การใช้เฮอร์เดิลเทคโนโลยีเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์

HURDLE TECHNOLOGY FOR INHIBITING GROWTH OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DURING PRODUCING AND STORAGING OF E'CLAIR CREAM

พรรณ์วลัย บ้านศาลเจ้า
PANWALAI BANSANJAO

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาคุณภาพอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การใช้เฮอร์เดิลเทคโนโลยีเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์

HURDLE TECHNOLOGY FOR INHIBITING GROWTH OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DURING PRODUCING AND STORAGING OF E'CLAIR CREAM

พรรณ์วลัย บ้านศาลเจ้า

PANWALAI BANSANJAO

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 74552
วัน,เดือน,ปี - 3 ต.ค. 2550

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2550

HURDLE TECHNOLOGY FOR INHIBITING GROWTH OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DURING PRODUCING AND STORAGING OF E'CLAIR CREAM

PANWALAI BANSANJAO

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITAION
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2007

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้เฮอร์เดิลเทคโนโลยีเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์
นักศึกษา	นางสาวพรรณ์วลัย บ้านศาลเจ้า
รหัสนักศึกษา	46067907
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง

บทคัดย่อ

การใช้เฮอร์เดิลเทคโนโลยี ในด้านการใช้อุณหภูมิความร้อน ระยะเวลาในการเตรียมส่วนผสม และการใช้อุณหภูมิขณะเก็บรักษา ในผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์ เพื่อยับยั้งการเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ โดยถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์เอแคลร์เท่ากับ 1.0$\pm$0.1 3.8$\pm$0.1 และ 6.2$\pm$0.1 Log_{10}CFUต่อกรัม แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (35$\pm$2 องศาเซลเซียส) พบว่า ระยะเวลาในการแบ่งตัว (generation time) ของเชื้อ *Staph. aureus* อยู่ในช่วง 1.2 -1.6 ชั่วโมง ส่วนอุณหภูมิและระยะเวลาการเตรียมส่วนผสมที่อุณหภูมิห้อง (35$\pm$2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5$\pm$2 องศาเซลเซียส) ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์เอแคลร์เท่ากับ 6.2$\pm$0.1 Log_{10}CFUต่อกรัม พบว่าไม่ควรทิ้งส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกิน 15 นาที เพราะทำให้เชื้อ *Staph. aureus* เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) แต่ที่อุณหภูมิแช่เย็นไม่พบการเพิ่มจำนวน ส่วนระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนแก่ไส้ครีม เอแคลร์ที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เมื่อถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์เอแคลร์เท่ากับ 6.2$\pm$0.2 Log_{10}CFUต่อกรัม ที่เวลา 15 20 และ 25 นาที พบว่าเชื้อ *Staph . aureus* มีอัตราการรอดชีวิต ร้อยละ 69.3 40.4 และ 32.7 ตามลำดับ ถึงแม้ที่เวลา 25 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ได้สูงที่สุด แต่เนื่องจากลักษณะทางกายภาพมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่แข็งกระด้างเกินไป ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์เท่ากับ 20 นาที

เมื่อศึกษาอุณหภูมิในการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ โดยถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์เอแคลร์เท่ากับ 6.2$\pm$0.1 Log_{10}CFUต่อกรัมและไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิแช่เย็น พบว่าที่อุณหภูมิการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็นไม่มีการเพิ่มจำนวนเชื้อ *Staph. aureus* แต่ที่อุณหภูมิห้องเชื้อ *Staph. aureus* เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) โดยไส้ครีม

ที่มีการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* โดยเพิ่มจาก 0.8 เป็น 7.7 Log_{10}CFUต่อกรัม และจาก 0.5 เป็น 4.8 Log_{10}CFUต่อกรัม ในไส้ครีมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ลงไป

ดังนั้นการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ให้มีความปลอดภัยที่ยอมรับได้

Thesis Title	Hurdle technology for inhibiting growth of *Staphylococcus aureus* during producing and storaging of E'clair cream
Student	Miss Panwalai Bansanjao
Student ID.	46067907
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2007
Thesis Advisor	Asso. Prof. Dr. Warawut Krusong

ABSTRACT

Inhibition of *Staphylococcus aureus* during producing and storing of E'clair cream was studied by using the concept of hurdle technology. The mixing time and temperature of E'clair cream, heating time at 70-75°C and storing condition were investigated. Growth of *Staph. aureus* stored at room temperature (35±2°C) with initial load composing different inoculation of 1.0±0.1, 3.8±0.1 และ 6.2±0.1 Log_{10}CFU/g provided 1.2-1.6 hours of generation time. By using high load inoculation of 6.2±0.1 Log_{10}CFU/g *Staph. aureus* into the mixed ingredients of E'clair cream, mixing time was recommended to not exceed than 15 min at room temperature. The significant increasing of *Staph. aureus* ($P \leq 0.05$) was found when the mixing was over 15 min. While no increment of *Staph. aureus* was found when the E'clair cream mixture was kept at chilled temperature (5±2°C). The 6.2±0.2 log_{10}CFU/g *Staph. aureus* inoculated into the cream mixture heated at 70-75°C for 15, 20 and 25 minutes was investigated. The survival rate of *Staph. aureus* were 69.3%, 40.4% and 32.7%, respectively. At 25 minutes of 70-75°C heating, the highest amount of *Staph. aureus* could be decreased, but the cream texture was unsatisfactory. Therefore, the suitable heating time of E'clair cream for 20 minutes was recommended. Storage condition of E'clair cream inoculated with 6.2±0.1 log_{10}CFU/g *Staph. aureus* and without inoculation was further compared. Two conditions at chilled (5±2°C) and ambient temperature were studied. The results showed that abundant increasing of *Staph. aureus* was found in cream kept at room temperature in both inoculated and no inoculated cream samples while slight increasing of *Staph. aureus* was observed in both samples kept at chilled temperature. Therefore, the E'clair cream was recommended to keep at chilled temperature for its reliable food safety.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจาก รศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไข วิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสุขาภิบาลอาหาร โครงการคณะอุตสาหกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในหลักสูตรปริญญาโทสาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุชาติ บ้านศาลเจ้า และ คุณแม่เนตรนภิส บ้านศาลเจ้า คุณกำพล บ้านศาลเจ้า และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

พรรณ์วลัย บ้านศาลเจ้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....IX

สารบัญภาพ.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 ขอบเขตการวิจัย.....2

1.3 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 เอแคลร์.....3

2.2 เฮอร์เดิลเทคโนโลยี.....6

2.3 กระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อน.....7

2.3.1 การถ่ายเทความร้อน.....7

2.3.2 การนำความร้อน.....8

2.3.3 การพาความร้อน.....8

2.3.4 การแผ่รังสีความร้อน.....9

2.4 วิธีการถนอมอาหารโดยการใช้ความร้อน.....11

2.4.1 การพาสเจอร์ไรส์.....11

2.4.1.1 ระบบอุณหภูมิต่ำเวลานาน.....11

2.4.1.2 ระบบอุณหภูมิสูงเวลาสั้น.....11

2.4.2 การสเตอริไรส์.....12

2.5 การควบคุมเชื้อจุลินทรีย์โดยให้ความร้อน.....12

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์.....13

2.6.1 ส่วนประกอบของอาหารที่มีผลต่อความต้านทานต่อความร้อน.....13

2.6.2 ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ในอาหาร.....15

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.3 ชนิดของจุลินทรีย์.....15

2.6.4 ระดับความร้อน.....15

2.7 การถนอมอาหารโดยใช้อุณหภูมิต่ำ.....16

2.7.1 การถนอมอาหารโดยใช้อุณหภูมิสูงกว่าจุดเยือกแข็ง.....16

2.7.1.1 การเก็บแบบชิลลิง.....16

2.7.1.2 การเก็บแบบเซลลาร์.....17

2.7.2 การถนอมอาหารโดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง.....17

2.7.2.1 การแช่เยือกแข็งแบบช้า.....17

2.7.2.2 การแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็ว.....17

2.8 จุลินทรีย์ในอาหารแช่เย็น.....18

2.8.1 อุณหภูมิต่ำมีผลต่อจุลินทรีย์.....18

2.8.2 ปัจจัยที่พบว่ามีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการแช่เย็นอาหาร.....19

2.9 เชื้อ *Staphylococcus aureus*.....20

2.9.1 ประวัติและและการเกิดโรคของเชื้อ *Staph. aureus*.....21

2.9.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....22

2.9.3 การเกิดโรคและพยาธิสภาพ.....23

2.9.4 แหล่งที่พบ.....24

2.9.5 การเจริญและการอยู่รอดของเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหาร.....25

2.9.6 การต้านทานความร้อนของเชื้อ *Staph. aureus*.....25

2.9.7 การปนเปื้อนของ *Staph. aureus* ในอาหารและการเกิดโรค
จากอาหารเป็นพาหะ.....26

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....29

3.1 วัตถุดิบ.....29

3.2 เชื้อจุลินทรีย์.....29

3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์.....29

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....30

3.5 สถานที่ทำการทดลอง.....30

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.6 วิธีการทดลอง.....31

3.6.1 การผลิตไส้ครีมเอแคลร์.....31

3.6.2 การเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง.....32

3.6.2.1 การเตรียมเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* 32

3.6.2.2 การตรวจนับจำนวนเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus*.....32

3.6.2.3 การเตรียมตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์.....33

3.6.2.4 การสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* 33

3.6.3 อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาส่วนผสมในช่วงก่อนให้ความร้อน.....33

3.6.4 เวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนของไส้ครีมเอแคลร์.....34

3.6.5 อายุการเก็บรักษาของไส้ครีมเอแคลร์.....34

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....35

4.2 ผลการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง.....35

4.3 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาส่วนผสมในช่วงก่อนให้ความร้อน.....37

4.4 ผลของเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนของไส้ครีมเอแคลร์.....39

4.5 อายุการเก็บรักษาของไส้ครีมเอแคลร์.....43

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....49

สรุปผลการทดลอง.....49

ข้อเสนอแนะ.....51

บรรณานุกรม.....52

ภาคผนวก.....58

ก. วิธีการเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ (Stock culture solution).....59

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ข. การผลิตไส้ครีมเอแคลร์.....61
ค. การคำนวณหาระยะเวลาในการแบ่งตัว (Generation Time).....65
ง. การคำนวณหาอัตราการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus*.....67
จ. การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อบาดเจ็บ.....68

ประวัติผู้เขียน.....69

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 รายงานการเกิดโรคระบาดโดยศึกษาปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคระบาด.....4

2.2 การระบาดของโรคทางเดินอาหารโดยเชื้อ *Staph. aureus* ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่.....4

4.1 ระยะเวลาในการแบ่งตัว (generation time) ของเชื้อจุลินทรีย์.....36

4.2 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ก่อนนำไปให้ความร้อนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิแช่เย็นที่เวลาภายใน 60 นาที.....38

4.3 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่เวลาต่างๆ.....39

4.4 อัตราการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที.....40

4.5 ลักษณะทางกายภาพของไส้ครีมเอแคลร์ขณะให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที.....41

4.6 ลักษณะทางกายภาพของไส้ครีมเอแคลร์ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส).....46

4.7 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์หลังการให้ความร้อนแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส).....47

4.8 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์หลังการให้ความร้อนแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส).....48

ค 1 ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ที่เวลาต่างๆ โดยเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส).....66

ง 1 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่เวลาต่างๆ.....67

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 การเกิดการนำความร้อนผ่านผนังกระจก.....8

2.2 การพาความร้อน.....9

2.3 การดูดกลืน การสะท้อนและการส่งผ่านรังสี.....10

2.4 ภาพขยายจากกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus*.....20

2.5 ลักษณะของเชื้อ *Staph. aureus* ในฝีหนอง เมื่อนำมาย้อมแกรม.....20

3.2 ขั้นตอนการผลิตไส้ครีมเอแคลร์.....31

3.3 ตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ที่เตรียมได้จากการทดลอง.....32

4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ *Staph. aureus* $\log_{10}$CFUต่อกรัมเอแคลร์ กับเวลา(ชั่วโมง) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ณ อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส).....35

4.2 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) ภายในเวลา 60 นาที.....37

4.3 ไส้ครีมเอแคลร์เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที.....41

4.4 การเลี้ยงเชื้อ *Staph. aureus* บาดเจ็บ ในอาหาร TSB+10%NaCl+1%pyruvate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....42

4.5 การเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* 6 Log_{10}CFUต่อกรัม.....43

4.6 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายและไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ในช่วงเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส และ 5±2 องศาเซลเซียส.....44

4.7 ปริมาณเชื้อ*Staph. aureus*ในไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายและไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPในช่วงเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส และ 5±2 องศาเซลเซียส.....44

4.8 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และเวลาต่าง ๆ.....45

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

4.9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staph. aureus* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BP ที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) วันที่ 2 45

4.10 ลักษณะตัวอย่างของไส้ครีมเอแคลร์ 46

ก 1 เขี่ยเชื้อ 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth จำนวน 10 มิลลิลิตร.....59

ก 2 ลักษณะเชื้อ *Staph. aureus* ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar.....60

ข 1 การเตรียมส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์.....61

ข 2 นำไส้ครีมเอแคลร์ให้ความร้อน โดยอาศัยความร้อนจากน้ำในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นตัวกลางส่งผ่านความร้อน (อุณหภูมิน้ำในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 93±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 นาที.....62

ข 3 กระปุกและฝาพลาสติกฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที.....62

ข 4 การบรรจุไส้ครีมเอแคลร์.....63

ข 5 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์.....64

ค 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ *Staph. aureus* $\log_{10}$CFUต่อกรัมเอแคลร์กับเวลา(ชั่วโมง) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ณ อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส).....66

จ 1 การเลี้ยงเชื้อ *Staph. aureus* บาดเจ็บ ในอาหาร TSB+10%NaCl+1%pyruvate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....68

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เป็นที่นิยมจากผู้บริโภคตั้งแต่วัยเด็กจนถึงผู้ใหญ่ ซึ่งผลิตภัณฑ์เอแคลร์จัดเป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ชนิดหนึ่งที่มีผู้นิยมบริโภคกันมาก เนื่องจากมีราคาไม่สูงนัก รสชาติอร่อย แต่ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้มักจำหน่ายในลักษณะขายวันต่อวัน เนื่องจากมีอายุการเก็บรักษาสั้น เนื่องจากผลิตภัณฑ์เอแคลร์โดยทั่วไป จะมีค่าความชื้นสัมพัทธ์สมดุลมากกว่าร้อยละ 85 (หรือ $a_w > 0.85$) ทั้งนี้สาเหตุการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ส่วนใหญ่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ปัจจุบันได้มีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ในอาหาร โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และมีการนำปัจจัยเหล่านั้นมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเพื่อทำให้เกิดความปลอดภัย ความคงตัว คุณค่าทางอาหาร และรสชาติ ความปลอดภัยของอาหารและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิดร่วมกัน ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้สามารถควบคุมได้ด้วยการสร้างอุปสรรคหรือสิ่งกีดขวาง (Hurdle) การเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอาจจะเป็น การควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ ความเป็นกรด - ด่าง ความเข้มข้นของออกซิเจน การปรับสภาพแวดล้อม ดังนั้นจึงนำหลักการเฮอร์เดิลเทคโนโลยี (Hurdle technology) หรือเทคโนโลยีแบบผสมผสานมาประยุกต์ใช้ โดยเป็นเทคโนโลยีที่ได้รับการพัฒนามาจากผลกระทบของกรรมวิธีการแปรรูปที่ใช้วิธีการต่าง ๆ ร่วมกัน เช่น การควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ ความเป็นกรด - ด่าง ความเข้มข้นของออกซิเจน และสารกันเสีย ให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหารมากนัก ทั้งทางด้านคุณค่าทางโภชนาการและคุณภาพของอาหารทางด้านประสาทสัมผัส ดังนั้นอาหารจะมีคุณภาพใกล้เคียงกับอาหารสดหรืออาหารที่ปรุงสุกใหม่ การควบคุมปัจจัยเหล่านี้เหมือนเป็นการสร้างอุปสรรคหรือสิ่งกีดขวาง (Hurdle) ร่วมกันจนทำให้สภาพแวดล้อมในการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม ทำให้จุลินทรีย์ชะงักการเจริญหรือไม่เพิ่มจำนวน จึงทำให้มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในระดับที่ไม่ทำให้อาหารเสื่อมเสียหรือเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ดังนั้นอาหารจึงเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ช้ากว่าอาหารที่ไม่ได้ผ่านการแปรรูป วัตถุประสงค์ของการนำเฮอร์เดิลเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร คือเพื่อส่งเสริมและปรับปรุงคุณภาพโดยรวมของอาหาร โดยการนำวิธีการถนอมอาหารมาใช้ร่วมกันอย่างชาญฉลาด (Leistner and Gould , 2002) ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้

1.2 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการใช้เฮอร์เดิลเทคโนโลยี ด้านการใช้อุณหภูมิความร้อน ระยะเวลาในการเตรียมส่วนผสม และการใช้อุณหภูมิขณะเก็บรักษา ในผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์

1.3 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในระหว่างการผลิตและเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอแคลร์

เอแคลร์เป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ประเภทหนึ่ง โดยคำว่า เอแคลร์ มาจากภาษาฝรั่งเศส แปลว่า ดอกกะหล่ำ ซึ่งก็คือลักษณะของขนมปังที่อบออกมาแล้วมีรูปร่างคล้ายดอกกะหล่ำ จริง ๆ แล้วก็มีหลายรูปร่างหน้าตาแตกต่างกันออกไป อาจจะเป็นวงกลม แท่งยาวเล็ก ๆ แต่ที่เห็นกันในบ้านเราจะมีรูปร่างหน้าตาเป็นก้อนกลม ๆ เสียเป็นส่วนใหญ่

เอแคลร์เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของไข่ไก่ แป้ง น้ำ และเนย เป็นหลักเท่านั้น อาจมีการเติมผงฟูหรือแอมโมเนียลงไปในสูตรด้วยก็ได้ แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมเท่าที่ควร หากใส่ในปริมาณที่มากเกินไปเนื้อของขนมจะแตกง่ายและอาจทำให้ปริมาณของขนมลดลงได้ (http://naichef.50megs.com/bakery4.html) เนื่องจากส่วนประกอบหลักของผลิตภัณฑ์เอแคลร์ มีปริมาณโปรตีน และน้ำตาล จากส่วนผสม ซึ่งเหมาะต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ในอดีตที่ผ่านมาปัญหาการเกิดโรคทางเดินอาหารในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่มีไส้ครีมในหลายประเทศ ซึ่งในประเทศไทยก็เคยเกิดโรคทางเดินอาหารโดยมีสาเหตุจากการปนเปื้อนจากเชื้อ *Staph. aureus* ในผลิตภัณฑ์เอแคลร์ ซึ่งสาเหตุการปนเปื้อนจากเชื้อ *Staph. aureus* มีหลายปัจจัยที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อน ซึ่ง Stewart และคณะ (2003) รายงานดังตารางที่ 2.1 และ 2.2

รายงานการวิจัยที่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Staph. aureus* ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เช่น Pacini และคณะ (1996) ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารหลายชนิด เช่น นม เนื้อ ไข่ ปลา เนย และไอศกรีม พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหารประเภทเนย และไอศกรีม มากที่สุด

Estefo and Soavedra (1996) ทำการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของขนมเค้ก และพาย 150 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Staph. aureus* ร้อยละ 2.6

Pla และคณะ (1996) ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของขนมเค้ก 311 ตัวอย่าง (Cream cakes, truffe, chocolate cakes, coffe cakes และ fruit cakes) โดยร้อยละ 61.41 ของโรงงานผู้ผลิตไม่ได้รับการยอมรับจาก Spanish legislation พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Staph. aureus* 10 ตัวอย่าง และพบว่า Cream cakes เป็นตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของเชื้อมากที่สุด คือ ร้อยละ 80 แต่เนื่องจากวัตถุดิบในขนมเค้กดังกล่าวเป็นวัตถุดิบที่มีคุณภาพ จึงสรุปว่าเกิดการปนเปื้อนขึ้นภายหลังการผลิต

ตารางที่ 2.1 รายงานการเกิดโรคระบาดโดยศึกษาปัจจัยที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคระบาด

ต้นเหตุของโรค หรือ พาหะ(ปี ค.ศ)	จำนวนของโรคระบาดที่พบ(ครั้ง)	ปัจจัยที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคระบาด			
		อุณหภูมิการเก็บอาหารไม่เหมาะสม	สุขลักษณะไม่เหมาะสม	การปรุงอาหารไม่เหมาะสม	อุปกรณ์ปนเปื้อน
พายไส้ครีม (1976)	367	262	110	12	21
Staph. aureus (1984)	131	84	43	-	22
Staph. aureus (1990)	272	267	193	60	117
ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ (1990)	51	37	34	6	29
Staph. aureus (1996)	42	37	18	15	3
โรคทางเดินอาหาร (2000)	134	60	41	4	2
Staph. aureus (2000)	-	25	12	3	6

ที่มา : Stewart และคณะ (2003)

ตารางที่ 2.2 การระบาดของโรคทางเดินอาหารโดยเชื้อ *Staph. aureus* ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

สถานที่ (ปี ค.ศ.)	จำนวน (ครั้ง)	ปริมาณ *Staph. aureus* (CFU/g)	สารพิษที่พบ	อาหารที่เกี่ยวข้อง
USA (1962)	2	2.15×10^8	SEA	โดนัทไส้ครีม
Wales, UK (1969-1972)	-	1.5×10^8	SEA	เค้กวนิลา
Wales, UK (1969-1972)	-	1×10^9	SEA	เค้กครีมทอร์ทา
France (1969)	100	$1\text{-}9.6 \times 10^6$	SEA	พายคัสตาร์ด
Brazil	28	1×10^9	SED	เอแคลร์ชอกโกแลต
Sheffield, UK (1983)	36	1×10^9	SEA	ขนมปังวนิลา
Caribbean Cruise Ship (1983)	215	-	-	พายไส้ครีม
Spain (-)	1,800	$>5 \times 10^5$	SEA	เค้กอีสเตอร์ไส้ครีม
Brazil (1994)	12	1.2×10^8	SEA	เค้กไส้ครีม
Thailand (1990)	485	1.8×10^8	SEA, SEC	เอแคลร์
Mexico (1984)	100	-	-	เค้กมอคคา

ที่มา : Stewart และคณะ (2003)

ส่วนประกอบหลัก

ไข่ไก่ (บุษกร, 2547)

จุลินทรีย์สามารถผ่านเข้าไปในไข่ได้โดยผ่านเข้าทางรูที่เปลือกไข่และเนื้อเยื่อภายในไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเก็บไข่ไว้เป็นเวลานาน รูนี้จะขยายใหญ่ขึ้นทำให้จุลินทรีย์ผ่านเข้าไปเจริญภายในได้ โดยทั่วไปในไข่โดยเฉพาะไข่ขาวจะมีค่าความเป็นกรดด่างค่อนข้างสูง (ประมาณ 9.3) มีเอนไซม์และสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น ไลโซไซม์ (Lysozyme) ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก สารคอนอัลบูมิน (Conalbumin) ซึ่งจะรวมตัวกับเหล็กและอวิดิน (Avidin) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำสารเหล่านี้ไปใช้ได้ นอกจากนี้ยังมีสารยับยั้งโปรติเอส (Protease inhibitors) และโปรตีนแอนติวิตามิน (Antivitamin proteins) ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ถ้ามีการเก็บไข่ไว้เป็นเวลานาน น้ำที่เป็นส่วนประกอบในไข่ขาวจะถูกดูดซึมเข้าไปในไข่แดงทำให้ชั้นของไข่ขาวบางลงและหดตัว มีผลให้จุลินทรีย์สามารถเข้าถึงไข่แดงได้ง่ายขึ้น ในไข่แดงจะมีสารอาหารมากมายและมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่าไข่ขาว (ประมาณ 6.8) ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มักพบว่าสามารถเจริญได้ในไข่ จะเป็นพวกแกรมลบเคลื่อนที่ได้ เช่น *Proteus, Pseudomonas, Alcaligenes, Aeromonas* รวมทั้งแบคทีเรียในกลุ่ม *Escherichia, Micrococcus, Salmonella, Serratia, Enterobacter, Flavobacterium, Staphylococcus* และ Coliform ซึ่งจะทำให้เกิดผลเสียแตกต่างกัน

นมพาสเจอร์ไรส์ (บุษกร, 2547)

น้ำนมดิบจากฟาร์มจะถูกนำมาพาสเจอร์ไรส์ก่อนนำออกจำหน่าย ดังนั้นจุลินทรีย์ที่อยู่ในนมพาสเจอร์ไรส์จึงเป็นพวกที่มีความทนทานต่อความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรเซชั่นได้ เช่น *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* บางชนิด, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, สปอร์ของ*Bacillus* และ *Clostridium* นอกจากนี้ Coliform, *Pseudomonas, Alcaligenes* และ *Flavobacterium* ยังสามารถปนเปื้อนในภายหลังได้ นมพาสเจอร์ไรส์ต้องเก็บในตู้เย็นซึ่งจะทำให้ Psychrotrophic bacteria เจริญได้ดีและนมจะถูกทำให้เน่าเสียในลักษณะเดียวกันกับน้ำนมดิบ

เนย (บุษกร, 2547)

ประกอบด้วยไขมันนมประมาณร้อยละ 80 น้ำร้อยละ 15 ส่วนคาร์โบไฮเดรทและโปรตีนเพียงร้อยละ 0.5 อาจมีการเติมเกลือเพื่อเพิ่มรสชาติและมีผลช่วยยับยั้งแบคทีเรียด้วย จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ จะเป็นแบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. โดยเฉพาะ *Ps. putrefacians* ซึ่งเจริญที่ผิวของเนย เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ที่ 4 ถึง 7 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นประมาณ 7 ถึง 10 วัน เนยก็จะเริ่มมีกลิ่นของกรดที่แบคทีเรียสร้าง อีกสาเหตุหนึ่งของการเสื่อมเสียของเนยเกิดจาก *Ps. fragi* ที่สามารถเจริญและย่อยสลายไขมันเนยทำให้เกิดกลิ่นหืน ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้จัดเป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียของเนย

2.2 เฮอร์เดิลเทคโนโลยี

เฮอร์เดิลเทคโนโลยี เป็นหลักการหนึ่งที่ใช้สำหรับการเก็บรักษาอาหารซึ่งอาจจะใช้สารเคมีหรือกระบวนการใดก็ตามเพื่อยับยั้งกระบวนการเสื่อมสลายของอาหาร โดยใช้สำหรับควบคุมการเสื่อมสลายอาหารที่เกิดจากกระบวนการทางชีวภาพหรือจุลินทรีย์เท่านั้น สามารถแบ่งเฮอร์เดิลหรืออุปสรรคออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ด้วยกัน คือ (Leistner and Gould , 2002)

2.2.1 อุปสรรคทางกายภาพ (Physical impact) ได้แก่ กระบวนการใช้ความร้อน การควบคุมอุณหภูมิต่ำในระหว่างการเก็บรักษาวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ หรืออุณหภูมิในระหว่างการผลิต การใช้รังสีในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ การใช้พลังงานอิเลคโทรแมกเนติกส์ (Electromagnetic energy) การใช้ภาชนะบรรจุในการควบคุมจุลินทรีย์ เช่น การเก็บในสภาพสุญญากาศ การควบคุมบรรยากาศ หรือการดัดแปลงบรรยากาศ หรือแม้การใช้การบรรจุแบบปลอดจากเชื้อ (Aseptic packaging)

2.2.2 อุปสรรคทางเคมี และ/หรือ อุปสรรคทางกายภาพเคมี (Physico-chemical impact) ได้แก่ การควบคุมปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (Water activity, a_w) การควบคุมการเป็นกรดด่าง การควบคุมปฏิกิริยารีดอกซ์ในอาหาร (Redox potential, Eh) เช่น การใช้น้ำตาลหรือเกลือในการควบคุมแรงดันออสโมติกเพื่อปรับค่าน้ำอิสระในอาหารในผลิตภัณฑ์ การใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือก๊าซออกซิเจนร่วมกับการใช้สารเคมี การใช้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด การรมควัน การใช้สมุนไพรและเครื่องเทศในการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์

2.2.3 อุปสรรคจากตัวจุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ (Microbial impact or microbial derive products) อุปสรรคจากตัวจุลินทรีย์ เช่น จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติแต่เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการแข่งขันสูงกว่าจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสีย (Competitive flora) หัวเชื้อจุลินทรีย์ (Starter cultures) ซึ่งมีจุลินทรีย์อยู่ในปริมาณที่สูง เมื่อนำไปใส่ในอาหาร (Mass inoculation) ที่ต้องการบ่มให้ได้ผลิตภัณฑ์ เช่น ไวน์ จะทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถเจริญได้ต่อไป สารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมาแล้วมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น สารปฏิชีวนะ (Antibiotic) ไคโตซาน (Chitosan) และ โคลีน (Choline) เป็นต้น ซึ่งสารประกอบเหล่านี้อาจเป็นสารที่สร้างขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือเมื่อจุลินทรีย์ชนิดนั้นสิ้นสุดการเจริญเติบโตในอาหารนั้น ๆ แล้วก็เป็นได้ สารเหล่านี้ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถเจริญในอาหารชนิดนั้นได้ (สุมณฑา, 2541)

ตัวอย่างของการนำเฮอร์เดิลเทคโนโลยีมาประยุกต์ใช้ เช่น การประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมายองเนสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแต่อย่างใด แต่ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าความเป็นกรด - ด่าง ประมาณ 4.0-4.5 ซึ่งจัดอยู่ในประเภทอาหารที่เป็นกรดและอาจมีการเติมสารกันเสีย ดังนั้นค่าความเป็นกรด และสารกันเสียที่เติมในผลิตภัณฑ์จึงจัดเป็นปัจจัยเฮอร์เดิลที่สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ที่อาจปนเปื้อนใน

ผลิตภัณฑ์ได้ เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอาจมาจากไข่แดงผง ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญ หรือปนเปื้อนในระหว่างการผลิต และการบรรจุมายองเนสได้แก่เชื้อ *Salmonella spp., E. coli* และ *Staph. aureus* ซึ่งเชื้อแต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่ค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 4.5-9.0 , 4.4-9.0 และ 4.0-9.8 ตามลำดับ (Varnam, 1991)

โดยทั่วไปการผลิตอาหารให้มีคุณภาพดีเพื่อจำหน่ายในท้องตลาด สิ่งที่สำคัญคือ ต้องทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์หลงเหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์ในระดับต่ำที่สุด ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในด้านการยืดอายุการเก็บของอาหารที่ผลิตให้อยู่ได้นาน รวมถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค จำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการผลิตแล้วมักมีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมเริ่มต้นของแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต คุณภาพทางจุลชีววิทยาของวัตถุดิบ สุขลักษณะที่ดีในการผลิต นอกจากนี้การใช้บรรจุภัณฑ์ การขนส่ง และสภาพการเก็บผลิตภัณฑ์ต้องดีพอที่จะทำให้จุลินทรีย์คงอยู่ในปริมาณที่ต่ำ (อดิศร และคณะ, 2537)

2.3 กระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อน

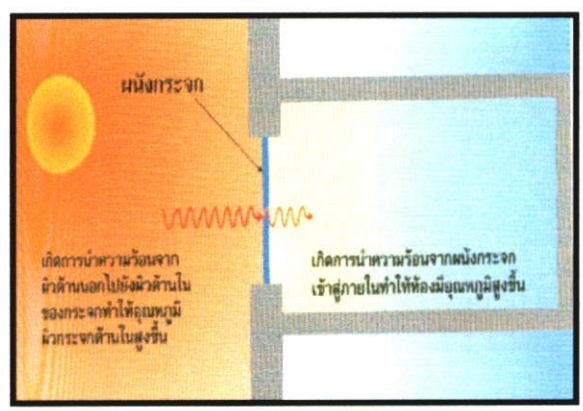
กระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อนเป็นวิธีที่สำคัญในการถนอมอาหาร มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อยับยั้งการเน่าเสียของอาหารและการสร้างสารพิษจากจุลินทรีย์ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงในระยะเวลานานจะสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ได้มีประสิทธิภาพกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำและเวลาสั้น อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงในช่วงเวลาสั้นๆ จะสามารถยืดอายุของผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำในระยะเวลานานและยังสามารถรักษากลิ่นรสและคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์นั้นไว้ได้ (วิไล, 2543)

2.3.1 การถ่ายเทความร้อน (Heat transfer)

การถ่ายเทความร้อนระหว่างวัตถุใดๆ สามารถเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่ออุณหภูมิของวัตถุทั้งสอง มีความแตกต่างกัน ซึ่งโดยปกติแล้วความร้อนจะถ่ายเทจากที่มีอุณหภูมิสูงไปยังที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าเสมอ ลักษณะการถ่ายเทความร้อนมี 3 วิธี คือ การนำความร้อน (Conduction) การพาความร้อน (Convection) และการแผ่รังสีความร้อน (Radiation) โดยอาจจะเกิดขึ้นจากวิธีใดวิธีหนึ่ง หรือหลายๆ วิธีพร้อมกันได้ อย่างไรก็ตามกระบวนการถ่ายเทความร้อนจะดำเนินไปจนกระทั่งเข้าสู่สมดุลทางความร้อน (Thermal equilibrium) และเมื่อเข้าสู่สมดุลทางความร้อนแล้ว กระบวนการถ่ายเทความร้อนจะไม่เกิดขึ้นอีกต่อไป เนื่องจากไม่มีความแตกต่างของอุณหภูมิแล้วนั่นเอง

2.3.2 การนำความร้อน (Conduction)

การนำความร้อน คือ ปรากฏการณ์ที่พลังงานความร้อนถ่ายเทภายในวัตถุหนึ่ง ๆ หรือระหว่างวัตถุสองชิ้นที่สัมผัสกัน โดยมีทิศ-ทางของการเคลื่อนที่ของพลังงานความร้อนจากบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงไปยังบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า การนำความร้อนเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นบนชั้นอะตอมของอนุภาค ในโลหะการนำความร้อนเป็นผลมาจากการเคลื่อนที่ของอิเลคตรอนอิสระ (คล้ายการนำไฟฟ้า) ในของเหลวและของแข็งที่มีสภาพการนำความร้อนต่ำเป็นผลมาจากการเคลื่อนที่ของอิเลคตรอนอิสระ (คล้ายการนำไฟฟ้า) ในของเหลวและของแข็งที่มีสภาพการนำความร้อนต่ำเป็นผลมาจากการสั่นของโมเลกุลข้างเคียง ในก๊าซการนำความร้อนเกิดขึ้นผ่านการสั่นสะเทือนระหว่างโมเลกุลหรือกล่าวคือการนำความร้อนเป็นลักษณะการถ่ายเทความร้อนผ่าน โดยตรงจากวัตถุหนึ่งไปยังอีกวัตถุหนึ่งโดยการสัมผัสกัน เช่น การเอามือไปจับกาน้ำร้อนจะทำให้ความร้อนจากกาน้ำถ่ายเทไปยังมือ จึงทำให้รู้สึกร้อน และการนำความร้อนผ่านผนังกระจก ดังภาพที่ 2.1 เป็นต้น



ภาพที่ 2.1 การเกิดการนำความร้อนผ่านผนังกระจก

ที่มา : http://www.region11.m-energy.go.th/mirror/mirror21.htm

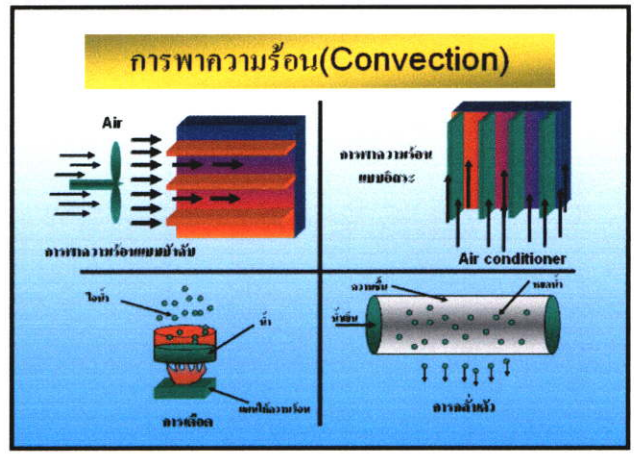
2.3.3 การพาความร้อน (Convection)

การพาความร้อน เป็นกระบวนการถ่ายเทพลังงานความร้อนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของมวลของของไหล เช่น อากาศ น้ำหรือ ไอน้ำ เมื่อมีของไหล(Fluid) สัมผัสกับพื้นที่ผิวของวัตถุใด ๆ ที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน จะเกิดการแลกเปลี่ยนความร้อนขึ้น ในสภาพธรรมชาติเมื่อของไหลถูกทำให้ร้อนจะสามารถเคลื่อนที่จากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่งได้ ทำให้เกิดการไหลเวียนพาความร้อน เพราะโมเลกุลที่เย็นและหนักกว่าจะตกลงข้างล่าง ส่วนโมเลกุลที่ร้อนและเบากว่าจะลอยตัวขึ้นหรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า การพาความร้อนเป็นลักษณะการถ่ายเทความร้อน โดยมีอากาศหรือลมเป็นสื่อกลาง ในการพาความร้อนจากวัตถุหนึ่งไปยังอีกวัตถุหนึ่งดังภาพที่ 2.2 เช่น พัดลมเป่าผม จะใช้ลมเป่าผ่านเครื่องทำความร้อน (Heater) ให้ลมพาความร้อนไปให้เส้นผม เป็นต้น

ลักษณะของการพาความร้อนที่เกิดขึ้นอาจขึ้นแบ่งออกได้ตามแรงที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของความร้อนในโมเลกุลของของไหลได้เป็น 2 ประเภท คือ

1) การพาความร้อนแบบอิสระ หรือโดยธรรมชาติ (Free or natural convection) เป็นการถ่ายเทความร้อนโดยอาศัยความแตกต่างของความหนาแน่นของของไหลเนื่องจากของไหล เมื่อได้รับความร้อน (อุณหภูมิสูงขึ้น) จะมีความหนาแน่นลดลงกว่าอากาศโดยรอบ ทำให้เกิดการลอยตัวสูงขึ้น เช่น ควันที่ลอยขึ้นจากปล่องไฟ

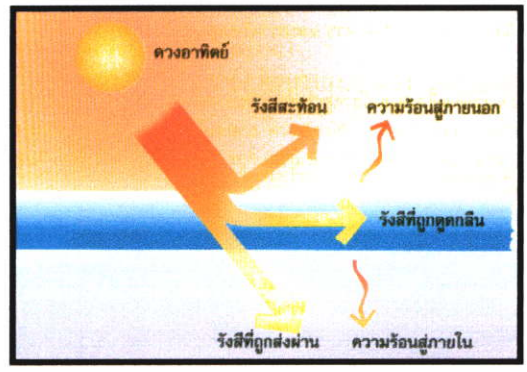
2) การพาความร้อนแบบบังคับ เป็นการถ่ายเทความร้อนโดยใช้แรงภายนอกมาทำให้ของไหลเคลื่อนที่ผ่านพื้นผิวของแข็งที่มีอุณหภูมิต่างกันไปในทิศทางที่กำหนดไว้ เช่น แรงจากปั๊มหรือพัดลม



ภาพที่ 2.2 การพาความร้อน
ที่มา : ทวีวัฒน์ (2539)

2.3.4 การแผ่รังสีความร้อน (Radiation)

การแผ่รังสีความร้อนเป็นการถ่ายเทพลังงานความร้อนทะลุผ่านช่องว่างใด ๆ ในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic waves) จากพื้นผิวของวัตถุที่มีอุณหภูมิสูงกว่าไปยังพื้นผิวของวัตถุที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าในทุกทิศทุกทาง ในความเป็นจริงแล้วการเกิดการแผ่รังสีอย่างแท้จริงของความร้อนระหว่างวัตถุใดๆ จะไม่ทำให้อุณหภูมิของตัวกลางที่ความร้อนนั้นผ่านเพิ่มสูงขึ้น เมื่อรังสีนี้ไปตกกระทบวัตถุใดๆ บางส่วนอาจสะท้อน บางส่วนอาจจะ ส่งผ่านทะลุไปบางส่วนอาจ ถูกดูดกลืนไว้และถ้ารังสีตกกระทบคือ รังสีความร้อนรังสีที่ถูกดูดกลืนไว้จะปรากฏเป็นความร้อนภายในวัตถุนั้น ดังตัวอย่างการแผ่รังสีความร้อนจากดวงอาทิตย์ (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 การดูดกลืน การสะท้อนและการส่งผ่านรังสี

ที่มา : http://www.region11.m-energy.go.th/mirror/mirror21.htm

การแบ่งชนิดของอาหารตามลักษณะการถ่ายเทความร้อนและการบรรจุของอาหารกระป๋องสามารถแบ่งได้ดังนี้ (บุษกร, 2547)

1. ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบการพาอย่างรวดเร็วตลอดระยะเวลาการให้ความร้อน เช่น น้ำผัก น้ำผลไม้ นม ผลไม้บรรจุในน้ำเชื่อม ผักบรรจุในน้ำเกลือ เนื้อสัตว์บรรจุในน้ำเกลือ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ ถ้ามีชิ้นใหญ่จะมีการพาความร้อนช้าลง

2. ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบการพา แต่ช้ากว่าแบบแรก เช่น ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ หรือเนื้อสัตว์ที่บรรจุแน่นขึ้น ทำให้มีน้ำซึ่งเป็นตัวพาความร้อนลดลง

3. ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนเปลี่ยนจากการพาความร้อน เป็นการนำความร้อนในระหว่างการฆ่าเชื้อ เช่น น้ำมะเขือเทศ ซุปบางชนิด หรืออาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบอยู่มาก

4. ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบการนำตลอดกระบวนการ เช่น ครีมซุป ผลิตภัณฑ์ในซอสข้น แยม คอร์นบีฟ และแซนวิชสเปรด เป็นต้น

5. ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบการนำ แล้วเป็นการพาความร้อนในช่วงหลังของการให้ความร้อน พบได้ในอาหารที่มีการสลายของเจล เช่น พุดดิ้ง และน้ำมะเขือเทศบางชนิด

กระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อนมีหลายวิธีขึ้นกับวัตถุประสงค์การกำหนดคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์นั้นๆ โดยแบ่งตามวิธีการให้ความร้อน มี 2 วิธีคือการให้ความร้อนแบบแห้ง (Dry heat) เป็นการให้ความร้อนโดยไม่อาศัยน้ำเป็นตัวกลางในการพาความร้อน แต่จะอาศัยการถ่ายเทความร้อนแบบอื่น เช่นการนำความร้อน หรือการแผ่รังสีความร้อน และการให้ความร้อนแบบเปียก (Moist heat) ซึ่งเป็นการให้ความร้อนโดยอาศัยน้ำเป็นตัวกลางพาความร้อนสู่ชิ้นอาหาร

2.4 วิธีการถนอมอาหารโดยการใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนในการถนอมอาหาร หมายถึง การใช้อุณหภูมิสูง เพื่อช่วยถนอมอาหาร โดยความร้อนจะทำลายจุลินทรีย์ที่ให้โทษและทำให้อาหารเสื่อมเสีย เอนไซม์ สารพิษและแมลงต่าง ๆ ที่ไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ โดยการถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนสามารถกระทำได้ 2 วิธี คือ การพาสเจอร์ไรส์ (Pasteurization) และ การสเตอริไลซ์ (Sterilization)

2.4.1 การพาสเจอร์ไรส์

เป็นวิธีการถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูงนักโดยมุ่งทำลายแบคทีเรียพวกที่ไม่สร้างสปอร์และก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ (Pathogenic bacteria) ส่วนจุลินทรีย์ที่อื่น ๆ ที่ทนความร้อนของการพาสเจอร์ไรส์นี้ได้จะทำให้อาหารเสีย ดังนั้นอาหารที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ต้องอาศัยความเย็นช่วยในการเก็บรักษา

กระบวนการพาสเจอร์ไรส์ทำได้ 2 ระบบ คือ

2.4.1.1 ระบบอุณหภูมิต่ำเวลานานหรือ LTLT (Low temperature long time) เป็นระบบที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที เป็นวิธีที่ง่ายสามารถทำได้ในระดับครัวเรือน โดยวิธีการพาสเจอร์ไรส์มักนำมาใช้กับอาหารในกรณีต่อไปนี้(พวงพร, 2534)

1). ถ้าอาหารได้รับความร้อนในอุณหภูมิระดับสูงแล้ว คุณภาพของอาหารจะเสียไป โดยเฉพาะคุณภาพทางด้านกลิ่นรส

2). มีจุดประสงค์ฆ่าเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ

3). จุลินทรีย์ที่เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียมีการต้านทานความร้อนไม่สูงนัก

4). มีจุดประสงค์ฆ่าเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีการต้านทานความร้อนต่ำเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหาร แล้วทำให้จุลินทรีย์ที่ใส่ลงไปเป็นสตาร์ทเตอร์ (Starter) ในกระบวนการต่าง ๆ เจริญเติบโต และทำให้เกิดกระบวนการหมัก (Ferment)ได้เร็ว

5). สามารถควบคุมไม่ให้จุลินทรีย์ที่คงเหลืออยู่หลังการพาสเจอร์ไรส์เจริญเติบโต หรือทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงด้วยกรรมวิธีถนอมอาหารอื่น เช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ การใช้สารเคมี การบรรจุภายในภาชนะที่ปิดสนิทและภายในมีสภาพไม่มีอากาศ

2.4.1.2 ระบบอุณหภูมิสูงเวลาสั้นหรือ HTST (High temperature short time) เป็นระบบที่ให้ความร้อนในระดับสูงแต่ใช้เวลาสั้น เช่น ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที แล้วทำให้เย็นลงโดยเร็ว มักเป็นระบบต่อเนื่องโดยให้อาหารเหลว เช่น น้ำนม น้ำผลไม้ ไหลผ่านแผ่นแลกเปลี่ยนความร้อนในช่วงระยะเวลากำหนดตามชนิดของผลิตภัณฑ์

2.4.2 การสเตอริไรส์

เป็นวิธีการถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าการพาสเจอร์ไรส์ เพื่อทำลายสิ่งมีชีวิตทั้งหลายรวมทั้งสปอร์ของจุลินทรีย์ให้หมดไป แต่ในทางอุตสาหกรรมอาหารสามารถทำได้เพียงให้ความร้อนที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและทำให้ผู้บริโภคปลอดภัยเมื่อบริโภคอาหารนั้นภายใต้สภาวะการเก็บรักษาและขนถ่าย โดยปกติปริมาณความร้อนที่ใช้ในระดับนี้เรียกว่า การฆ่าเชื้อที่ใช้ในทางการค้า (Commercial sterilization) ซึ่งเพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์และสปอร์ที่ทนความร้อนมากที่สุด อาหารที่ได้จากการสเตอริไรส์ถือได้ว่าเป็นอาหารที่ปลอดเชื้อ (Commercial sterilized food) สามารถเก็บได้นานโดยไม่ต้องเก็บในห้องเย็น เช่น การทำอาหารกระป๋อง การสเตอริไรส์น้ำนมวัวโดยกระบวนการยูเอชที (UHT- ultra high temperature) นิยมใช้อุณหภูมิ 135–150 องศาเซลเซียส นาน 1-4 วินาที ซึ่งมีวิธีให้ความร้อนกับอาหารได้ 2 แบบ คือทางตรง (Direct type) เป็นการใช้ไอน้ำร้อนเป็นตัว กลางให้ความร้อน โดยฉีดลงไปผสมกับอาหารโดยตรง แล้วจึงผ่านไปยังเครื่องระเหยน้ำส่วนที่เกินออกไปโดยทำภายใต้สุญญากาศ และอีกแบบ คือ ทางอ้อม (Indirect type) เป็นการให้ความร้อนผ่านแผ่นแลกเปลี่ยนความร้อนเหมือนกับการพาสเจอร์ไรส์ แต่อุณหภูมิสูงกว่า (ปรียา, 2528)

2.5 การควบคุมเชื้อจุลินทรีย์โดยให้ความร้อน

การใช้ความร้อนมีจุดประสงค์เพื่อทำลายเซลล์และสปอร์ของจุลินทรีย์ทั้ง รา ยีสต์ และแบคทีเรียรวมทั้งไวรัส ที่ปนเปื้อนในอาหาร ซึ่ง Gould (1989)ได้สรุปผลของความร้อนต่อการทำลายและการบาดเจ็บของจุลินทรีย์โดยอุณหภูมิในระดับที่ทำลายจุลินทรีย์ (Lethal temperature) ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลาย ในขณะที่อุณหภูมิที่ระดับต่ำกว่า (Sub-lethal temperature) จะทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ นอกจากนี้ยังสรุปว่าการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อนแบบแห้ง (Dry heat) เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Oxidation) ของสารประกอบภายในเซลล์ ส่วนความร้อนแบบเปียก (Moist heat) จะเกิดการตกตะกอนและสูญเสียกิจกรรมของโปรตีนซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญต่อการอยู่รอดและโครงสร้างโปรตีนในเซลล์ (สุมาลี , 2539)

ดังนั้นการใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารต้องพิจารณาระดับอุณหภูมิและปริมาณความร้อนที่ใช้ ซึ่งจะต้องศึกษาถึงความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ (Heat resistance) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่นอัตราการแทรกผ่านความร้อน (Heat penetration rate) ไปยังจุดที่ร้อนช้าที่สุด เวลาในการให้ความร้อน การกระจายความร้อน (Heat distribution) และการถ่ายเทความร้อน (Heat transfer) (Tucker และ Philip, 2001)

กลไกการทำลายจุลินทรีย์ ความร้อนสามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเซลล์และสปอร์ของจุลินทรีย์ได้ดีเพียงใด ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ แม้ว่าเซลล์ของจุลินทรีย์จะไม่ถูกทำลายความร้อนจะยับยั้งการเจริญของเซลล์ทำให้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ เนื่องจากกลไกต่างๆ ภายใน

เซลล์ถูกทำลายไป ผนังเซลล์ (Cell wall) และเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ไม่สามารถควบคุมการไหลเข้าออกของสารได้ DNA, RNA และเอนไซม์ภายในเซลล์ไม่สามารถทำงานได้เป็นปกติ สปอร์ของแบคทีเรียจะถูกทำลายได้ง่ายขึ้นเนื่องจากเยื่อหุ้มสปอร์ถูกทำให้เปลี่ยนแปลง และเซลล์ที่อยู่ภายในไม่สามารถใช้น้ำในการงอก จะเห็นได้ว่าความร้อนมีผลต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ในหลายกรณี จึงถือได้ว่าเป็นวิธีการควบคุมจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมากวิธีหนึ่ง ในบางกรณีถ้าเซลล์ถูกความร้อนที่ 45-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสั้นๆ เช่น การให้ความร้อนกับอาหารจำนวนมาก เซลล์เหล่านี้อาจสร้าง Heat shock proteins (Stress protein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่จะทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์สามารถทนความร้อนได้ดีขึ้น ดังนั้น การทำลายจุลินทรีย์โดยใช้อุณหภูมิต่ำในเวลาสั้นเกินไป ถือว่าเป็นวิธีที่ไม่ถูกต้อง (บุษกร, 2547)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์

การใช้ความร้อนในการถนอมอาหาร การเป็นการทำลายจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตได้ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละชนิดมีสมบัติและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันที่จะเอื้อให้จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ เมื่อนำผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านั้นไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อน พบว่าอาจมีจุลินทรีย์บางชนิดเหลือรอด เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านทานความร้อนแตกต่างกัน โดยคุณสมบัติการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดและองค์ประกอบของอาหาร ความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาล ชนิดของจุลินทรีย์ อุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนที่แตกต่างกัน แบคทีเรียสามารถสร้างโปรตีนที่สามารถต้านทานความร้อนในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการมีชีวิตอยู่ (Golden และคณะ, 1998) แต่อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนในระดับสูง หรือการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำในระยะเวลานานทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างกลไกการต้านทานความร้อนได้ (Jay, 1992) ซึ่งการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ขึ้นกับปัจจัย ดังนี้ (บุษกร, 2547)

2.6.1 ส่วนประกอบของอาหารที่มีผลต่อความต้านทานต่อความร้อน

องค์ประกอบต่าง ๆ ของอาหารได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ตัวถูกละลาย สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เป็นต้น และคุณสมบัติในตัวอาหารที่แตกต่างกัน เช่นค่าปริมาณน้ำอิสระ ค่าพีเอช องค์ประกอบต่างๆมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ ๆ ดังนี้ (วิไล, 2543)

- น้ำตาล จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะต้านทานความร้อนได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสภาวะของจุลินทรีย์ อันเนื่องมาจากการช่วยลดค่าปริมาณน้ำอิสระนั่นคือ น้ำตาลทำให้ปริมาณน้ำในโพรโทพลาสซึม (Protoplasm) ของเซลล์ลดลงจึงช่วยป้องกันโปรตีนไม่ให้เสียสภาพเนื่องจากความร้อน
- เกลือ ความสามารถในการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีเกลือขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือ (ทนง, 2524) โดย Helmy และคณะ (1975) พบว่าเมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staph. aureus* ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

การเพิ่มความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในองค์ประกอบของน้ำตาลและเกลือสืบเนื่องจากการลดลงของค่า ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร หรือค่า a_w (บุษกร, 2547) ที่ทำให้เซลล์สูญเสียน้ำหรือเรียกว่าเกิด Plasmolysis จุลินทรีย์จะสร้างกลไกการปรับตัวโดยเซลล์จะเลือกรับตัวถูกละลาย (Solute) จากภายนอกและจะพยายามสร้างตัวทำละลายชนิดใหม่หรือรวบรวมตัวถูกละลายให้เข้มข้นขึ้นเพื่อให้เกิดความสมดุลย์ (ทนง, 2524) และการลดลงของค่าปริมาณน้ำอิสระในอาหาร จะช่วยป้องกันโปรตีนไม่ให้เสียสภาพได้ (นิศานาถ , 2543)

- ไขมัน ในอาหารที่มีไขมันสูงจะทำให้อาหารนั้น ๆ มีความสามารถในการนำความร้อนต่ำ ค่าความจุความร้อนต่ำและมีความชื้นน้อยทำให้ไขมันทำหน้าที่ในการป้องกันจุลินทรีย์จากความร้อน จุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารที่มีไขมันจะทนความร้อนได้มากกว่า เมื่ออยู่ในน้ำ เมื่อปริมาณไขมันในอาหารเพิ่มขึ้น การใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์ในน้ำมันมีความคล้ายคลึงกับการทำสเตอริไรส์แบบความร้อนแห้ง (Dry heat sterilization) ซึ่งต้องใช้ความร้อนสูงกว่าการใช้ความร้อนเปียก (Moist heat sterilization) (บุษกร, 2547)
- แป้ง โปรตีน และเครื่องเทศ แป้ง ไม่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ แต่ถ้าจุลินทรีย์มีโอกาสเจริญเติบโตในอาหารที่มีแป้งจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารที่ปราศจากแป้ง ส่วนสารประเภทโปรตีนพบว่าช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ได้ดี แต่น้ำมันในเครื่องเทศและเครื่องปรุงรส เช่น มัสตาร์ด กานพลู หอม พริกไทย และกระเทียม ทำให้การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ลดลง

นอกจากนี้ขนาดของชิ้นอาหาร น้ำหนักบรรจุ การเรียงตัวของอาหารมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ หากชิ้นอาหารขนาดใหญ่ จะใช้เวลาในการฆ่าเชื้อนานกว่าชิ้นขนาดเล็ก และถ้าน้ำหนักบรรจุมากเกินไป ทำให้อัตราการแทรกผ่านความร้อนลดลง จึงต้องให้ความร้อนที่นานขึ้นจึงสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ และลักษณะของอาหารที่จะให้ความร้อนมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ หากอาหารที่มีซอกมุมหรือพื้นผิวไม่เรียบ อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของไอน้ำที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์เนื่องจากจุลินทรีย์อาจซ่อนอยู่ที่ผิวของอาหาร

2.6.2 ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ในอาหาร

ปกติจุลินทรีย์จะทนความร้อนได้ดีที่สุดในอาหารที่มีช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง ถ้าอาหารมีความเป็นกรดหรือด่างเพิ่มขึ้นจุลินทรีย์จะทนความร้อนได้น้อยลง (Farber and Pagotto, 1992) การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ในทางที่เป็นกรดมากขึ้นจะทำลายจุลินทรีย์ได้มากกว่าเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยทั่วไปจึงใช้ความร้อนฆ่าจุลินทรีย์ทนอาหารที่เป็นกรดไม่มากนัก นอกจากนี้ในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง สามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์อื่น เช่น ยีสต์ หรือเอนไซม์ที่ทนความร้อนเป็นตัวกำหนดเวลาในการให้ความร้อน โดยวัตถุประสงค์การให้ความร้อนในอาหารที่เป็นกรดสูง (ค่าความเป็นกรด - ด่างน้อยกว่า 3.7) คือ เป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยเงื่อนไขการให้ความร้อนจะรุนแรงน้อยกว่าอาหารที่มีค่าความเป็น กรด-ด่างเป็นกลาง

2.6.3 ชนิดของจุลินทรีย์

สปอร์ของแบคทีเรียสามารถทนความร้อนได้ดีที่สุด รองลงมาคือเซลล์แบคทีเรีย (Vegetative cell) ราและยีสต์ตามลำดับ (บุษกร, 2547) และแบคทีเรียรูปกลมทนความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียรูปท่อน แบคทีเรียที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิสูงจะทนความร้อนได้สูง และแบคทีเรียที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรือที่สร้างแคปซูลจะทนความร้อนได้สูงกว่าแบคทีเรียที่อยู่เดี่ยว ๆ หรือแบคทีเรียที่ไม่สร้างแคปซูล (ปรียา, 2528) Heid and Joslyn (1967) พบว่าระยะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีผลต่อการต้านทานความร้อน โดยจุลินทรีย์จะต้านทานความร้อนได้ดีที่สุดในระยะสเตชันนารี (Stationary phase) รองลงมาคือช่วงแลก (Lag phase) ซึ่งเป็นช่วงพักตัวก่อนเริ่มการเจริญเติบโต และจุลินทรีย์จะทนความร้อนได้น้อยที่สุดในช่วงลอการิทึม (Logarithmic phase)

2.6.4 ระดับความร้อน

ความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับระดับความร้อนที่ให้แก่อาหาร โดยกระบวนการให้ความร้อนมี 3 ระดับดังนี้ (สุมาลี , 2539)

1. การให้ความร้อนอุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส หรือเรียกว่าพาสเจอร์ไรส์ การให้ความร้อนดังกล่าวจะทำลายจุลินทรีย์กลุ่มที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำ และจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้งแบคทีเรียพวกที่ไม่สร้างสปอร์ ดังนั้นจึงยังคงมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเซลล์หรือสปอร์ที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส หลงเหลืออยู่และสามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นอาหารที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์จะต้องแช่เย็น เพื่อควบคุมการเติบโตของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต หรืออาจยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การใช้บรรยากาศดัดแปลงในการบรรจุหรือเก็บอาหาร หรือการใช้สารถนอมอาหาร การลดค่า a_w Frazier and Westhoff (1988) พบว่าการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลาน้อยกว่า 30 นาทีจะไม่สามารถทำลายเอนไซม์และสารพิษที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนได้

2. การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิน้ำเดือดจะเพียงพอในการทำลายจุลินทรีย์กลุ่มไม่สร้างสปอร์ แต่ไม่เพียงพอในการทำลายสปอร์ของแบคทีเรียบางชนิด (วราวุฒิ, 2539) การใช้ความร้อนระดับนี้พบในการฆ่าเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกผัก ผลไม้กระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ เนื่องจากการใช้ความร้อนที่สูงเกินไปจะทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป

3. การใช้ความร้อนอุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส หรือเรียกว่าการสเตอริไรส์เป็นการถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าการพาสเจอร์ไรส์ซึ่งความร้อนระดับนี้สามารถทำลายจุลินทรีย์ทุกชนิด

2.7 การถนอมอาหารโดยใช้อุณหภูมิต่ำ

จุดประสงค์หลักของการใช้อุณหภูมิต่ำในการควบคุมจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันหรือลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์โปรติเนสและไลเปส ที่ทนความร้อน แม้ว่า อุณหภูมิต่ำอาจทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลงถึงร้อยละ 90 แต่ก็ไม่สามารถกำหนดได้อย่างแน่นอนเหมือนค่า D และ Z value ที่ได้จากการใช้ความร้อน ดังนั้นการใช้อุณหภูมิต่ำ อาจทำให้จุลินทรีย์บางส่วนยังมีชีวิตอยู่ โดยเฉพาะสปอร์ของแบคทีเรียจะไม่ถูกทำลายโดยการใช้ความเย็น (บุษกร, 2547)

การถนอมอาหารโดยใช้อุณหภูมิต่ำแบ่งออกเป็น2 กลุ่ม ดังนี้ (ปรียา, 2528)

2.7.1. การถนอมอาหารโดยใช้อุณหภูมิสูงกว่าจุดเยือกแข็ง แบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่

2.7.1.1 การเก็บแบบชิลลิง (Chilling storage) มีอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ใช้เก็บ เนื้อ ไก่ ไข่ และอาหารทะเลเป็นต้น การแช่เย็นอาหารมี 2 วิธี คือ การแช่น้ำแข็ง และการแช่เย็นในตู้เย็น ซึ่งการแช่น้ำแข็ง (Ice chilling) เป็นวิธีที่ใช้ในร้านขายของปลีกที่มีการเก็บอาหารไว้บนก้อนน้ำแข็ง ผิวอาหารที่สัมผัสกับน้ำแข็งจะมีอุณหภูมิระหว่าง 0-1 องศาเซลเซียส อาหารที่นิยมเก็บโดยวิธีนี้ เช่น ปลาสด อาหารทะเลสด เนื้อสด ผลไม้ที่ปอกเปลือกแล้ว ผักสลัดที่บรรจุในถุง น้ำสลัด (ที่มีค่าความเป็นกรด - ด่างสูงแต่มีแคลอรีต่ำ) การเก็บอาหารโดยวิธีนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ไม่แน่นอน(เนื่องจากขนาดของภาชนะหรือมีการละลายของน้ำแข็ง) ในระหว่างการเก็บอาหารสดเป็นเวลาหลายวันอาจมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนข้าม (Cross-contamination) ระหว่างอาหารชนิดหนึ่งไปยังอาหารอีกชนิดหนึ่ง ส่วนการแช่เย็นในตู้เย็นหรือห้องเย็น (Refrigeration) ปัจจุบันใช้ที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส อาหารที่เสี่ยงต่อการเน่าเสียได้ง่ายต้องแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4.4 องศาเซลเซียส นมและผลิตภัณฑ์นมที่เป็นของเหลวควรเก็บโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิน้อยกว่า 5 องศาเซลเซียส เพราะที่อุณหภูมินี้เชื้อ *Staph. aureus* จะไม่มีการเจริญเติบโต (ICMSF, 1988) อาหารที่ขายทั่วไปต้องเก็บที่อุณหภูมิ

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

1 องศาเซลเซียส เช่น เนื้อสด และปลาสด นอกจากนี้ยังมีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์และบรรยากาศที่เก็บอาหารด้วย การเก็บอาหารดิบ และอาหารผ่านการปรุงที่ทำจากเนื้อสัตว์และพืชผัก ในตู้เย็นอาจเก็บได้นานกว่า 60 วัน อาหารแช่เย็นมีอายุการเก็บนาน โดยใช้รวมกับวิธีการถนอมอาหารอื่น ๆ แต่อาหารยังคงมีเชื้อ แม้ว่าจะมีเชื้อในอาหารต่ำ (น้อยกว่า 1 เซลล์ต่อกรัม) เชื้อสามารถเติบโตได้จนมีปริมาณที่ทำอันตรายต่อคนหรือทำให้อาหารเน่าเสียได้ เมื่ออุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลง หรืออุณหภูมิแช่เย็นไม่ต่ำพอ (ICMSF, 1998) หรือมีการรั่วของภาชนะที่เก็บอาหารแบบสุญญากาศหรือบรรยากาศดัดแปลงที่ใช้เก็บอาหารไม่เหมาะสม จะมีผลให้จุลินทรีย์เติบโตเพิ่มขึ้น ทำให้อาหารเน่าเสียถ้าไม่ควบคุมให้ดีพอ

2.7.1.2 การเก็บแบบเซลลาร์ (Cellar storage) ใช้อุณหภูมิ 10-20 องศาเซลเซียส หรือประมาณ 15 องศาเซลเซียส ในการเก็บอาหารประเภทผักและผลไม้

2.7.2 การถนอมอาหารโดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง หรือ การแช่เยือกแข็ง ปกติใช้อุณหภูมิต่ำกว่า -10 องศาเซลเซียส เพื่อให้น้ำที่อยู่ในอาหารกลายเป็นน้ำแข็ง วิธีนี้สามารถเก็บอาหารไว้ได้นานเป็นปี แบ่งเป็น 2 วิธีดังนี้

2.7.2.1 การแช่เยือกแข็งแบบช้า (Slow freezing) เป็นวิธีการทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็งอย่างช้า ๆ โดยใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 3-72 ชั่วโมง หรือ 3 วัน เช่น การแช่อาหารในช่องทำน้ำแข็ง (Freezer) ของตู้เย็นที่ใช้กันทั่วไปตามบ้านเรือน วิธีแช่เยือกแข็งแบบนี้ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในอาหารจะมีขนาดใหญ่ จะทำลายผนังเซลล์ของอาหารที่แช่แข็งจนฉีกขาด ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของอาหาร เมื่อนำอาหารไปละลายน้ำแข็ง (Thawing) อาหารจะมีลักษณะชุ่มน้ำ เนื่องจากของเหลวในอาหารจะไหลออกมาประกอบด้วยสารอาหาร วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ

2.7.2.2 การแช่เยือกแข็งแบบรวดเร็ว (Quick freezing หรือ Fast freezing) เป็นวิธีการทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว โดยใช้อุณหภูมิต่ำ -17.8 ถึง -45.6 องศาเซลเซียส และใช้เวลาไม่เกิน 30 นาที วิธีนี้จะเกิดน้ำแข็งที่มีผลึกเล็กโดยจะไม่ทำลายเซลล์อาหารมาก การแช่เยือกแข็งแบบเร็วทำได้หลายวิธี เช่น การจุ่มอาหารลงในสารเคมีโดยตรง (Direct immersion) ซึ่งสารเคมีนั้นจะต้องไม่เป็นสารพิษ มักได้แก่ สารละลายเกลือ น้ำตาล เป็นต้น

2.8 จุลินทรีย์ในอาหารแช่เย็น

อุณหภูมิต่ำที่สุดที่จุลินทรีย์ในกลุ่มมีโซฟายล์ (Mesophiles) สามารถเจริญเติบโตได้ คือ 10 องศาเซลเซียส แต่ในการแช่เย็นอาหารมักใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ในอาหารแช่เย็นเชื้อมีโซฟายล์บางชนิดเป็นพวกไซโครโทรฟ (Psychrotroph) ที่สามารถเติบโตได้ในอาหารแช่เย็น (ปรียา,2528)

จุลินทรีย์สำคัญที่พบในอาหารแช่เย็น คือ ไซโครฟายล์ (Psychrohiles) เป็นเชื้อที่เติบโตในที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส แม้จุลินทรีย์ในกลุ่มมีโซฟายล์ และ ไซโครฟายล์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ แต่เมื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงอีก เชื้อเหล่านี้จะยิ่งเจริญเติบโตได้ช้าลง กระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์โดยใช้เอนไซม์และอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะสูงสุด เมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิเหมาะสมที่สุดในการเจริญ เมื่ออุณหภูมิลดลงกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะลดลง โดยปกติระยะเวลาที่เชื้อใช้ในการแบ่งเซลล์ (Generation time) จะเพิ่มเป็น 2 เท่า ทุก ๆ อุณหภูมิที่ลดลง 10 องศาเซลเซียส เช่น เชื้อมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทุก ๆ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เมื่อลดอุณหภูมิลงเหลือ 12 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการแบ่งตัวเพิ่มเป็นเวลา 120 นาที และเมื่อลดอุณหภูมิลงเป็น 2 องศาเซลเซียส เชื้อต้องใช้เวลาในการแบ่งตัวเพิ่มเป็น 240 นาที (ปรียา,2528)

2.8.1 อุณหภูมิต่ำมีผลต่อจุลินทรีย์ดังนี้

1. การทำงานของเอนไซม์ในจุลินทรีย์ลดลง เนื่องจากอุณหภูมิลดลง ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลงด้วย โดยเฉพาะเอนไซม์โปรติเนส และ ไลเปสที่ทนความร้อน เมื่อเอนไซม์ถูกทำลายโปรตีนในเซลล์ของจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปโดยเกิดการตกตะกอนองค์ประกอบต่าง ๆ ของผนังเซลล์ รวมทั้งเยื่อบุเซลล์ได้รับบาดเจ็บ สายของ DNA เกิดการแตกหัก ทำให้ RNA เกิดการเปลี่ยนแปลงด้วย ซึ่ง Tyski และคณะ (1983) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Staph. aureus* คือที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส

2. อุณหภูมิต่ำทำให้น้ำในอาหารกลายเป็นน้ำแข็งโดยปริมาณน้ำในอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้มีปริมาณลดลง โดย a_w ของอาหารลดลงมีผลให้จุลินทรีย์ขาดอาหารและอาจตายได้ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดจะทำลายเซลล์ โดยทำให้ผนังเซลล์และเยื่อบุเซลล์เกิดการฉีกขาด ส่งผลให้สารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ไหลออกมานอกเซลล์ ซึ่งในที่สุดจุลินทรีย์จะไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

การยืดอายุการเก็บรักษาอาหารให้ยาวนานขึ้นมีหลายวิธี แตกต่างกันออกไป ขึ้นกับชนิดของอาหาร ผักและผลไม้สดส่วนใหญ่มักเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10-20 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า เพื่อลดอัตราเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ที่อุณหภูมินี้ยีสต์และเชื้อราสามารถเจริญได้ จึงต้องลดความชื้นสัมพัทธ์เพื่อการป้องกันความชื้นที่ผิวอาหาร ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการลดการเจริญของ

จุลินทรีย์ลง ผลิตภัณฑ์อาหารที่เน่าเสียง่ายมักถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส โดยใช้ร่วมกับการถนอมอาหารวิธีอื่น

2.8.2 ปัจจัยที่พบว่ามีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในการแช่เย็นอาหาร ได้แก่

- เชื้อบางชนิดที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพวกไซโครฟายล์ แต่ส่วนใหญ่จะไม่เติบโตหรือสร้างสารพิษในที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 4.4 องศาเซลเซียส ในที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 1.7 องศาเซลเซียส ไม่พบการเติบโตของเชื้อประเภทนี้

- องค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารได้แก่ สารอาหาร พีเอช a_w และการมีสารยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น สารกันเสียที่มีอยู่ในอาหาร ส่งผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์

- อาหารที่มีปริมาณเนื้ออาหารสูง เช่น มีโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมันสูง แต่มีไอออนต่ำ จะมี ค่าความเป็นกรด - ด่างประมาณ 7.0 มี a_w สูง และไม่มีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เอื้อให้เชื้อเติบโต ทำให้เชื้อรอดชีวิตได้ในอุณหภูมิตู้เย็น รวมทั้งทำให้เชื้อบาดเจ็บลดลง อายุการเก็บของอาหารแช่เย็นจะเพิ่มขึ้น

- ภายใต้ความดันบรรยากาศปกติ น้ำบริสุทธิ์ที่ 0 องศาเซลเซียส จะกลายเป็นน้ำแข็ง หากลดอุณหภูมิลงต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส น้ำจะกลายเป็นน้ำแข็งอย่างรวดเร็วจึงเป็นการลดค่า a_w ลงต่ำกว่าที่แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเติบโตได้

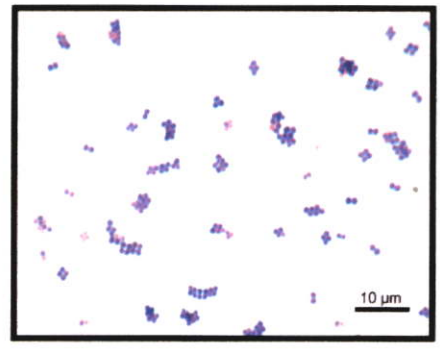
- เซลล์ของเชื้อมีโซฟายล์และเทอร์โมฟายล์บางชนิด อาจได้รับบาดเจ็บหรือตายเมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 4.4 องศาเซลเซียส

- การเปลี่ยนแปลง ของอุณหภูมิต่ำที่ใช้เก็บอาหาร มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น ทำให้เชื้อบาดเจ็บและตาย การขึ้น - ลง ของอุณหภูมิ จาก 4.4 เป็น 10-12 องศาเซลเซียส ไม่เพียงแต่ไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อแบคทีเรียประเภทไซโครโทรฟ และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย แต่จะทำให้เชื้อแบคทีเรียประเภทมีโซฟายล์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และแบคทีเรียก่อโรคเติบโต และมีการงอกของสปอร์ในช่วงอุณหภูมินั้น ๆ

2.9 เชื้อ *Staphylococcus aureus*

เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะกันด้วยสายสั้น ๆ เป็นกิ่งหรือเป็นลักษณะพวงองุ่น เป็นแบคทีเรียแกรมบวกบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่เป็นโปรตีนซึ่งทนต่อความร้อนได้ดี และเป็นสาเหตุให้เกิดอาการเจ็บป่วยในมนุษย์ ซึ่งโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Staphylococcus* นั้นมีชื่อเรียก คือ Staphyloenterotoxicosis, Staphyloenterotoxemia เหล่านี้เป็นชื่อของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Staph. aureus* ซึ่งเมื่อนำเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* ที่พบในฝีหนองแล้วนำมาย้อมแกรม และนำมาขยายโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบลักษณะดังแสดงในภาพที่ 2.4 และ 2.5

ภาพที่ 2.4 ภาพขยายจากกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus*
ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/staph.html



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของเชื้อ *Staph. aureus* ในฝีหนอง เมื่อนำมาย้อมแกรม
ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/staph.html

2.9.1 ประวัติและและการเกิดโรคของเชื้อ *Staph. aureus*

Pan และคณะ (1997) พบว่าการเกิดโรคระบาดจากอาหารเป็นพาหะส่วนใหญ่มักเกิดในฤดูร้อนมากถึงร้อยละ 80 โดยที่ *B. Cereus* และ *Staph. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในประเทศแถบร้อน เป็นแบคทีเรียที่มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารโดยเฉพาะอาหารประเภทแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก และเมื่อสภาพการเก็บรักษาเอื้ออำนวยให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวน *B. cereus* และ *Staph. aureus* จำนวนสูงเกินมากกว่า 10^5 โคโลนีต่อกรัม สามารถผลิตสารพิษ (ประเภทเอนเทอโรซิน) ทำให้เกิดอาการ Diarrhea syndrome และ Emeticsyndrome ได้ (Anderson และคณะ, 1995; Jay, 1996)

เชื้อ *Staph. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ เซลล์มีความทนทานมากและสามารถอยู่รอดในสภาวะแห้งแล้งได้นาน แหล่งของเชื้อ *Staph. aureus* จึงพบทั่วไปในอากาศ ฝุ่น น้ำ น้ำเสีย น้ำนม และอาหาร ตลอดจนอุปกรณ์ที่ใช้ในการประกอบอาหารที่หมักหมมทำความสะอาดไม่ดีพอ

ในประเทศไทย กองระบาดวิดยา รายงานในระหว่างปี พ.ศ. 2527-2535ว่าโรคที่มีน้ำและอาหารเป็นพาหะ จำนวน 160 ครั้ง มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 8,851 ราย โรคระบาดที่มีผู้ป่วยมากที่สุด สาเหตุเกิดจากสารพิษของเชื้อ *Staph. aureus* มีผู้ป่วยรวม 517 ราย จาก 8,851 ราย (กองระบาดวิดยา, 2537) การรวบรวมข้อมูลและการสืบสวนสาเหตุของโรคท้องร่วงจากอาหารเป็นพาหะ พบว่าโรงเรียนเป็นแหล่งของโรคที่เกิดจาก Staphylococcal enterotoxin หรือ SE มากถึง 10 ครั้ง จากจำนวนทั้งสิ้น 12 แม้ว่าอัตราการเสียชีวิตจากโรคนี้ค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามมีบันทึกรายงานการเสียชีวิตจากโรคหลายครั้ง (Anonymous, 2001a; Miwa และคณะ, 2001; Stewart และคณะ, 2001)

รายงานการแพร่ระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในประเทศโครเอเชียเฉพาะในปี ค.ศ. 1992 พบว่าสาเหตุเกิดจากเชื้อ *Staph. aureus* มากถึง 126 ราย เมื่อคิดเป็นจำนวนครั้งของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อ *Staph. aureus* ในช่วงปี ค.ศ. 1986 - 1992 พบมากถึง 750 ราย หรือเป็นร้อยละ 6.3 ของโรคระบาดที่เกิดจากอาหารเป็นพาหะทั้งหมด (Razem and Katusin, 1994)

สาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการระบาดของโรคจากอาหารเป็นพาหะเพิ่มขึ้น อาจเกิดจากพฤติกรรมของผู้บริโภคที่เปลี่ยนไป มีการรับประทานอาหารนอกบ้านมากขึ้น หากซื้อมารับประทานที่บ้านก็ต้องการอาหารที่ปรุงได้ง่าย หรือพร้อมบริโภค ดังนั้นสุขลักษณะของร้านอาหารและภัตตาคารตลอดจนคุณภาพของอาหารซื้อกลับบ้าน (Take home food) จึงมีความสำคัญ จากการสำรวจสาเหตุของการเกิดการระบาดของโรคจากอาหารเป็นพาหะที่มีสาเหตุจากอาหารบริการ ดังเช่น ในสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1973 – 1982 โดย Reed (1993) สรุปว่าสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษบ่อยครั้ง ได้แก่

1. การทำให้อาหารเย็นลงอย่างไม่เหมาะสมร้อยละ 56 เช่น ทิ้งอาหารที่ปรุงสุกแล้วไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน หรือเก็บอาหารที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส แต่อาหารที่เก็บรักษานั้นมีปริมาณมากและปล่อยทิ้งให้อาหารเย็นลงอย่างช้าๆ
2. ช่วงเวลาระหว่างเตรียมอาหารและรับประทานมากเกินกว่า 12 ชั่วโมง ร้อยละ 31
3. ผู้เตรียมอาหารหรือสัมผัสอาหารมีสุขลักษณะที่ไม่ดี ร้อยละ 24
4. การอุ่นซ้ำ (reheat) ไม่เหมาะสมร้อยละ 20 ส่วนใหญ่อุณหภูมิในการอุ่นซ้ำสูงไม่เพียงพอ
5. การอุ่นอาหารโดยการคงอาหารไว้ที่อุณหภูมิสูงไม่เพียงพอหรือไม่เหมาะสมร้อยละ16
6. การปนเปื้อนจากวัตถุดิบและเครื่องปรุงร้อยละ 9
7. วัตถุดิบอาหารมาจากแหล่งไม่ปลอดภัยร้อยละ 6
8. ภาชนะ อุปกรณ์ ไม่สะอาดร้อยละ 6
9. การปนเปื้อนข้ามระหว่างอาหารดิบและอาหารดิบและอาหารที่ปรุงสุกแล้วร้อยละ5
10. การปรุงอาหารไม่เหมาะสมร้อยละ 4

แม้แต่อาหารที่เสิร์ฟบนสายการบินที่คาดว่าควรมีคุณภาพทางจุลินทรีย์ดี แต่ Hatakka (1998) ได้สำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของอาหารที่เสิร์ฟบนเครื่องบินในระหว่างปี ค.ศ. 1991-1994 จำนวน 1,012 ชนิด ซึ่งอาหารเหล่านี้เตรียมจาก 33 ประเทศทั่วโลก พบว่าอาหารดังกล่าวปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคร้อยละ 33 ในกรณีของประเทศไทย มาลัย และคณะ (2543) ได้สำรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของอาหารพร้อมบริโภคประเภท ยำ สลัดผัก และข้าว ที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร ตรวจพบ *Staph. aureus* ในอาหารทุกชนิด ในปริมาณตั้งแต่ 1 - 2.85 $\log_{10}$CFUต่อกรัม

2.9.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อ *Staph. aureus* เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปกลม (Cocci) ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ (Non-motile) จับกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น บางครั้งพบอยู่เป็นคู่ ๆ หรือจับกันเป็นสายสั้น ๆ (Eley, 1992) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ แต่เจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศ เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 6.7 - 48 องศาเซลเซียส (Adam and Moss, 1995) โดยอุณหภูมิเหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 7-35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชนิดนี้มีสมบัติทนเกลือได้ดี บางชนิดทนได้มากถึงร้อยละ 15 จึงสามารถทนต่อสภาพ a_w ต่ำ นอกจากนี้ยังมีสมบัติทนต่อความร้อนได้ดี

2.9.3 การเกิดโรคและพยาธิสภาพ

เชื้อ *Staph. aureus* บางสายพันธุ์เมื่อเจริญในอาหารจะสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (SE) ซึ่งสารพิษนี้จะทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 ชั่วโมง (Lee และคณะ, 1975) สารพิษชนิดนี้เป็น Single polypeptides ชนิด Neutral protein มีค่า pI (Isoelectric point) ระหว่าง 7 - 8.6 น้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ย 26 - 28 kDa มีสมบัติทำให้พลาสมาของเลือดแข็งตัวได้ เชื้อชนิดนี้จะก่อให้เกิดความเป็นพิษเมื่อมีปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม หรือ 6 $\log_{10}$CFUต่อกรัม อาหารขึ้นไป และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เชื้อนี้ทนเกลือซึ่งมีความเข้มข้นถึงร้อยละ 15 แต่ไม่ทนต่อกรด และปริมาณของเชื้อซึ่งก่อให้เกิดโรคได้จะอยู่ในช่วง $10^5 - 10^8$ เซลล์ต่อกรัม (Doyle และคณะ, 1997)

Halpin and Marth (1989) กล่าวว่า สารพิษ Staphylococcal enterotoxin หรือ SE ที่สร้างโดยเชื้อ *Staph. aureus* มี 7 ชนิด คือ A, B, C_1, C_2, C_3, D และ E สารพิษชนิดที่ทำให้อาหารเป็นพิษอยู่เสมอ คือ SEA และ SED คิดเป็นร้อยละ 77 และ 37.5 ตามลำดับ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารพิษแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของอาหารที่เกี่ยวข้อง แบคทีเรียสามารถเจริญและสร้างสารพิษได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 6.5 - 50 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ส่วนค่าความเป็นกรด - ด่างที่แบคทีเรียจะเจริญได้อยู่ในช่วง 4.2 - 9.3 แต่ค่าความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารพิษจะอยู่ในช่วง 7.0 - 7.5 ในสภาวะที่มีอากาศ ค่า a_w ต่ำสุดที่แบคทีเรียต้องการคือ 0.86 ขณะที่ในสภาพที่ไม่มีอากาศแบคทีเรียต้องการ a_w ที่สูงกว่า คือ 0.90 เมื่อแบคทีเรียเจริญได้ดีจะสร้างสารพิษปริมาณมาก ซึ่งสารพิษจะสร้างได้ดีระหว่างอุณหภูมิ 15.6 - 46.1 องศาเซลเซียส และสร้างได้ดีที่สุดที่ 40 องศาเซลเซียส ภายใน 4 - 6 ชั่วโมง การลดอุณหภูมิขณะที่เชื้อกำลังเจริญจะช่วยลดการสร้างสารพิษได้ ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส แบคทีเรียจะสร้างสารพิษได้ภายใน 3 วัน (72 ชั่วโมง) แต่ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียจะสร้างสารพิษภายในเวลาที่สั้นลง คือ 12 ชั่วโมง แต่เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง ระยะเวลาในการสร้างสารพิษจะนานขึ้น เช่น ที่ 15 องศาเซลเซียส ตรวจพบสารพิษในวันที่ 4 และที่อุณหภูมิ 9 องศาเซลเซียส ตรวจพบสารพิษในวันที่ 8 หรือที่อุณหภูมิ 4 - 6.7 องศาเซลเซียส สามารถเก็บอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยตรวจไม่พบสารพิษ อย่างไรก็ตามการสร้างสารพิษของเชื้อ *Staph. aureus* จะสร้างได้ดีเมื่อปราศจากแบคทีเรียชนิดอื่น ดังนั้นอาหารที่ผ่านความร้อนมาแล้วและจำนวนจุลินทรีย์ชนิดอื่นต่ำ เมื่อเชื้อ *Staph. aureus* ปนเปื้อนภายหลัง อาหารนั้นจึงมีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษ สารพิษปริมาณน้อยกว่า 1.0 µg ที่ปนเปื้อนในอาหารทำให้มีอาการของโรคอาหารเป็นพิษแก่คนและสัตว์ได้

การเกิดโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อ *Staph. aureus* มีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ SE เนื่องจากอาหารนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงพอ (ควรเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส หรือมากกว่า) หรืออุณหภูมิต่ำไม่เพียงพอ (ควรเท่ากับ 7.2 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า) จากที่กล่าวมาแล้วเนื่องจากสารพิษ SE ทนร้อนได้ดี ดังนั้นความร้อนจากการหุงต้มธรรมดาทั่วไปจึงไม่สามารถทำลายความเป็นพิษได้ โรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิษของเชื้อ *Staph. aureus* เรียกว่า Staphylococcal intoxication (Eley, 1992) Halpin and Marth (1989) กล่าวว่าบุคคลแต่ละคนจะมีความไวต่อสารพิษแตกต่างกัน กลุ่มคนที่ทานอาหารที่เป็นพาหะชนิดเดียวกัน บางคนอาจเจ็บป่วยรุนแรง แต่บางคนอาจเจ็บป่วยเล็กน้อย และบางคนอาจไม่ป่วยเลย โดยทั่วไปในอาหารที่มีเซลล์ *Staph. aureus* อยู่มากกว่า 10^5 เซลล์ต่อกรัมอาหารหรือ 5 $\log_{10}$CFUต่อกรัมอาหาร แบคทีเรียจึงจะสร้างสารพิษได้มากพอที่จะทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ

สารพิษ SE เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และระบบกล้ามเนื้อที่อยู่นอกอำนาจการควบคุมของจิตใจ ระยะเพาะเชื้อหลังจากรับประทานอาหารจนเกิดอาการเป็นพิษ ใช้เวลาตั้งแต่ 1 - 7 ชั่วโมง โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 2 - 4 ชั่วโมง อาการของโรคที่พบเสมอคือ มีน้ำลายมาก วิงเวียนศีรษะ อาเจียน ปวดท้อง และท้องร่วง อาจมีมูกเลือดปนมาด้วย คนที่มีอาการป่วยรุนแรงมักมีอาการปวดหัว ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ เหงื่อออก ตัวสั่น และร่างกายมีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติ อาการป่วยคงอยู่นาน 1 - 2 วันก็หาย ไม่จำเป็นต้องให้การรักษา การเสียชีวิตเนื่องจากอาหารเป็นพิษจาก Staphylococcal intoxication พบน้อยมาก แต่อาจจะเกิดได้หากผู้ที่เกิดการเจ็บป่วยเป็นผู้สูงอายุ เด็กทารก หรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ (Balaban and Rosooly, 2000) ดังที่กล่าวมาแล้วอาการของโรคในแต่ละคนค่อนข้างแตกต่างกันขึ้นกับความไวต่อสารพิษของแต่ละบุคคล นอกจากนั้นปริมาณของสารพิษในอาหารที่เป็นพาหะ และสุขภาพโดยรวมของผู้ที่ติดเชื้อ อีกทั้งชนิดของสารพิษที่บริโภคมีผลต่อความรุนแรงของโรคด้วยเช่นกัน (Lynn and Bohach, 1997)

2.9.4 แหล่งที่พบ

การศึกษาเกี่ยวกับการระบาดวิดยาของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Staph. aureus* พบว่า คนและสัตว์เป็นแหล่งของ *Staph. aureus* และเป็นพาหะนำเชื้อชนิดนี้ปนเปื้อนมาสู่อาหาร แบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อประจำถิ่นอาศัยอยู่ในโพรงจมูก ช่องคอ ช่องปาก และตามผิวหนัง เส้นผม บาดแผล ฝี หนอง ของคนและสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อนี้แสดงให้เห็นถึงสุขลักษณะการผลิตและการเก็บรักษาอาหารที่ไม่ดี (Martin and Iandolo, 2000) อาหารเป็นพิษที่เกิดจากการปนเปื้อนของเชื้อ *Staph. aureus* มีหลายชนิด โดยมากเป็นอาหารที่ต้องใช้มือสัมผัสอาหาร อาหารที่พบว่าเกิดโรคอยู่เสมอ ได้แก่ อาหารจำพวกเนื้อ ไก่ ผลิตภัณฑ์จากไข่ นม เนย คัสตาร์ด ขนมชนิดครีม สลัด เช่น สลัดทูน่า สลัดไก่ และอาหารพวกข้าวผัด มักกะโรนี อาหารที่เป็นพิษเนื่องจาก

แบคทีเรียชนิดนี้สาเหตุส่วนใหญ่ (ร้อยละ75) เกิดจากการเก็บรักษาอาหารสุกภายใต้อุณหภูมิต่ำไม่เพียงพอ เมื่อมีเชื้อ *Staph. aureus* ปนเปื้อนในอาหารเซลล์จะเจริญและเพิ่มจำนวน และเมื่อเพิ่มจำนวนมากถึง 10^5 โคโลนีต่อกรัมอาหาร หรือ 5 $\log_{10}$CFUต่อกรัมอาหารจะสร้างสารพิษในอาหาร (Halpin and Marth, 1989)

2.9.5 การเจริญและการอยู่รอดของเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหาร

โดยปกติเชื้อ *Staph. aureus* สามารถเจริญและรอดชีวิตได้ในวัตถุดิบที่ยังไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปได้น้อยกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นที่เจริญร่วมอยู่ด้วย (Background flora) โดยแบคทีเรียเหล่านั้นอาจทำให้อาหารเสียจนสังเกตได้ก่อนที่เชื้อ *Staph. aureus* จะผลิตสารพิษถึงระดับที่เป็นอันตราย แต่ถ้าอาหารนั้นได้รับความร้อนมาก่อน จุลินทรีย์ชนิดอื่นถูกทำลายไปแล้วเป็นส่วนใหญ่ เชื้อ *Staph. aureus* ซึ่งอาจปนเปื้อนภายหลังจากกระบวนการให้ความร้อนหรือปนเปื้อนภายหลัง (Post contamination) จะสามารถเจริญได้ดีโดยเฉพาะในสภาพที่ไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นแข่งขัน (Lynn and Bohach, 1997) และก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารได้

2.9.6 การต้านทานความร้อนของเชื้อ *Staph. aureus*

จากที่กล่าวข้างต้นว่าความร้อนมีผลต่อจุลินทรีย์ คือทำให้ DNA RNA เอนไซม์ที่จำเพาะและเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายหรือสูญเสีย ซึ่งเชื้อนี้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนโดยใช้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และน้ำยาฆ่าเชื้อโรคทั่ว ๆ ไป แต่สารพิษของเชื้อทนต่อความร้อนมาก การต้มน้ำเดือด (100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที ไม่สามารถทำลายสารพิษนี้ได้ เชื้อชนิดนี้จะก่อให้เกิดความเป็นพิษเมื่อมีปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม หรือ 6 $\log_{10}$CFUต่อกรัมอาหารขึ้นไป และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เชื้อนี้ทนเกลือซึ่งมีความเข้มข้นถึงร้อยละ 15 แต่ไม่ทนต่อกรด และปริมาณของเชื้อซึ่งก่อให้เกิดโรคได้จะอยู่ในช่วง $10^5 - 10^8$ เซลล์ต่อกรัม (Doyle และคณะ, 1997) และที่อุณหภูมิระดับพาสเจอร์ไรส์ ได้แก่ อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที หรืออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 83 นาที สามารถทำลายเซลล์ *Staph. aureus* ได้หมด อย่างไรก็ตามความสามารถในการทนความร้อนของเชื้อ *Staph. aureus* ขึ้นกับสายพันธุ์ ค่าความเป็นกรด - ด่าง และชนิดของอาหาร เช่น $D_{60\,^{\circ}C}$ ในคัสตาร์ด 7.7 - 7.8 นาที ในขณะที่ซุปไก่มี $D_{60\,^{\circ}C}$ 5.2 - 5.4 นาที ในสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 และ 4.5 มี $D_{48.9\,^{\circ}C}$ 42.1 และ 9.5 นาที ตามลำดับ ในสภาวะการแช่แข็งเชื้อ *Staph. aureus* ทนต่อสภาวะนี้ได้ดีและยังรอดชีวิตได้จากการทำละลายจากการแช่แข็ง โดยเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* สามารถอยู่รอดในอาหารที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Lynn and Bohach, 1997) นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อ *Staph. aureus* ยังเป็นแบคทีเรียอีกชนิดที่มีความสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ในทางการแพทย์ (Martin and Iandolo, 2000)

เนื่องจากสารพิษ SE ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ในกลุ่ม Proteolytic enzyme เช่น เปปซิน และทนต่อความร้อนได้ดีมาก หากมีสารพิษปนเปื้อนลงในอาหาร ความร้อนในการหุงต้มอาหารจะไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายความเป็นพิษของสารพิษได้หมด มีรายงานว่าที่ความร้อน 60 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 6.9 เป็นเวลา 20 นาที สามารถลดความเป็นพิษของเอนเทอโรทอกซินได้เพียงร้อยละ 50 เท่านั้น แต่ถ้าใช้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที หรือ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จะสามารถทำลายสมบัติของ SEA ได้หมด ส่วน SEB สามารถทนความร้อนได้ดีกว่าที่ความร้อน 60 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 6.3 สารพิษ SEB สามารถทนความร้อนระดับนี้ได้นานถึง 16 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที สมบัติของสารพิษจะลดลงร้อยละ 50 ส่วนสมบัติของ SEC จะถูกทำลายไปร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที (Martin and Iandolo, 2000) ในขณะที่ Anderson และคณะ (1995) พบว่า SEA ที่ปนเปื้อนอยู่ในเห็ดกระป๋อง แม้จะให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 28 นาที หรือ 127 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยังคงมีสมบัติต่อการก่อพิษในสัตว์ทดลอง (ด้วยวิธี Kitten animal Assay) ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานว่า SEA จะสูญเสียสมบัติทางชีววิทยา เมื่อให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 28.11 นาที (ด้วยวิธี Kitten Assay) หรือ 127 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 8 นาที (ด้วยวิธี Monkey Assay) (Balaban and Rosooly, 2000)

Gilmour and Harvey (1990) และ Olson and Mocquot (1980) รายงานว่าควรใช้น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ในการผลิตขนมปังประเภทสอดไส้ครีม เพื่อหลีกเลี่ยงเชื้อ *Staph. aureus* ที่อาจมีการปนเปื้อนจากน้ำนมดิบโดยเชื้อ *Staph. aureus* ถูกทำลายที่อุณหภูมิ เอชทีเอสที (HTST) และยูเอชที (UHT)

2.9.7 การปนเปื้อนของ *Staph. aureus* ในอาหารและการเกิดโรคจากอาหารเป็นพาหะ

การกำหนดปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ในอาหารชนิดต่าง ๆ นั้น FDA (1994) ได้ระบุว่าอาหารพร้อมบริโภคที่ทำมาจากอาหารทะเลที่ต้องผ่านการให้ความร้อนอีกครั้งก่อนบริโภคจะต้องมีเชื้อ *Staph. aureus* น้อยกว่า 4 $\log_{10}$CFUต่อกรัมอาหาร ในขณะที่ Canadian Federal Fish Inspection Laboratory ของประเทศแคนาดา กำหนดว่ายอมรับจำนวนเชื้อ *Staph. aureus* ที่ปนเปื้อนได้ในอาหารโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ประมง มีจำนวนต่ำกว่า 1 $\log_{10}$CFUต่อกรัมอาหาร (Bonnell, 1994) ในประเทศไทย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536) ระบุว่าอาหารปรุงสุกแล้วแช่เย็นหรือแช่แข็งและต้องอุ่นก่อนบริโภค ยอมให้พบเชื้อ *Staph. aureus* ได้น้อยกว่า 2 $\log_{10}$CFU ต่อกรัมอาหาร และน้อยกว่า 0.5 $\log_{10}$CFUต่อกรัมอาหาร ตามลำดับ ส่วนอาหารดิบ เช่น เนื้อดิบ ปลาสดนั้น ยอมให้มีเชื้อ *Staph. aureus* น้อยกว่า 200 เซลล์ต่อกรัมของอาหารหรือ 2 $\log_{10}$CFU ต่อกรัมอาหาร

การปนเปื้อนของเชื้อ *Staph. aureus* ในโรงงานผลิตอาหารนั้นมักเกิดจากการจัดการสุขาภิบาลโรงงานที่ไม่ดี โดยเฉพาะคนงานหรือบุคคลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดี ทำให้เชื้อมีโอกาสปนเปื้อนในอาหารที่ผลิตได้สูง การปนเปื้อนดังกล่าว ได้แก่ การปนเปื้อนในน้ำที่ทำการผลิต ปนเปื้อนจากวัตถุดิบ ตลอดจนเครื่องจักร อุปกรณ์ ภาชนะบรรจุ หรือแม้แต่ในผลิตภัณฑ์หลังการฆ่าเชื้อก่อนจัดจำหน่าย (Hayes, 1985) การปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในปริมาณที่สูงก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค เนื่องจากสารพิษเอนเทอโรทอกซินที่สร้างขึ้นมา ทนความร้อนได้สูง นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของอาหารเป็นปัจจัยสำคัญต่อการสร้างสารพิษ จากการทดลองในผลิตภัณฑ์เนื้อพบว่าการต้มที่เวลา 20 - 60 นาที หรือเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อไม่สามารถทำลายสมบัติของสารพิษนี้ได้สมบูรณ์ เพียงแต่จะลดลงเท่านั้น อาหารที่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้มักเป็นอาหารที่อุดมด้วยโปรตีน มีค่าความเป็นกรด - ด่างสูง และค่า a_w สูงกว่า 8.5 เช่น น้ำนม และผลิตภัณฑ์จากน้ำนม ไข่และผลิตภัณฑ์ เนื้อและผลิตภัณฑ์ ปลาและผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอาหารที่ต้องใช้มือสัมผัสในการเตรียมมาก ๆ เช่น ปั้นหรือหั่นเป็นชิ้น (Defigueiredo and Splittstoesser, 1976) แหล่งของเชื้อ *Staph. aureus* ที่มีโอกาสปนเปื้อนในอาหารและก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร เกิดจากผู้สัมผัสอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น ไม่ล้างมือ กระบวนการเตรียมอาหารที่ไม่ถูกต้อง มีการปนเปื้อนจากวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ เช่น มีด เขียง ที่บดเนื้อที่ไม่สะอาด ขาดการฆ่าเชื้อ และสภาวะที่เอื้ออำนวยให้เซลล์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ เช่น ที่อุณหภูมิในการเก็บรักษาอาหารสูงไม่เพียงพอ หรือเย็นไม่เพียงพอ และปรุงอาหาร หรือให้ความร้อนกับอาหารไม่เหมาะสม หรือไม่พอเพียงลักษณะเอื้ออำนวยให้แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ในอาหาร

การดำเนินการเพื่อป้องกันและควบคุมไม่ให้เชื้อ *Staph. aureus* ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งที่ผู้ผลิตและควบคุมคุณภาพของโรงงานต้องกระทำอย่างจริงจังและต่อเนื่อง
การกำจัดสารพิษของเชื้อ *Staph. aureus* ออกจากอาหารกระทำได้ยาก จึงจำเป็นต้องป้องกันไม่ให้เชื้อปนเปื้อนในอาหาร โดยภายใต้ข้อกำหนดทางสุขลักษณะที่ดีใช้วิธีที่ถูกต้องในทางปฏิบัติและควบคุมปัจจัยต่างๆเพื่อลดการปนเปื้อนซึ่งอาจเกิดขึ้นได้ดังนี้

1. ผู้สัมผัสอาหาร ในการผลิต คนเป็นแหล่งสำคัญในการแพร่เชื้อ *Staph. aureus* การระบาดของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษซึ่งเกิดจากเชื้อนี้ สาเหตุส่วนใหญ่คือการปนเปื้อนจากส่วนต่างๆ ของร่างกายของผู้สัมผัสอาหาร เช่น จากแผลที่มีการอักเสบโดยผ่านทางมือ ฉะนั้นสุขอนามัยส่วนบุคคลของร่างกายของผู้สัมผัสอาหารและการฝึกอบรมพนักงานเกี่ยวกับสุขลักษณะที่ดีในการปฏิบัติงาน เป็นสิ่งสำคัญมากและควรจัดให้มีอย่างสม่ำเสมอ

2. วัตถุดิบ ใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพสูงและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิที่สูง หรือต่ำกว่าช่วงที่เชื้อสามารถเจริญแพร่พันธุ์ได้ อาหารที่ใส่สารเคมีเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเน่าเสียและควบคุมการเจริญของเชื้อได้ ตลอดจนน้ำและน้ำแข็งที่ใช้ในลักษณะสัมผัสกับอาหารต้องมีคุณภาพเทียบเท่าน้ำดื่มตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุข

3. ระบบการผลิตอาหาร การควบคุมจุดวิกฤติในขั้นตอนการผลิตอาหาร (Hazard Analysis and Critical Control Point) ระบบในการวิเคราะห์และควบคุมปัจจัยที่ป้องกันการปนเปื้อนและแพร่กระจายของเชื้อ *Staph. aureus* (เพ็ญศรี และคณะ, 2534)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

ส่วนประกอบไส้ครีมเอแคลร์

3.1.1	น้ำตาลทรายขาว ตรามิตรผล	บริษัท รวมเกษตรกรอุตสาหกรรมจำกัด
3.1.2	ไข่ไก่ ตราซีพี	บริษัท บมจ. กรุงเทพผลิตผลอุตสาหกรรมการเกษตร (ฟาร์มนครหลวง)
3.1.3	นมสดพาสเจอร์ไรส์ ตราเมจิ	บริษัท ซีพี-เมจิ จำกัด
3.1.4	เนยเค็ม ตราออร์คิด	บริษัท อุตสาหกรรมนมไทย จำกัด
3.1.5	น้ำเปล่า ตราสิงห์	บริษัท บุญรอดเอเชียเบเวอเรซ จำกัด
3.1.6	แป้งข้าวโพด ตราเบสฟู้ดส์	บริษัท ยูนิลีเวอร์ไทยเทรดดิ้ง จำกัด

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

Staphylococcus aureus จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.3 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

3.3.1	เครื่องชั่งอิเลคทรอนิค	Mettler Toledo, Dragon 3002 Switzerland	
3.3.2	อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)	Memmert, D-91126	Germany
3.3.3	ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Heraeus, UT 6420	Germany
3.3.4	ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)	Heraeus, B 6420	Germany
3.3.5	หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Tomy SS-245	Japan
3.3.6	ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)	ASTEC, ABS 1200	England
3.3.7	ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ	LG	Korea
3.3.9	หม้อสแตนเลส	ตราม้าลาย	Thailand
3.3.10	เตาแก๊ส	Lucky flame	Thailand
3.3.11	เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง	Vortex genei	USA
3.3.12	เครื่องตีป่นอาหาร	Seward	England
3.3.13	เทอร์โมมิเตอร์		
3.3.14	นาฬิกาจับเวลา		

3.3.15 เครื่องบันทึกอุณหภูมิอัตโนมัติ Circuitlink International Pty Ltd. Australia

3.3.16 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็น

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1 Peptone Merck Germany

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl sulfate tryptose broth (LSTB) Merck Germany

3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Biard – Parker agar (BPA) Merck Germany

3.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy broth (TSB) Merck Germany

3.4.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy agar (TSA) Merck Germany

3.4.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) Merck Germany

3.4.6 น้ำกลั่น

3.4.7 เอธานอลร้อยละ 95

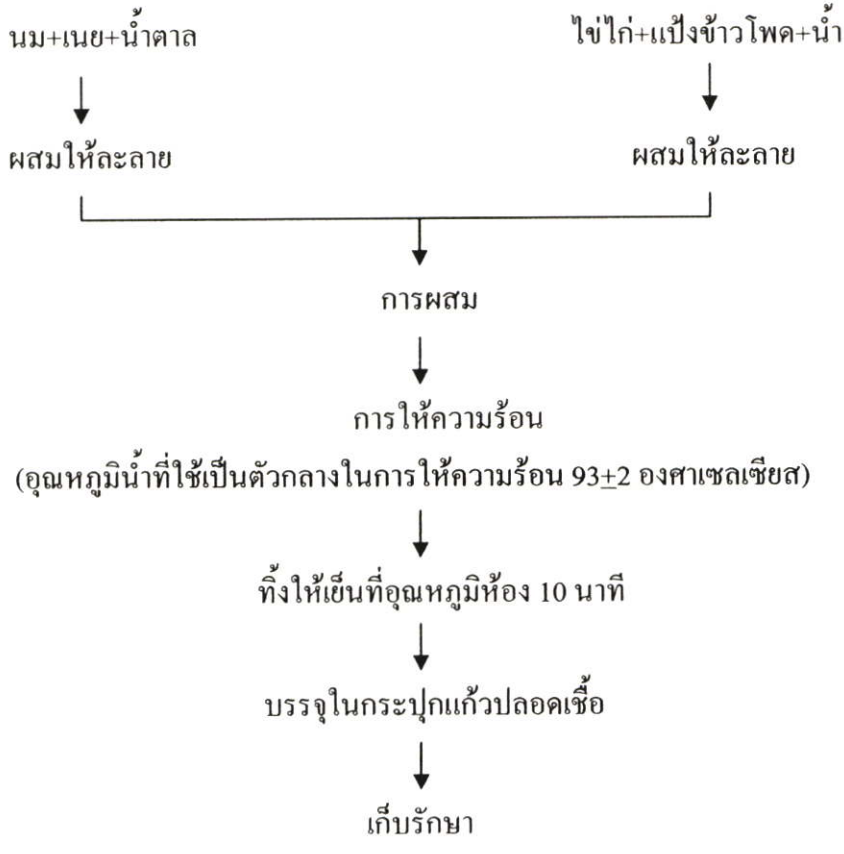
3.5 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 วิธีการทดลอง

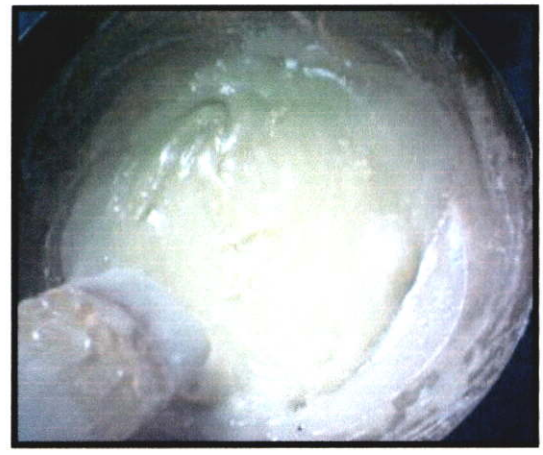
3.6.1 การผลิตไส้ครีมเอแคลร์

ขั้นตอนการผลิตไส้ครีมเอแคลร์ (ดังแสดงในภาคผนวก ข) เริ่มต้นโดยการนำส่วนผสมซึ่งประกอบด้วย นม เนย และน้ำตาลมาผสมให้ละลาย นำไข่ไก่ตอกใส่น้ำและแป้งข้าวโพดผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งสอง มาผสมให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนโดยอาศัยความร้อนจากน้ำในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) เป็นตัวกลางส่งผ่านความร้อน (อุณหภูมิน้ำในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 93±2 องศาเซลเซียส) แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที บรรจุในกระปุกแก้วปลอดเชื้อ แล้วปิดฝาพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ (นำกระปุกและฝาพลาสติกฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที) จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) กรรมวิธีการเตรียมดังแสดงในภาพที่ 3.1 ส่วนตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ที่เตรียมได้แสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการผลิตไส้ครีมเอแคลร์

ที่มา : ดัดแปลงจากจิตธนา และ อรอนงค์ (2546)



ภาพที่ 3.2 ตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ที่เตรียมได้จากการทดลอง

3.6.2 ศึกษาการเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.6.2.1 การเตรียมเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus*

(ดัดแปลงจาก Cynthia และ Beuchat, 1998)

นำ Stock culture ที่เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) ประมาณ 6 ชั่วโมง ใช้ลูป (Loop) เขี่ยเชื้อ 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB; ค่าความเป็นกรด - ด่าง เท่ากับ 7.2) ซึ่งบรรจุในหลอดจำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจาก TSB จำนวน 1 ลูป ถ่ายลงใน TSB หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (Inoculum) ก่อนนำมาทำให้เจือจาง โดยใช้สารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จนได้ความเข้มข้นของเซลล์ตามต้องการ

3.6.2.2 การตรวจนับจำนวนเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* ทำได้โดยการเจือจางเชื้อ *Staph. aureus* ในสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 โดยดูดตัวอย่างจากสารละลายเปปโตน 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird – Parker agar (BPA) แล้ว Spread plate จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงตรวจนับจำนวนโคโลนี (Colony) ของเชื้อ *Staph. aureus* โดยเลือกนับลักษณะโคโลนีที่มีสีดำ และมีบริเวณโดยรอบใส (clear zone) บริเวณรอบ ๆ โคโลนี (ภาคผนวก ก) แสดงผลเป็น $\log_{10}$CFUต่อกรัม และบันทึกผล

3.6.2.3 การเตรียมตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์

เตรียมไส้ครีมเอแคลร์โดยมีส่วนประกอบและวิธีการตามข้อที่ 3.6.1 (ดังแสดงในภาคผนวก ข) ชั่งตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ 25 กรัม บรรจุในกระปุกแก้วปราศจากเชื้อ ในแต่ละ 25 กรัมตัวอย่างอาหาร ปิเปตเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* โดยกำหนดจำนวนเซลล์เมื่อถ่ายเชื้อ *Staph. aureus*]'ในตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์เท่ากับ 10^1 10^4 และ 10^6 CFUต่อกรัมเอแคลร์ ปิดฝากระปุกโดยใช้ฝาพลาสติกปราศจากเชื้อ (ทำ 3 ซ้ำ)

3.6.2.4 การสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเจริญของเชื้อ *Staph. aureus*

- สุ่มตัวอย่างที่เก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) มาตรวจวิเคราะห์จำนวนเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* ในเวลาที่ 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ของอายุการเก็บรักษา แล้วนำผลที่ได้มาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ *Staph. aureus* (log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์) กับเวลา

- การตรวจวิเคราะห์ *Staph. aureus* (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000) ทำการชั่งตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ 25 กรัมใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ใส่สารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณ 225 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างโดยใช้เครื่องตีป่นอาหาร (Stomacher) ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^1 จากนั้นใช้ปิเปตดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ที่บรรจุอยู่ในหลอดปริมาตร 9 มิลลิลิตร ได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^2 จากนั้นทำเช่นเดียวกันจนได้ระดับความเจือจางของตัวอย่างที่ต้องการ แล้วดูดตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar (BPA) และทำการ Spread plate ก่อนนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงตรวจนับจำนวนโคโลนี (Colony) ของเชื้อ *Staph. aureus* โดยเลือกนับลักษณะโคโลนีที่มีสีดำ และมีบริเวณ Clear zone บริเวณรอบๆ แสดงผลเป็น log_{10}CFUต่อกรัม และบันทึกผล

3.6.3 ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาส่วนผสมในช่วงก่อนให้ความร้อน

นำส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์ตามข้อที่ 3.6.1 ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้ได้ระดับจำนวนเซลล์ 10^6 CFUต่อกรัม แล้วบรรจุในกระปุกแก้วปลอดเชื้อ ทำการเก็บในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) แล้วสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ *Staph. aureus* ที่เวลา 0 15 30 และ 60 นาที โดยทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ *Staph. aureus* โดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.4

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เพื่อเลือกอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเก็บก่อนนำไปให้ความร้อนของไส้ครีมเอแคลร์

3.6.4 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนของไส้ครีมเอแคลร์

ผลิตไส้ครีมเอแคลร์ตามข้อที่ 3.6.1 ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้ได้ระดับจำนวนเซลล์ 10^6 CFUต่อกรัม แล้วบรรจุในกระปุกแก้วปลอดเชื้อ ทำการเก็บรักษาส่วนผสมในช่วงก่อนให้ความร้อนในสภาวะที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.3 มาให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ที่ปรับอุณหภูมิน้ำที่ใช้เป็นตัวกลางประมาณ 93±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ติดตามการอยู่รอดของเชื้อ *Staph. aureus* โดยการตรวจนับจำนวนเชื้อตามวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.4 และ ติดตามอุณหภูมิตามเวลาที่ให้ความร้อนโดยใช้ Data logger

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เพื่อเลือกเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนของไส้ครีมเอแคลร์

3.6.5 ศึกษาอายุการเก็บรักษาของไส้ครีมเอแคลร์

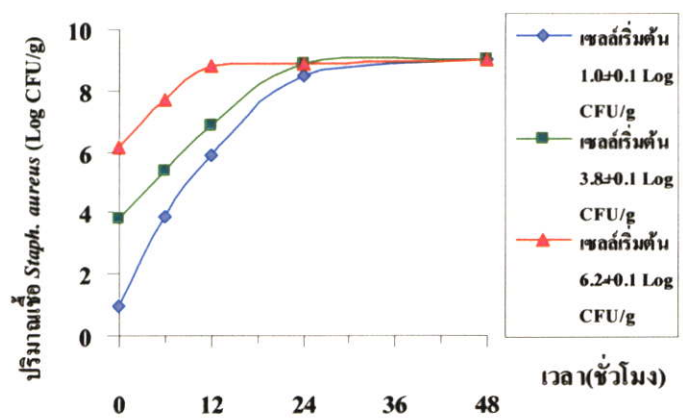
นำไส้ครีมเอแคลร์ตามข้อที่ 3.6.1 ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้ได้ระดับจำนวนเซลล์ 10^6 CFUต่อกรัม และที่ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* บรรจุในกระปุกแก้วปลอดเชื้อ ทำการเก็บในสภาวะที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.3 มาให้ความร้อนในเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 3.6.4 ก่อนนำมาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโดยใช้อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) สุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ *Staph. aureus* ทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน โดยทำการวิเคราะห์จำนวนเซลล์ *Staph. aureus* โดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.4 และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของผลการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) ใช้โปรแกรม SPSS version 10.0 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test เพื่อเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ให้มีคุณภาพดีที่สุด

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.2 ผลการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ โดยการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 1.0±0.1 3.8±0.1 และ 6.2±0.1 Log_{10}CFUต่อกรัม ลงในไส้ครีมเอแคลร์ โดยเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) แล้วทำการสุ่มตัวอย่าง มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อ *Staph. aureus* ในเวลาที่ 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ของอายุการเก็บรักษา จากนั้นนำผลที่ได้มาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ *Staph. aureus* log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์ กับเวลา (ดังภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ *Staph. aureus* log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์ กับเวลา(ชั่วโมง) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ณ อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส)

จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) นานขึ้น การเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* เพิ่มขึ้น แม้ว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในตัวผลิตภัณฑ์แตกต่างกัน โดยปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงจุดหนึ่ง(ชั่วโมงที่ 24) เชื้อจะไม่มีการเพิ่มจำนวน และเมื่อนำผลจากกราฟมาคำนวณหาค่าระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มเท่าตัว (Generation time) ของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ที่มีปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เท่ากับ 1.0±0.1 3.8±0.1 และ 6.2±0.1 Log_{10}CFUต่อกรัม ระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มเท่าตัวของเชื้อ *Staph. aureus* มีค่าอยู่ในช่วง 1.2 -1.6 ชั่วโมง ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค)

โดยทั่วไปแล้วระยะเวลาในการแบ่งตัวของเชื้อ *Staph. aureus* มีค่าเท่ากับ 27 นาที (http://textbookofbacteriology.net/growth.html) อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการแบ่งตัวของเชื้อต่าง ๆ นั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่เชื้อนั้นเจริญ (ฟุจิโอะ, 2546) ดังเช่นตัวอย่างในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ระยะเวลาในการแบ่งตัว (generation time) ของเชื้อจุลินทรีย์

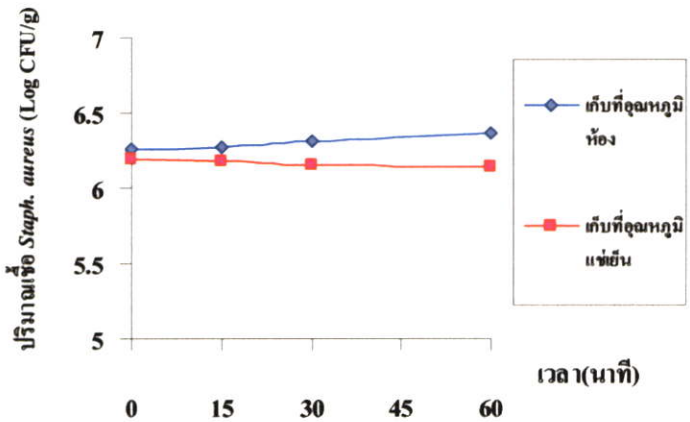
เชื้อจุลินทรีย์	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ระยะเวลาในการแบ่งตัว(นาที)
Escherichia coli	Glucose-salts	17
Bacillus megaterium	Sucrose-salts	25
Streptococcus lactis	Milk	26
Streptococcus lactis	Lactose broth	48
Staphylococcus aureus	Heart infusion broth	27-30
Lactobacillus acidophilus	Milk	66-87
Rhizobium japonicum	Mannitol-salts-yeast extract	344-461
Mycobacterium tuberculosis	Synthetic	792-932
Treponema pallidum	Rabbit testes	1980

ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/growth.html

ดังนั้นจากข้อมูลที่คำนวณหาค่าระยะเวลาในการแบ่งตัวของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ ทำให้สามารถคำนวณระยะเวลาในการเกิดอาหารเป็นพิษได้ เชื้อชนิดนี้จะก่อให้เกิดความเป็นพิษเมื่อมีปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อกรัม หรือ 6 log_{10}CFUต่อกรัมอาหารขึ้นไป และปริมาณของเชื้อซึ่งก่อให้เกิดโรคได้จะอยู่ในช่วง $10^5 - 10^8$ เซลล์ต่อกรัม (Doyle และคณะ, 1997)

4.3 ผลของอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาส่วนผสมในช่วงก่อนให้ความร้อน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาส่วนผสมในช่วงก่อนให้ความร้อน โดยนำส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์ดังข้อที่ 3.6.1 นำมาถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 6.2±0.1 Log_{10}CFUต่อกรัม แล้วบรรจุในกระปุกแก้วปลอดเชื้อ ทำการเก็บในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) แล้วสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ *Staph. aureus* ที่เวลา 0 15 30 และ 60 นาที พบว่าเมื่อเก็บรักษาส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) เวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ขณะที่เก็บรักษาส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์ที่อุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ดังภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) ภายในเวลา 60 นาที

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ก่อนนำไปให้ความร้อนเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิแช่เย็นที่เวลาภายใน 60 นาที

อุณหภูมิในการเก็บรักษา (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* (Log_{10} CFU/g)			
	ระยะเวลาการเก็บ(นาที)			
	0	15	30	60
เก็บที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส)	6.26 ± 0.01^{c}	6.28 ± 0.01^{bc}	6.32 ± 0.03^{b}	6.37 ± 0.04^{a}
เก็บที่อุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส)	6.20 ± 0.04^{a}	6.19 ± 0.01^{a}	6.11 ± 0.01^{ab}	6.10 ± 0.01^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Staph. aureus* เป็นเชื้อที่อยู่ในประเภทมีโซฟายล์ (mesophile) คือ เจริญได้ที่อุณหภูมิ ตั้งแต่ 6.5-50 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส (Halpin and Marth, 1989) ดังนั้นเมื่อนำไส้ครีมเอแคลร์ที่มีเชื้อ *Staph. aureus* ปนเปื้อนในปริมาณ 6.2±0.1 Log_{10}CFUต่อกรัม มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) จึงทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่เก็บไส้ครีมเอแคลร์ที่มีเชื้อ *Staph. aureus* ปนเปื้อนในปริมาณใกล้เคียงกัน เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) ไม่พบการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Staph. aureus* โดยปริมาณเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ค่าปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้น้อยลง แต่ในการทดลองของ Yang และคณะ (2001) ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 5.2 log_{10}CFU/units ลงในไข่ตุ๋น (Streamed egg) และ ไข่กวน (Scrambled egg) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเชื้อไม่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ซึ่งผลเชื้อที่ลดลงอาจเนื่องจากอุณหภูมิแช่เย็นที่ 4 - 5 องศาเซลเซียส สามารถลดกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ เพราะอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลง โดยเฉพาะเอนไซม์โปรติเนสและไลเปสที่ทนความร้อน เมื่อเอนไซม์ถูกทำลายโปรตีนในเซลล์ของจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปโดยเกิดการตกตะกอน องค์ประกอบต่าง ๆ ของผนังเซลล์ รวมทั้งเยื่อบุเซลล์ได้รับบาดเจ็บ สายของ DNA อาจเกิดการแตกหัก หรือทำให้ RNA เกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้เชื้อ *Staph. aureus* ลดลง (ปรียา, 2528) ซึ่ง Tyski และคณะ(1983) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Staph. aureus* คือ ที่อุณหภูมิ 32 - 35 องศาเซลเซียส

ดังนั้นจึงเลือกส่วนผสมที่เตรียมในช่วงก่อนให้ความร้อนที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) ภายในเวลาไม่เกิน15 นาที เพื่อนำไปให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ในการศึกษาในขั้นตอนที่ 4.4 ต่อไป เนื่องจากปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ไม่มีการเพิ่มขึ้นที่สภาวะอุณหภูมิห้องภายในเวลาไม่เกิน 15 นาที เช่นเดียวกับการเก็บที่สภาวะแช่เย็น

4.4 ผลของเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนของไส้ครีมเอแคลร์

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาส่วนผสมในช่วงก่อนให้ความร้อน โดยนำส่วนผสมที่เตรียมในช่วงก่อนให้ความร้อนที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) ภายในเวลาไม่เกิน15 นาที แล้วถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 6.2±0.2 Log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์ จากนั้นนำมาให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) ที่ปรับอุณหภูมิน้ำที่ใช้เป็นตัวกลางประมาณ 93±2 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้อุณหภูมิของตัวผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์อยู่ระหว่าง 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ติดตามปริมาณของเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อผ่านการให้ความร้อนดังแสดงในตารางที่ 4.3 และอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่เวลาต่างๆ

เวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน (นาที)	ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* (Log_{10}CFU/g)			
	ก่อนให้ความร้อน	หลังให้ความร้อน	ผลต่าง	ลดลงคิดเป็นร้อยละ
15	6.31±0.01 [a]	4.37±0.01 [a]	1.94 [c]	30.7
20	6.41±0.02 [a]	2.59±0.01 [b]	3.82 [b]	59.6
25	6.39±0.03 [a]	2.09±0.02 [c]	4.30 [a]	67.3

หมายเหตุ 1. ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อเปรียบเทียบโดย DMRT

2. อุณหภูมิของไส้ครีมเอแคลร์ระหว่างการให้ความร้อน เท่ากับ 70-75 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.4 อัตราการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที

เวลาในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส	อัตราการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* (%)
15	69.3
20	40.4
25	32.7

เมื่อให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ เนื่องจากอุณหภูมิขณะให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคร์อยู่ที่ 70-75 องศาเซลเซียส (ใช้ data logger เป็นตัววัด) เป็นเวลานาน 15 นาที ส่งผลให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลงจาก 6.31 log_{10}CFUต่อกรัม เหลือ 4.37 log_{10}CFUต่อกรัม หรือประมาณ 2 log cycle คิดเป็นร้อยละ 30.7 ในขณะที่อุณหภูมิ 70 - 75 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลงจาก 6.41 log_{10}CFUต่อกรัม เหลือ 2.59 log_{10}CFUต่อกรัม หรือประมาณ 4 log cycle คิดเป็นร้อยละ 59.6 ส่วนที่อุณหภูมิ 70 - 75 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลงจาก 6.39 log_{10}CFUต่อกรัม เหลือ 2.09 log_{10}CFUต่อกรัม หรือประมาณ 4 log cycle คิดเป็นร้อยละ 67.3 ซึ่งสอดคล้องกับวิไล (2543) ที่ระบุว่าในทางทฤษฎีไม่สามารถทำลายแบคทีเรียได้หมด ซึ่งอาจไม่สามารถตรวจพบได้เนื่องจากเชื้อมีการบาดเจ็บจึงไม่สามารถเจริญในอาหารที่จำเพาะ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Staph. aureus* ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อนโดยใช้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และน้ำยาฆ่าเชื้อโรคทั่วๆไปแต่สารพิษของเชื้อทนต่อความร้อนมาก การต้มน้ำเดือด (100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที) ไม่สามารถทำลายสารพิษนี้ได้ (Doyle และคณะ, 1997) และที่อุณหภูมิระดับพาสเจอร์ไรส์ ได้แก่ อุณหภูมิ 66 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที หรืออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 83 นาที สามารถทำลายเซลล์ *Staph. aureus* ได้หมด โดยอาจตรวจไม่พบเนื่องจากเชื้อบาดเจ็บ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ค่า D-value ของเชื้อ *Staph. aureus* ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ของคัสตาร์ด มีค่าเท่ากับ 7.68-7.82 นาที (Anoymous, 2001b) และค่า F_{150} ของเชื้อ *Staph. aureus* ในคัสตาร์ด ใช้เวลา 5.2 นาที (Angelotti และคณะ, 1961) อย่างไรก็ตามความสามารถในการทนความร้อนของเชื้อ *Staph. aureus* ขึ้นกับสายพันธุ์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และชนิดของอาหาร (Lynn และ Bohach, 1997) ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนในไส้ครีมเอแคลร์ สูงกว่าอุณหภูมิดังกล่าว เชื้อ *Staph. aureus* จะเริ่มสูญเสียกิจกรรมภายในเซลล์และตายลง และอาจเนื่องจากจุลินทรีย์บางตัวมีความอ่อนแอ ทำให้ถูกทำลายได้ง่าย แต่ทั้งนี้เมื่อต้องเลือกเวลาในการให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ อาจต้องเลือกจากลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ (ดังภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.5) ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการให้ความร้อนไส้ครีมเอแคลร์ ในการทำให้สุกนั้น ต้องให้ความร้อน

เพียงแค่พอสุกเท่านั้น อุณหภูมิต้องไม่สูงถึง 100 องศาเซลเซียส เพราะถ้าสุกมากเกินไป ลักษณะของผลิตภัณฑ์นี้จะไม่น่ารับประทาน

ภาพที่ 4.3 ไส้ครีมเอแคลร์เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางกายภาพของไส้ครีมเอแคลร์ขณะให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 20 และ 25 นาที

เวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน (นาที)	ลักษณะทางกายภาพ
15	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะเป็นของเหลวใส สีเหลืองอ่อน
20	เนื้อครีมเนียนละเอียด อ่อนนุ่ม มีลักษณะข้นหนืด สีเหลืองอ่อน
25	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะข้นหนืด เป็นก้อนยืดหยุ่น สีเหลืองค่อนข้างเข้ม

ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ พบว่าที่ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เริ่มต้นเท่ากัน อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) นั่นคือเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส นาน 15 20 และ 25 นาที มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* เท่ากับร้อยละ 69.3 40.4 และ 32.7 ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.4) แสดงว่าที่เวลา 25 นาทีสามารถลดจำนวนเชื้อ *Staph. aureus* ได้มากที่สุด แต่เมื่อพิจารณาทางด้านลักษณะปรากฏ พบว่าที่เวลา 20 นาทีในการให้ความร้อนนั้นมีลักษณะใกล้เคียงกับที่จำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ส่วนที่เวลา 15 และ 25 นาทีนั้น มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่เหลวและกระด้างเกินไป

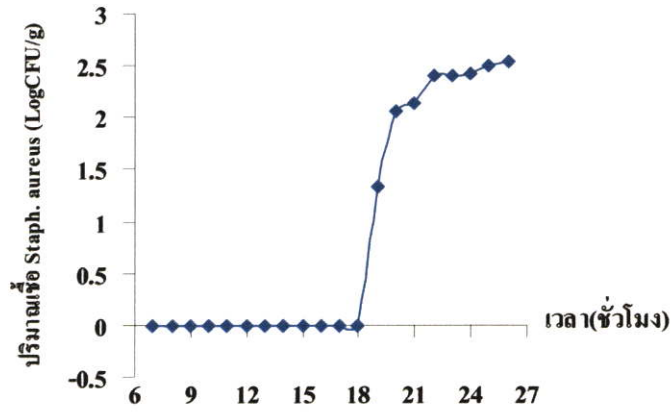
ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5) ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่ 20 นาทีในการให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ที่อุณหภูมิ 70 - 75 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ที่ปรับอุณหภูมิน้ำที่ใช้เป็นตัวกลางประมาณ 93±2 องศาเซลเซียส ในการศึกษาในขั้นตอนที่ 4.5 ต่อไป

เชื้อบาดเจ็บ (Injured Cell)

การใช้ความร้อนในการผลิตไส้ครีมเอแคลร์ที่มีการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ลงไปนั้น ในทางทฤษฎีไม่สามารถทำลายเชื้อให้เหลือศูนย์ได้ (วิไล, 2543) แต่ยังมีเชื้อรอดชีวิตอยู่ โดยเชื้อดังกล่าวอาจมีสภาพบาดเจ็บ และไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *Staph. aureus* คือ Baird-Parker agar (BPA) จัดเป็น Selective media ทำให้เชื้อ *Staph. aureus* ที่ผ่านความร้อน 70-75 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ไม่สามารถเจริญได้ เนื่องจากเชื้ออยู่ในสภาวะที่อ่อนแอ หรือบาดเจ็บ จึงต้องเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypicase soy broth ที่เติม 10%NaCl และ 1%pyruvate (TSB + 10%NaCl + 1%pyruvate) ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่จำเพาะต่อการเจริญ(Nonselective enumeration agar) แต่เชื้อ *Staph. aureus* ที่อยู่ในสภาวะอ่อนแอ หรือบาดเจ็บสามารถฟื้นตัวเองจากการบาดเจ็บได้ (ชญากานต์ และณัฐนิช, 2539) เนื่องจากสารอาหารเหล่านี้สามารถซ่อมแซมส่วน ประกอบของเซลล์ที่บาดเจ็บได้ ดังนั้นหลังการให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ที่ได้รับการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* จึงต้องทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB + 10%NaCl + 1%pyruvate (ภาพที่ 4.4) ก่อนหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต โดยระยะเวลา (ชั่วโมง)ในการฟื้นชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* สามารถนำไปใช้ในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บ โดยมีข้อแม้ว่าระยะเวลานั้นต้องไม่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเชื้อขึ้นมา

ภาพที่ 4.4 การเลี้ยงเชื้อ *Staph. aureus* บาดเจ็บ ในอาหาร TSB+10%NaCl+1%pyruvate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ดังนั้นเมื่อนำตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.2±0.1 Log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์ แล้วผ่านการให้ความร้อนโดยอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์อยู่ระหว่าง 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) แล้วถ่ายใส่อาหารที่ไม่จำเพาะต่อการเจริญ (TSB+10%NaCl+1%pyruvate) แล้วนำมาหาปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ทุก ๆ ชั่วโมง โดยมีหน่วยเป็น log_{10}CFUต่อกรัม ดังภาพที่ 4.5



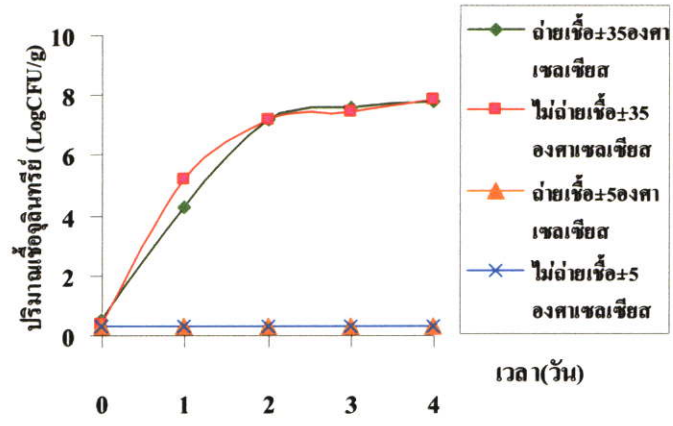
ภาพที่ 4.5 การเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* 6 Log_{10}CFUต่อกรัม

จากภาพที่ 4.5 พบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7-18 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* คงที่โดยไม่มีการเพิ่มขึ้น แต่ชั่วโมงที่ 19 เป็นต้นไป ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แสดงว่า ชั่วโมงที่เชื้อบาดเจ็บสามารถฟื้นตัวได้ คือ ชั่วโมงที่ 18 ดังนั้นในการทำ Pre-enriched ของไส้ครีมเอแคลร์ที่ผ่านการให้ความร้อน จึงเลือกใช้เวลาในการบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ที่ผ่านการให้ความร้อนต่อไป

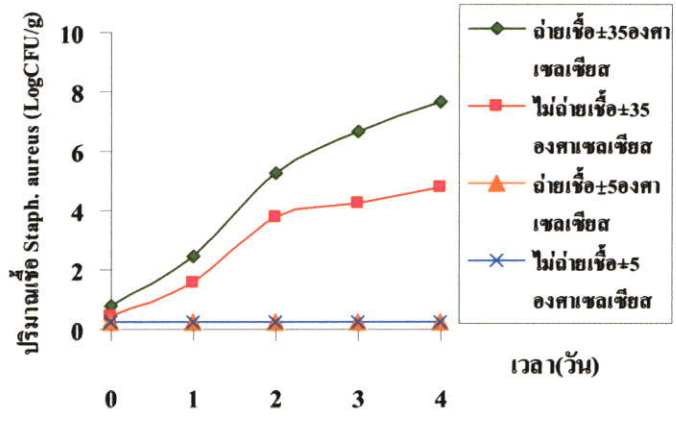
4.5 อายุการเก็บรักษาของไส้ครีมเอแคลร์

นำส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 6.2±0.1 Log_{10}CFUต่อกรัม และที่ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ทำการให้ความร้อนเป็นเวลา 20 นาที โดยนำมาให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) ที่ปรับอุณหภูมิน้ำที่ใช้เป็นตัวกลางประมาณ 93±2 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้อุณหภูมิของตัวผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์อยู่ระหว่าง 70 - 75 องศาเซลเซียส แล้วบรรจุในกระปุกแก้วปลอดเชื้อ มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโดยใช้อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) แล้วสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์จำนวนเซลล์ *Staph. aureus* และเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป เป็น

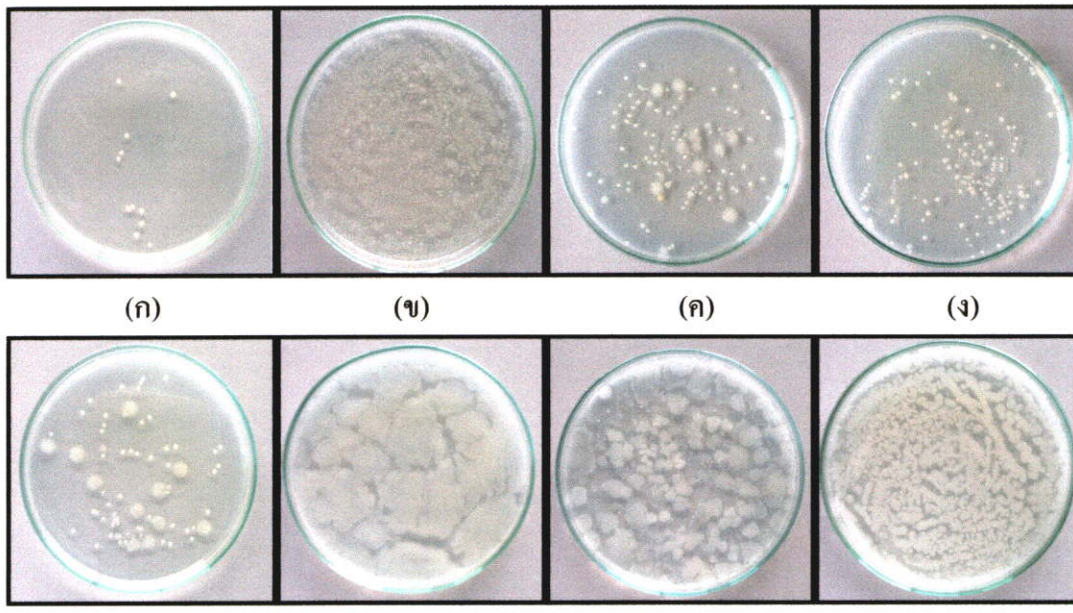
เวลา 5 วัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6-4.7 และ ภาพที่ 4.6-4.10 และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน



ภาพที่ 4.6 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายและไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ในช่วงเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส และ 5±2 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.7 ปริมาณเชื้อ*Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายและไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BPในช่วงเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส และ 5±2 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และเวลาต่าง ๆ

(ก) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^2cfu/g วันที่ 1

(ข) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^2cfu/g วันที่ 2

(ค) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^3cfu/g วันที่ 2

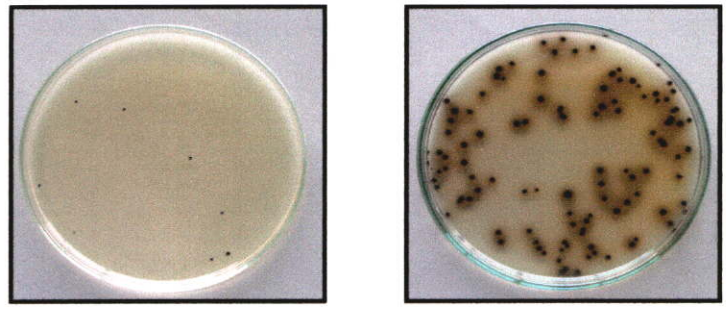
(ง) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^4cfu/g วันที่ 3

(จ) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^2cfu/g วันที่ 1

(ฉ) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^2cfu/g วันที่ 2

(ช) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^3cfu/g วันที่ 2

(ซ) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^3cfu/g วันที่ 3



ภาพที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staph. aureus* ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BP ที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) วันที่ 2

(ก) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^2cfu/g

(ข) ไส้ครีมเอแคลร์ที่ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^3cfu/g

ตารางที่ 4.6 ลักษณะทางกายภาพของไส้ครีมเอแคลร์ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส)

เวลาในการเก็บรักษา (วัน)	ลักษณะทางกายภาพของไส้ครีมเอแคลร์	
	อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส)
0	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะข้นหนืด จับตัวเป็นก้อน อ่อนนุ่ม สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมของไข่และนม	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะข้นหนืด จับตัวเป็นก้อน อ่อนนุ่ม สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมของไข่และนม
1	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะข้นหนืด จับตัวเป็นก้อน อ่อนนุ่ม สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นเหม็น	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะข้นหนืด จับตัวเป็นก้อน หยุ่น สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมของไข่และนม
2	เนื้อครีมมีการแยกชั้น ระหว่างตัวครีมเอแคลร์กับของเหลวใส มีกลิ่นเหม็น	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะข้นหนืด จับตัวเป็นก้อน หยุ่น สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมของไข่และนม
3	เนื้อครีมมีการแยกชั้น ระหว่างตัวครีมเอแคลร์กับของเหลวใส มีกลิ่นเหม็น	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะข้นหนืด จับตัวเป็นก้อน หยุ่น สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมของไข่และนม
4	เนื้อครีมมีการแยกชั้น ระหว่างตัวครีมเอแคลร์กับของเหลวใส มีกลิ่นเหม็น	เนื้อครีมเนียนละเอียด มีลักษณะข้นหนืด จับตัวเป็นก้อน หยุ่น สีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมของไข่และนม

(ก)

(ข)

ภาพที่ 4.10 ลักษณะตัวอย่างของไส้ครีมเอแคลร์ :

(ก) ตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) ในวันที่ 5

(ข) ตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ที่เก็บรักษาอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) ในวันที่ 5

เมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการลดปริมาณ เชื้อ *Staph. aureus* ของไส้ครีมเอแคลร์ที่เก็บในอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า การเก็บโดยการแช่เย็นที่ 5±2 องศาเซลเซียส ดีกว่าการเก็บโดยที่อุณหภูมิห้องที่ 35±2 องศาเซลเซียส เพราะในเก็บโดยการแช่เย็นที่ 5±2 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ไม่สามารถเจริญเพิ่มขึ้น แต่การเก็บที่อุณหภูมิห้องที่ 35±2 องศาเซลเซียส เชื้อ *Staph. aureus* มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ทั้งไส้ครีมเอแคลร์ที่มีการถ่ายเชื้อและไม่มีการถ่ายเชื้อ ดังตารางที่ 4.7 จากตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายเชื้อ 6.2±0.1 $\log_{10}$CFUต่อกรัม และไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน โดยไส้ครีม เอแคลร์ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 7.7 $\log_{10}$CFUต่อกรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BP ส่วนไส้ครีมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นจาก เป็น 0.5 $\log_{10}$CFUต่อกรัม เป็น 4.8 $\log_{10}$CFUต่อกรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BP

ตารางที่ 4.7 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์หลังการให้ความร้อนแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส)

เชื้อ *Staph. aureus* เริ่มต้น	ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ ($\log_{10}$CFUต่อกรัม)*				
		ระยะเวลาการเก็บ (วัน)				
		0	1	2	3	4
ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus*	BP**	0.8±0.02 ^{d}	2.5±0.03 ^{c}	5.3±0.04 ^{b}	6.7±0.05 ^{ab}	7.7±0.03 ^{a}
	PCA***	0.5±0.03 ^{c}	4.3±0.05 ^{b}	7.2±0.06 ^{a}	7.6±0.06 ^{a}	7.8±0.06 ^{a}
ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus*	BP	0.5±0.03 ^{e}	1.6±0.02 ^{d}	3.8±0.04 ^{c}	4.3±0.04 ^{b}	4.8±0.05 ^{a}
	PCA	0.4±0.04 ^{c}	5.2±0.06 ^{b}	7.2±0.05 ^{a}	7.5±0.05 ^{a}	7.9±0.06 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

* นำตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ที่ผ่านการให้ความร้อน เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ต้องทำการ pre-enriched ในอาหาร TSB+10%NaCl+1%pyruvate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

** BP = Baird Parker medium สำหรับตรวจนับปริมาณเชื้อ *Staph. aureus*

*** PCA = Plate Count Agar สำหรับตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

ตารางที่ 4.8 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์หลังการให้ความร้อนแล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส)

เชื้อ *Staph. aureus* เริ่มต้น	ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (log_{10}CFUต่อกรัม)*				
		ระยะเวลาการเก็บ (วัน)				
		0	1	2	3	4
ถ่ายเชื้อ *Staph.*	BP**	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]
aureus	PCA***	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]
ไม่ถ่ายเชื้อ *Staph.*	BP	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]
aureus	PCA	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]	0.3 [a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

* นำตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ที่ผ่านการให้ความร้อน เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ ต้องทำการ pre-enriched ในอาหาร TSB+10%NaCl+1%pyruvate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

** BP = Baird Parker medium สำหรับตรวจนับปริมาณเชื้อ *Staph. aureus*

*** PCA = Plate Count Agar สำหรับตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

ในกรณีของการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ โดยแช่เย็น(5±2 องศาเซลเซียส) ดีกว่า การเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ ที่อุณหภูมิห้อง(35±2 องศาเซลเซียส) คือ เมื่อเก็บไส้ครีมเอแคลร์เป็นเวลา 5 วัน ลักษณะทางกายภาพยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงนักอีกทั้งปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* และปริมาณเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ตรวจไม่พบ เนื่องจากการลดลงของอุณหภูมิส่งผลให้ เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้การเจริญเติบโตช้าลง (Tyski และคณะ,1983) และในทำนองเดียวกัน Yang และคณะ (2001) ได้ศึกษาผลการเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* ในไข่ตุ๋นและไข่กวนที่เก็บในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมินี้เชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น และเป็นที่รู้กันว่าการเจริญและการผลิตสารพิษของเชื้อ *Staph. aureus* สามารถป้องกันได้โดยเก็บอาหารที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส (Segalove and Dack, 1941; ICMSF, 1996; Crisley และคณะ, 1964) แต่เมื่อเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) จะมีอายุการเก็บรักษาสั้นกว่าเพราะในวันที่ 2 ที่ทำการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์เริ่มมีกลิ่นเหม็นและเริ่มแยกชั้นระหว่างน้ำและตัวครีมในวันที่ 3 อีกทั้งปริมาณเชื้อก็เพิ่มขึ้น

ดังนั้นการแช่เย็นที่ อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียสจึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ให้มีคุณภาพที่ดีก่อนรับประทาน

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของการใช้เฮอร์เดิลเทคโนโลยี ด้านการใช้อุณหภูมิความร้อน ระยะเวลาในการเตรียมส่วนผสม และการใช้อุณหภูมิขณะเก็บรักษา ในผลิตภัณฑ์ไส้ครีมเอแคลร์ สามารถสรุปได้ดังนี้

เมื่อศึกษาการเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* โดยถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 1.0±0.1 3.8±0.1 และ 6.2±0.1 Log_{10}CFUต่อกรัม ในไส้ครีมเอแคลร์แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) พบว่าระยะเวลาในการแบ่งตัว (generation time) ของเชื้อ *Staph. aureus* อยู่ในช่วง 1.2 -1.6 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาอุณหภูมิกับระยะเวลาการเตรียมส่วนผสมที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิแช่เย็น (5±2 องศาเซลเซียส) ที่เวลา 0 15 30 และ 60 นาที โดยถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 6.2±0.1 Log_{10}CFU ต่อกรัม พบว่าไม่ควรทิ้งส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกิน 15 นาที เพราะทำให้เชื้อ *Staph. aureus* เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ที่อุณหภูมิแช่เย็นไม่พบการเพิ่มจำนวน ในการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เมื่อถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 6.2±0.2 Log_{10}CFUต่อกรัม ที่เวลา 15 20 และ 25 นาที พบว่าเชื้อ *Staph. aureus* มีอัตราการรอดชีวิต ร้อยละ 69.3 40.4 และ 32.7 ตามลำดับ ถึงแม้ที่เวลา 25 นาทีจะลดปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ได้มากที่สุด แต่เนื่องจากลักษณะทางกายภาพที่เวลา 25 นาทีนั้น มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่แข็งกระด้างเกินไป ดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ คือที่เวลา 20 นาที

ในการศึกษาอุณหภูมิการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ โดยการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ให้มีปริมาณเชื้อในผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 6.2±0.1 Log_{10}CFUต่อกรัมและไม่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิแช่เย็น พบว่าที่อุณหภูมิการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็นดีกว่าเพราะปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้น แต่ที่อุณหภูมิห้องเชื้อ *Staph. aureus* เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยไส้ครีมที่มีการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* โดยเพิ่มจาก 0.8 เป็น 7.7 Log_{10}CFU ต่อกรัม และจาก 0.5 เป็น 4.8 Log_{10}CFUต่อกรัม ในไส้ครีมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ลงไป

ดังนั้นการแช่เย็นที่ อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาไส้ครีมเอแคลร์ให้มีความปลอดภัยที่ยอมรับได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ก่อนทำการทดลองควรตรวจสอบกลไก และระบบควบคุมต่าง ๆ ของเครื่องมือวัดและอุปกรณ์ที่ให้ความร้อนให้สามารถทำงานเป็นปกติ โดยต้องมีการสอบเทียบ และตัววัดอุณหภูมิ ที่ใช้ต้องมีความทนทานต่อสภาวะการให้ความร้อน และต้องสามารถตรวจสอบอุณหภูมิซ้ำได้

5.2.2 ขณะให้ความร้อนแก่ไส้ครีมเอแคลร์ ต้องกวนไส้ครีมขณะให้ความร้อนอย่างรวดเร็วและตลอดเวลา เพราะไส้ครีมเอแคลร์อาจสุกไม่ทั่วถึง

5.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Selective media คือ Baird – Parker agar (BPA) พบว่าเชื้อ *Staph. aureus* ที่ผ่านความร้อน 70 - 75 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากเชื้อดังกล่าวอยู่ในสภาวะที่อ่อนแอ หรือบาดเจ็บ จึงต้องเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + 10%NaCl + 1%pyruvate ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่จำเพาะต่อการเจริญ (Nonselective enumeration agar) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยเชื้อ *Staph. aureus* ที่อยู่ในสภาวะอ่อนแอ หรือบาดเจ็บสามารถรักษาตัวเองได้ แต่ยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้

5.2.4 เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง เช่น น้ำตาลทราย เนย เมื่อนำมาหาปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ใน Baird – Parker agar (BPA) ไม่ไม่พบโคโลนีของเชื้อ *Staph. aureus* เลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัตถุดิบที่ใช้ตรวจผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น การพาสเจอร์ไรส์ในนม เชื้อ *Staph. aureus* อาจเกิดการบาดเจ็บ จึงไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (Baird – Parker agar (BPA)) ดังนั้นเมื่อไส้ครีมเอแคลร์ผ่านการให้ความร้อนจึงสามารถตรวจพบเชื้อ *Staph. aureus* หลังทำการ pre-enriched ได้

บรรณานุกรม

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2536. *เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร*. เอกสารแนบท้ายประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 4 หน้า.

กองระบาดวิดยา. 2537. *รายงายการเฝ้าระวังโรคประจำสัปดาห์*. สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณะสุข. กรุงเทพฯ. 25 : หน้า 449-459.

ฟุจิโอะ อิโนะอุเอะ. 2546. *หนังสือชุดสุขลักษณะการผลิตในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เล่ม1*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี(ไทย-ญี่ปุ่น) 160 หน้า.

จิตธนา แจ่มเมฆ และ อรอนงค์ นัยวิกุล. 2546. *เบเกอรี เทคโนโลยีเบื้องต้น*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 224 หน้า.

ชญากานต์ มะลิวัลย์ และ ณัฐนิช กิตติก้องนภางค์. 2539. *การหาคงทนและเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ Staphylococcus aureus ในไอศกรีมพื้นบ้านไทย*. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 47 หน้า.

ทวีวัฒน์ สุภารส. 2539. *การถ่ายเทความร้อน*. เอกสารประกอบคำสอนการถ่ายเทความร้อน. ภาควิชาครุศาสตร์เครื่องกล. คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ. หน้า 29-47.

ทนง ภัครัชพันธุ์. 2524. *การใช้ความร้อนในขบวนการแปรรูป*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 1-160.

นิศานาถ ตัณฑัยย์. 2543. *ผลของความร้อนและโซเดียมคลอไรด์ต่อการอยู่รอดของ Listeria monocytogenes ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลพร้อมบริโภค*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 7-45.

พวงพร โชติกไกร. 2534. จุลชีววิทยาของอาหารและนม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. กรุงเทพฯ. 334 หน้า.

เพ็ญศรี รอดมา ทะนงพันธ์ สัจจปาละ และภัชราภรณ์ สุวรรณวิทยา. 2534. *การศึกษาปริมาณ Staphylococcus aureus ในอาหารแช่แข็ง*. วารสารอาหาร. 21: 97-204.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2547. *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. หน้า 56-131.

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. 2528. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 180-435.

มาลัย บุญรัตนกรกิจ สิริพร สธนเสาวภาคย์ พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์ และ จันทิมา จาปะเกษตร์. 2543. *คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาเก็ต.* วารสารอาหาร. 30: 37-43.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2539. *การถนอมและการแปรรูปอาหารด้วยการหมักดอง.* ในเอกสารการสอนชุดวิชาการถนอมและการแปรรูปอาหาร สาขาวิชาคหกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. กรุงเทพฯ. หน้า 61-89.

วิไล รังสาดทอง. 2543. *เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร* . ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. กรุงเทพฯ. เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น. หน้า 125-165.

สุมณฑา วัฒนสินธ์. 2541. *ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารและการควบคุม.* มูลนิธิอีซี่ประเทศไทย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2539. *จุลชีววิทยาทางอาหาร.* พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร. กรุงเทพ ฯ. หน้า 75-95.

อดิศร เสวตวิวัฒน์ ปรีชา จึงสมานุกูล มัณฑนา พันธ์บัวหลวง และอรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2537. *การศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์วิทยาของผลิตภัณฑ์เนื้อที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพมหานคร.* เกษตรพระจอมเกล้า. 12: 15-24.

Adam, M.R. and M.O. Moss. 1995. *Food Microbiology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 389 P.

Anderson,A., U. Ronner and P. E. Granum. 1995. *What problems does the food industry have with the spore- forming pathogens Bacillus cereus and Clostridium perfringen? Int.* J. Food Microbiol. 28: 145-155.

Angelotti, R., M.J. Foter, and K.H. Lewis. 1961. *Time-temperature effect on salmonellae and staphylococci in foods*.III.Thermal death time studies. Appl. Microbiol. 9: 308-315.

Anonymous. 2001a. *Letter to the editor*. Legal Medicine. 3: 123-124.

Anonymous. 2001b. *Alinorm 03/13. Report of the 34th session of the Codex Committee on Food Hygiene*. Codex Committee on Food Hygiene

AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis.* Association of Official Analytical Chemists. 17th ed. Gaithersburg, Maryland.

Balaban, N. and A. Rasooly. 2000. *Review staphylococcal enterotoxins*. Int. J. Food Microbiol. 61: 1-10.

Bonnell, A.D. 1994. *Quality Assurence in Seafood Processing*. Chapman Hall, New York. 208 pp.

Crisley, E.D., R. Angelotti, and M.J. Foter. 1964. *Multiplication of Staphylococcus aureus in synthetic cream filling and pies*. PublicHealth Rep. 79: 369-376.

Cynthia, B. J. and L. R. Beuchat. 1998. *Survival and growth of psychrotrophic Bacillus cereus in dry and reconstituted infant rice cereal*. J. Food Prot. 61: 1629-1635.

Defigueiredo, M.P. and D. F. Splittstoesser. 1976. *Food Microbiology*. The AVI Publishing Co. Inc., Connecticut. 492 pp.

Doyle, M.P., L.R. Beuchat and T.J. Montville. 1997. *Food microbiology fundamentals and frontiers*. Washington D.C. : ASM Press. 768 pp.

Eley, A.R. 1992. *Microbial Food Poisoning*. St.Edmundsbury Press, London. 191 pp.

Estefo, M.A. and C.M. Saavedra. 1996. *Bacteriological quality of pastries manufactured in factories in the Metroplitan regile (Chile), 1995*. Alimentaria. 137-141.

Farber, J.M. and F. Pagotto. 1992. *The effect of acid shock on the heat resistance of Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 15: 197-201.

FDA. 1994. *Fish and Fishery Products*. Hazard and Control Guide. 250 pp.

Frazier, W.C. and D.C. Westhoff. 1988. Food microbiology. 4th ed. McGraw-Hill. New York, Sydney. 341 pp.

Gilmour, A. and J. Harvey. 1990. *Staphylococci in milk and milk products*. J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl. 69: 147s-166s.

Golden, D.A., L.R. Beuchat and R.E. Brackett. 1998. *Interactivation and injury of Listeria monocytogenes as affected by heating and freezing*. Food Microbial. 5: 17-23.

Gould, G.W.1989. *Heat-Induced injury and inactivation*. Mechanism of action of food preservation procedure. Unilever Research Laboratory., Sharnbrook. Elsvier Science Publisher . Befford. pp.11-33.

Halpin, D.M. I. and E. H. Marth. 1989. *Staphylococcus aureus: Production of extracellular compounds and behavior in food review*. J. Food Prot. 52: 257-282.

Hatakka, M. 1998. *Microbiological quality of hot meals served by airlines*. J. Food Prot. 61: 1052-1056.

Hayes, P. R. 1985. *Food Microbiology and Hygiene*. Department of Microbiology, University of Leeds, UK. 403 pp.

Heid, J. L. and M. A. Joslyn. 1967. *Fundamentals of food processing operation*. The AVI . Westport Conn. 580 pp.

Helmy, Z.A., Y. Abd-el-Malek and A.A. Mahmoud. 1975. *Effect of sodium chloride on the staphylococcal growth in milk*. Zentralbl.Bakteriol. Abt.1. Orig. B 130: 334-342.

http://naichef.50megs.com/bakery4.html. 2006. *เรื่องเกี่ยวกับขนมอบ ตอนที่ 5*. บ้านอาหารนายเชฟ. Accessed date on September12, 2006.

http://www.region11.m-energy.go.th/mirror/ mirror21.htm. 2006. Accessed date on July18, 2006.

http://textbookofbacteriology.net/growth.html. 2006. *Growth of bacterial* populations. Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. Accessed date on July22, 2006.

http://textbookofbacteriology.net/staph.html. 2006. *Staphylococcus aureus*. Accessed date on July22, 2006.

ICMSF. 1988. *Healt and hygiene of personnel. Microorganisms In food :application of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system to ensure microbiological safety and quality*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. pp.117-128.

ICMSF. 1996. *Staphylococcus aureus in microorganisms in foods 5: characteristics of microbial phathogens*. Blackie Academic & Professional, London. pp.299-333.

ICMSF. 1998. *Cereals and cereal products in microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities*. Blackie Academic & Professional, London. pp.313-355.

Jay, J. M. 1992. *Modern food microbiology*. 4th ed. Chapman & Hall, New york. 701 pp.

Jay, J. M. 1996. *Modern food microbiology*. Chapman & Hall, New York. 661 pp.

Lee, W.H., C. L. Staples and J. C. Olson. 1975. *Staphylococcus aureus growth and survival in macaroni dough and the persistence of enterotoxin in the dried products*. J. Food. Sci. 40: 119-120.

Leistner, L. and G. W. Gould. 2002. *Hurdle technologies: combination treatments for food stability, safety, and quality*. Kluwer Academic/Plenum, New York. 194 pp.

Lynn, M. and G. Bohach. 1997. *Staphylococcus aureus*, pp. 353-375. In M. R Doyle, L. R. Beuchat and Y. J. Montville. *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM Press. Washington D.C.

Martin, S. E. and J. J. Iandolo. 2000. *Staphylococcus*, pp. 2062-2083. In Robinson R.K., C.A. Batt and D.D. Patel. *Encyclopedia of Food Microbiology vol.2*. Academic Press. Califonia.

Miwa, N., A. Kawamura, T. Masuda and M. Akiyama. 2001. *An outbreak of food poisoning due to egg yolk reaction negative Staphylococcus aureus*. Int. J. Food Microbiol. 64:361-366.

Notermans, S. and R.L.M. van Otterdijk. 1985. *Production of enterotoxin A by Staphylococcus aureus in food*. Int. J. Food Micribiol. 2: 145-149.

Olson, J.C., and G. Mocquot. 1980. *Milk and milk products in microbial ecology of food*. Academics Press, London. 2: 470-520.

Pacini, R., G. Galleschio, E. Tozzi, L. Malloggi, R. Galassi, E. Qvagli. 1996. *Biological hazards connected with consumption of animal origin foods*. Industries-Alimentori. 35: 27-32.

Pan, T.M., T.K. Wang, C.L. Lee, S.W. Chien and C.B. Horng. 1997. *Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan*, 1986 to 1995. J. Clinical Microbiol. 35: 1260-1262.

Pla, S., P. Mareno, F. Fagoaga, M.C. Rodriguez, M. Garcia, A. Torregrosa. 1996. *Bacteriological control of Cakes in the Alcoi health area*. Alimentaria. 15-53.

Razem, D. and B. Katusin. 1994. *The incidence and cost of foodborne diseases in Croatia*. J. Food Prot. 57: 746-753.

Reed, G.H. 1993. *Foodborne illness(part1) staphylococcal("Staph") food poisoning*. Dairy, Food and Environ. Sanitat. 13: 642.

Segalove, M., and G.M. Dack. 1941. *Relation of time temperature to growth and enterotoxin production of staphylococci*. Food Res. 6: 127-133.

Stewart, C. M., M. O. Cole, J.D. Legen, L. Slade, M. H. Vandevan and D. W. Schaffner. 2001. *Modeling the growth boundary of Staphylococcus aureus risk assessment purposes*. J. Food Prot. 64: 51-57.

Stewart, C. M., M. O. Cole and D. W. Schaffner. 2003. *Managing the Risk of Staphylococcal Food Poisoning from Cream-Filled Baked Goods to Meet a Food Safety Objective*. J. Food Prot. 66: 1310-1325.

Tucker,G. S., R. Philip. 2001. *Validation of heat process*. Thermal Technologies in Food Processing. Wood Head Publishing. pp.75-77.

Tyski, S., W. Hryniewicz and J. Jeljaszewics. 1983. *Purification and some properties of the staphylococcal extracellular lipase*. Biochem. Biophys. Acta 749: 312-317.

Varnam, A.H. 1991. *Foodborne Pathogens*. BPCC Hazell Book, London. 484 pp.

Yang, S.E., R.C. Yu and C.C Chou. 2001. *Influence of holding temperature on the growth and survival of Salmonella spp. and Staphylococcus aureus and the production of Staphylococcal enterotoxin in egg products*. Int. J. Food Microbiol. 63:99-107.

ภาคผนวก

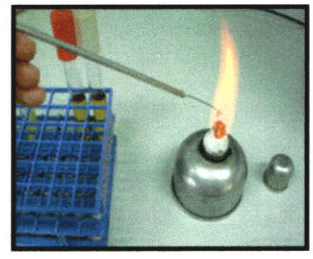
ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์

(Stock culture solution)

1. การเตรียมเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* (ดัดแปลงจาก Cynthia และ Beuchat, 1998)

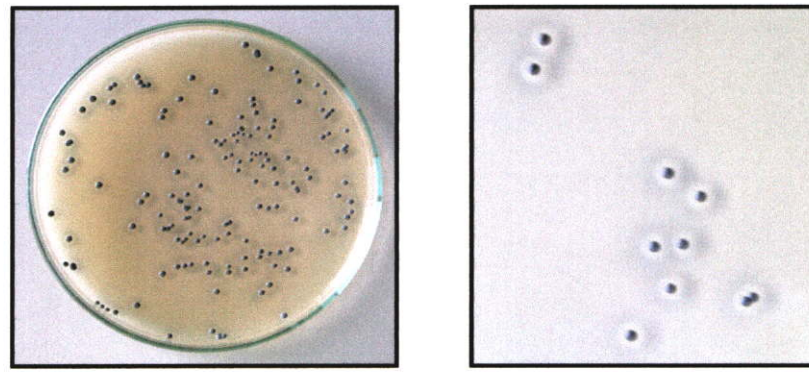
นำ Stock culture ของเชื้อ *Staph. aureus* ที่เก็บที่อุณหภูมิ 5±2 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) ประมาณ 6 ชั่วโมง ใช้ลูป (Loop) เขี่ยเชื้อ 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB; ค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 7.2) บรรจุในหลอดจำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อจาก TSB จำนวน 1 ลูป ถ่ายลงใน TSB หลอดใหม่ บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ (inoculum) ก่อนนำมาทำให้เจือจาง โดยใช้สารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 จนได้ความเข้มข้นของเซลล์ตามต้องการ สำหรับภาพที่ ก1 แสดงขั้นตอนการเผาลวดเขี่ยเชื้อก่อนการถ่ายเชื้อลงใน TSB



ภาพที่ ก 1 เขี่ยเชื้อ 1 ลูป ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth จำนวน 10 มิลลิลิตร

2. การตรวจนับเชื้อ *Staph. aureus*

ทำการเจือจางเชื้อ *Staph. aureus* ในสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ตรวจนับจำนวนเซลล์ปกติโดยดูดตัวอย่างจากสารละลายเปปโตน 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird - Parker agar(BPA) แล้ว Spread plate จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงตรวจนับจำนวนโคโลนี (Colony) ของเชื้อ *Staph. aureus* โดยเลือกนับลักษณะโคโลนีที่มีสีดำ และมีบริเวณโซนใส (Clear zone) บริเวณรอบๆ (ภาพที่ ก2) โดยแสดงผลเป็น $\log_{10}$CFUต่อกรัม และบันทึกผล



(ก) (ข)

ภาพที่ ก 2 ลักษณะเชื้อ *Staph. aureus* ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar :
(ก) โคโลนีสีดำ และมีบริเวณโซนใส (Clear zone) รอบๆ
(ข) ลักษณะของโซนใส (Clear zone) บริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อ *Staph. aureus*

ภาคผนวก ข

การผลิตไส้ครีมเอแคลร์

การผลิตไส้ครีมเอแคลร์

ขั้นตอนการผลิตไส้ครีมเอแคลร์ ประกอบด้วย การนำส่วนผสม นม เนย และน้ำตาลมาผสมให้ละลาย นำไข่ไก่ตอกใส่น้ำและแป้งข้าวโพดผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งสอง มาผสมให้เข้ากัน(ภาพที่ ข 1) นำไปให้ความร้อนโดยอาศัยความร้อนจากน้ำในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นตัวกลางส่งผ่านความร้อน (อุณหภูมิน้ำในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 93±2 องศาเซลเซียส) แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที (ภาพที่ ข 2) บรรจุในกระปุกแก้วปลอดเชื้อ (ภาพที่ ข 3) แล้วปิดฝาพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ (นำกระปุกและฝาพลาสติกฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที) จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส) (ภาพที่ ข 4)

(ก) (ข) (ค) (ง)

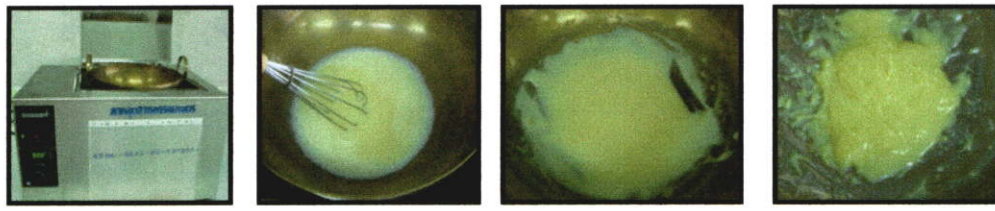
ภาพที่ ข 1 การเตรียมส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์:

(ก) ภาชนะเตรียมส่วนผสมที่ผ่านการต้มในน้ำเดือด

(ข) ไข่ไก่ที่ตอกแล้ว

(ค) เทน้ำตาลลงในส่วนผสม

(ง) ส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์ก่อนนำไปให้ความร้อน



(ก) (ข) (ค) (ง)

ภาพที่ ข 2 นำไส้ครีมเอแคลร์ให้ความร้อน โดยอาศัยความร้อนจากน้ำในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นตัวกลางส่งผ่านความร้อน (อุณหภูมิน้ำในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ ประมาณ 93±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 นาที :

(ก) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ

(ข) กวนส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์ขณะให้ความร้อน

(ค) ไส้ครีมเอแคลร์ขณะให้ความร้อน

(ง) ไส้ครีมเอแคลร์เมื่อสุก

(ก) (ข)

ภาพที่ ข 3 กระปุกและฝาพลาสติกฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที :

(ก) กระปุกแก้วขณะนำออกจากหม้อนึ่งความดัน

(ข) ทิ้งกระปุกแก้วปลอดเชื้อให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

(จ)

ภาพที่ ข 4 การบรรจุไส้ครีมเอแคลร์ :

(ก) ช้อนจุ่มแอลกอฮอลล์ร้อยละ 95 นำมาลนไฟ ก่อนตักไส้ครีมเอแคลร์

(ข) ลนไฟบริเวณปากกระปุกแก้วก่อนบรรจุไส้ครีมเอแคลร์

(ค) ชั่งไส้ครีมเอแคลร์

(ง) ลนไฟบริเวณปากกระปุกแก้วหลังบรรจุไส้ครีมเอแคลร์

(จ) ไส้ครีมเอแคลร์ในภาชนะบรรจุ

การเตรียมตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์

เตรียมตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์โดยชั่งตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ 25 กรัม บรรจุในกระปุกแก้วปราศจากเชื้อ ในแต่ละ 25 กรัมตัวอย่างอาหาร ปิเปตเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus* โดยกำหนดจำนวนเซลล์ในตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์เท่ากับ 10^2 10^4 และ 10^6 CFUต่อกรัมเอแคลร์ ปิดฝากระปุกโดยใช้ฝาพลาสติกปราศจากเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ ข5

(ก) (ข) (ค)

ภาพที่ ข 5 ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ *Staph. aureus* ในตัวอย่างไส้ครีมเอแคลร์ :

(ก) ปิเปตเซลล์ของเชื้อ *Staph. aureus*

(ข) ส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์ก่อนถ่ายเชื้อ *Staph. aureus*

(ค) ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* ลงส่วนผสมไส้ครีมเอแคลร์

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาระยะเวลาในการแบ่งตัว (Generation Time)

สามารถนำความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกับเวลามาใช้ในการคำนวณอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารได้ตามหลักคณิตสาสตร์ กล่าวคือ ในช่วงที่มีการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียอย่างรวดเร็ว (log phase) ความสัมพันธ์ของ log จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตกับเวลาจะเป็นเส้นตรง ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในช่วงลอกเฟส (Log phase) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถคำนวณได้โดยใช้สูตรทางคณิตศาสตร์ ดังนี้ (ฟุจิโอะ, 2546)

$$\boxed{G = t/n}$$

G = ระยะเวลาในการแบ่งตัวเพิ่มเท่าตัว

t = ช่วงเวลา หน่วย ชั่วโมง หรือ นาที

B = จำนวนของเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น

b = จำนวนของเชื้อแบคทีเรียหลังจากเวลาผ่านไป t

n = จำนวนรุ่นของการเจริญเติบโตจากปริมาณ B ถึงปริมาณ b

$$b = B \times 2^n$$

หาค่า n:

$$\log b = \log B + n \log 2$$

$$n = \frac{\log b - \log B}{\log 2}$$

$$n = \frac{\log b - \log B}{0.301}$$

$$n = 3.3 \log b/B$$

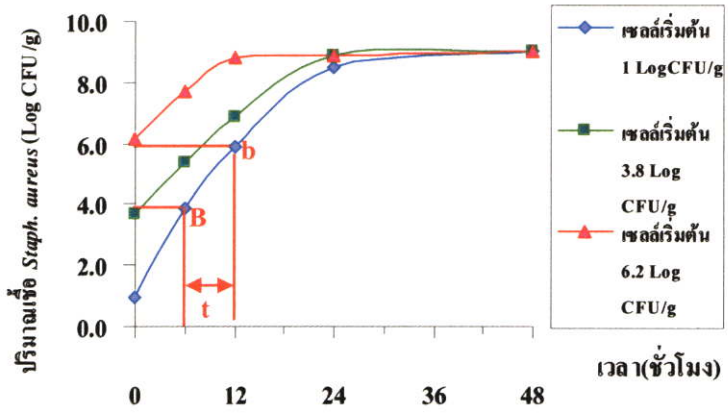
ดังนั้น ระยะเวลาการแบ่งตัวเพิ่มเท่าตัว **(G)** $= \dfrac{t}{\mathbf{3.3 \log b/B}}$

วิธีการคำนวณ :

ตารางที่ ค 1 ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ที่เวลาต่างๆ โดยเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* (Log_{10} CFU/g)		
0	1.0	3.8	6.2
6	3.9	5.4	7.7
12	5.9	6.9	8.8
24	8.5	8.9	8.9
48	9.0	9.0	9

เมื่อนำผลข้างต้นมาสร้างกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ *Staph. aureus* log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์ กับเวลา (ดังภาพที่ 4.1)



ภาพที่ ค 1 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ *Staph. aureus* log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์ กับเวลา(ชั่วโมง) ที่จำนวนเซลล์เริ่มต้นต่างกัน ณ อุณหภูมิห้อง (35±2 องศาเซลเซียส)

ดังนั้นเมื่อแทนค่าในสูตร $G = \dfrac{t}{3.3 \log b/B}$

$$G = \frac{6 \text{ ชั่วโมง}}{3.3\ (5.9/3.9)}$$

$$G = \frac{6 \text{ ชั่วโมง}}{3.3 \times 1.5} = 1.2 \text{ ชั่วโมง}$$

ดังนั้น ระยะในการแบ่งตัว 1.2 ชั่วโมง

ภาคผนวก ง

การคำนวณหาอัตราการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus*

ตารางที่ ง 1 ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่เวลาต่างๆ

เวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน (นาที)	ปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* (Log_{10}CFU/g)	
	ก่อนให้ความร้อน	หลังให้ความร้อน
15	6.31 [a]	4.37 [a]
20	6.41 [a]	2.59 [b]
25	6.39 [a]	2.09 [c]

ถ้าก่อนการให้ความร้อนมีปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เท่ากับ 6.31 Log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์ และหลังให้ความร้อนมีปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* เท่ากับ 4.37 Log_{10}CFUต่อกรัมเอแคลร์ ในการคำนวณอัตราการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* เป็นร้อยละ ทำได้โดย

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.31 Log_{10}CFU/g ผ่านการให้ความร้อนลดลงเหลือ 4.37 Log_{10}CFU/g

ถ้าปริมาณเชื้อเริ่มต้น 100 Log_{10}CFU/g ผ่านการให้ความร้อนลดลงเหลือ $\frac{4.37 \times 100}{6.31}$

$= 69.3$ Log_{10}CFU/g

ดังนั้น อัตราการเหลือรอดชีวิตของเชื้อ *Staph. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เท่ากับ 69.3 Log_{10}CFUต่อกรัม

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อบาดเจ็บ

การตรวจนับปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* ที่เหลือรอดจากการให้ความร้อน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth เป็น Pre-enrichment medium โดยนำไส้ครีมเอแคลร์ที่ถ่ายเชื้อ *Staph. aureus* แล้วผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส มา 25 กรัมใส่ในฟลาสก์ (Flask) ที่บรรจุ Trypicase soy broth ที่เติม 10%NaCl และ 1%pyruvate 225 มิลลิลิตร (TSB + 10%NaCl + 1%pyruvate; ค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 7.0) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน(ดังภาพที่ จ 1) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-26 ชั่วโมง โดยทุก ๆ ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหาปริมาณเชื้อ *Staph. aureus* โดยทำการเจือจางในสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ตรวจนับจำนวนเซลล์ปกติโดยดูดตัวอย่างจากสารละลายเปปโตน 0.1 มิลลิลิตร ถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird - Parker agar(BPA) แล้ว Spread plate จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงตรวจนับจำนวนโคโลนี (Colony) ของเชื้อ *Staph. aureus* โดยเลือกนับลักษณะโคโลนีที่มีสีดำ และมีบริเวณโซนใส (Clear zone) บริเวณรอบๆ โดยแสดงผลเป็น $\log_{10}$CFUต่อกรัม และบันทึกผล

ภาพที่ จ 1 การเลี้ยงเชื้อ *Staph. aureus* บาดเจ็บ ในอาหาร TSB+10%NaCl+1%pyruvate ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวพรรณ์วลัย บ้านศาลเจ้า

วันเดือนปีที่เกิด 27 พฤศจิกายน 2524

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.2545 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการอาหาร)
มหาวิทยาลัยศิลปากร