา การติดเชื้ออาจเกิดจากเซลล์เพียงแค่ 2-3 เซลล์เท่านั้น (Robinson และคณะ, 2000) เซลล์จะเข้าเกาะที่เนื้อเยื่อของระบบทางเดินอาหารและเข้าไปอยู่ในลำไส้เล็กส่วนปลายแล้วเพิ่มจำนวนขึ้น หลังจากนั้นจะผ่านผนังสำไส้เล็กเข้าสู่ระบบท่อน้ำเหลือง เข้าทำลายเม็ดเลือดขาว จากนั้นเมื่อเข้าสู่กระแสเลือดจะทำให้เกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์ และคณะ, 2544)

เชื้อ *Salmonella* ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้จากสารพิษเอนโดทอกซิน (Endotoxin) ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ พอลีแซคคาไรด์-พอลีเพปไทด์ลิปิด เอ (Polysaccharide-polypeptide-lipid A) มีอยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อผู้บริโภคทานอาหารที่มีเชื้อนี้เข้าไปในปริมาณที่สูงพอ จะเกิดอาการภายใน 6-36 ชั่วโมง (Hobbs และ Gilbert, 1978) โดยความรุนแรงของอาการจะแตกต่างตามปริมาณของเชื้อ สายพันธุ์ และความต้านทานของผู้บริโภค

อาการเป็นพิษของเชื้อ *Salmonella* เกี่ยวข้องกับสารพิษ 2 ชนิดคือ เอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) และ ไซโตทอกซิน (Cytotoxin) Koupal และ Deibel (1975) รายงานว่าความเป็นพิษของเอนเทอโรทอกซินของ *Salmonella* จะทำให้เกิดลักษณะความเป็นพิษคล้ายกับพิษของ *E. coli* โดยทำให้ cAMP (Cyclic Adenosine Monophosphate) เพิ่มขึ้นในลำไส้และชักนำให้ของเหลวในร่างกายของสัตว์ทดลองตกตะกอน นอกจากนี้เอนเทอโรทอกซินของเชื้อ *Salmonella* ยังมีลักษณะทางชีวภาพและพันธุกรรมคล้ายกับสารพิษของเชื้ออหิวาต์ (Cholera toxin-CT) ทำให้เชื้อ *Salmonella* ยังก่อให้เกิดอาการคล้ายบิด ทำลายเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นอาการที่นอกเหนือจากฤทธิ์ของเอนเทอโรทอกซิน และจากการวิจัยในสัตว์ทดลองพบว่า สารพิษที่ทำให้เกิดอาการคล้ายบิด และทำให้เยื่อบุลำไส้ของสัตว์ทดลองถูกทำลายคือสารพิษประเภท ไซโตทอกซิน (Koo และ Peterson, 1983)

หน้านี้ไม่มีในต้นฉบับ

จากการสำรวจเชื้อ *Salmonella* ในประเทศไทย ตั้งแต่ปี 2537-2546 โดยพบเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้จากมนุษย์จำนวน 44,087 ตัวอย่าง ในสิ่งแวดล้อม 26,148 ตัวอย่าง การสำรวจพบว่า *S.* Weltevreden เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ ซึ่งสัดส่วนสายพันธุ์ของเชื้อ *Salmonella* ที่พบในประเทศไทยแสดงไว้ดังตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.3** สัดส่วน (เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ของเชื้อ ที่พบในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537-2546

| ที่มา | ผู้ป่วย | ไก่แช่แข็ง | อาหารทะเลแช่แข็ง | อาหารอื่น | น้ำ |
|---|---|---|---|---|---|
| N | 44087 | 14559 | 1007 | 6928 | 984 |
| *S.* Weltevreden | 12.5 | - | 26.3 | 6.6 | 14.5 |
| *S.* Enteritidis | 11.4 | 19.9 | 1.4 | 4.5 | 2.2 |
| *S.* Anatum | 7.4 | - | 2.0 | 17.0 | 11.5 |
| *S.* Derby | 6.6 | - | 2.0 | 5.3 | 7.2 |
| *S.* Typhimurium | 5.3 | - | 1.2 | 2.9 | - |
| *S.* Rissen | 5.3 | | 2.1 | 10.3 | 9.5 |
| *S.* Stanley | 3.8 | - | 2.0 | - | - |
| *S.* Panama | 3.3 | - | - | 3.7 | 4.8 |
| *S.* Agona | 2.7 | 3.1 | - | 3.9 | 4.0 |
| *S.* Hardar | - | 9.3 | 2.1 | 6.3 | 2.7 |
| *S.* Virchow | - | 5.9 | - | 3.6 | - |

ที่มา : Bangtrakulnonth และคณะ (2004)

**2.2.3 การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella***

ในระดับสากลมีหลายหน่วยงานที่ทำการวิเคราะห์ และกำหนดวิธีมาตรฐานเพื่อใช้วิเคราะห์ Salmonella เช่น Association of Offical Analytical Chemist (AOAC), American Public Health Association (APHA), Food and Drug Administration (FDA), International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF), International Organization for Standardization (ISO) และ United States Department of Agriculture (USDA) เป็นต้น นอกจากนี้วิธีการตรวจวิเคราะห์ยังได้รับการพัฒนาเพื่อให้วิธีการตรวจสอบแม่นยำขึ้น โดยการตรวจวิเคราะห์มีขั้นตอนสำคัญ 5 ขั้นตอน คือ

Pre-enrichment

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนเพื่อปรับสภาพของเซลล์ *Salmonella* ที่อาจเกิดการบาดเจ็บจากกระบวนการแปรรูปและปนเปื้อนให้อยู่ในสภาพแข็งแรงขึ้น รวมทั้งยังเป็นขั้นตอนที่ทำให้ *Salmonella* ที่อาจมีปริมาณน้อย ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น จากรายงานของ Clark และ Ordal (1969) ทดลองเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ Trypticase soy broth, Nutrient broth และ Lactose broth เพื่อกระตุ้นเซลล์ *Salmonella* ที่บาดเจ็บจากความร้อนพบว่า มีความแตกต่างกันระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ โดย Trypticase soy broth ให้ผลดีกว่า Lactose broth และ Nutrient broth

Selective Broth

หลังจากกระตุ้น *Salmonella* ให้แข็งแรงขึ้น และเซลล์บาดเจ็บเกิดกระบวนการคืนสภาพที่สมบูรณ์แล้ว เพาะเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เพื่อเสริมการเจริญของ *Salmonella* ตัวอย่างสารยับยั้งเช่น สี (Dyes), Tetrathionate, Selenite และ Novobiocin เป็นต้น ในทางปฏิบัติแนะนำให้ใช้ Selective enrichment medium มากกว่า 1 ชนิด เพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการตรวจพบ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์ และคณะ, 2544) สำหรับการเพาะเลี้ยงในขั้นนี้ไม่ควรใช้เวลานานเกินไป เพราะสาร Selective agent ที่เป็นองค์ประกอบใน Selective enrichment จะเป็นพิษต่อเซลล์ *Salmonella* ( D'Aoust, 1981)

Selective plating

เชื้อ Salmonella ที่ผ่านการเลี้ยง และเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเลือกเฉพาะชนิดนำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บน Plating media ซึ่งจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเลือกเฉพาะชนิดที่เติมวุ้น ซึ่งมีสารเคมีชนิดต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น และมีผลทำให้โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* มีลักษณะเฉพาะ เช่น Bile salt ในวุ้นอาหาร Hektoen Enteric หรือ Desoxycholate-citrate ในวุ้นอาหาร Xylose Lysine Desoxychlolate, Desoxychlolate-citrate, Hektoen Enteric หรือแม้แต่การเติมสีเช่น Brilliant green dye ในวุ้นอาหาร Brilliant green, Brilliant green-MacConkey, Bismuth Sulphite รวมถึงสารต้านจุลชีพ เช่น Novobiocin ในวุ้นอาหาร Brilliant green (Moats, 1981)

Biochemistry test

ปัจจุบันการทดสอบทางชีวเคมีมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการหมักย่อยน้ำตาล สำหรับทดสอบการสร้างอินโดล (Indole) หรือสำหรับทดสอบปฏิกิริยา

ของเอนไซม์ยูรีเอส (Urease) ทำโดยการเขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* มาทดสอบทางชีวเคมี เพื่อเป็นการยืนยันว่าคือ เชื้อ *Salmonella*

Serological test

เป็นขั้นตอนการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา โดยการเขี่ย *Salmonella* ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบทางชีวเคมีมาทดสอบกับแอนติบอดี เพื่อแยกหาซีโรวาร์

## 2.3 การทำความสะอาดไข่

### 2.3.1 สารเคมีที่ใช้ผสมน้ำเพื่อทำความสะอาดไข่

การล้างไข่ด้วยน้ำล้างไข่ วิธีนี้ใช้ทำความสะอาดไข่ที่ไม่มีเชื้อหรือไข่ไก่ที่ใช้สำหรับบริโภค ซึ่งน้ำที่ใช้ล้างทำความสะอาดไข่ ประกอบด้วย สารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น Sanitizer สารเคมีที่นิยมใช้ทั่วไปในน้ำล้างไข่ได้แก่ Quaternary Ammonium Compound (QAC), Sodium Carbonate ($Na_2CO_3$), Sodium hypochlorite (NaOCl) และSodium Hydroxide (NaOH) โดย QAC ที่นิยมใช้คือ Cetylpyridimium Chloride มีคุณสมบัติเป็น Cationic surfactant ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการเชื่อมกันของโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ Cell wall ส่วน NaOCl มีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent ที่ดีมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดย NaOCl ทำให้เกิดการ oxidation ของเซลล์จุลินทรีย์ ขณะที่ $Na_2CO_3$ มีคุณสมบัติเป็นด่างซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ช่วยลดความต้านทานต่อ Turgor Pressure ของ Cytoplasmic membrane ของเซลล์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับไข่ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบคือ *S.* Enteritidis ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญเกิดจากการติดเชื้อของแม่ไก่ (Kim และ Slavik, 1996)

Quaternary Ammonium Compound (QAC) เป็น Antiseptic ที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง จุลินทรีย์รา โปรโตซัวบางชนิด แต่ไม่มีผลต่อ Endospore (Smith, 1995) เนื่องจาก QAC มีคุณสมบัติเป็น Cationic surfactant ซึ่งนิยมใช้ทั่วไปคือ Cetylpyridimium chloride (CPC) ซึ่งเป็นเกลือของ Alkylpyridinium ที่มีประสิทธิภาพในการยับยังเชื้อจุลินทรีย์ โดย CPC นี้จะมีผลในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมได้ตามปกติ

Sodium Carbonate ($Na_2CO_3$) มีชื่อเรียกทั่วไปว่า โซดาซักผ้า มีคุณสมบัติเป็นด่างแก่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่เปลือกไข่ได้โดยคุณสมบัติความเป็นด่างแก่ที่มีค่ากรด-เบสสูงนี้ ทำให้มีความต้านทานต่อ Turgor Pressure ลดลง เมื่อเยื่อหุ้มไซโตพลาสได้รับความเป็นด่างขึ้นสำหรับแบคทีเรียแกรมลบ เมื่อค่า pH ที่สูงขึ้นนี้สนับสนุนการทำลาย Cell Membrane ของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ปนเปื้อนบนผิวเปลือกไข่

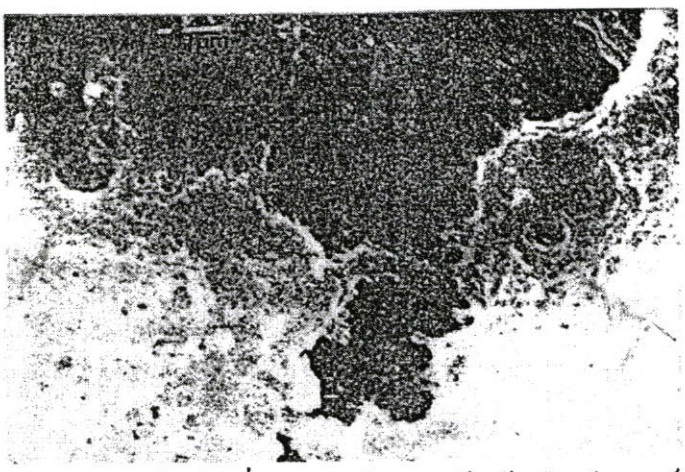
Sodium Hypochlorite (NaOCl) มีคุณสมบัติเป็น Antiseptic และ Disinfectant ที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อโรคได้ ซึ่ง NaOCl เป็น Oxidizing Agent ในรูปของสารละลาย ทำให้เกิด Oxidation ของเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจาก Available Free Chorine ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของจุลินทรีย์

Sodium Hydroxide (NaOH) มีคุณสมบัติในการกัดกร่อน เป็นสารที่ช่วยในการทำให้น้ำมันปิโตรเลียมบริสุทธิ์ ให้เป็นSanitizing ในน้ำยาล้างไข่เพื่อลดจำนวนเชื้อที่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสีย

กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของ QAC, NaOCl , NaOH และ $Na_2CO_3$

โครงสร้างส่วนต่างๆ ของจุลินทรีย์ประกอบด้วยสารประกอบและประจุต่างๆ ซึ่งประจุนี้จำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ ภายในเซลล์จุลินทรีย์ รวมทั้งการเกิดเมตาบอลิสมต่างๆ ในการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นถ้าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประจุในโครงสร้างของเซลล์จุลินทรีย์ ปฏิกิริยาภายในเซลล์จุลินทรีย์ก็ไม่สามารถดำเนินไปได้ตามปกติ ซึ่งมีผลทำให้กิจกรรมต่างๆของเซลล์ถูกยับยั้งด้วย ดังนั้นการแลกเปลี่ยนประจุ และอนุมูลอิสระจึงเป็นกลไกหนึ่งที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ดังเช่น Cetylpyridinium Chlorite และ Benzalkanium Chloride ซึ่งเป็นสารประกอบ QAC ที่ใช้ในน้ำล้างไข่มีคุณสมบัติเป็น Cationic Surfactants ที่เปลี่ยนแปลงการเชื่อมกันของโปรตีนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

Wang และ Slavik (1997) ศึกษาการใช้สารเคมี QAC, NaOCl และ $Na_2CO_3$ ในการล้างไข่ พบว่าเปลือกไข่ที่ล้างด้วย $Na_2CO_3$ มีลักษณะที่ถูกทำลายอย่างรุนแรง เนื่องจาก $Na_2CO_3$ เป็นด่างแก่ที่สามารถกัดกร่อนผิวของเปลือกไข่ได้ ดังภาพที่ 2.2



**ภาพที่ 2.2** ผิวของเปลือกไข่ที่ถูกทำลายโดยการล้างด้วยโซเดียมคาร์บอเนต

ที่มา : Wang และ Slavik (1997)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ดังนั้นจึงควรเลือกใช้สารเคมีในการล้างไข่ที่เหมาะสม เนื่องจากเปลือกไข่เป็นกลไกที่ป้องกันจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ หากเปลือกไข่ถูกทำลาย เชื้อจุลินทรีย์สามารถปนเปื้อนและซึมผ่านเข้าสู่ภายในไข่ในระหว่างการเก็บรักษาได้

**2.3.2 การทำความสะอาดไข่โดยใช้เปอร์ออกซีแอซีติกแอซิด**

เปอร์ออกซีอะซีติกแอซิดเป็นสารเคมีที่ใช้ฉีดพ่นหรือผสมน้ำเพื่อทำความสะอาดผิวเปลือกไข่ นิยมใช้ทำความสะอาดไข่ไม่มีเชื้อหรือไข่บริโภค เปอร์ออกซีอะซีติกแอซิด (Peroxyacetic Acid) คือ เปอร์ออกไซด์ของกรดอะซีติก เป็นสารออกซิไดส์ (Oxidizing Agent) ที่แรง ละลายน้ำได้ดี มีกลิ่นฉุน เมื่อความเข้มข้นสูง โดยทั่วไปมีสารที่ให้ความคงตัวผสมอยู่ด้วย ประสิทธิภาพการทำลายเชื้อลดลงเมื่ออุณหภูมิสูง และเมื่อมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก เมื่อเปรียบเทียบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แล้ว สารละลายกรดเปอร์ออกซีอะซีติกมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อดีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีสารอินทรีย์ปะปนอยู่ นอกจากนี้แล้วสารละลายกรดเปอร์ออกซีอะซีติกไม่ทำปฏิกิริยากับคะตะเลส และเปอร์ออกซิเดส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่แตกต่างจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

<u>กลไกลการยั้บยั้งจุลินทรีย์ของเปอร์ออกซีอะซีติกแอซิด</u>

กรดเปอร์ออกซีอะซีติกสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้โดยการรบกวนพันธะซันไฮดริลและซัลเฟอร์ในโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์ โดยทำหน้าที่เป็นสารออกซิไดส์ นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ รวมถึงการทำให้โปรตีนเสียสภาพ ขัดขวางการขนส่งของผนังเซลล์และเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ สามารถรบกวนการผ่านเข้าออกที่เยื่อหุ้มเซลล์ จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด เมื่อสารละลายกรดเปอร์ออกซีอะซีติกสลายตัว จะได้น้ำ ออกซิเจน และกรดอะซีติก ซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นพิษในอาหารและสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังไม่ทำให้เกิดโฟมและสารประกอบฟอสเฟต ไม่มีคุณสมบัติในการกัดกร่อนแสตนเลส อลูมิเนียม รวมถึงดีบุก กรดเปอร์ออกซีอะซีติกสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ในน้ำกระด้างและย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (ศศิกานต์ อึ้งนิภากุล, 2544)

**2.3.3 การทำความสะอาดด้วยวิธีการรมควัน (Fumigation)**

การรมควันก็เป็นอีกวิธีหนึ่งในการฆ่าเชื้อที่เปลือกไข่ นิยมใช้กับการทำความสะอาดไข่ที่มีเชื้อหรือไข่ฟัก เนื่องจากการล้างไข่อาจทำให้น้ำนำพาจุลินทรีย์ผ่านเข้าไปทางรูอากาศบริเวณเปลือกไข่และทำให้ความชื้นไม่เหมาะสมในการฟักไข่ ซึ่งอาจจะทำไข่เน่าและเปอร์เซ็นต์ฟักไข่ลดลง การรมควันไข่

ทำได้โดยใช้โพแตสเซียมเปอแมงกาเนต ($KMnO_4$) 80 กรัม ใส่ถาดสังกะสีหรือถ้วยดิน แล้วนำฟอร์มาลีน (40 %) ประมาณ 130 มิลลิลิตร สำหรับตู้ขนาด 3 ตารางเมตร เทใส่ในถ้วยดังกล่าว จะเกิดก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ (HCHO) ขึ้น การรมควันควรกระทำในบริเวณปิด ทิ้งไว้ 20-30 นาที

<u>กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของก๊าซฟอร์มาดีไฮด์</u>

ฟอร์มาลดีไฮด์เป็นก๊าซที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง เมื่อละลายน้ำเรียกว่าฟอร์มาลินซึ่งมีฟอร์มาลดีไฮด์อยู่ประมาณ 37%-40% สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์และก๊าซฟอร์มาลดีไฮด์ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ โดยจะฆ่าเซลล์ปกติได้เร็วกว่าสปอร์ ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจะขึ้นอยู่กับความชื้นสัมพัทธ์และอุณหภูมิ คือ การทำลายจุลินทรีย์จะดีที่สุดที่ความชื้นสัมพัทธ์ 60%-80% และอยู่ในอุณหภูมิห้อง (22 องศาเซลเซียส) ฟอร์มาลดีไฮด์ทำลายเซลล์โดยรวมตัวกับสารประกอบอินทรีย์ เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก ทำให้ เซลล์ผิดปกติ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544)

## 2.4 กรดแอซีติก

กรดแอซีติก มีสูตรทางเคมี $CH_3COOH$ มีลักษณะเป็นของเหลว ไม่มีสี เป็นของแข็งที่อุณหภูมิ 62 องศาฟาเรนไฮด์ รวมตัวกับน้ำ แอลกฮอล์ และกลีเซอรีนได้ดี (Chichester และ Tanner, 1972) กรดอะซีติกหรือน้ำส้มสายชูเป็นสารให้กลิ่นรสและวัตถุกันเสียที่นิยมใช้กันมาตั้งแต่สมัยโบราณแล้ว กรดอะซีติกเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำส้มสายชูและกรด Pyroligneous พบตามธรรมชาติในผลมะเดื่อ การผลิตกรดอะซีติกนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น จากการหมักน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ น้ำตาล หรือเมล็ดธัญพืช หรือจากการออกซิเดชั่น (Oxidation) ของอะซิทอลดีไฮด์ (Acetaldehyde) หรือของบิวเทน (Butane) หรือได้จากปฏิกิริยาของเมทธานอล (Methanol) และคาร์บอนมอนอกไซด์ (Carbon monoxide) (Borgstrom, 1968) กรดแอซีติกเป็นสารเจือปนอาหารที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ภายใต้การควบคุม (Generally Recognized As Safe : GRAS) ดังนั้นกรดแอซีติกและอนุพันธุ์จึงเป็นที่ยอมรับและอนุญาตให้ใช้ในอาหาร

### 2.4.1 การใช้กรดแอซีติกในผลิตภัณฑ์อาหาร

กรดแอซีติกหรือน้ำส้มสายชูที่ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารและในการถนอมอาหาร มักใช้กัน 2 รูปแบบ คือ ใช้ในรูปของน้ำส้มสายชูเข้มข้น 5% - 10% และใช้ในรูปของสารละลายกรดแอซีติกสังเคราะห์เข้มข้น 25% - 80% (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2532) มีผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่ใช้กรดแอซีติกหรือน้ำส้มสายชูเป็นส่วนประกอบ เช่น ซอสมะเขือเทศ มายองเนส น้ำสลัดต่างๆ

อาหารดองทั้งเปรี้ยวและหวาน นอกจากนี้ใช้ในการบ่มเนื้อ และผลิตภัณฑ์ผักบรรจุกระป๋อง (Chichester และ Tanner, 1972; Adams, 1985) สำหรับสาเหตุที่ใช้กรดแอซีติกหรือกรดน้ำส้มในการถนอมอาหารนั้น เนื่องจากกรดแอซีติกให้กลิ่นรสเฉพาะตัวเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2532) ในอุตสาหกรรมการทำมายองเนส ถ้าหากมีการเติมแอซีติกลงไปด้วยจะทำให้ความสามารถในการต้านทานความร้อนของเชื้อ *Salmonella* ลดลง (ในกรณีที่มีการปนเปื้อนเชื้อ) และมีการใช้กรดแอซีติกเข้มข้น 1% - 3% ในผลิตภัณฑ์ปลาเพื่อป้องกันแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้โดยเฉพาะเชื้อ *Clostridium* ในประเทศฟิลิปปินส์มีการทดลองใช้น้ำส้มสายชูในการยืดอายุการเก็บรักษาปลาเค็มแห้งในการผลิตปลาเค็ม (ศรวณีย์ รอดเพียง, 2542)

**2.4.2 ผลของกรดแอซีติกต่อจุลินทรีย์**

ประสิทธิภาพของกรดแอซีติกในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์จะสูงที่ความเป็นกรด-เบสของอาหารต่ำๆ และสามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายแบคทีเรียได้มากกว่ายีสต์และเชื้อรา และยับยั้งเชื้อ *Bacillus* spp. และแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่า แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria) เชื้อ *Clostridium* และแบคทีเรียแกรมบวก กรดแอซีติกสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ได้โดยการแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ และทำให้โปรตีนที่ผนังเซลล์เกิดการแปรสภาพหรือจะเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์โดยได้มีการตั้งสมมติฐานว่า กรดจะไปรบกวนการสร้าง ATP โดยการไปลดระบบการขนถ่ายอิเลคตรอน หรือยับยั้งการขนถ่ายเมแทบอไลท์ไปยังเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการแทรกซึมของกรดแอซีติกจะสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าอยู่ในรูปที่เป็นกรดที่ไม่แตกตัวเพราะสามารถละลายในไขมันได้ดีมาก ความสามารถของกรดแอซีติกในการยับยั้งจุลินทรีย์นั้นจะแปรเปลี่ยนไปตามผลิตภัณฑ์อาหาร สิ่งแวดล้อม และชนิดจุลินทรีย์ (ศิวาพร ศิวเวชช, 2535) ทั้งนี้สามารถแบ่งประเภทของกรดออกเป็น 3 กลุ่มตามประสิทธิภาพในการทำลาย *Salmonella* ด้วยโมเลกุลกรด (Chung และ Goepfert, 1970) ดังนี้

<u>กรดที่มีประสิทธิภาพต่ำ</u> ได้แก่ กรดทาร์ทาริก กรดไฮโดรคลอริกและกรดซิตริก ซึ่งมีกรด-เบสต่ำสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้อยู่ในช่วง 4.05

<u>กรดที่มีประสิทธิภาพปานกลาง</u> ได้แก่ กรดฟูมาลิก กรดกลูโคนิก กรดกลูตาริก กรดแลกติก กรดมาลิกและกรดซัคซินิก ค่ากรด-เบสต่ำสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้อยู่ในช่วง 4.20-4.70 ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของกรด

<u>กรดที่มีประสิทธิภาพสูง</u> ได้แก่ กรดอะดิปิก กรดไพมิลิก กรดไขมันที่มีสายโมเลกุลสั้น กรดแอซีติกและกรดโพรพิโอนิกค่ากรด-เบสต่ำสุดของกรดจำพวกไดคาร์บอกซิลิกที่จุลินทรีย์เจริญได้คือ 5.10 และค่ากรด-เบสที่ 5.4 และ 5.50 สำหรับกรดแอซีติกและกรดโพรพิโอนิก ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งประเภทของกรดจากความสามารถในการแตกตัวได้เป็น 2 ประเภท คือ กรดแก่ (Strong Acid) และกรดอ่อนหรือกรดอินทรีย์ (Weak Acid/Organic Acid) ซึ่งสังเกตได้จากค่าคงที่การแตกตัว ($K_a$) กรดแก่ คือ กรดที่แตกตัวได้หมดและมีค่า $K_a$ มากกว่า 1 สำหรับกรดอินทรีย์ คือ กรดที่แตกตัวได้ไม่หมดหรือแตกตัวได้น้อย กรดอินทรีย์อาจมีการแตกตัวได้หลายครั้งและมีค่า $K_a$ น้อยกว่า 1 เช่น กรดแอซีติกมีค่า $K_a$ น้อยมาก คือ $1.8\times10^{-5}$ ค่า $K_a$ สามารถแสดงอยู่ในค่า $pK_a$ ($pK_a = -\log K_a$) ทั้งนี้ค่า $pK_a$ คือ กรด-เบสที่กรดแตกตัวไป 50% โดยกรดแต่ละชนิดจะมีค่า $pK_a$ ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.4 ซึ่งผลการทำลายเชื้อของกรดขึ้นกับเปอร์เซ็นต์กรดที่ไม่แตกตัว โดยเปอร์เซ็นต์กรดที่ไม่แตกตัวมากขึ้นจะทำให้กรดมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อสูงขึ้น ประสิทธิภาพการทำลาย จุลินทรีย์ของกรดแต่ละชนิดเรียงลำดับได้ดังนี้ โพรพิโอนิก > กรดแอซีติก > กรดแลกติก > กรดซิตริก (Garbutt, 1997)

**ตารางที่ 2.4** ค่า $pK_a$ ของกรดแต่ละชนิด

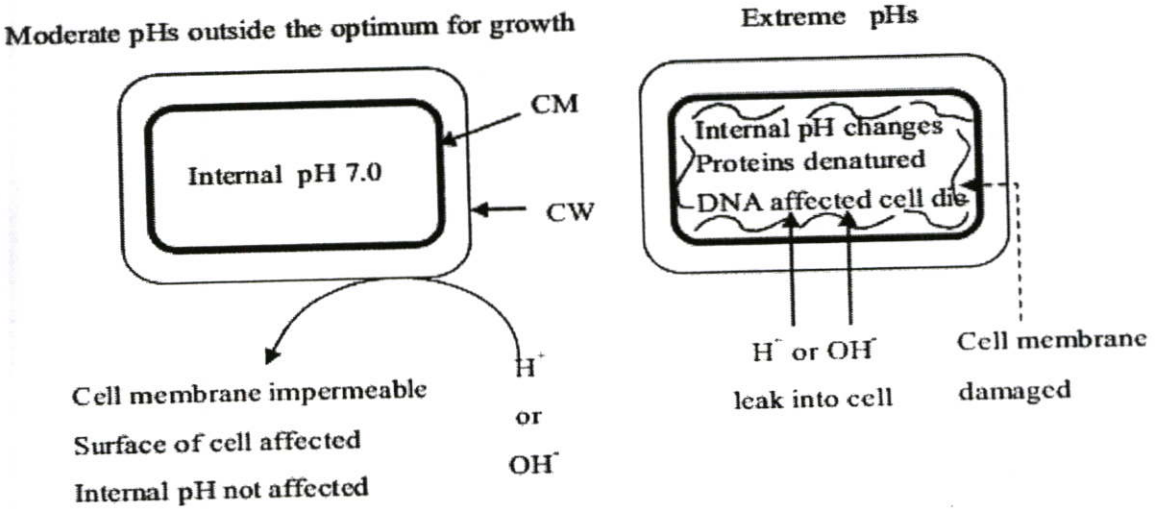
| ชนิดกรด | $pK_a$ 1 | $pK_a$ 2 | $pK_a$ 3 |
|---|---|---|---|
| กรดออกซาลิก | 1.19 | 4.21 | - |
| กรดฟอสฟอริก | 2.12 | 7.21 | 12.30 |
| กรดทาร์ทาริก | 3.02 | 4.54 | - |
| กรดมาลิก | 3.40 | 5.05 | - |
| กรดซิตริก | 3.06 | 4.74 | 5.40 |
| กรดแลกติก | 3.86 | - | - |
| กรดแอสคอร์บิก | 4.10 | 11.79 | - |
| กรดแอซีติก | 4.76 | - | - |
| กรดคาร์บอนิก | 6.10 | 10.25 | - |

ที่มา : Nielsen (1994)

นอกจากประสิทธิภาพการทำลายจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์การไม่แตกตัวของกรดอินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับค่ากรด-เบส และอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมด้วย โดยกรดอินทรีย์จะมีประสิทธิภาพ

สูงขึ้นเมื่อสิ่งแวดล้อมมีค่ากรด-เบสต่ำลงและอุณหภูมิสูงขึ้น เพราะทำให้มีปริมาณกรดที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้น เช่น กรดแอซีติกจะมีเปอร์เซ็นต์กรดที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้นจาก 0.54 เป็น 84.50 เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่ากรด-เบส ลดลงจาก 7 เป็น 4 (Bell และ Kyriakides, 2002) จากการรายงานของ Entani และคณะ (1998) พบว่าประสิทธิภาพของน้ำส้มสายชู (กรดแอซีติก 2.5%) ในการทำลาย *E.coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจาก 10 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Vijayakumar และ Wolf-Hall (2002a) รายงานว่า การจุ่มผักกาดแก้วในกรดแอซีติกเข้มข้น 0.3% เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวน *E.coli* ได้ (2.8 log cfu/g) มากกว่าการจุ่มผักที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (1.8 log cfu/g) ที่ระยะเวลาการแช่ผักที่เท่ากัน

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดอ่อนและกรดแก่แตกต่างกัน โดยกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยกรดแก่แสดงดังภาพที่ 2.3 เมื่อค่ากรด-เบสของสภาวะแวดล้อมเหมาะสม (ค่ากรด-เบสปานกลาง) กรดแก่ที่แตกตัวเป็น $H^+$ และ $OH^-$ ภายนอกเซลล์ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากกรดที่แตกตัวนั้นเป็นโมเลกุลที่มีขั้วหรือมีประจุ และบริเวณผนังเซลล์เป็นชั้นไขมันซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงจับประจุของกรดที่แตกตัวไว้ ในขณะที่กรดที่ไม่แตกตัวผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าเพราะเป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว ดังนั้นกรดแก่ที่แตกตัวจึงไม่สามารถทำลายเซลล์ได้ ในทางตรงข้ามเมื่อค่ากรด-เบสของสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น มีค่ากรด-เบสต่ำมากๆ เซลล์เมมเบรนจะถูกทำลาย ส่งผลให้กรดที่แตกตัวที่อยู่ในรูป $H^+$ และ $OH^-$ สามารถผ่านผนังเซลล์จุลินทรีย์เข้าไป เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและดีเอ็นเอภายในเซลล์ เซลล์จึงถูกทำลายในที่สุด (Garbutt, 1997)




**ภาพที่ 2.3** กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยกรดแก่

ที่มา : Grabutt (1997)

สำหรับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยกรดอ่อนหรือกรดอินทรีย์ แสดงดังภาพที่2.4 โดยการเข้าทำลายเซลล์ของกรดอ่อนหรือกรดอินทรีย์จะอยู่ในรูปของกรดที่ไม่แตกตัวเป็นสำคัญ ซึ่งสามารถละลายในไขมัน (Lipophilic Layer) ในชั้นผนังเซลล์ แล้วเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์ได้ ในขณะที่กรดในรูปที่แตกตัวไม่สามารถผ่านไปได้ กรดที่ไม่แตกตัวนี้จะเกิดการแตกตัวภายในเซลล์จุลินทรีย์ทำให้ค่ากรด-เบส ภายในเซลล์ลดลง ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ โปรตีน รวมทั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดปกติจึงทำให้เซลล์ถูกทำลาย (Garbutt, 1997)

Adams และ Hall (1988) แสดงให้เห็นว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *S.* Enteritidis และ *Escherichia coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกรดแอซีติกและหรือกรดแลกติกที่ความเข้มข้น 16 มิลลิโมลาร์

Ahamad และ Marth (1989) พบว่า กรดแอซีติก กรดซิตริก และกรดแลกติก อย่างน้อย 0.1% สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับ Entani และคณะ (1998) ที่ใช้น้ำส้มสายชูซึ่งมีกรดแอซีติก 0.1% ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7, *S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium

Branen และคณะ (1989) ได้รวบรวมการทดลองที่ใช้กรดแอซีติกในการทำลายจุลินทรีย์ ในการศึกษาถึงความสามารถของกรดแอซีติกในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ค่ากรด-เบส 4 , 5 และ 6 พบว่า ค่ากรด-เบส 6 กรดแอซีติกจะสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus, Clostridium* และแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าแบคทีเรีย แลคติก (Lactic acid bacteria) ยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อค่ากรด-เบสลดลงเหลือ 5.0 แบคทีเรีย แกรมบวกจะถูกยับยั้งมากกว่าแบคทีเรียแลคติก ยีสต์ และเชื้อรา ที่ค่ากรด-เบส 4.0 ความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ต้องการในการยับยั้งจะลดลง

การศึกษาถึงความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า *Staph . aureus* จะถูกยับยั้งที่ค่ากรด-เบส 5.0, ขณะที่เชื้อ *B. cereus* และ *Salmonella* ยับยั้งที่ค่ากรด-เบส 4.9 ส่วนเชื้อ *Aspergillus niger* ค่ากรด-เบสที่ยับยั้งคือ 4.1 และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อค่ากรด-เบสเท่ากับ 3.9 กรดแอซีติกสามารถยับยั้งเชื้อ*Staph. aureus* ได้ 90-99% ภายใน 12 ชั่วโมง ที่ เมื่อค่ากรด-เบสเท่ากับ 5.2 และ 5.0 ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 1% จะยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้ 99% ภายใน 1 ชั่วโมง ( Branen และคณะ, 1989 )

Dickson (1992) รายงานว่า การใช้กรดอะซีติกเข้มข้น 2% ในเนื้อที่มีไขมันสูงจะช่วยลดจำนวน *S.* Typhimurium แต่จะไม่มีผลในเนื้อที่มีไขมันต่ำ และกรดสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ 65%

Vijayakumar และ Wolf-Hall (2002b) ได้ศึกษาการยับยั้ง *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า Apple Cider Vinegar (0.2% กรดแอซีติก) Lemon Juice (6% กรดแอซีติก) Lime Juice

(5.8% กรดซิตริก) และ white vinegar (0.9% และ 1.1% กรดแอซีติก) สามารถยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์นี้ได้ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองดังที่กล่าวมา

Sengun และ Karapinar (2004) รายงานการลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium บนแครอทโดยใช้สารละลายน้ำส้มสายชูหมักร่วมกับน้ำมะนาวในอัตราส่วน 1:1 สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ถึง 0.79-3.95 log cfu/g

Kilonzo-Wthenge และคณะ (2006) รายงานการใช้น้ำส้มสายชู 5% เพื่อลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปนเปื้อนใน ผักกาดหอม แอปเปิ้ล และบล็อกโคลี่ โดยการใช้น้ำส้มสายชูล้างผลิตภัณฑ์หลังจากล้างด้วยน้ำประปา พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ในช่วง 1.88-2.01 log cfu/g ขึ้นอยู่กับพื้นผิวของผลิตภัณฑ์

# บทที่ 3
# ระเบียบวิธีวิจัย

## 3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

### 3.1.1 ไข่ไก่สด

ใช้ไข่ไก่สดที่ได้มาจากตลาดสดเขตมีนบุรี และเขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยก่อนนำมาใช้ในการทดลองต้องทำให้ปลอดเชื้อจุลินทรีย์

## 3.2 อุปกรณ์การทดลอง

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3.2.1 เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ | UV-1601 | Shimadzu | Japan |
| 3.2.2 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ | HA-240 MN | Hirayama | Japan |
| 3.2.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง | AB 104 | Mettler Toledo | Switzerland |
| 3.2.4 ตู้อบฆ่าเชื้อ | UL50 | Memmert | Germany |
| 3.2.5 ตู้บ่มเพาะเชื้อ | B30 | Memmert | Germany |
| 3.2.6 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Air Flow) | BS24 9BP | Bio safety | UK |
| 3.2.7 วอร์เทกซ์ มิกเซอร์ | G-560 E | Scientific | U.S.A |
| 3.2.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง | CR 21 | Hitachi | Japan |
| 3.2.9 เครื่องตีป่น | BA 7021 | Seward | UK |
| 3.2.10 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) | CG841 | Schott gerate | Germany |
| 3.3.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิและความชื้น (Hygrometer) | 445703 | Extech | Thailand |
| 3.2.12 เครื่องแก้ว | | | |
| 3.2.13 Mc Farland Standard | | | |
| 3.2.14 จานเพาะเชื้อพลาสติก | | | |
| 3.2.15 เวอเนียร์แคลลิปเปอร์ | | | |
| 3.2.16 กระบอกฉีด | | | |

3.2.17 เครื่องรมไอ

3.2.18 ปั้ม

## 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3.3.1 | Tryptic Soy Broth (TSB) | Merck | Germany |
| 3.3.2 | Tryptic Soy Agar (TSA) | Merck | Germany |
| 3.3.3 | Buffered Peptone Water | Merck | Germany |
| 3.3.4 | Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn) | Merck | Germany |
| 3.3.5 | Brilliant-green Phenol-red Lactose Agar (BPL) | Merck | Germany |
| 3.3.6 | Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (XLD) | Merck | Germany |
| 3.3.7 | Triple Sugar Iron Agar (TSI) | Merck | Germany |
| 3.3.8 | Lysine Iron Motility Medium (LIM) | Merck | Germany |
| 3.3.9 | Mueller Hinton Agar (MHA) | Merck | Germany |
| 3.3.10 | Rappaport-Vassiliadis medium with Soya Broth (RVS) | Merck | Germany |
| 3.3.11 | Diluent (0.1%BPW) | Merck | Germany |

## 3.4 สารเคมี

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3.4.1 | น้ำส้มสายชูหมักเข้มเข้น 10% | My Garden | Thailand |
| 3.4.2 | แอลกอฮอล์ 70% และ 90% | Sigma | Malaysia |

## 3.5 เชื้อจุลินทรีย์

3.5.1 เชื้อ *Salmonella* Enteritidis (SE) ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

## 3.6 วิธีการทดลอง

### 3.6.1 การเตรียมเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* Enteritidis (SE)

เขี่ยเชื้อ SE ลากลงในอาหาร TSA slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้ออีก 2 ครั้ง เขี่ยเชื้อที่ได้ลงบนผิวของอาหาร TSA ในจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 10 มิลลิลิตร. บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อแยกเซลล์ แล้วทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% จากนั้นจึงทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1% ปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 1 (สุรีย์ นานาสมบัติ และคณะ, 2549) โดยวัดความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 nm ค่าความขุ่นที่ได้ (Absorbance) คือ 0.257 จะได้เชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ $3.0 \times 10^8$ cfu/ml (Mcfarland standard , 2009)

### 3.6.2 การเพาะเชื้อ SE บนปลือกไข่ (Inoculated SE on Eggshell)

นำไข่มาจุ่มลงในสารแขวนลอยเซลล์ SE ที่เตรียมจากข้อ 3.6.1เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้ไข่แห้งโดยนำไปตากที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 30% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นโดยใช้ Hygrometer แล้วนำไข่ที่ได้วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 ชั่วโมง การควบคุมความชื้นและอุณหภูมิภายในไข่ให้เท่ากับอุณหภูมิภายนอก เพื่อป้องกันเชื้อ SE ซึมผ่านรูบนเปลือกไข่เข้าสู่ภายในไข่ ทำการ ตรวจนับจำนวนเชื้อ SE ตามวิธีดัดแปลงของ Himathongkham และคณะ (1999) และตรวจสอบการซึมผ่านของ SE เข้าสู่ภายในไข่ขาวและไข่แดงตามวิธีวิเคราะห์มาตรฐาน (ISO 6579 : 2002)

### 3.6.3 การเตรียมไข่ปลอดเชื้อ (ดัดแปลงจากวิธีเตรียมไข่ปลอดเชื้อสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified Brain Heart Infusion Egg yolk Agar กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2552)

3.6.3.1 ล้างทำความสะอาดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่บนผิวของเปลือกไข่ เช็ดให้แห้ง แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้อุณหภูมิภายในไข่เท่ากับอุณหภูมิที่อยู่ภายนอก 24 ชั่วโมงทำการศึกษาขั้นตอนการเตรียมไข่ปลอดเชื้อ 2 วิธี เพื่อหาวิธีที่เหมาะสมดังนี้

1. วิธีที่ 1 นำไข่ที่ทำการเพาะเชื้อ SE ตามข้อ 3.6.2 แช่ในแอลกอฮอล์ 95% 5 วินาที ใช้ที่คีบปลอดเชื้อคีบไข่ผ่านเปลวไฟ 5-10 วินาที ตรวจสอบเชื้อ SE ที่อยู่รอดบนเปลือกไข่ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6.7 ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2. วิธีที่ 2 นำไข่ที่ทำการเพาะเชื้อ SE ตามข้อ 3.6.2 มาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 5 วินาที 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที วางไข่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีในสภาพปลอดเชื้อ จากนั้นตรวจสอบเชื้อ SE ที่อยู่รอดบนเปลือกไข่ ตามวิธีที่ระบุในข้อ 3.6.7 ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อเลือกวิธีฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ที่เหมาะสม

### 3.6.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE

3.6.4.1 ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อ SE โดยวิธีการ Agar Overlay Disc Diffusion

ทำการทดลองหาความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE ตามวิธีการของ Huys และคณะ (2002) ดังนี้ เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) 10 มล. ในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที จากนั้นเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA 5 มล. ที่มีการเติมสารแขวนลอยเซลล์ SE (จากการเตรียมในข้อ 3.6.1) 20 ไมโครลิตร ทำการ Pour Plate เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เขียนระบุตำแหน่งที่วางแผ่นกระดาษขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.00 มิลลิเมตร ใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อคีบแผ่นกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อวางตรงตำแหน่งที่ระบุ หยดน้ำส้มสายชูหมักที่จะทดสอบแต่ละความเข้มข้น (0% ถึง 5% โดยเพิ่มความเข้มข้นขึ้นระดับละ 1%) 20 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง รวมทั้งการทดสอบ negative control ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 $\pm$2 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยใช้เวอเนียร์แคลลิปเปอร์วัดโซนยับยั้งซึ่งมีลักษณะใส (Inhibition Zone) แผ่นกระดาษกรองที่หยดน้ำส้มสายชูหมัก ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.6.4.2 ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งเชื้อ SE ในอาหารเหลว

ดูดเชื้อ SE ที่เตรียมไว้ตามวิธีการในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีสารละลายน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นในช่วงที่เหมาะสม (จากผลการทดลองข้อ 3.6.4.1 โดยใช้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นระดับละ 0.1% ให้ครอบคลุมความเข้มข้นที่น้อยกว่าและมากกว่าผลการทดลองข้อ 3.6.4.1 อย่างละ 10 ระดับความเข้มข้น ระดับความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของ

เชื้อ SE ถือเป็นระดับความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ SE ซึ่งจะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป) ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ซึ่งปรับความเข้มข้นดังกล่าว โดยใช้สูตร $M_1V_1 = M_2V_2$ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่ม 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) (Chang และ Fang, 2007; สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา และ คณะ, 2006) จากนั้นตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยใช้วิธี Total Plate Count (TPC) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (VanderZant และ Splittstoesser, 1992) และค่า OD ที่ 625 นาโนเมตร (Alexander และคณะ, 2001) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.6.4.3 ผลของเวลาต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE ในน้ำส้มสายชูหมัก

ดูดเชื้อ SE ที่เตรียมไว้ตามวิธีการในข้อ 3.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มี สารละลายน้ำส้มสายชูหมัก ความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ SE ได้ดีที่สุดจากข้อ 3.6.4.2 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0-10 นาที ทำการตรวจสอบการ เจริญของเชื้อ ทุก 1 นาที โดยใช้วิธี TPC เช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 3.6.4.2 ระยะเวลาเร็วที่สุดที่ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE ถือเป็นเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

### 3.6.5 วิธีการในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE บนเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก

3.6.5.1 วิธีจุ่มไข่ในน้ำส้มสายชูหมัก

นำไข่ที่ถ่ายเชื้อ SE จากข้อ 3.6.2 มาจุ่มในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นที่เหมาะสมจาก ข้อ 3.6.4.2 และความเข้มข้นกรด 10% (v/v) เป็นเวลา 10 วินาทีนำขึ้นมาทิ้งไว้ให้แห้งนาน 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที จากนั้นวางทิ้งไว้ให้แห้งภายใต้สภาวะปลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปตรวจหาเชื้อ SE ตามวิธีการดัดแปลงจาก Himathongkham และคณะ (1999)

3.6.5.2 วิธีสเปรย์เปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก

นำไข่ที่ถ่ายเชื้อ SE จากข้อ 3.6.2 มาผ่านการสเปรย์ด้วยน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น กรดที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.4.2 และความเข้มข้นกรด 10% บนเปลือกไข่ โดยให้ระยะห่างระหว่างไข่ และกระบอกฉีดเท่ากับ 1 ฟุต ทำการฉีดพ่น 3 ครั้ง ครั้งละ 1 ด้าน หมุนไข่พร้อมกับฉีดพ่นน้ำส้มสายชู ความเข้มข้นกรดแต่ละระดับ วางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 10, 20, 30, 40, 50,..., 120 นาทีโดย ทำการฉีดพ่นน้ำส้มสายชูหมักทุก ๆ 30 นาที ทำให้แห้งโดยใช้ลมจากตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Air Flow) เป็น เวลา 3 นาที จากนั้นนำเปลือกไข่ไปผ่านการตรวจหาเชื้อ SE ตามวิธีการดัดแปลงจาก Himathongkham และคณะ (1999)

3.6.5.3 วิธีการรมไอน้ำส้มสายชูหมัก

นำไข่ที่ถ่ายเชื้อ SE จากข้อ 3.6.2 โดยใช้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.4.2 และความเข้มข้นกรด 10% ทำให้เกิดไอของน้ำส้มสายชูหมัก ทดสอบการรมไอน้ำส้มสายชูหมักที่เวลา 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำมาตรวจหาเชื้อ SE ตามวิธีการดัดแปลงของ Himathongkham และคณะ (1999)

**3.6.6 การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาไข่ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส**

3.6.6.1 เตรียมไข่ที่ซื้อจากท้องตลาดจำนวน 2 ชุด โดยแบ่งเป็นชุดที่ 1 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดที่ 2 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบอายุการเก็บรักษาตามวิธีมาตรฐานสากล (ISO 6579 : 2002) ในข้อ 3.6.8 โดยตรวจวิเคราะห์ทุก 7 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 28 วัน

3.6.6.2 เตรียมไข่ปลอดเชื้อตามวิธีที่เหมาะสมในข้อ 3.6.3 เพาะเชื้อ SE บนเปลือกไข่ตามข้อ 3.6.2 จำนวน 2 ชุด โดยแบ่งเป็นชุดที่ 1 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และชุดที่ 2 เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบจำนวนเชื้อบนไข่ตามวิธีการดัดแปลงของ Himathongkham และคณะ (1999) ตรวจวิเคราะห์ทุก 7 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 28 วัน

3.6.6.3 เตรียมไข่ปลอดเชื้อตามวิธีที่เหมาะสมในข้อ 3.6.3 เพาะเชื้อ SE บนเปลือกไข่ตามข้อ 3.6.2 จำนวน 4 ชุด ดังนี้

1. ฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ด้วยน้ำส้มสายชูหมักตามวิธีการที่เหมาะสมในข้อ 3.6.5 ให้ชุดที่ 1 เป็นไข่ที่ผ่านการทำความสะอาดโดยการจุ่มหรือสเปรย์ หรือรมไอน้ำส้มสายชูหมัก (3.6.4) ทดสอบกับความเข้มข้นกรดที่ได้ในข้อ 3.6.4 ซึ่งเลือกวิธีทำความสะอาดที่เหมาะสมที่สุด (ข้อ 3.6.5.1, 3.6.5.2 และ 3.6.5.3) ชุดที่ 2 เป็นไข่ที่ทำความสะอาดโดยการจุ่มหรือสเปรย์ หรือรมไอน้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 10% ตามลำดับ (ข้อ 3.6.5.1, 3.6.5.2 และ 3.6.5.3) เก็บรักษาไข่ชุดที่ 1 และ 2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบอายุการเก็บรักษาตามวิธีมาตรฐานสากล (ISO 6579 : 2002) โดยตรวจวิเคราะห์ทุก 7 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 28 วัน

2. เตรียมไข่ตามข้อ 1 (3.6.6.3) ให้เป็นชุดที่ 3 และ 4 เก็บรักษาไข่ ทั้ง 2 ชุดที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบอายุการเก็บรักษาตามวิธีมาตรฐานสากล (ISO 6579 : 2002) โดยตรวจวิเคราะห์ทุก 7 วัน เป็นเวลาทั้งหมด 28 วัน

### 3.6.7 การตรวจนับจำนวนเซลล์ SE ดัดแปลงจาก Himathongkham และคณะ (1999)

เปิดเปลือกไข่ทางด้านป้าน เทเอาไข่ขาวและไข่แดงออกทิ้ง นำเปลือกไข่และเมมเบรนมาบดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักทั้งหมดของเปลือกไข่แต่ละใบและทำให้เปลือกไข่แห้ง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ เติม TSB 10 มิลลิลิตร ในเปลือกไข่ที่บดแล้ว ดูดออกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี BPW ความเข้มข้น 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อทำการเจือจาง ใช้เทคนิค Spread Plate ในการตรวจนับเซลล์บนอาหารแข็ง TSA และ XLD โดยดูดตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารแข็งแต่ละชนิด เกลี่ยให้ทั่วด้วยแท่งแก้วงอ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* โดยถ่ายเชื้อที่ขึ้นบนอาหารแข็ง TSA ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ BPL เชื้อที่ตรวจสอบจะคิดเป็น 5% ของจำนวนโคโลนีที่นับได้บนอาหารแข็ง TSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ± 2 ชั่วโมงก่อนนำไปทดสอบทางชีวเคมี

### 3.6.8 การตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ SE ตามวิธีมาตรฐานสากล (ISO 6579 : 2002)

3.6.8.1 ตรวจเชื้อ SE บนเปลือกไข่ โดยเปิดไข่ทางด้านป้าน เทไข่ขาวและไข่แดงออก ชั่งน้ำหนักของเปลือกไข่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นบดเปลือกไข่และเมมเบรนทั้งหมดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำเปลือกไข่และเมมเบรนทั้งหมด (ต่อ 1 ฟอง) ใส่ในถุงสเตอไรส์ เติม BPW อัตตราส่วน 1:10 ส่วนการตรวจเชื้อ SE ที่ซึมผ่านเปลือกไข่เข้าสู่ภายในไข่ขาวและไข่แดง ตรวจวิเคราะห์โดยนำไข่ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อที่เปลือกไข่ตามข้อ 3.6.3 เปิดไข่ทางด้านป้านใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดไข่ขาวและไข่แดง 25 มิลลิลิตร ใส่ในถุงสเตอ-ไรส์ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW 225 มิลลิลิตร ตีป่นให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 2 นาทีบ่ม 37 องศาเซลเซียส 18 ± 2 ชั่วโมง

3.6.8.2 ถ่ายตัวอย่างในข้อ 3.6.8.1 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี MKTTn 10 มิลลิลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง และถ่ายตัวอย่างเดียวกัน(ข้อ 3.6.8.1) 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี RVS 10 มิลลิลิตร บ่ม 41.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง

3.6.8.3 เพาะเชื้อที่ได้ในข้อ 3.6.8.2 บนอาหารแข็ง XLD และ BPLS โดยใช้เทคนิค Streak Plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 3 ชั่วโมง ตรวจสอบยืนยันโคโลนีของเชื้อ *Salmonella* ที่ตรวจพบโดยทำการทดสอบทางชีวเคมีและแอนติเซรั่ม

**3.6.9 การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลอง**

ในการงานวิจัยนี้ออกแบบการทดลองเป็นแบบ RCBD เพื่อทำการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ SE โดยใช้น้ำส้มสายชูหมัก ในการทดสอบด้วยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion มีขนาดของโซนยับยั้งเป็นตัวแปรตอบในการศึกษา ส่วนในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักและเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของ SE ตลอดจนการยับยั้งการเจริญของ SE บนเปลือกไข่และการศึกษาอายุการเก็บรักษาไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่เหมาะสมออกแบบการทดลองแบบ CRD สำหรับการศึกษาที่กล่าวมาทั้งหมดนั้น มีจำนวนการเหลือรอดของเซลล์ SE เป็นตัวแปรตอบในการศึกษา ซึ่งใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Science) โดยใช้การทดสอบของ Duncan ตลอดการทดลอง ซึ่งแสดงความแตกต่างด้วยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Mean) ของข้อมูล ทำการทดลองจำนวน 3 ครั้ง ค่าทางสถิติตลอดการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย (Mean) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและวิจารณ์

## 4.1 ผลของน้ำส้มสายชูหมักต่อการลดลงของเชื้อ *S.* Enteritidis (SE) ในระดับหลอดทดลอง

### 4.1.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งของเชื้อ SE โดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion

ในการทดสอบวิธีนี้ ใช้หลักการแพร่โดยน้ำส้มสายชูหมัก (กรดแอซีติก) ที่เติมลงบนกระดาษกรอง (Filter Paper Disc) ซึ่งวางไว้บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ที่เพาะเลี้ยง SE มีความเข้มข้นของสารละลายเซลล์เริ่มต้น 8.34 log cfu/ml ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำส้มสายชูหมักที่ระดับความเข้มข้นกรดแอซีติก 6 ระดับ คือ 0%, 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% (v/v) โดยอัตราการแพร่ของสารออกฤทธิ์ที่ผ่านไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีอิทธิพลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (Inhibition Zone) ซึ่งบอกถึงความสามารถของน้ำส้มสายชูหมักที่แต่ละระดับความเข้มข้นของกรด ในการยับยั้งเชื้อ SE โดยอาศัยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง ผลการยับยั้งแสดงดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 พบว่าน้ำส้มสายชูความเข้มข้นของกรด 1%- 5% (v/v) มีค่ากรด-เบส ในช่วง 2.3 – 4.9 สามารถทำให้เกิดโซนยับยั้งที่มีความกว้างเพิ่มขึ้นตามลำดับจนถึงน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดสูงสุด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 1% (v/v) เกิดโซนยับยั้งที่มีขนาดความกว้าง 7.64 มิลลิเมตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 2%, 3%, 4% และ 5% ทำให้เกิดโซนยับยั้งขนาด 12.46, 12.86, 15.34 และ 17.71 มิลลิเมตร ตามลำดับ น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 1% (v/v) ทำเกิดโซนยับยั้งที่มีความกว้างน้อยที่สุดคือ 7.64 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 0% (v/v) (ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางจานกระดาษกรองมีค่า 6.00 มิลลิเมตร) และโซนยับยั้งที่มีขนาดกว้างที่สุดคือ 17.71 มิลลิเมตร เกิดจากการยับยั้งของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 5% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กับการยับยั้งของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 0% - 4% (v/v) นอกจากนี้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 3% ทำให้เกิดโซนใสไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของโซนยับยั้งที่เกิดจากการยับยั้งของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 0% 1% 4%

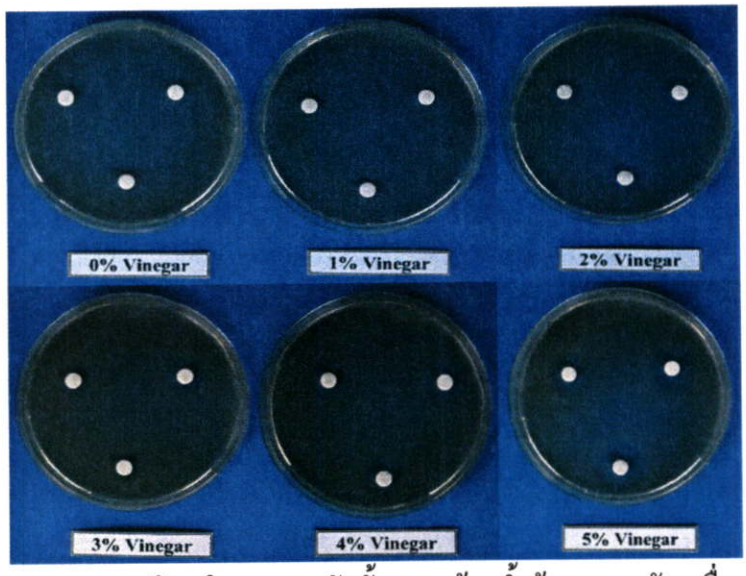
และ 5% พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่แต่ละระดับความเข้มข้น ณ ระดับความเชื่อมั่น 95%

กรดแอซีติกเป็นกรดอินทรีย์หรือกรดอ่อน ซึ่งเป็นกรดที่แตกตัวได้ไม่หมดหรือแตกตัวได้น้อย ผลการทำลายเชื้อของกรดขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์กรดที่ไม่แตกตัว เมื่อความเข้มข้นกรดที่เพิ่มขึ้นจะมีปริมาณกรดที่ไม่แตกตัวสูงขึ้น (Adams และ Hall, 1988) ซึ่งกรดแอซีติกที่ไม่แตกตัวนี้เป็นปัจจัยหลักในการทำลาย SE โดยโมเลกุลของกรดที่ไม่แตกตัวสามารถละลายในไขมัน (Lipophilic Layer) ที่อยู่ในชั้นผนังเซลล์ แล้วเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เข้าไปในเซลล์ ในขณะที่กรดในรูปที่แตกตัวจะไม่สามารถผ่านไปได้ กรดในรูปที่ไม่แตกตัวนี้จะเกิดการแตกตัวภายในเซลล์จุลินทรีย์ทำให้ค่ากรด-เบสภายในเซลล์ลดลง ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ โปรตีน รวมทั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดปกติจึงทำให้เซลล์ถูกทำลายในที่สุด (Garbutt, 1997) ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของกรดที่สูงขึ้นทำให้มีปริมาณกรดที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น

**ตารางที่ 4.1** ค่าความเป็นกรด-เบส และฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ SE ด้วยน้ำส้มสายชูหมักที่ระดับความเข้มข้น 0% - 5% (v/v) ทดสอบโดย Agar Overlay disc diffusion method

| ความเข้มข้น | ความเป็นกรด-เบส | ขนาดของโซนยับยั้ง (มิลลิเมตร)* |
|---|---|---|
| 0% | 7.0 | $\leq 6.00^{e} \pm 0.00$ |
| 1% | 4.9 | $7.64^{d} \pm 0.29$ |
| 2% | 4.4 | $12.46^{c} \pm 0.52$ |
| 3% | 3.5 | $12.86^{c} \pm 0.62$ |
| 4% | 3.0 | $15.34^{b} \pm 0.33$ |
| 5% | 2.3 | $17.71^{a} \pm 0.54$ |

* ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

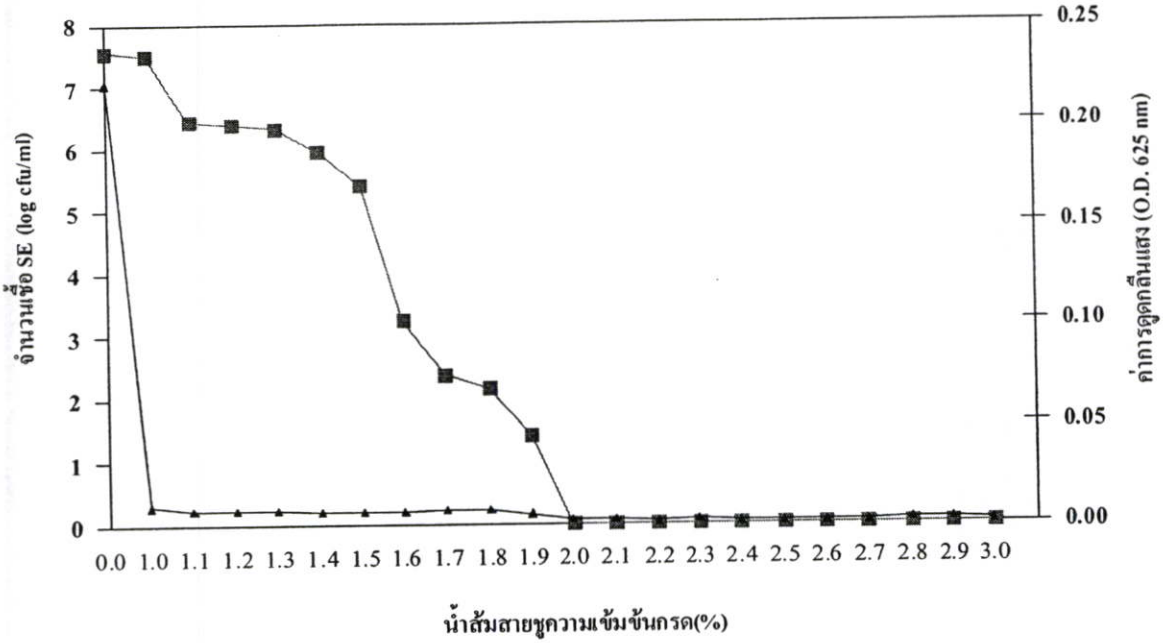



**ภาพที่ 4.1** ขนาดของโซนใสของการยับยั้ง SE ด้วยน้ำส้มสายชูหมัก เมื่อทดสอบโดย Agar Overlay Disc Diffusion Methodที่ระดับความเข้มข้น 1%-5% (v/v)

จากการศึกษาของ Bell และ Kyriakides (2002) รายงานว่า นอกจากประสิทธิภาพการทำลายจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์การไม่แตกตัวของกรดอินทรีย์แล้ว ยังขึ้นอยู่กับค่ากรด-เบสและอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมด้วย โดยกรดอินทรีย์จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อมีค่ากรด-เบสต่ำลงและอุณหภูมิสูงขึ้น เพราะทำให้มีปริมาณกรดที่ไม่แตกตัวเพิ่มขึ้น Branen และคณะ (1989) ได้รวบรวมการใช้กรดแอซีติกในการทำลายจุลินทรีย์ พบว่าเชื้อ *Staph. aureus* ถูกยับยั้งเมื่อค่ากรด-เบสเท่ากับ 5.0 ส่วนในเชื้อ *B. cereus* และ *Salmonella* ค่ากรด-เบสเท่ากับ 4.9 ขณะที่เชื้อรา *A. niger* ค่ากรด-เบสที่ 4.1 และเชื้อยีสต์ *Sac. cerevisiae* ที่ค่ากรด-เบส 3.9 เมื่ออ้างอิงกับผลการทดลองที่พบว่า น้ำส้มสายชูหมักที่ความเข้มข้นกรด 1%, 2% และ 3% (v/v) มีค่ากรด-เบสที่ 4.9, 4.4 และ 3.5 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ากรด-เบส สอดคล้องกับรายงานของ Branen และคณะ (1989) นอกจากนี้ จิตศิริ ทองสอน (2543) ยังรายงานว่า การปรับค่าค่ากรด-เบส ของอาหารเลี้ยงหรือ TSB ให้มีค่า 4.0 และ 5.0 โดยใช้กรดแอซีติก สามารถทำลายเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ ดังนั้นเพื่อให้การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งของน้ำส้มสายชูหมักที่ระดับความเข้มข้นกรดที่เหมาะสมจึงจำเป็นต้องศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักอย่างละเอียดในระดับหลอดทดลองต่อไป โดยจะพิจารณาใช้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรดในช่วง 1% - 3% (v/v) ในการยับยั้งเชื้อ SE เนื่องจากมีค่ากรด-เบส อยู่ในช่วงที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ อีกทั้งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาจากขนาดของโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นระหว่างความเข้มข้นกรด 2% - 3% (v/v)

**4.1.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งเชื้อ SE ในระดับหลอดทดลอง**

จากการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ SE ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเข้มข้นกรดในน้ำส้มสายชูหมัก 1%-3% (v/v) ดังแสดงในภาพที่ 4.2 ปริมาณเชื้อ SE ในสารละลายน้ำส้มสายชูหมักมีจำนวนลดลงสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงซึ่งลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักเพิ่มขึ้น จากการติดตามปริมาณเชื้อ SE ที่มีความเข้มข้นของสารละลายเซลล์แขวนลอยเริ่มต้น 7.56 log cfu/ml พบว่าถูกยับยั้งได้ 1 log cycle ในสารละลายน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 1.1% (v/v) ในระยะเวลาที่สารละลายสัมผัสกับเซลล์นาน 5 นาที สอดคล้องกับการรายงานของ Medina และคณะ (2007) และพบการลดลงของเชื้อ SE อย่างเฉียบพลัน ที่ความเข้มข้นระหว่าง 1.5% ถึง 1.6% (v/v) ซึ่งสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ 2 log cfu/ml สำหรับในกรณีที่ความเข้มข้นกรด 2.0% (v/v) สามารถลดจำนวนเชื้ออย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาสัมผัส 5 นาที เมื่อพิจารณาค่ากรด-เบส ของอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าที่ความเข้มข้น 1.0%-3.0% มีค่ากรด-เบส อยู่ในช่วง 4.89 - 4.15 ทั้งนี้ค่ากรด-เบส ของน้ำส้มสายชูหมัก (ความเข้มข้นกรด 2.0% (v/v)) ที่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ SE ได้สมบูรณ์ คือ 4.4 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา และคณะ (2006) ที่รายงานว่า เชื้อ SE ถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2.0% และมีค่ากรด-เบส อยู่ในช่วง 4.3 - 4.6 นอกจากนี้ วราวุฒิ ครูส่ง และคณะ (2547) รายงานว่าน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2.0%, 1.6% และ 1.0% ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli*, *Staph . aureus* และ *Vibrio* spp. ตามลำดับ



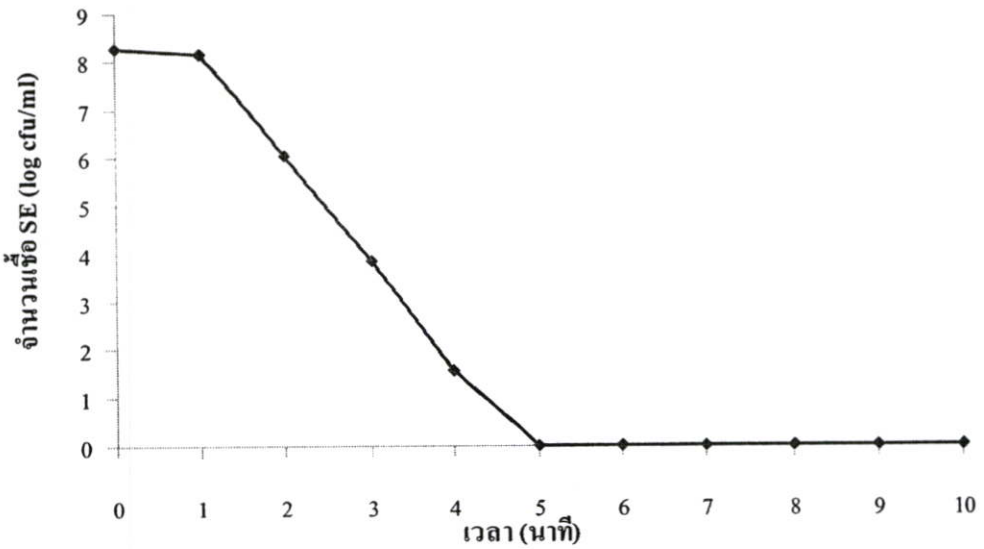

**ภาพที่ 4.2** การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง ($OD_{625\ nm}$) (▲) และจำนวนเชื้อ SE ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นต่างกัน (■) โดยบ่มเชื้อ SE ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 นาที

**ตารางที่ 4.2** ค่ากรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเข้มข้นของกรดในน้ำส้มสายชูหมักระดับต่างๆ เมื่อบ่มเชื้อ SE ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 เซลเซียส) เป็น เวลา 5 นาที

| ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (%v/v) | pH | ความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (%v/v) | pH |
|---|---|---|---|
| 0.0 | 6.83 | 2.0 | 4.44 |
| 1.0 | 4.89 | 2.1 | 4.42 |
| 1.1 | 4.72 | 2.2 | 4.36 |
| 1.2 | 4.72 | 2.3 | 4.35 |
| 1.3 | 4.66 | 2.4 | 4.33 |
| 1.4 | 4.62 | 2.5 | 4.29 |
| 1.5 | 4.55 | 2.6 | 4.27 |
| 1.6 | 4.53 | 2.7 | 4.27 |
| 1.7 | 4.52 | 2.8 | 4.26 |
| 1.8 | 4.47 | 2.9 | 4.22 |
| 1.9 | 4.47 | 3.0 | 4.15 |

### 4.1.3 ผลของเวลาต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE ในน้ำส้มสายชูหมัก

เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของกรดในสารละลายน้ำส้มสายชูหมักเท่ากับ 2.0% (v/v) ซึ่งมีค่ากรด-เบส 4.4 จากผลการทดลองข้อ 4.1.2 มาใช้ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของสารละลายเซลล์เชื้อ SE ซึ่งมีปริมาณเริ่มต้น 8.25 log cfu/ml พบว่าเมื่อระยะเวลาสัมผัสเชื้อนานขึ้น การอยู่รอดของ SE ลดลง ดังแสดงในภาพที่ 4.3 กล่าวคือ จำนวนเซลล์ที่อยู่รอด ณ เวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที เท่ากับ 8.25, 8.12, 6.06, 3.84, 1.56 และน้อยกว่า 1.00 log cfu/ml ตามลำดับ โดยจำนวนเชื้อ SE จะลดลงอย่างรวดเร็ว (3 log cfu/ml) ในช่วงเวลาระหว่าง 2 ถึง 3 นาที และที่ระยะเวลาสัมผัสของเชื้อ SE ในสารละลายน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 2.0% เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดจำนวนเชื้อ SE ได้อย่างสมบูรณ์ ผลการทดลองที่ได้พบว่า ไปในทิศทางเดียวกับ Chang และ Fang (2007) ซึ่งพบว่า การใช้น้ำส้มสายชูหมักจากข้าวทางการค้า (Rice Vinegar) ความเข้มข้น 5% (v/v) และมีค่า pH 3.0 มาล้างทำความสะอาดผักที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* ส่งผลทำให้ปริมาณเชื้อลดลง 3 log cfu/ml ในเวลา 5 นาที แต่ถ้าใช้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 0.5% (v/v) สามารถทำให้เชื้อลดลง 1 log cfu/ml ได้ภายในเวลา 5 นาที




**ภาพที่ 4.3** การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อ SE ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมัก 2% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส)

### 4.1.4 ผลการลดการปนเปื้อนเบื้องต้นของแบคทีเรียบนเปลือกไข่

จากตารางที่ 4.3 แสดงจำนวนเชื้อ SE (ที่ถ่ายลงบนผิวเปลือกไข่ในปริมาณ 6.23 log cfu/g)หลังจากผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ที่ระยะเวลาสัมผัสต่างกันและการฆ่าเชื้อโดยใช้แอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไข่มาผ่านเปลวไฟตามวิธีการของ Himathongkham และคณะ (1999) จากการตรวจนับจำนวนเชื้อ SE เมื่อนำไข่มาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้อย่างรวดเร็ว โดยเซลล์ลดลงเหลือน้อยกว่า 1 log cfu/g ที่เวลาสัมผัส 5 วินาที 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที โดยจำนวนการลดลงของเชื้อ SE คิดเป็น 99.99% ทุกระยะเวลาสัมผัสของเชื้อ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อระยะเวลาที่สารละลายสัมผัสกับเชื้อที่แตกต่างกัน (5 วินาที 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที) เช่นเดียวกับผลของการฆ่าเชื้อบนผิวของเปลือกไข่โดยใช้แอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไข่ไปผ่านเปลวไฟ ซึ่งสามารถลดจำนวนเชื้อลงเหลือน้อยกว่า 1 log cfu/g จำนวนที่ลดลงคิดเป็น 99.99% เช่นกัน

**ตารางที่ 4.3** จำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่หลังการเตรียมไข่ปลอดเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ที่เวลาต่างกันและการนำไปทำให้ปลอดเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ

| สภาพที่ศึกษา | จำนวนเชื้อ SE (log cfu/g) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | แอลกอฮอล์ 70% (นาที)* | | | | | | | | แอลกอฮอล์ |
| | 5s | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 95%** |
| ก่อนฆ่าเชื้อ | 6.23 | 6.23 | 6.23 | 6.23 | 6.23 | 6.23 | 6.23 | 6.23 | 6.23 |
| หลังฆ่าเชื้อ | <1.00 | <1.00 | <1.00 | <1.00 | <1.00 | <1.00 | <1.00 | <1.00 | <1.00 |
| การลดจำนวน (%) | 99.99 | 99.99 | 99.99 | 99.99 | 99.99 | 99.99 | 99.99 | 99.99 | 99.99 |

* การฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% ในระยะเวลาต่างๆโดยไม่มีการผ่านเปลวไฟ

** การฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ

S คือ เวลา มีหน่วยเป็นวินาที

การฆ่าเชื้อที่เปลือกไข่นอกจากจะมีผลต่อการทำลายเชื้อ SE บนเปลือกไข่แล้ว ยังอาจมีผลกับ Cuticle ซึ่งเป็นสิ่งปกคลุมไข่ตามธรรมชาติเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแบคทีเรีย ทั้งนี้ Cuticle ที่อยู่บนเปลือกไข่จัดเป็นสารพวก Mucin (Baker, 1974) ต่อมา Park และคณะ (2006)

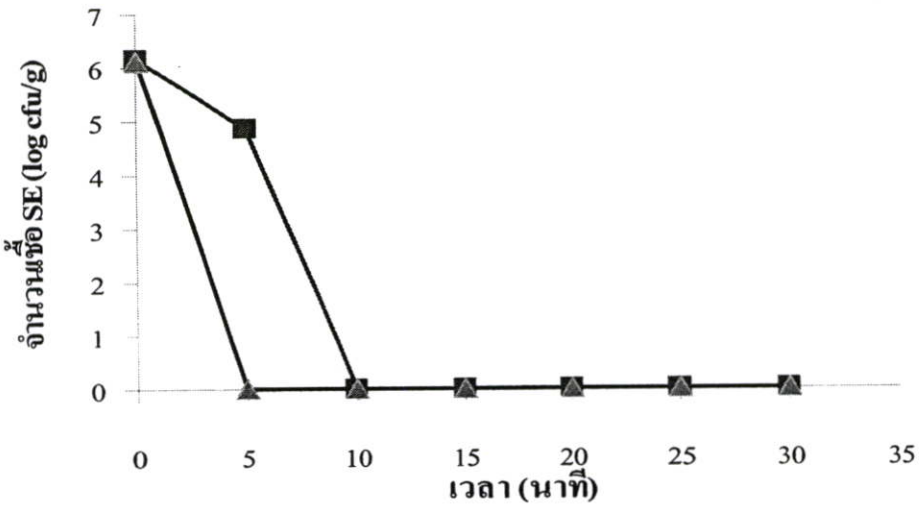
รายงานว่า Mucin ที่อยู่ในรูปของเหลวของสัตว์จะถูกทำลายได้โดยการต้มเป็นเวลา 10 นาที และจะเสื่อมสภาพเมื่อถูกความร้อน ดังนั้นการฆ่าเชื้อที่เปลือกไข่โดยการใช้แอลกอฮอล์ 95% แล้วนำไข่ไปผ่านเปลวไฟอาจทำให้ Cuticle ที่เคลือบบนเปลือกไข่เสียสภาพได้ ส่งผลให้เชื้อ SE ที่เพาะเลี้ยงบนผิวเปลือกไข่สามารถซึมผ่านเข้าไปภายในไข่ได้ นอกจากนี้แล้วผลการทดลองฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ ยังพบว่าจำนวนการลดลงของเชื้อในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังนั้นการฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ด้วยแอลกอฮอล์ 70% ที่ระยะเวลาสัมผัสของเชื้อ 5 วินาที จึงเป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสมในการฆ่าเชื้อผิวของเปลือกไข่ เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

## 4.2 ผลของการใช้น้ำส้มสายชูหมักในการลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่

### 4.2.1 การใช้น้ำส้มสายชูหมักลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยวิธีการจุ่ม

ผลของการลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ด้วยวิธีการฆ่าเชื้อโดยการจุ่มไข่ในสารละลายน้ำส้มสายชูหมักที่ความเข้มข้นกรด 2% (v/v) และ 10% (v/v) พบว่า หลังจากนำไข่ที่ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ SE บนเปลือกไข่ในปริมาณ 6.14 log cfu/g มาทำการฆ่าเชื้อโดยจุ่มในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% โดยใช้เวลาในการสัมผัสกรดเท่ากับ 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที ผลของการลดลงของเชื้อ SE ลดลง ดังแสดงในภาพที่ 4.4 พบว่าน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) สามารถลดจำนวนเชื้อ SE ที่เวลา 5 นาที ได้ 1.28 log cfu/g โดยมีจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดอยู่จำนวน 4.86 log cfu/g (คิดเป็น 79.15%) และสามารถลดจำนวนเชื้อ SE ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 10 นาที (จำนวนเชื้อน้อยกว่า 1.00 log cfu/g) ส่วนการฆ่าเชื้อโดยจุ่มไข่ในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) ให้เวลาในการสัมผัสกรดตั้งแต่ 0, 5, 10, 15, 20 และ 30 นาที (ดังภาพที่ 4.4) พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 5 นาที เมื่อเปรียบเทียบผลการลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่และการลดจำนวนในอาหารเหลว ซึ่งเป็นการทดสอบการยับยั้งในระดับหลอดทดลอง (ข้อ 4.1.3) พบความไม่สอดคล้องของผลการทดลอง โดยน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) ระยะเวลาสัมผัสกรด 5 นาที สามารถลดจำนวนเชื้อ SE ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหารเหลว แตกต่างกับการทดลองฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาสัมผัสกรดนานขึ้นที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน หรือใช้ความเข้มข้นมากขึ้นในระยะ เวลาสัมผัสกรดเท่ากัน ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ SE ในอาหารเหลวอยู่ในสภาพสัมผัสกับกรดแอซีติกโดยตรง ซึ่งมีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายเซลล์ของกรดแอซีติก ส่วนบนเปลือกไข่ ซึ่งมีลักษณะพรุนทำให้เชื้อ SE สามารถฝังตัวอยู่ในรูพรุนเหล่านั้นได้

จึงทำให้ถูกทำลายได้น้อยลง จากการรายงานของ กนกอร เจียมจิตต์ และ วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร (2547) ซึ่งสำรวจเชื้อ SE ที่ปนเปื้อนบนเปลือกไข่ที่ผ่านการอบโดยใช้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยพบว่าอุณหภูมิและเวลาดังกล่าว สามารถลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่จากเชื้อเริ่มต้น $2.3 \times 10^6$ cfu/g เป็น $1.7 \times 10^4$ cfu/g ซึ่งตามปกติเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถทำลายได้ที่อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 12 นาที (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539) แต่ความร้อนแห้งเป็นการส่งความร้อนผ่านอากาศ อีกทั้งเชื้อ SE ยังสามารถฝังตัวอยู่ในรูพรุนบนเปลือกไข่ จึงทำให้ประสิทธิภาพการทำลายด้วยความร้อนลดลง




**ภาพที่ 4.4** การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยการจุ่มในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) (■) และ 10% (v/v) (▲) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0 ถึง 30 นาที

Yu และคณะ (2001) รายงานว่า ประสิทธิภาพของน้ำส้มสายชูหมักในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium และ *E. coli* O157:H7 ขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น การจุ่มสตรอเบอร์รี่ในกรดแอซีติกความเข้มข้น 2% และ 5% (v/v) เป็นเวลา 2 นาที สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อให้ความเข้มข้นของกรดแอซีติกเป็น 2% (v/v) ใช้ระยะเวลาสัมผัสนาน 2, 5 และ10 นาที สามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้การใช้ความเข้มข้นของกรดที่สูงขึ้นและการเพิ่มเวลาสัมผัสกรดของเชื้อนานขึ้นไม่มี

ผลต่อการทำลาย จุลินทรีย์บนผลสตรอเบอรี่ เนื่องจากลักษณะผิวที่ขรุขระของสตรอเบอรี่ ทำให้กรดแอซีติกไม่สามารถสัมผัสกับจุลินทรีย์ได้โดยตรง

นอกจากคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของเปลือกไข่แล้ว Hinton (1968) กล่าวว่า คุณลักษณะภายนอก คือรูปร่างฟองไข่ ความหนาและสีของเปลือก เป็นดัชนีที่ใช้ในการพิจารณาคุณภาพไข่ จากการทดลองฆ่าเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยการจุ่มไข่ในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ที่เวลาสัมผัสกรด 10 นาที และ 5 นาที ตามลำดับ พบว่าการฆ่าเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวทั้งสองวิธีให้ผลต่อลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่คือ ผิวของเยื่อหุ้มเปลือกไข่ถูกทำลายจนเห็นได้ชัดด้วยตาเปล่านอกจากนี้ยังมีผลต่อเปลือกไข่ซึ่งมีแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นส่วนประกอบหลักดังแสดงในภาพที่ 4.5ก ถึง 4.5ค

คุณสมบัติของกรดเมื่อทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเปลือกไข่ จะได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แสดงดังปฏิกิริยา

$$CH_3COOH + CaCO_3 \longrightarrow (CH_3COO)_2Ca + H_2O + CO_2$$

ดังนั้นเมื่อจุ่มไข่ในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) เป็นเวลา 10 และ 5 นาที ตามลำดับ จะสังเกตเห็นฟองก๊าซขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งการที่เปลือกไข่ถูกทำลายดังภาพที่ 4.5ข และ 4.5ค เกิดจากการที่แคลเซียมคาร์บอเนตในเปลือกไข่สูญเสียหมู่คาร์บอน ทำให้เปลือกไข่บางและมีรูพรุนที่ใหญ่ขึ้น ทำให้มีผลต่อคุณภาพภายในไข่ (ไข่ขาวและไข่แดง) จากการศึกษาของ สุวรรณ เกษตรสุวรรณ (2529) กล่าวว่า การนำเอาไข่ไปแช่ในกรดอ่อน 1 วัน จะทำให้แคลเซี่ยมกับเกลือแร่ต่างๆ ถูกละลายออกไป เหลือแต่ชั้นพื้นเปลือก (Matrix) ซึ่งหนาเท่ากับเยื่อหุ้มไข่และมีลักษณะนิ่ม นอกจากนี้ Kim และ Slavik (1996) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของ Citylpyridimium Chloride (CPC) ซึ่งเป็นสารทำความสะอาดที่มีฤทธิ์เป็นด่าง และใช้ผสมน้ำเพื่อล้างทำความสะอาดไข่ โดย CPC สามารถลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ได้ และมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อสูง แต่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ คือ ทำให้เปลือกไข่มีลักษณะรูพรุน และเยื่อหุ้มเปลือกไข่บางลง ซึ่งเยื่อหุ้มเปลือกไข่ประกอบด้วย Globular Mucoproteins เชื่อมต่อกันจำนวนมาก

คุณภาพเปลือกไข่บ่งชี้จากสภาพพื้นผิว รูปร่าง และสภาพเปลือกไข่ คุณลักษณะของคุณภาพเปลือกไข่ควรมีการพิจารณาโดยยึดหลักคือ ความสะอาด ความสมบูรณ์ (ไม่แตกร้าว) ความเรียบ และรูปร่าง ซึ่งคุณลักษณะดังกล่าวมีความสำคัญมากต่อคุณภาพไข่ในระหว่างการเก็บรักษา ความสะอาดและความสมบูรณ์ของเปลือกไข่เป็นดัชนีบ่งชี้การยอมรับในตัว

ผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค (FAO, 2003) ดังนั้นการใช้การจุ่มไข่ในน้ำส้มสายชูหมักจึงไม่มีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

(ก) (ข) (ค)

**ภาพที่ 4.5** ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ (ก) ไข่ควบคุม (ข) ไข่ที่ผ่านการจุ่มฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) เป็นเวลา 10 นาที (ค) ไข่ที่ผ่านการจุ่มฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) เป็นเวลา 5 นาที

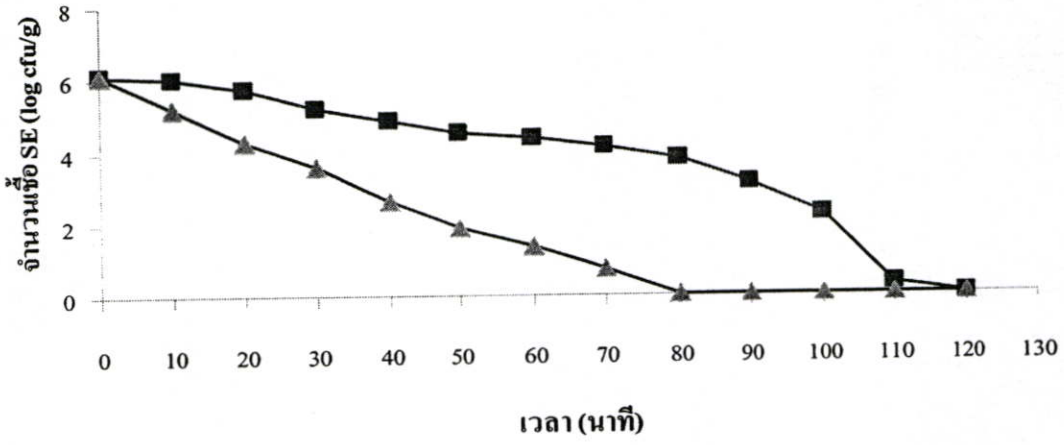
### 4.2.2 การใช้น้ำส้มสายชูหมักลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยวิธีการสเปรย์

การศึกษาการลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีการสเปรย์ด้วยน้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 2 ระดับ คือ 2% และ 10% (v/v) เพื่อศึกษาระยะเวลาที่สามารถลดจำนวนเชื้อลงได้อย่างสมบรูณ์ ณ ความเข้มข้นกรดทั้ง 2 ระดับ ดังกล่าว รวมถึงการศึกษาลักษณะทางกายภาพของไข่เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธีสเปรย์น้ำส้มสายชูหมัก โดยคาดว่าการสเปรย์น้ำส้ม สายชูหมักบนเปลือกไข่จะสามารถฆ่าเชื้อ SE และไม่ทำให้ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่เสื่อมลง ทั้งนี้ในการทดลองนี้จะทำการสเปรย์ด้วยกระบอกฉีด โดยฉีดพ่นน้ำส้มสายชู แต่ละความเข้มข้นที่ระยะเวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที และทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดที่ระยะเวลาสัมผัส ทุก 10 นาที

จากผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4.6 พบว่า เปลือกไข่มีเชื้อ SE เริ่มต้นที่ 6.10 log cfu/g เมื่อทำการฆ่าเชื้อโดยการสเปรย์น้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 2 % (v/v) ในระยะเวลาสัมผัสกรด 10 นาที มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย จำนวนเชื้อเหลือรอด 6.08 log cfu/g (คิดเป็น 99% ) และลดลงจากเซลล์เริ่มต้นเป็น 5.73 log cfu/g (คิดเป็น 94% ) ที่ระยะเวลาสัมผัสกรดเป็นเวลา 20 นาทีเมื่อระยะเวลาสัมผัสกรด 30 นาที สามารถลดจำนวนเชื้อ SE เปลือกไข่ได้

0.93 log cfu/g โดยเซลล์ที่เหลือรอด 5.17 log cfu/g ( 85% ) แสดงให้เห็นว่าจำนวนเชื้อ SE มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาสัมผัสกรดเพิ่มขึ้น จนที่เวลา 120 นาที จำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ลดลงได้อย่างสมบรูณ์ ( จำนวนเซลล์ที่เหลือรอดน้อยกว่า 1.0 log cfu/g ) ทั้งนี้อาศัยการสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) ทั้งหมด 5 ครั้ง ส่วนในกรณีการสเปรย์ด้วยน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) ในระยะเวลาสัมผัสกรด 10 นาที พบว่ามีจำนวนเชื้อเหลือรอด 5.18 log cfu/g ( คิดเป็น85% ) ซึ่งสามารถลดจำนวนเชื้อลงได้ 0.92 log cfu/g จำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ลดลงได้อย่างสมบรูณ์ (จากเชื้อเริ่มต้น 6.10 log cfu/g) ที่ระยะเวลาสัมผัสนาน 80 นาที โดยอาศัยการสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 10% (v/v) จำนวน 3 ครั้ง

เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยวิธีสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 2% และ 10% (v/v) ที่เวลาสัมผัสกรด 120 และ 80 นาที ตามลำดับ ได้ผลแสดงดังภาพที่ 4.7ก- 4.7ค เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า พบว่าการสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักบนเปลือกไข่ที่ความเข้มข้นกรดทั้ง 2 ระดับ มีผลต่อเยื่อหุ้มเปลือกไข่ แต่ไม่มีผลในการทำลายเปลือกไข่ ซึ่งการสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักบนเปลือกไข่มีผลทำให้กรดอ่อนทำลาย Cuticle ซึ่งเป็นชั้นเยื่อมิวซันที่มีความบางมาก และฉาบอย่างแน่นกับผิวนอกของเปลือก อย่างไรก็ตามการฆ่าเชื้อด้วยวิธีนี้ส่งผลกระทบที่น้อยกว่าวิธีจุ่มในน้ำส้มสายชูหมักอย่างเห็นได้ชัด




**ภาพที่ 4.6** การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยการสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) (■) และ 10% (v/v) (▲) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เวลา 0 ถึง 30 นาที

(ก) (ข) (ค)

**ภาพที่ 4.7** ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ (ก) ไข่ควบคุม (ข) ไข่ที่ผ่านการสเปรย์ฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) เป็นเวลา 120 นาทีโดยอาศัยการสเปรย์ 5 ครั้ง (ค) ไข่ที่ผ่านการสเปรย์ฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) เป็นเวลา 80 นาที โดยอาศัยการสเปรย์ 3 ครั้ง

หมายเหตุ : ทำการสเปรย์ที่ 0 นาที (เริ่มต้น) จากนั้นจะสเปรย์อีกครั้งทุก 30 นาที

### 4.2.3 การใช้น้ำส้มสายชูหมักลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยวิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมัก

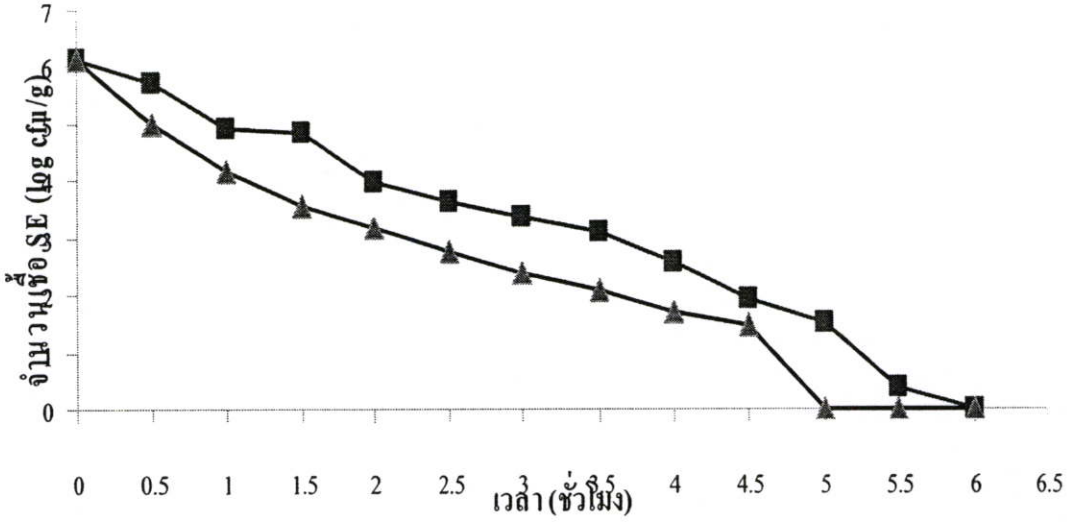
ในการทดลองนี้ได้ทำการฆ่าเชื้อ SE บนเปลือกไข่ด้วยการรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) โดยกำหนดให้ระยะเวลาสัมผัสไอกรดระหว่าง 0 ถึง 6 ชั่วโมง ในภาชนะปิดที่มีไอน้ำส้มสายชูหมัก ซึ่งเกิดจากการตีให้อากาศในน้ำส้มสายชูหมักด้วยปั๊มที่ต่อกับตัวกรอง แล้วทำการตรวจปริมาณเซลล์ SE ที่รอดชีวิตบนเปลือกไข่ทุก ๆ 30 นาที โดยคาดว่าไอน้ำส้มสายชูหมักจะสามารถฆ่าเชื้อ SE และไม่ทำลายลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่

เปลือกไข่ที่ผ่านการรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) มีจำนวน SE ตั้งต้นปนเปื้อนใกล้เคียงกันคือ 6.14 และ 6.12 log cfu/g ตามลำดับ จากภาพที่ 4.8 พบว่า จำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการรมไอน้ำส้มสายชูหมัก 2% (v/v) ลดลง 1.21 log cfu/g ที่เวลา 1.0 ชม. อีกทั้งสามารถลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อรมไอน้ำส้มสายชูหมักเป็นเวลา 6.0 ชั่วโมง ส่วนการลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ด้วยไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) ในเวลา 0.5 ชม. มีเชื้อลดลง 1.11 log cfu/g เชื้อที่เหลือรอดในช่วงเวลาดังกล่าวเท่ากับ 5.01 log cfu/g (คิดเป็น 82% ของปริมาณเชื้อ

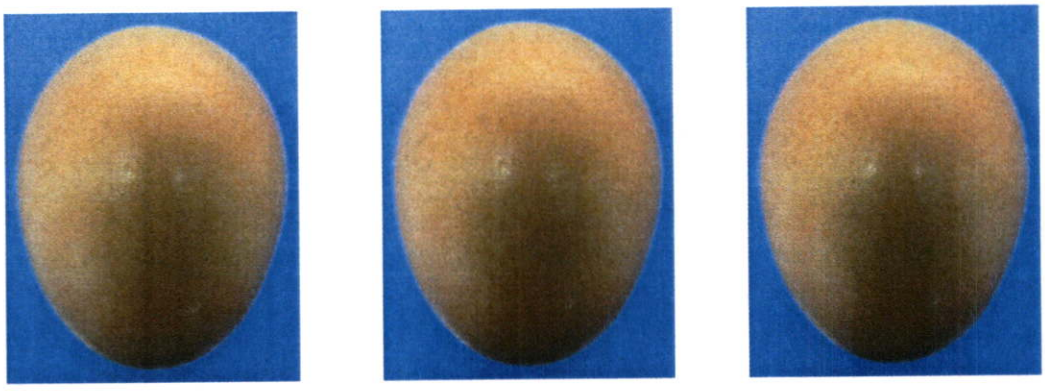
SE เริ่มต้น) และมีแนวโน้มในการลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นจนที่เวลา 5.0 ชม. สามารถลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อพิจารณากลไกการยับยั้งเชื้อ SE โดยวิธีการรมไอน้ำส้มสายชูหมัก หลังจากที่กรดแอซีติกแตกตัวให้ประจุบวก ($H^+$) และประจุลบ ($CH_3COO^-$) ซึ่งกรดที่แตกตัวจะไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เนื่องจากโมเลกุลที่มีขั้วหรือประจุ (+,-) จะถูกดึงดูดไว้ผนังเซลล์ของเชื้อ SE ส่วนกรดที่ไม่แตกตัว ($CH_3COOH$) จะผ่านเข้าสู่เซลล์เนื่องจากเป็นโมเลกุลไม่มีขั้ว ( Garbutt, 1997 ) การรมไอเป็นวิธีที่ใช้อากาศเป็นตัวพาโมเลกุลของกรดซึ่งแตกต่างกับวิธีการจุ่มและการสเปรย์ซึ่งมีน้ำเป็นตัวกลางในการนำพากรดเข้าไปทำลายเชื้อ SE ดังนั้นการฆ่าเชื้อโดยวิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมักจึงจำเป็นต้องใช้ระยะเวลาที่สัมผัสกรดนานกว่าการจุ่มและการสเปรย์

จากการติดตามลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ภายหลังการฆ่าเชื้อด้วยการรมไอน้ำส้ม สายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ลักษณะทางกายภาพแสดงดังภาพที่ 4.9ก – 4.9ค ไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ณ ความเข้มข้นทั้งสองระดับไม่สังเกตเห็นความแตกต่างของเปลือกไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับไข่ควบคุม ซึ่งถือเป็นข้อดีของการใช้วิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมักในการฆ่าเชื้อ SE ที่เปลือกไข่




**ภาพที่ 4.8** การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยการรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) ( ■ ) และ 10% (v/v) (▲) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0 ถึง 6 .0 ชั่วโมง



(ก) (ข) (ค)

**ภาพที่ 4.9** ลักษณะทางกายภาพของเปลือกไข่ (ก) ไข่ควบคุม (ข) ไข่ที่ผ่านการรมไอฆ่าเชื้อด้วยน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) เป็นเวลา 6.0 ชั่วโมง (ค) ไข่ที่ผ่านการรมไอฆ่าเชื้อในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) เป็นเวลา 5.0 ชั่วโมง

## 4.3 การเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาไข่ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การทดลองในขั้นตอนนี้ได้ทำการถ่ายเชื้อ SE บนเปลือกไข่เท่ากับ 6.18 และ 6.14 log cfu/g จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (31 ± 1องศาเซลเซียส) ตามลำดับ เพื่อหาจำนวนเชื้อที่เหลือรอดอยู่บนเปลือกไข่ เป็นเวลา 0 ถึง 28 วัน ตรวจสอบจำนวนเชื้อ SE ทุก 7 วัน ดังผลแสดงในตารางที่ 4.4 เมื่อเก็บไข่ที่ปนเปื้อนเชื้อ SE 6.18 log cfu/g ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวนเชื้อที่เหลือรอดอยู่บนเปลือกไข่เป็น 5.34 , 4.93, 4.80 และ 4.79 log cfu/g เมื่อเวลาผ่านไป 7, 14, 21 และ 28 วันตามลำดับ โดย 7 วันแรกจำนวนเชื้อลดลง 0.84 log cfu/g และเชื้อ SE มีแนวโน้มคงที่ในวันที่ 14-28 ส่วนในกรณีของไข่ที่ปนเปื้อนเชื้อ SE 6.14 log cfu/g ที่เก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิห้อง จำนวนเชื้อมีแนวโน้มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 28 วัน ซึ่งปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่สูงคือ 6.14 ถึง 5.77 log cfu/g จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ SE สามารถอยู่รอดบนเปลือกไข่และก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อโรคอาหารเป็นพิษของผู้บริโภคได้เมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องมีโอกาสเสี่ยงสูงกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างเห็นได้ชัด สุเจตน์ ชื่นชมและคณะ (2547) รายงานว่า เชื้อ

*Salmonella* สามารถมีชีวิตในอุจจาระไก่ที่ติดบนถาดไข่ และผิวของเปลือกไข่ได้นานอย่างน้อย 7 วัน

**ตารางที่ 4.4** จำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (31± 1 องศาเซลเซียส)

| สภาพที่ศึกษา | จำนวนเชื้อบนเปลือกไข่ (log cfu/g)* | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 วัน | 7 วัน | 14 วัน | 21 วัน | 28 วัน |
| เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส | $6.18^{a} \pm 0.09$ | $5.34^{b} \pm 0.08$ | $4.93^{c} \pm 0.07$ | $4.80^{d} \pm 0.03$ | $4.79^{d} \pm 0.07$ |
| เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (31± 1 องศาเซลเซียส) | $6.14^{a} \pm 0.12$ | $6.12^{a} \pm 0.12$ | $6.01^{a} \pm 0.05$ | $5.83^{b} \pm 0.11$ | $5.77^{b} \pm 0.06$ |

* ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวนอนหมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P> 0.05) เมื่อเปรียบเทียบใน DMRT

ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ SE ภายในไข่ที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจากตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ในเวลา 0 ถึง 28 วัน โดยสุ่มตัวอย่างทุก 7 วัน พบว่าไม่พบการปนเปื้อนเชื้อ SE ภายในไข่ จากตัวอย่างที่สุ่มตรวจทั้งหมด เช่นเดียวกันกับไข่ที่เก็บรักษาไว้ ณ อุณหภูมิห้อง (31± 1 องศาเซลเซียส) อนึ่งในการถ่ายเชื้อ SE บนเปลือกไข่เพื่อใช้ในการทดลองนี้ อาจทำให้มีโอกาสที่เชื้อจำนวนหนึ่งสามารถซึมผ่านรูเปลือกเข้าไปได้ แต่ไม่สามารถเจริญได้ภายในไข่เนื่องจากเชื้อไม่สามารถจะทำการละลายโปรตีนจากไข่ขาวมาใช้ประโยชน์ได้จึงถูกทำลายในไข่ขาว เว้นไว้แต่ถ้าไข่แดงแตกมาปนกับไข่ขาวจะทำให้เชื้อ SE สามารถนำอาหารจากไข่แดงไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิสม และเจริญได้ดีในที่สุด (Wang และ Slavik, 1997) ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ Himathongkham และคณะ (1999) ซึ่งรายงานว่า เชื้อ SE ไม่สามารถซึมผ่านจากเปลือกไข่เข้าไปเจริญภายในไข่ได้

เมื่อทำการฆ่าเชื้อ SE บนเปลือกไข่ด้วยวิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ10% (v/v) ก่อนที่จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (31± 1 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 28 วัน เพื่อติดตามคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์รวมถึงคุณลักษณะทางกายภาพทั้งภายในและภายนอกไข่ โดยตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ SE บนเปลือกไข่และภายในไข่ตามวิธีมาตรฐานสากล ISO 6579 ทุก 7 วัน ผลการตรวจติดตามแสดงในตารางที่ 4.5 จากการสุ่มตรวจไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) เก็บรักษาที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่าไม่มีเชื้อ SE ปนเปื้อนบนเปลือกไข่และภายในไข่ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวการตรวจไข่จำนวน 15 ตัวอย่าง ที่ฆ่าเชื้อด้วยการรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากการเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาไข่ที่อุณหภูมิห้อง (แสดงดังตารางที่ 4.6) ไม่พบความแตกต่างเมื่อตรวจหาเชื้อ SE ที่ปนเปื้อนบนเปลือกไข่และภายในไข่เช่นกัน

**ตารางที่ 4.5** ผลการตรวจหาเชื้อ SE บนเปลือกไข่และภายในไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% เมื่อเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

| ความเข้มข้นกรด (%) | เวลา (วัน) | จำนวนที่พบเชื้อ/จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ | |
|---|---|---|---|
| | | เปลือกและเมมเบรน | ภายในไข่ |
| 2 | 0 | 0/15 | 0/15 |
| | 7 | 0/15 | 0/15 |
| | 14 | 0/15 | 0/15 |
| | 21 | 0/15 | 0/15 |
| | 28 | 0/15 | 0/15 |
| 10 | 0 | 0/15 | 0/15 |
| | 7 | 0/15 | 0/15 |
| | 14 | 0/15 | 0/15 |
| | 21 | 0/15 | 0/15 |
| | 28 | 0/15 | 0/15 |

**ตารางที่ 4.6** ผลการตรวจหาเชื้อ SE บนเปลือกไข่และภายในไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยรมไอน้ำส้มสายชู 2% และ 10% เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้อง (31± 1 องศาเซลเซียส)

| ความเข้มข้นกรด (%) | เวลา (วัน) | จำนวนที่พบเชื้อ/จำนวนตัวอย่างที่ตรวจ | |
|---|---|---|---|
| | | เปลือกและเมมเบรน | ภายในไข่ |
| 2 | 0 | 0/15 | 0/15 |
| | 7 | 0/15 | 0/15 |
| | 14 | 0/15 | 0/15 |
| | 21 | 0/15 | 0/15 |
| | 28 | 0/15 | 0/15 |
| 10 | 0 | 0/15 | 0/15 |
| | 7 | 0/15 | 0/15 |
| | 14 | 0/15 | 0/15 |
| | 21 | 0/15 | 0/15 |
| | 28 | 0/15 | 0/15 |

# บทที่ 5
# สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของน้ำส้มสายชูหมักต่อการลดจำนวนเชื้อ SE ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อหาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการลดจำนวนเชื้อ SE เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการยับยั้งเชื้อ SE บนเปลือกไข่ โดยทำการถ่ายเชื้อ SE ที่เปลือกไข่ในปริมาณเซลล์ตั้งต้นที่สูง (ประมาณ 6 log cfu/g) เนื่องจากจำนวนเซลล์ตั้งต้นดังกล่าวอยู่ในระดับที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายจากโรคอาหารเป็นพิษได้

จากการศึกษาผลความเข้มข้นของน้ำส้มสายชูหมักต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE โดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion พบว่า โซนการยับยั้งจะมีความกว้างมากขึ้นตามเมื่อให้ความเข้มข้นกรดของน้ำส้มสายชูหมักเพิ่มขึ้น น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 1%-3% (v/v) ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ SE ในระดับที่ดี มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.9-3.5 ซึ่งเหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ได้ อีกทั้งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อพิจารณาขนาดของโซนยับยั้งที่เกิดขึ้นจากน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2%-3% (v/v)

เมื่อศึกษาการลดลงของเชื้อ SE ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเข้มข้นกรดในน้ำส้มสายชูหมัก 1%-3% (v/v) และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (31 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส) ระยะเวลาสัมผัสนาน 5 นาที พบว่า จำนวนเชื้อ SE ลดลงอย่างเฉียบพลันที่ความเข้มข้นระหว่าง 1.5%-1.6% (v/v) อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) มีผลต่อการลดจำนวนเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับระยะเวลาที่เหมาะสมเมื่อสารละลายสัมผัสกับเซลล์ SE ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีความเข้มข้นกรด 2% (v/v) พบว่า จำนวนเชื้อ SE ลดลงอย่างรวดเร็วที่ช่วงเวลา 2 ถึง 3 นาที และลดลงน้อยกว่า 1.0 log cfu/g ที่ระยะเวลาสัมผัส 5 นาที ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% (v/v) และเวลาสัมผัสนาน 5 นาที เป็นความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการลดจำนวนเชื้อ SE ได้อย่างสมบูรณ์ในระดับหลอดทดลอง

ผลของการใช้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ในการลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่ โดยการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการจุ่มไข่ในน้ำส้มสายชูหมัก ให้ผลการฆ่าเชื้ออย่างสมบูรณ์ที่เวลาในการจุ่ม 10 และ 5 นาทีตามลำดับ แต่ส่งผลต่อการทำลายเปลือกไข่อย่างมากโดยทำลาย Cuticle ที่เคลือบบนเปลือกไข่ ขนาดรูพรุนที่เปลือกไข่ใหญ่ขึ้นและทำให้เปลือกไข่บางลง

ส่วนกรณีการฆ่าเชื้อโดยใช้วิธีการสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักบนเปลือกไข่ จะต้องใช้เวลาในการฆ่าเชื้อนานขึ้น โดยเมื่อใช้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ต้องใช้เวลา 120 นาทีและ 80 นาที ตามลำดับ รวมถึงจำนวนครั้งที่ใช้ในการสเปรย์คือ น้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด2% (v/v) จำนวน 5 ครั้ง และการสเปรย์จำนวน 3 ครั้ง เมื่อใช้ความเข้มข้นกรด 10% (v/v) อนึ่งการฆ่าเชื้อบนเปลือกไข่ด้วยวิธีนี้มีผลทำให้เปลือกไข่เสียหายน้อยกว่าการจุ่ม โดยมีผลทำลาย Cuticle ที่เคลือบบนเปลือกไข่ แต่ไม่มีผลทำให้เปลือกไข่เสียหายมากนัก สำหรับการฆ่าเชื้อโดยวิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมัก พบว่าจำเป็นต้องใช้เวลานานที่สุด โดยเมื่อใช้น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้น 2% และ 10% (v/v) ต้องใช้ระยะเวลาในการรมไอเป็นเวลา 6.0 ชั่วโมง และ 5.0 ชั่วโมง ตามลำดับ อนึ่งการฆ่าเชื้อด้วยวิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมักต้องใช้ระยะเวลานานในการลดจำนวนเซลล์ลงอย่างสมบูรณ์ แต่การฆ่าเชื้อด้วยวิธีการนี้ไม่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของไข่ ดังนั้นการฆ่าเชื้อ SE บนเปลือกไข่ด้วยการรมไอน้ำส้มสายชูหมัก จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการลดจำนวนเชื้อ SE ที่เปลือกไข่

การศึกษาอายุการเก็บรักษาไข่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการรมไอน้ำสมสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส) ไม่พบเชื้อ SE บนเปลือกไข่และภายในไข่เมื่อเก็บรักษาไว้ที่ทั้งสองอุณหภูมิดังกล่าว ในระยะเวลา 28 วัน

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าในงานวิจัยนี้พบว่าการรมไอน้ำส้มสายชูหมักเป็นวิธีที่เหมาะสมมากที่สุดในการฆ่าเชื้อ SE บนเปลือกไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับการฆ่าเชื้อโดยการจุ่มและสเปรย์ แต่เนื่องจากการใช้ระยะเวลานานเพื่อลดจำนวนเชื้ออย่างสมบูรณ์ อาจไม่เหมาะสมเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งหากต้องการจะทำการวิจัยเพื่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ควรจะศึกษาปัจจัยอื่นร่วมกับการใช้น้ำส้มสายชูหมัก เพื่อลดระยะเวลาที่ใช้ฆ่าเชื้อลง

# เอกสารอ้างอิง


กนกอร เจียมจิตต์ และวรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร. 2547. **การใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์ในเปลือกไข่ไก่และการศึกษาสมบัติบางประการของเปลือกไข่**.การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 ปี 2547. หน้า 299-236.

กนกอร อินทราพิเชษฐ. 2538. **การเปลี่ยนแปลงของวัสดุชีวภาพหลังการเก็บเกี่ยว**. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครราชสีมา : สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. หน้า 45-48.

จิตศิริ ทองสอน. 2543. **ประสิทธิภาพของสารคลอรีนร่วมกับกรดอินทรีย์ในการลด *Salmonella* Typhimurium ในผักสด**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิชาวิทยาศาตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จิโรจน์ ศศิปรียจันทร์. 2547. **โรคติดเชื้อซัลโมเนลลาใน : การจัดการและโรคสำคัญในไก่เนื้อ**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: บริษัทธนาเพลส แอนด์ กราฟฟิค จำกัด. หน้า 118-134.

ชุลีพร ศักดิ์สง่าวงษ์ นิตยา ชะนะญาติ ภาวิน ผดุงทศ และณัฐกานต์ อวัยวานนท์. 2550. **การสำรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในไข่ เขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่**. ทุนการวิจัย สถานสัตวแพทย์สาธารณสุขเอเชียแปซิฟิก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 590 หน้า.

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

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

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. **จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ โอ.เอส. พริ้นติงเฮาส์. 258 หน้า.

ศรวณีย์ รอดเที่ยง. 2542. ผลของกรดต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาปลาสลิดเค็ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาคหกรรมศาสตร์ ภาควิชาคหกรรมศาตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิกานต์ อึ้งนิภากุล. 2544. **การใช้สารผสมเปอร์รอกซีแอซีติกแอซิดในการลดปริมาณ *Listeria monocytogenes* ปนเปื้อนในกุ้งสดก่อนกระบวนการแช่เยือกแข็ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา วราวุฒิ ครูส่ง อดิศร เสวตวิวัฒน์ อัศนี วิจิตระกะ และสุเมธ ตันตระเธียร. 2006. **การยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อไก่สดโดยใช้น้ำส้มสายชู**. The 8th Agro Industrial Conference: Food Innovation, 15-16 June 2006. BITEC, Bangna, Bangkok, Thailand.

สถาบันสุขภาพสัตว์. 2540. **รายงานประจำปี 2540**.

สถาบันอาหาร. 2550. ***Salmonella* spp**. [Online]. แหล่งที่มา : http://www.techno.msu.ac.th/fn/ecenter/pathogens/salmonella_spp.htm. [27 มีนาคม 2550].

สุเจตน์ ชื่นชม นำดี แซ่เฮง อรประพันธ์ ส่งเสริม วัชรชัย ณรงค์ศักดิ์ สุชาติ สงวนพันธุ์ และ อรรถวุฒิ พลายบุญ. 2547. **การศึกษาการคงอยู่ของเชื้อโรคและการลดเชื้อโรคที่ปนเปื้อนมากับเปลือกไข่และถาดไข่**. รายงานการวิจัย ปีงบประมาณ 2547, ภาควิชาสัตวบาล, คณะเกษตร กำแพงแสน, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์ อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และเธนศ ชิดเครือ. 2544. **การเฝ้าระวังจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม เพื่อลดเชื้อ *Salmonella* ในการผลิตไก่กระทงแช่แข็งเพื่อการส่งออก. รายงานการวิจัย,** ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร, คณะวิทยาศาสตรและเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2539. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร. หน้า 157-163.

สุรีย์ นานาสมบัติ จิราวรรณ ยี่สิบแสน และฉัตรแก้ว ช่วยเกิด. 2549. ผลของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศร่วมกับโซเดียมแลคเตทและการแช่แข็งต่อการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Rissen ในระหว่างการหมักแหนม. **วารสารองค์การเภสัชกรรม**. 32: 4-13.

สุวรรณ เกษตรสุวรรณ. 2529. **ไข่และเนื้อไก่**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพ: โรงพิมพ์ชุมนุมเกษตรแห่งประเทศไทย. 20 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. กองพัฒนาศักยาภาพผู้บริโภค. **ไข่ไข่**. [online]. แหล่งที่มา: http://www.elib.fda.moph.go.th .[ 13 สิงหาคม 2550].

สำนักงานที่ปรึกษาการเกษตรต่างประเทศ ประจำสหภาพยุโรป. 2549. **EU เตรียมปรับมาตรการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อน *Salmonella* ในไข่ไก่**. [Online]. แหล่งที่มา : http://www.ThaiEurope.net. [23 มิถุนายน 2549].

เสกสม อาตมางกรู อรทัย ไตรวุฒานนท์ และสุเตน์ ชื่นชม. 2548. **รายงานการวิจัยการประกันคุณภาพไข่ไก่เพื่อการบริโภค**. ทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยบูรณาการสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ. 1-1, 2-5, 2-7, 4-7.

อรทัย ลีลาพจนาพร และวงค์ทิพา โรจนประภพ. 2549. โรคอาหารเป็นพิษ. **วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ**. 54: 37-40.

อินทิรา กระหม่อมทอง. 2543. การปนเปื้อนเชื้อซัลโมเนลลาในอุตสาหกรรมการเลี้ยงและการผลิตสัตว์ปีก. **วารสารสัตวแพทย์**. 10: 1-12.

Adams, M.R. 1985. Vinegar. **In. Microbiology of Fermented Food**. Vol 1, Elsevier Science Publ. Co., New York. 1-48.

Adam, M.R. and C.J. Hall. 1988. " Growth Inhibit Food Borne Pathogens by Lactic and Acetic Acids and Their Mixtures." **Int. J. Food Sci Technol**. 23: 287-292.

Ahamad, N. and E.H. Marth. 1989."Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35 °C in Tryptose Broth Acidified with Acetic, Citric or Lactic Acid." **J. food Protection**. 52: 688-695.

Alexander, M.C., Y.H. Kim, S. Tahk, T. Hong, P. Weis, A.J. Waring and T. Ganz. Calcitermin. 2001. A Novel Antimicrobial Peptide Isolated from Human Airway Secretions. FEBS Letters, 504: 5-10. Available from http://www.elsevier.com/febs/163/19/20/00025139.pdf . Accessed Date on 22 March 2004.

Baker, R.C. 1974. Microbiology of Eggs. **J. Milk Food Technol**. 37: 265-268.

Bangtrakulnonth, A., S. Pornreongwang, C. Pulsrikarn, P. Sawangpanyalert, R.S. Hedriksen, D.M.A Lo Fo Wong, F.M. Aarestrop. 2004. "Salmonella Serovars from Humans and Other Sources in Thailand, 1993-2002." **Emerging Infect Dis**. 10: 131-135.

Barnwart, G.J. 1979. **Basic Food Microbiology**. AVI Publishing Company, Inc. New York.

Bean, K.C. and D.W. Mc Laury. 1959. The Bacterial Contamination of Hatching Eggs and Methods for Its Control. **Poult. Sci**. 38: 693-698.

Bell, C. and A. Kyriakides. 2002. Salmonella **: A Practical Approach to the Organism and Its**

**Control in Food**. Blackwell Science. United Kingdom. 330p.

Board, P.A., L.P. Hendon and R.G. Board. 1968. The Influence of Iron on the Course of Bacterial Infection of the Hen's Egg. **Br.Poult.Sci**. 2: 211-215.

Board, R.G. and J.C. Ayres. 1965. Influence of temperature on Bacterial Infection of the Hen's Egg. **Appl. Microbiol**. 13: 358 p.

Borgstrom, G. 1968. **Principles of Food Science**. Volume I. Food Technology. The Macmillan Company., New York.

Braden, C.R.2006. " *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis and Eggs: A National Epidemic in the United States." **Clinical Infect. Diseases**. 43: 512-517.

Branen, A.L., P.M. Davidson and S. Salminen. 1989. **Food Additives**. Marcel Dekker, Inc. New York.

Brenner F.W., AC. McWhorter-Murlin. 1998. Identification and Serotyping of Salmonella and an Update of the Kauffman-White Scheme. **GA: Centers for Disease Control and Prevention**. Atlanta.

Carter T.C. 1968. Microbiology of the Egg: A Review. pp. 133-139. In R.G. Board (ed.). **Egg Quality a Study of the Hen's Egg**. Oliver and Boyd Edinburgh. London.133-139.

Chang J.M. and T.J. Fang. 2007. "Survial of *Escherichaia coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica serovars Typhimurium in Iceberg Lettuce and the Antimicrobial Effect of Rice Vinegar Against *E.coli* O157:H7." **Food Microbiol**. 24: 745-751.

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

Chung, K.C. and J.M. Goepfert. 1970. " Growth of *Salmonella* at Low pH." **J. Food Sci**. 35: 326-328.

Clark, C.W. and Z.J. Ordal. 1969. Thermal Injury and Recovery of *Salmonella* Typhimurium and its Effect on Enumeration Procedures. **Appl. Microbiol**. 18: 332-336.

D'Aoust, J.Y. 1981. Update on Preenrichment and Selective Enrichment Condition for Detection on *Salmonella* in Foods. **J. Food Protection**. 44: 396-374.

Davis, B.D., R. Dulbecco, H.N. Eisen, H.S. Ginsberg and W.B. Wood, Jr. 1968. **Microbiology**. Hoeber Medical Division. New York.

De Reu, K., K. Grijspeerdt , W. Messens and M. Heyndrickx. 2006. "Eggshell Factors Influencing Eggshell Penetration and Whole Egg Contamination by Different Bacteria." **Int J Food Microbiol**. 112: 253-260.

De Reu, K., W. Messens, M. Heyndrickx, T.B. Rodenburg, M. Uyttendaele and L. Herman. 2008. "Bacterial Contamination of Table Eggs and the Influence of Housing Systems." **World's Poul. Sci J.** . 64: 5-18.

Dickson, J.S. 1992. Acetic Acid Action on Beef Tissue Surfaces Contaminated with *Salmonella typhimurium*. **Food Sci**. 57: 297-301.

Ebel, E. and W. Schlosser. 2000. "Estimating the Annual Fraction of Eggs Contaminated with *Salmonella enteritidis* in the United States." **Int. J. Food Microbiol**. 61:51-62.

Entani, E., M. Asai, S. Tsujihata, Y. Tsukamoto and M. Ohta. 1998. " Antimicrobial Action of Vinegar Against Food Borne Pathogenic Bacteria Including *Escherichia coli* O157:H7." **J. Food Protection**. 61: 953-959.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2003. **Egg Marketing-A Guide for the Production and Sale of Eggs**. Rome.

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

Gast, R.K. and C.W. Beard. 1990. "Production of *Salmonella enteritidis*-Contaminated eggs by Experimentally Infected Hens." **Avian Dis**. 34: 438-446.

Greenwood, D., R. C. B. Slack and J.F. Peutherer. 2002. Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infection: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control. 7th edition. **Elsevis Science Limited**. Chaina. 709 pp.

Hilton R.D. 1968. The Influence of Iron on the Course of Bacterial Infection of the Hen's Egg. **Br.Poult.Sci**. 2: 301-315.

Himathongkham, S., H. Riemann, and R. Ernst. 1999. "Efficacy of Disinfection of Shell Eggs Externally Contaminated with *Salmonella enteritidis* Implications for Egg Testing." **Int. J. Food Microbiol**. 49: 161-167.

Hobbs, B.C. and R. J. Gilbert. 1978. **Food Poisoning and Food Hygiene**. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.

Huys, G, K.D' Haene and J. Swings. 2002. "Influence of the Culture Medium on Antibiotic Susceptibility Testing of Food-Associated Lactic Acid Bacteria with the Agar Overlay Disc Diffusion Method." **Letters in Appl. Microbiol**. 34: 402-406.

Jorgensen, J.H., J.D. Turnidge and J.A. Washingto. 1999. Antibacterial Susceptibility Test: Dilution and Disc Diffusion Methods. pp. 1526-1562. In. P.R. Murray, E.R. Barron, M.A. Praller, F.C. Tenover and R.H. Yolken. (eds). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, D.C. : ASMPress.

Kilonzo-Nthenge, A., F. Chen, and S.L. Godwin. 2006. "Efficacy of Home Washing Methods in Controlling Surface Microbial Contamination on Fresh Produce." **J. Food Protection**. 69: 330-334.

Kim, J.W. and W.F. Slavik. 1996. "Change in Eggshell Surface Microstructure After Washing with Cetylpyridinium Chloride or Trisodium Phosphate." **J. Food Protection**. 59: 859-863.

Koo, F.C.W and J.W. Peterson. 1983. Cell-free Extracts of *Salmonella* Inhibit Protein Synthesis and Cause Cytotoxicity in Eukaryotic cells. **Toxicon**. 21: 309-320.

Koupal, L.P. and R.H. Diebel. 1975. Assay, Characterization and Localization of an Enterotoxin Produced by *Salmonella*. **Infect. Immun**. 11: 14-22.

Medina, E., C. Romero, M. Brenes and A.D. Castro. 2007. Antimicrobial Activity of Olive Oil, Vinegar and Various Beverages against Foodborne Pathogen. **J. Food Protection**. 70: 1194-1199.

Mcfarland Standard. 2009. Available from http://en.wikipedia.org/wiki/Mcfarland_standard. Accessed Date on 23 Febuary 2009.

McMullan, R., P.J. Edwards, M.J. Kelly, B.C. Millar, P.J. Rooney and J.E. Moore. 2007. Food-poisoning and Commercial Air Travel. **Travel Med. Infect. Dis**. 5: 276-286.

Moats, W.A. 1981. Update on Salmonella in Foods : Selective Plating Media and Other Diagnostic Media. **J. Food Protection**. 44: 375-380.

Nielsen, G.O. . 1994. Introduction to the chemical Analysis of Foods. pp. 86. In Jones and Bartlett (eds). **Food Chemical**. London. ASMPress.

Park, W., J. Chung, Y. Kim, S. Chung and H. Kho. 2006. Influences of Animal Mucins on Lysozyme Activity in Solution and on Hydroxyapatite Surfaces. **Archives of Oral Biology**. 51: 861-869.

Robinson, R.K., C.A. Balt and P.D. Patel. 2000. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Academic Press, New York.

Sengun, I.K. and M. Karapinar. 2004. "Effectiveness of Lemon Juice, Vinegar and Their Mixture in Elimination of *Salmonella* Typhimurium on Carrots." **Int. J. Food Microbiol**. 96: 301-305.

Smith, A.L. 1995. **Principles of Microbiology**. Times Mirror/Mosby college Publishing, USA.

Tartakow, I.J. and J.H. Vorperian. 1981. **Food Borne and Water Borne Diseases: Their Epidemiologic Characteristics**. The AVI Publishing Company Inc., Connectiont.

VanderZant, C. and D.F. Splittstoesser. 1992. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3rd ed. Edwards Brothers, Ann Arbor MI.

Varnam, A.H. and M.G. Evans. 1991. **Foodborne Pathogens: An Illustrated Text**. Wolfe Publishing Ltd. England. 459 pp.

Vijayakamar, C. and C.E. Wolf-Hall. 2002a. " Evaluation of Household Sanitizers for Reducing Levels of *Escherichia coli* on Iceberg Lettuce." **J. Food Protection**. 65: 1646-1650.

Vijayakamar, C. and C.E. Wolf-Hall. 2002b. " Minimum Bacteriostatic and Bactericidal Concentrations of Household Sanitizers for *Escherichia coli* Strains in Tryptic Soy Broth." **Food Microbiology**. 19: 383-388.

Wang, H and M.F. Slavik. 1997. "Bacterial Penetration into Eggs Washed with Various Chemicals and Stored at Different Temperature and Times." **J. Food Protection**. 61: 276-279.

White, P.L., A.L. Naugle, C.R. Jackson, P.J. Fedorka-Cray, B.E. Rose, K.M. Pritchard, P. Levine, P. K. Saini, C.M. Schroeder, M.S. Dreyfuss, R. Tan, K.G. Hol, J. Harman and S. Buchanan. 2007. "*Salmonella* Enteritidis in Meat, Poultry and Pasteurized Egg Products Regulated by the U.S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003." **J. Food Protection**. 70: 582-591.

Yu, K., M.C. Newman, D.D. Archbold and T.R. Hamilton-kemp. 2001. "Survival of *Escherichia coli* O157: H7 on Strawberry Fruit and Reduction of the Pathogen Population by Chemical Agents." **J. Food Protection**. 64: 1334-1340.

# ภาคผนวก ก
## สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **Trypticase Soy Broth (TSB, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | | |
|---|---|---|
| Casein Peptone | 17.0 | กรัม |
| Soymeal Peptone | 3.0 | กรัม |
| D (+) Glucose | 2.5 | กรัม |
| Sodium Chloride | 5.0 | กรัม |
| Di-Potassium Hydrogen Phosphate | 2.5 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1.0 | ลิตร |

ละลายน้ำ 30 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มน้ำให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. **Tryptic Soy Agar (TSA, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany )**

| | | |
|---|---|---|
| Casein Peptone | 15.0 | กรัม |
| Soymeal Peptone | 5.0 | กรัม |
| Sodium Chloride | 5.0 | กรัม |
| Agar | 15.0 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1.0 | ลิตร |

ละลายอาหาร 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**3. Buffered Peptone Water (BPW, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | |
|---|---|
| Peptone | 10.0 กรัม |
| Sodium Chloride | 5.0 กรัม |
| Diosodium Hydrogen | 3.5 กรัม |
| Potassium Dihydrogen Phosphate | 1.5 กรัม |
| pH | 7.2 $\pm$ 0.2 |
| Distilled Water | 1,000 มิลลิลิตร |

ละลายอาหาร 25.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**4. Muller-Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | |
|---|---|
| Meat Extract | 4.3 กรัม |
| Peptone from casein | 8.6 กรัม |
| Sodium Chloride | 2.6 กรัม |
| Calcium Carbonate | 38.7 กรัม |
| Sodium Thiosulphate Water Free | 30.5 กรัม |
| Ox Bile | 4.78 กรัม |
| Brilliant Green | 0.0096 กรัม |
| Novobiocin | 0.040 กรัม |
| Distilled Water | 1,000 มิลลิลิตร |

ละลายอาหาร 89.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้เดือดละลายเป็นเนื้อเดียวกันไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้อุ่นเติมสารละลายไอโอดีน 20 มิลลิลิตร ใน 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดละ 10 มิลลิลิตร ในสภาพปลอดเชื้อ

5. **Brilliant-green Phenol-red Lactose Agar (BPL, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | |
|---|---|
| Peptone from meat | 7.0 กรัม |
| Sodium Chloride | 5.0 กรัม |
| Lactose | 15.0 กรัม |
| Phenolred | 0.04 กรัม |
| Brilliant Green | 0.005 กรัม |
| Agar-agar | 13.0 กรัม |
| Distilled Water | 1,000 มิลลิลิตร |

ละลายอาหาร 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรงนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. **Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (XLD, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | |
|---|---|
| Yeat Extract | 3.0 กรัม |
| L-Lysine HCL | 5.0 กรัม |
| Xylose | 3.75 กรัม |
| Lactose | 7.5 กรัม |
| Sucrose | 7.5 กรัม |
| Sodium Deoxycholate | 1.0 กรัม |
| Sodium Chloride | 5.0 กรัม |
| Sodium Thiosulfate | 6.8 กรัม |
| Ferric Ammonium Citrate | 0.8 กรัม |
| Agar | 12.5 กรัม |
| Distilled Water | 1,000 มิลลิลิตร |

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ 55 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มน้ำให้เดือดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน อาหารเลี้ยงเชื้ออาจตกตะกอน ไม่มีผลต่อการทำงาน ห้ามนำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

**7. Triple Sugar Iron Agar (TSI, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | |
|---|---|
| Meat Extract | 4.3 กรัม |
| Yeat Extract | 3.0 กรัม |
| Peptone | 18.0 กรัม |
| Sodium Chloride | 5.0 กรัม |
| Sodium Thiosulfate | 0.3 กรัม |
| Lactose | 10.0 กรัม |
| Sucrose | 10.0 กรัม |
| Dextrose | 1.0 กรัม |
| Ferric Ammonium Citrate | 0.2 กรัม |
| Agar | 14.0 กรัม |
| Distilled Water | 1,000 มิลลิลิตร |

ละลายอาหาร 65.6 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอด หลอดละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที นำมาเอียงให้มีความลึกก่อนถึงผิวเอียง ประมาณ 1 นิ้ว

**8. Lysine Iron Motility Medium (LIM, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | |
|---|---|
| Yeat extract | 3.0 กรัม |
| Peptone | 5.0 กรัม |
| L-Lysine HCL | 10.0 กรัม |
| Dextrose | 1.0 กรัม |
| Sodium Thiosulfate | 0.2 กรัม |

| | |
|---|---|
| Ferric Ammonium Citrate | 0.3 กรัม |
| Bromcresol Purple | 0.3 กรัม |
| Agar | 14.0 กรัม |
| Distilled Water | 1,000 มิลลิลิตร |

ละลายอาหาร 23.0 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร แบ่งใส่หลอดๆ ละประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**9. Mueller Hinton Agar (MHA, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | |
|---|---|
| Meat Infusion | 2.0 กรัม |
| Casein Hydrolysate | 17.5 กรัม |
| Starch | 1.5 กรัม |
| Agar-agar | 13.0 กรัม |

ละลายอาหาร 40 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรงนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

**10. Rappaport-Vassiliadis Medium with Soya Broth (RVS, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | |
|---|---|
| Peptone from soymeal | 4.5 กรัม |
| Magnesium Chloride Hexahydrate | 28.6 กรัม |
| Sodium Chloride | 7.2 กรัม |
| Di-Potassium Hydrogen Phosphate | 1.26 กรัม |
| Photassium Di-Hydrogen Phosphate | 0.18 กรัม |
| Malachite-Green | 0.036 กรัม |

ละลาย 41.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอด หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**11. Diluent (0.1%BPW, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)**

| | | |
|---|---|---|
| Buffer Peptone Water | 0.036 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1.0 | ลิตร |

ละลายสารในน้ำกลั่นให้เข้ากัน เทใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร หรือขวดสารละลายเจือจางขวดละ 225 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

# ภาคผนวก ข
# สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

**1. สารละลายแอลกอฮอล์ 70 %**

การเตรียมแอลกอฮอล์ (เอทานอล) 70 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เตรียมจากเอทานอล 95 % โดยตวงแอลกอฮอล์ 95 % ปริมาตร 74 มิลลิลิตร ลงในขวดเชิงปริมาตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ก็จะได้เอทานอล 70 % ตามที่ต้องการ

**2. น้ำส้มสายชูหมัก**

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นกรดอะแซติกในน้ำส้มสายชูหมักโดยวิธีไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( NaOH ) ความเข้มข้น 1 N ด้วยตัวอย่างน้ำส้มสายชูหมัก 6 มิลลิลิตร แล้วคำนวณดังสูตร

$$\% \text{ Acidity} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ NaOH (N)} \times \text{ปริมาตรที่ไทเทรตได้} \times \text{มวลโมเลกุลกรด} \times 100}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง} \times 100}$$

**3. อาหารเหลว TSB ปรับความเข้มข้นกรด 1% - 5 %**

ปรับความเข้มข้นกรดด้วยสารละลายน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10 % (v/v) ปิเปตด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ผสมกับอาหารเหลว TSB ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ โดยคำนวณปริมาตรน้ำส้มสายชูหมักที่ต้องเติมในอาหารเหลว TSB ด้วยสูตร $M_1V_1 = M_2V_2$ เพื่อให้ได้อาหารเหลว TSB ที่มีความเข้มข้นกรดที่ต้องการ เช่น ถ้าต้องการอาหารเหลว TSB ความเข้มข้นกรด 5% (v/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) สามารถเตรียมได้ตามตัวอย่างที่คำนวณดังนี้

$$M_1V_1 = M_2V_2$$
$$10\% \times V_1 = 5\% \times 10 \text{ มิลลิลิตร}$$
$$V_1 = 5 \text{ มิลลิลิตร}$$

$M_1$ = ความเข้มข้นตั้งต้น

$M_2$ = ความเข้มข้นสุดท้าย

$V_1$ = ปริมาตรตั้งต้น

$V_2$ = ปริมาตรสุดท้าย

ดังนั้นสามารถเตรียมอาหารเหลว TSB ความเข้มข้นกรด 5% (v/v) โดยดูดสารละลายน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 10% (v/v) 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว TSB 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

# ภาคผนวก ค
# ข้อมูลวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

**ตารางภาคผนวก ค.1** ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งจากการใช้น้ำส้มสายชูหมักยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE โดยวิธี Agar Overlay Disc Diffusion

| น้ำส้มสาย | เส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้ง (มม.) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ชูหมัก (%) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 0 | ≤ 6.00 | ≤ 6.00 | ≤ 6.00 | ≤ 6.00 | ≤ 6.00 | ≤ 6.00 | ≤ 6.00 | ≤ 6.00 | ≤ 6.00 |
| 1 | 7.25 | 7.91 | 7.92 | 7.95 | 7.24 | 7.56 | 7.45 | 7.55 | 7.90 |
| 2 | 13.25 | 13.00 | 12.20 | 12.25 | 13.15 | 11.92 | 12.30 | 12.10 | 12.00 |
| 3 | 13.50 | 12.00 | 12.50 | 13.15 | 12.10 | 12.90 | 13.75 | 13.30 | 12.50 |
| 4 | 15.40 | 14.95 | 15.45 | 15.50 | 16.00 | 15.02 | 15.10 | 15.50 | 15.10 |
| 5 | 17.48 | 18.00 | 18.21 | 16.80 | 17.00 | 18.10 | 18.02 | 17.50 | 18.30 |

**ตารางภาคผนวก ค.2** การวิเคราะห์ทางสถิติขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนยับยั้งการเจริญของเชื้อ SE

| Source | Degree of Freedom | Sum Square | Mean Square | F Value | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Trt | 5 | 897.667 | 179.533 | 815.483 | 0.000 |
| Error | 40 | 8.806 | 0.220 | | |

หมายเหตุ Trt คือ น้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 0% 1% 2% 3% 4% และ 5% ที่ใช้ในการทดสอบโซนยับยั้งบนอาหารแข็ง Mueller Hinton Agar (MHA)

**ตารางภาคผนวก ค.3** ค่าการดูดกลืนแสงและผลของน้ำส้มสายชูหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ต่อจำนวนเซลล์ SE ที่รอดชีวิตที่อุณหภูมิห้อง (31 ± องศาเซลเซียส)

| น้ำส้มสายชูหมัก ความเข้มข้น (%) | ค่าการดูดกลืนแสง ($OD_{625nm}$) | จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log cfu/ml) |
|---|---|---|
| 0.0 | 0.220 | 7.56 |
| 1.0 | 0.009 | 7.51 |
| 1.1 | 0.007 | 6.44 |
| 1.2 | 0.007 | 6.39 |
| 1.3 | 0.007 | 6.32 |
| 1.4 | 0.006 | 5.95 |
| 1.5 | 0.006 | 5.39 |
| 1.6 | 0.006 | 3.24 |
| 1.7 | 0.007 | 2.37 |
| 1.8 | 0.007 | 2.15 |
| 1.9 | 0.005 | 1.40 |
| 2.0 | 0.002 | < 1.00 |
| 2.1 | 0.002 | < 1.00 |
| 2.2 | 0.001 | < 1.00 |
| 2.3 | 0.002 | < 1.00 |
| 2.4 | 0.001 | < 1.00 |
| 2.5 | 0.001 | < 1.00 |
| 2.6 | 0.001 | < 1.00 |
| 2.7 | 0.001 | < 1.00 |
| 2.8 | 0.002 | < 1.00 |
| 2.9 | 0.002 | < 1.00 |
| 3.0 | 0.001 | < 1.00 |

**ตารางภาคผนวก ค.4** จำนวนเชื้อ SE ที่เหลือรอดชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่มีน้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด 2% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส)

| เวลา (นาที) | จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (log cfu/ml) |
|---|---|
| 0 | 8.25 |
| 1 | 8.12 |
| 2 | 6.06 |
| 3 | 3.84 |
| 4 | 1.56 |
| 5 | < 1.00 |
| 6 | < 1.00 |
| 7 | < 1.00 |
| 8 | < 1.00 |
| 9 | < 1.00 |
| 10 | < 1.00 |

**ตารางภาคผนวก ค.5** การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยจุ่มในน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส)

| เวลา (นาที) | น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด (%) | จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต | |
|---|---|---|---|
| | | (log cfu/g) | (%) |
| 0 | 2 | 6.14 | 100.00 |
| 5 | | 4.86 | 79.15 |
| 10 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 15 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 20 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 25 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 30 | | < 1.00 | < 0.01 |

**ตารางภาคผนวก ค.5** (ต่อ)

| เวลา (นาที) | น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด (%) | จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต | |
|---|---|---|---|
| | | (log cfu/g) | (%) |
| 0 | 10 | 6.10 | 100.00 |
| 5 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 10 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 15 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 20 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 25 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 30 | | < 1.00 | < 0.01 |

**ตารางภาคผนวก ค.6** การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยวิธีสเปรย์น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส)

| เวลา (นาที) | น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด (%) | จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต | |
|---|---|---|---|
| | | (log cfu/g) | (%) |
| 0 | 2 | 6.10 | 100 |
| 10 | | 6.01 | 99 |
| 20 | | 5.73 | 96 |
| 30 | | 5.17 | 94 |
| 40 | | 4.87 | 85 |
| 50 | | 4.52 | 80 |
| 60 | | 4.35 | 74 |
| 70 | | 4.10 | 67 |
| 80 | | 3.80 | 62 |
| 90 | | 3.09 | 51 |
| 100 | | 2.25 | 37 |
| 110 | | 0.28 | 5 |
| 120 | | < 1.00 | < 0.01 |

**ตารางภาคผนวก ค.6** (ต่อ)

| เวลา (นาที) | น้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด (%) | จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต | |
|---|---|---|---|
| | | (log cfu/g) | (%) |
| 0 | 10 | 6.10 | 100 |
| 10 | | 5.18 | 85 |
| 20 | | 4.25 | 70 |
| 30 | | 3.60 | 59 |
| 40 | | 2.63 | 31 |
| 50 | | 1.90 | 22 |
| 60 | | 1.34 | 12 |
| 70 | | 0.72 | < 0.01 |
| 80 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 90 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 100 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 110 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 120 | | < 1.00 | < 0.01 |

**ตารางภาคผนวก ค.7** การลดจำนวนเชื้อ SE บนเปลือกไข่โดยวิธีรมไอน้ำส้มสายชูหมักความเข้มข้นกรด 2% และ 10% (v/v) ที่อุณหภูมิห้อง (31 ± 1 องศาเซลเซียส)

| เวลา (ชั่วโมง) | น้ำส้มสายชูความเข้มข้นกรด (%) | จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต | |
|---|---|---|---|
| | | (log cfu/g) | (%) |
| 0 | 2 | 6.14 | 100 |
| 0.5 | | 5.73 | 93 |
| 1.0 | | 4.93 | 80 |
| 1.5 | | 4.85 | 79 |
| 2.0 | | 3.98 | 65 |
| 2.5 | | 3.65 | 59 |
| 3.0 | | 3.35 | 55 |
| 3.5 | | 3.09 | 50 |
| 4.0 | | 2.58 | 42 |
| 4.5 | | 1.94 | 32 |
| 5.0 | | 1.50 | 24 |
| 5.5 | | 0.37 | 6 |
| 6.0 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 0 | 10 | 6.12 | 100 |
| 0.5 | | 5.01 | 82 |
| 1.0 | | 4.15 | 68 |
| 1.5 | | 3.55 | 58 |
| 2.0 | | 3.17 | 52 |
| 2.5 | | 2.76 | 45 |
| 3.0 | | 2.38 | 39 |
| 3.5 | | 2.09 | 34 |
| 4.0 | | 1.71 | 28 |
| 4.5 | | 1.48 | 24 |
| 5.0 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 5.5 | | < 1.00 | < 0.01 |
| 6.0 | | < 1.00 | < 0.01 |

**ตารางภาคผนวก ค.8** การวิเคราะห์ทางสถิติจำนวนเชื้อ SE โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0-28 วัน

| Source | Degree of Freedom | Sum Square | Mean Square | F Value | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Trt | 4 | 4.154 | 179.533 | 339.189 | 0.000 |
| Error | 10 | 0.31 | 0.220 | | |

หมายเหตุ Trt คือ จำนวนเชื้อ SE ที่พบบนเปลือกไข่และเมมเบรนในเวลา 0 7 14 21 และ 28 วัน

**ตารางภาคผนวก ค.9** การวิเคราะห์ทางสถิติจำนวนเชื้อ SE โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ( 31 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 0-28 วัน

| Source | Degree of Freedom | Sum Square | Mean Square | F Value | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Trt | 4 | 5.354 | 854.533 | 1.278 | 0.000 |
| Error | 10 | 0.34 | 0.28 | | |

หมายเหตุ Trt คือ จำนวนเชื้อ SE ที่พบบนเปลือกไข่และเมมเบรนในเวลา 0 7 14 21 และ 28 วัน

# ประวัติผู้วิจัย

นางสาวจิราวรรรณ ยี่สิบแสน เกิดเมื่อวันที่ 30 พฤษภาคม 2525 ที่ จังหวัดพะเยา สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิทยาศาสตร์ ปีการศึกษา 2548 ศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาวิชาสุขาภิบาลอาหารปี พ.ศ 2549 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2552

**ประวัติการทำงาน**

| | |
|---|---|
| ตุลาคม พ.ศ. 2548 | เจ้าหน้าที่วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ บริษัทนูบูน จำกัด |
| มีนาคม พ.ศ. 2549 | นักจุลชีววิทยา แผนกแบคทีเรียวิทยา บริษัทอาร์เบอร์ เอเคอร์ส ประเทศไทย จำกัด ( ในเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด (มหาชน) ) |
| มกราคม พ.ศ. 2551 | นักจุลชีววิทยาอาวุโส แผนก แบคทีเรียวิทยา บริษัทอาร์เบอร์ เอเคอร์ส ประเทศไทย จำกัด ( ในเครือเจริญโภคภัณฑ์ ประเทศไทย จำกัด ) |