บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. แหล่งปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในการผลิตเต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกร

การสำรวจกระบวนการผลิตเต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกรในจังหวัดตรัง ด้วยแบบสำรวจ (ภาคผนวก จ) และสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* เพื่อศึกษาการ ปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในการผลิตเต้าเจี้ยว โดยเลือกตัวแทนผู้ผลิต 2 กลุ่ม จากผู้ผลิตทั้งหมดจำนวน 7 กลุ่มในจังหวัดตรัง คือ กลุ่มเกษตรกรวัดกลางพัฒนา ซึ่งผลิตภัณฑ์ได้รับรองคุณภาพ (อ.ย.) และกลุ่มเกษตรกรบ้านปากคม ซึ่งผลิตภัณฑ์ยังไม่ได้รับรองคุณภาพ โดยสำรวจในระหว่างเดือนกรกฎาคม 2545 – เดือนพฤศจิกายน 2545 ได้ข้อมูลด้านการผลิตและการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ดังนี้ คือ

1.1 ผลสำรวจข้อมูลการผลิตเต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกร

1.1.1 กลุ่มเกษตรกรวัดกลางพัฒนา

เต้าเจี้ยวจากกลุ่มเกษตรกรวัดกลางพัฒนา เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับรองคุณภาพตามเกณฑ์ของกระทรวงสาธารณสุข (ภาคผนวก ค) เมื่อ พ.ศ. 2542 มีจำนวนสมาชิก 10 คน มีการผลิตทุกสัปดาห์ มีปริมาณการผลิต 1,000 ถึง 2,000 ขวดต่อเดือน น้ำหนักบรรจุ 250 กรัมต่อขวด ซื้อวัตถุดิบจากร้านค้าทั่วไปในจังหวัดตรัง โดยซื้อถั่วเหลือง ครั้งละ 3-4 กระสอบ (กระสอบละ 50 กิโลกรัม) ซึ่งบรรจุในกระสอบพลาสติกสีขาว ปิดปากถุงด้วยเชือก แป้งสาลีตราว่าวครั้งละ 1-2 กระสอบ (กระสอบละ 22 กิโลกรัม) และเกลือป่นละเอียดครั้งละ 4-5 มัด ขนาดบรรจุ 200 กรัมต่อ 1 ห่อ (50 ห่อต่อ1มัด) ซื้อเชื้อ *A. oryzae* จาก จังหวัด อ่างทอง ครั้งละ 1 ห่อ (500 กรัม) วัตถุดิบที่ซื้อแต่ละครั้งใช้ภายใน 1 เดือน ถั่วเหลือง แป้งสาลี และเกลือ วางบนโต๊ะ เก็บในห้องผลิตโคจิ และเก็บเชื้อ *A. oryzae* ในถุงพลาสติกมัดด้วยหนังยาง ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนขวดแก้วสำหรับบรรจุเต้าเจี้ยววางบนโต๊ะในบริเวณผลิต

1) กระบวนการผลิต ในการผลิตแต่ละครั้งใช้ถั่วเหลือง 60 กิโลกรัม แป้ง 10 กิโลกรัม เกลือ 30 กิโลกรัม และเชื้อ *A. oryzae* 120 กรัม มีวิธีผลิตดังนี้ คือ ล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำก๊อก 3 - 4 ครั้ง แล้วแช่น้ำค้างคืน 1 คืน (12 – 15 ชั่วโมง) โดยไม่เปลี่ยนน้ำแช่ถั่วเหลือง แยกถั่วเหลืองออกจากน้ำที่แช่ แล้วต้มถั่วเหลืองให้สุกที่อุณหภูมิสูงกว่า 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 45 นาที โดยต้มครั้งละ 2 กระทะ กระทะละ 15 กิโลกรัม แยกถั่วเหลืองออกแล้ววางพักให้เย็นในกระด้งประมาณ 2 ชั่วโมง สำหรับแป้งสาลีจะคั่วที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และวางพักให้เย็นประมาณ 2 ชั่วโมง ผสมถั่วเหลืองสุก แป้งสาลีที่คั่ว และหัวเชื้อ *A. oryzae* ในอัตราส่วนเท่ากับ 60 กิโลกรัม : 10 กิโลกรัม : 120 กรัม เกลี่ยบนกระด้งไม้ไผ่แล้วใช้ผ้าขาวบางคลุมด้านบน บ่มในห้องผลิตโคจิ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำโคจิที่ได้บรรจุในโอ่งเคลือบแล้วเติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 37 ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ววางทิ้งไว้ให้เย็นเป็นเวลา 12 ชั่งโมง ปิดปากโอ่งด้วยแผ่นพลาสติกใสและรัดด้วยหนังยางโดยรอบ บ่มในห้องหมักภายในตัวอาคาร เป็นเวลา 3-4 เดือน แล้วเติมน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 27 ในเต้าเจี้ยวที่หมักได้ และต้มที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แล้วบรรจุขณะร้อนในขวดแก้วที่ผ่านการนึ่งด้วยไอน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที

2) อุปกรณ์และภาชนะต่าง ๆ ได้แก่ กระด้งสำหรับวางพักถั่วเหลืองและโคจิ ใช้กระด้งทำจากไม้ไผ่ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำยาสำหรับล้างจานและใช้แปรงลวดขัดทุกครั้งและผึ่งให้แห้ง โอ่งเคลือบล้างด้วยน้ำยาสำหรับล้างจานและลวกด้วยน้ำต้มเดือดก่อนใช้ทุกครั้ง สำหรับ ไม้พาย ตะหลิว ทำความสะอาดด้วยน้ำยาสำหรับล้างจานและใช้ขัดด้วยแผ่นขัดทุกครั้ง และเก็บอุปกรณ์ที่แห้งแล้วบนโต๊ะ

3) สถานที่ผลิต อาคารผลิตตั้งอยู่ในบริเวณหมู่บ้าน ไม่มีรั้ว ห่างจากถนนประมาณ 200 เมตร และมีสัตว์เลี้ยงเข้าในบริเวณผลิตได้ ตัวอาคาร ประกอบด้วยบริเวณผลิตมีลักษณะเป็นลานทั้งด้านหน้าและหลังตัวอาคาร มีห้องหมักโคจิและห้องหมักเต้าเจี้ยวแยกออกจากกัน โดยบริเวณลานมีพื้นเป็นคอนกรีต ด้านหน้าใช้สำหรับวางพักถั่วเหลืองให้เย็นและวางโอ่งเคลือบที่ยังไม่ได้ใช้ ด้านหลังมีเตาก่อด้วยดินเหนียว

ใช้สำหรับต้มถั่วเหลือง คั่วแป้งสาลี ต้มน้ำเกลือและผลิตภัณฑ์ ห้องเตรียมโคจิ ด้านล่างเป็นปูนซิเมนต์ด้านบนตีด้วยไม้ระแนงมีมุ้งลวดที่ไม้ระแนงและประตู มีลักษณะโปร่งอากาศถ่ายเทได้สะดวก มีชั้นทำด้วยไม้สำหรับวางกระด้งโคจิ ห้องหมักเต้าเจี้ยวเป็นปูนซิเมนต์ มีลักษณะทึบ ไม่เปิดหน้าต่าง มีประตูปิด ทำให้แสงแดดไม่สามารถส่องผ่านได้ วางโอ่งหมักเต้าเจี้ยวบนพื้นห้องหมัก สำหรับขยะจากการผลิตทิ้งด้านหลังติดกับอาคารผลิต (ภาพที่ 4)

จากข้อมูลการผลิตพบว่า ควรแก้ไขในเรื่องสถานที่ผลิต คือให้มีห้องเก็บวัตถุดิบและห้องเตรียมโคจิที่แยกกันอย่างชัดเจน เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในวัตถุดิบปนเปื้อนในโคจิในระหว่างการผลิตโคจิได้ และควรมีรั้วเพื่อป้องกันสัตว์ไม่ให้เข้ามาในบริเวณผลิต

1.1.2 กลุ่มเกษตรกรบ้านปากคม

เต้าเจี้ยวจากกลุ่มเกษตรกรบ้านปากคม เป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่ได้รับรองคุณ-ภาพ มีปริมาณการผลิตประมาณ 150 ถึง 200 ขวดต่อเดือน น้ำหนักบรรจุ 250 กรัมต่อขวด วัตถุดิบทั้งหมดซื้อจากร้านค้าทั่วไปในจังหวัดตรัง โดยซื้อถั่วเหลืองครั้งละ 50 กิโลกรัม (ถุงละ 1 กิโลกรัม) บรรจุในถุงพลาสติกใส ปิดสนิท แป้งสาลีครั้งละ 10 กิโลกรัม (ถุงละ 1 กิโลกรัม) บรรจุในถุงพลาสติกใส มัดด้วยหนังยาง เกลือป่นละเอียดครั้งละ 1-2 มัด ขนาดบรรจุ 220 กรัมต่อห่อ (50 ห่อต่อ1มัด) และเชื้อ *A. oryzae* ครั้งละ 5 ถุง (ถุงละ 20 กรัม) วัตถุดิบที่ซื้อแต่ละครั้งใช้หมดภายใน 1 เดือน โดยถั่วเหลือง แป้งสาลี และเกลือ วางบนโต๊ะในห้องเก็บวัตถุดิบ และ เก็บเชื้อ *A. oryzae* ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนขวดแก้วสำหรับใส่เต้าเจี้ยว วางบนพื้นในบริเวณผลิต

1) กระบวนการผลิต การผลิตแต่ละครั้งใช้ถั่วเหลือง 10 กิโลกรัม แป้งสาลี 2 กิโลกรัม เกลือ 5 กิโลกรัมและเชื้อ *A. oryzae* 20 กรัม มีกระบวนการผลิตดังนี้ คือ ล้างถั่วเหลือง 3 - 4 ครั้ง แล้วแช่น้ำค้างคืน 1 คืน (12 – 15 ชั่วโมง) ไม่เปลี่ยนน้ำในระหว่างที่แช่ถั่วเหลือง แยกถั่วเหลืองออกแล้วนึ่งให้สุกที่อุณหภูมิประมาณ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที วางพักให้เย็นในตะกร้าพลาสติกโปร่งประมาณ 1 ชั่วโมง

ที่บริเวณผลิต สำหรับแป้งสาลีจะคั่วที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และวางพักให้เย็น ประมาณ 30 นาที แล้วผสมถั่วเหลืองสุก แป้งสาลีที่คั่ว และเชื้อ *A. oryzae* ในอัตราส่วนเท่ากับ 10 กิโลกรัม : 2 กิโลกรัม : 20 กรัม เกลี่ยใส่ตะกร้าพลาสติก บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำโคจิที่ได้บรรจุในโอ่งเคลือบแล้วเติมน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วพักให้เย็นเป็นเวลา 4 ชั่งโมง ปิดปากโอ่งด้วยผ่านพลาสติกใสและมีหนังยางมัดโดยรอบ บ่มในห้องหมัก ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3–4 เดือน นำเต้าเจี้ยวที่ได้ต้มที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วบรรจุขณะร้อนในขวดแก้วที่นึ่งด้วยไอน้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที

2) อุปกรณ์และภาชนะต่าง ๆ ได้แก่ ตะกร้าสำหรับวางพักถั่วเหลืองและโคจิ ใช้ตะกร้าพลาสติกโปร่ง ล้างด้วยน้ำยาล้างจานและขัดด้วยแผ่นขัดทุกครั้งแล้วผึ่งให้แห้ง โอ่งเคลือบสำหรับหมัก ล้างด้วยน้ำยาทำความสะอาดแล้วคว่ำให้แห้งและลวกด้วยน้ำร้อนก่อนใช้ อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ไม้พาย ตะหลิว ทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด แล้วผึ่งให้แห้งและเก็บในห้องเก็บของ

3) สถานที่ผลิต อาคารผลิตอยู่ในบริเวณบ้าน มีรั้ว อยู่ห่างจากถนนประมาณ 50 เมตร ตัวอาคารประกอบด้วยอาคารผลิตและอาคารสำหรับหมัก แยกออกจากกัน โดยอาคารผลิตมีพื้นเป็นคอนกรีต มีผนังเป็นปูนซิเมนต์ด้านล่าง ด้านบนของผนังและประตูทำด้วยตาข่าย เป็นบริเวณสำหรับเตรียมถั่วเหลือง แป้งสาลี ต้มน้ำเกลือและผลิตภัณฑ์ และมีห้องเก็บของ 1 ห้อง ผนังเป็นปูนซิเมนต์ มีลักษณะทึบ ไม่เปิดหน้าต่างและใช้เป็นห้องหมักโคจิ ส่วนอาคารหมักเต้าเจี้ยว มีลักษณะโปร่ง ผนังเป็นปูนซีเมนต์ด้านล่าง ผนังด้านบนเป็นมุ้งลวด หลังคาที่ใช้กระเบื้องใสทำให้แสงแดดส่องผ่านได้ หน้าต่างและประตูใช้มุ้งลวดเพื่อป้องกันแมลง โดยวางโอ่งหมักบนม้าหินสูงจากพื้น 30 เซนติเมตร (ภาพที่ 5)

จากข้อมูลการผลิตพบว่า ควรแก้ไขในเรื่องสถานที่ผลิต คือจัดให้มีห้องเก็บวัตถุดิบและห้องเตรียมโคจิที่แยกกันอย่างชัดเจน เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในวัตถุดิบปนเปื้อนในโคจิในระหว่างการผลิตโคจิได้ ทั้งนี้ลักษณะการผลิตอาจมีโอกาสปนเปื้อนจากฝุ่นละอองได้ด้วย

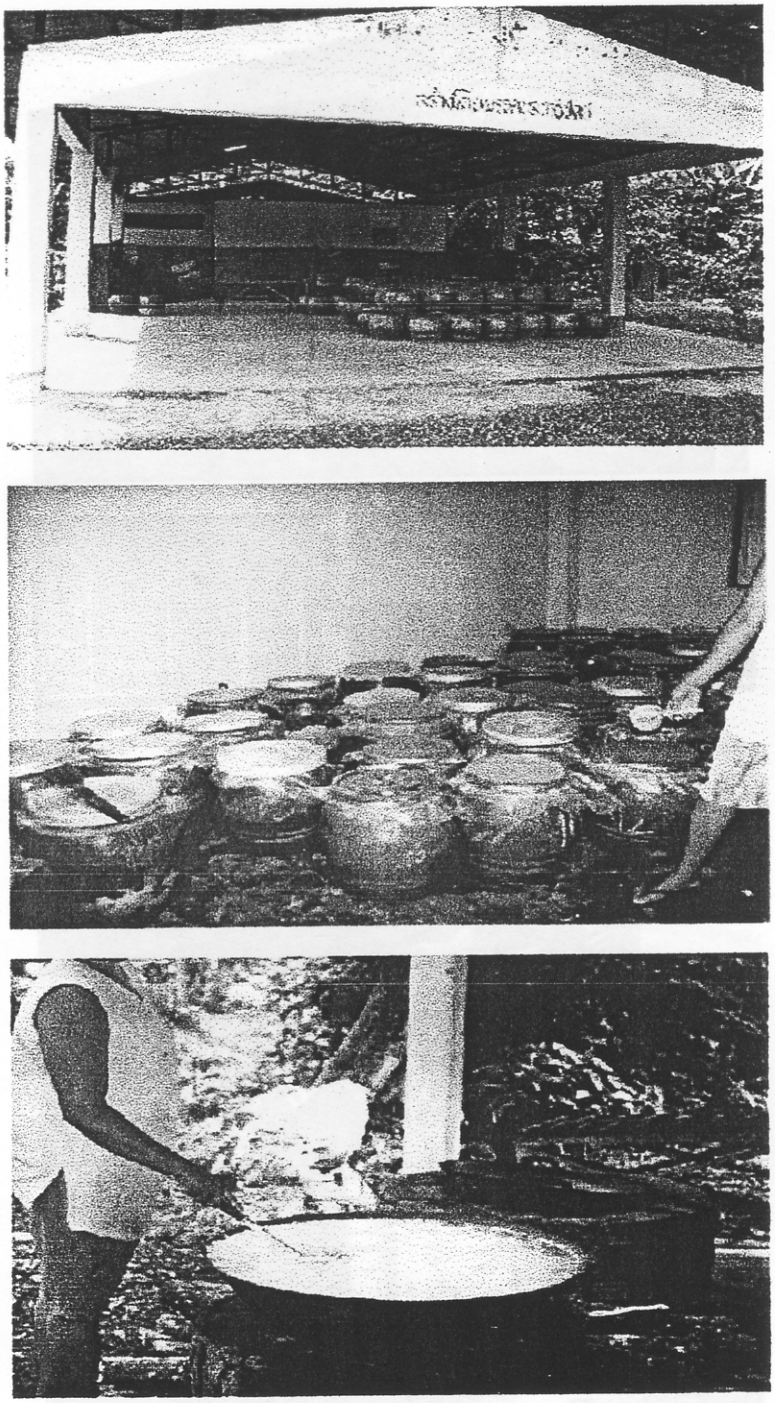


Figure 4 Production area, fermenting room and boiling of soybean (Watkangpattana's group)

ภาพที่ 4 อาคารผลิต ห้องหมักเต้าเจี้ยวและการต้มถั่วเหลืองของกลุ่มเกษตรกรวัดกลางพัฒนา

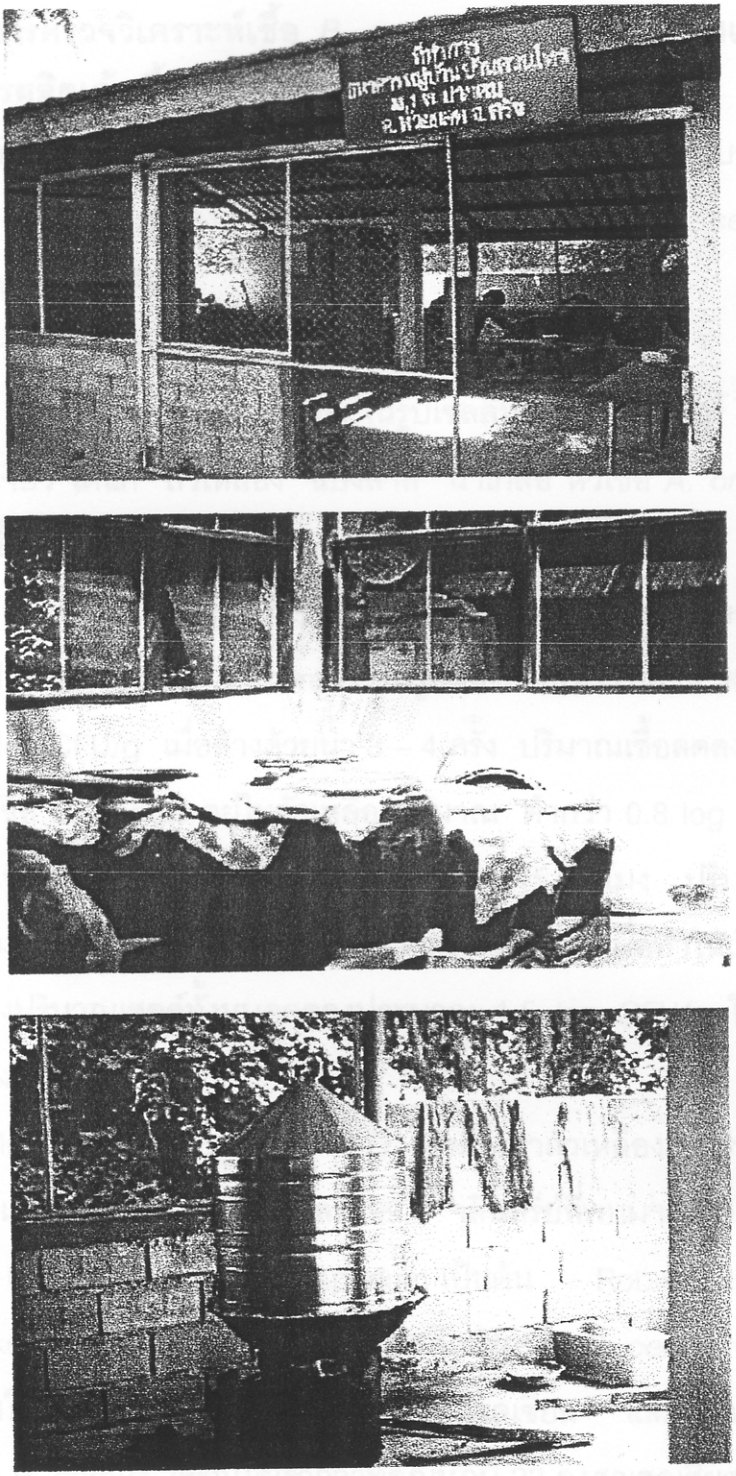


Figure 5 Production area, fermenting room and steaming of soybean (Banparkkom's group)

ภาพที่ 5 อาคารผลิต ห้องหมักเต้าเจี้ยวและการนึ่งถั่วเหลืองของกลุ่มเกษตรกรบ้านปากคม

1.2 การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *B. cereus* เพื่อศึกษาการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตเต้าเจี้ยวจากกลุ่มเกษตรกร

เมื่อตรวจวิเคราะห์ เชื้อ *B. cereus* ในวัตถุดิบและกระบวนการผลิตแต่ละขั้นตอน จากกลุ่มเกษตรกรทั้ง 2 กลุ่ม พบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ดังนี้คือ

1.2.1 ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในวัตถุดิบ

การตรวจเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเต้าเจี้ยว ได้แก่ ถั่วเหลือง แป้งสาลี น้ำเกลือ หัวเชื้อ *A. oryzae* ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้ คือ

1) ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองที่ใช้ในการผลิตเต้าเจี้ยวจากกลุ่มเกษตรกรทั้งสองกลุ่ม พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ในปริมาณ 0.6 ถึง 1.6 log CFU/g เมื่อล้างด้วยน้ำ 3 – 4 ครั้ง ปริมาณเชื้อลดลง 0.6 ถึง 0.8 log CFU/g จึงมีเชื้อ *B. cereus* อยู่ในถั่วเหลืองปริมาณ ต่ำกว่า 0.8 log CFU/g แต่เมื่อแช่ถั่วเหลืองในน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ถึง 15 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เพิ่มขึ้น 2.3 และ 0.7 log CFU/g ตามลำดับ และเมื่อทำให้ถั่วเหลืองสุก ด้วยการต้มหรือนึ่งปริมาณเซลล์ทั้งหมดลดลงประมาณ 1.5 log CFU/g ในขณะที่ปริมาณสปอร์ไม่ลดลง (ภาพที่ 6)

Mislivec และ Bruce (1977) กล่าวว่าถั่วเหลืองมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวนอก คิดเป็นร้อยละ 99.4 จุลินทรีย์ที่พบมาก ได้แก่ เชื้อรา ชนิด Aspergillus Penicillium และ Cladosporium เป็นต้น Roberts และ คณะ (1996) อ้างจาก Blakey และ Priest (1980) พบว่าเซลล์เจริญของ *B. cereus* จะเพิ่มจำนวนได้เมื่อแช่ถั่วแดงในน้ำที่อุณหภูมิ 22 และ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อ *B. cereus* เจริญได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 37 และ 22 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าได้ ภายใน 2.8 และ 6.6 ชั่วโมง ตามลำดับ

2) แป้งสาลี แป้งสาลีที่ใช้ในการผลิตเต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกรทั้งสองมีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ในปริมาณ 1.0 ถึง 1.6 log CFU/g หลังจากคั่วแป้งสาลีที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าปริมาณเซลล์ทั้งหมดลดลงเหลือ 1.3 log CFU/g ในขณะที่มีปริมาณสปอร์ลดลงเพียง 0.09 คือเหลือสปอร์อยู่ในช่วง 0.9 – 1.3 log CFU/g (ภาพที่ 6) แสดงว่าความร้อนที่ใช้ในการผลิตไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ได้ Varnam และ Evans (1996) กล่าวว่า สปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ทนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ได้ตั้งแต่ 4.8 นาที ถึง มากกว่า 500 นาที

Rosenkvist และ Hansen (1995) พบว่าในขนมปังที่อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ไม่สามารถทำลาย สปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในขนมปัง ซึ่งปนเปื้อนมาจากแป้งสาลีที่ใช้เป็นวัตถุดิบได้

3) หัวเชื้อเริ่มต้น (Starter) ใช้เชื้อราชนิด *A. oryzae* ในลักษณะเป็นผงสีเขียว พบว่ามีสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในปริมาณ 2.0 log CFU/g เนื่องจากการผลิตผง สปอร์เชื้อรา *A. oryzae* สำหรับการผลิตซีอิ้วและเต้าเจี้ยว โดยทั่วไปนิยมใช้ปลายข้าวเป็นวัสดุในการผลิต ซึ่ง Kramer Gilbert (1989) กล่าวว่าข้าวเปลือกมีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* คิดเป็นร้อยละ 46 -100 และการศึกษาของ Harmon และ Kautter (1991) พบว่าข้าวที่หุงสุกแล้วยังคงมีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละ 92 ในปริมาณ 6 log CFU/g เมื่อวางที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง Piernas และ Guiraud (1997) กล่าวว่าเมื่อความชื้นและอุณหภูมิเหมาะสม เชื้อ *B. cereus* ในเมล็ดข้าวสามารถเพิ่มปริมาณจาก 3.5 เป็น 7.3 log CFU/g ได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนได้ทั่วไปในหัวเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เช่น การศึกษาของ Rosenkvist และ Hansen (1995) พบเชื้อ *Bacillus* ปนเปื้อนในยีสต์แห้งที่ใช้ในการผลิตขนมปังในปริมาณ 0.6 ($\pm$1) CFU/g ซึ่ง Jones (1993) กล่าวว่า วัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ จะเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ได้

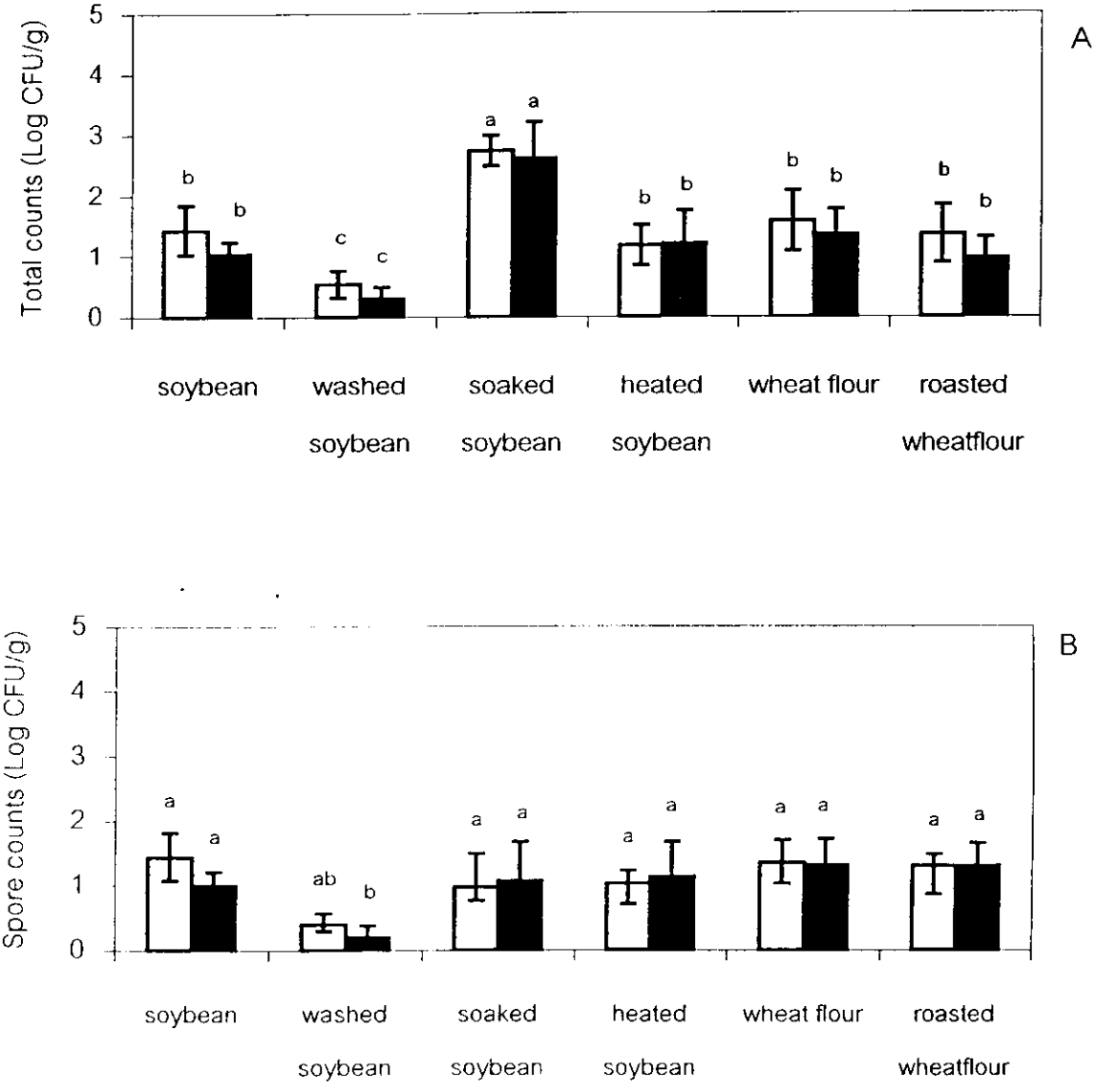


Figure 6 Total counts (A) and spores counts (B) of *B. cereus* on soybean and wheat flour in processing step on Watkangpattana's group and Banparkkom's group. □ ;Watkangpattana's group, ■ ; Banparkkom's group . Data followed by different letters are significant by least difference at $P < 0.05$

ภาพที่ 6 ปริมาณเซลล์ทั้งหมด (A) และสปอร์ (B) ของเชื้อ *B. cereus* ในขั้นตอนการเตรียมถั่วเหลืองและแป้งสาลี เพื่อผลิตเต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกรวัดกลางพัฒนา และกลุ่มเกษตรกรบ้านปากคม □; กลุ่มเกษตรกรวัดกลางพัฒนา, ■ ; กลุ่มเกษตรกรบ้านปากคม

4) น้ำเกลือ น้ำเกลือที่เตรียมเพื่อหมักเต้าเจี้ยว จากกลุ่มเกษตรกรทั้ง 2 กลุ่ม ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* จากการศึกษาของ Guinebretiere และคณะ (2003) ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารประเภทซุป

1.2.2 การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในอุปกรณ์ที่ใช้ผลิตเต้าเจี้ยว

อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต ได้แก่ กระด้งไม้ไผ่ ตะกร้าพลาสติก และโอ่งเคลือบ พบว่ามีสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในปริมาณต่ำกว่า 0.95 log CFU/g ทั้งนี้เนื่องจากอุปกรณ์ประเภท กระด้งไม้ไผ่ ตะกร้าพลาสติกและโอ่งเคลือบเป็นอุปกรณ์ที่มีรูและร่องเล็กๆ การล้างด้วยน้ำยาล้างจานและแผ่นขัด ไม่สามารถชะล้างสปอร์ออกได้หมด

1.2.3 การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในขั้นตอนผลิตโคจิและหมักเต้าเจี้ยว

การผลิตโคจิ การหมักเต้าเจี้ยวและการเก็บเกี่ยวมีเชื้อ *B. cereus* ปน-เปื้อนในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ดังนี้ คือ

1) การผลิตโคจิ จะนำถั่วเหลืองที่สุกผสมกับแป้งสาลีและเชื้อ *A. oryzae* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน สภาวะการผลิตโคจิ มีพีเอชเท่ากับ 6.3 – 6.8 ความชื้น ร้อยละ 50 - 57 อุณหภูมิ 30 - 34 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง เชื้อ *B. cereus* ในโคจิ ในรูปของเซลล์ ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 2 log CFU/g เป็น 8 log CFU/g ส่วนสปอร์มีเพิ่มขึ้นจาก 0.5 log CFU/g เป็น 2 log CFU/g พีเอช เท่ากับ 6.1 - 6.7 ความชื้นร้อยละ 69 - 75 อุณหภูมิ 33 - 35 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง สปอร์ของ *A. oryzae* จะมีสีเขียวคลุมถั่วเหลืองที่ผสมกับแป้งสาลี ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ไม่เปลี่ยนแปลง มีพีเอช เท่ากับ 5.9 - 6.7 ความชื้นร้อยละ 78 - 83 อุณหภูมิ 33 - 35 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 7)

สภาวะในการผลิตโคจิจะเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบได้ดี เนื่องจากเชื้อราใช้ออกซิเจนในการเจริญ แล้วทำให้อุณหภูมิและความชื้นเพิ่มขึ้น และการที่มีสารอาหารสมบูรณ์ อุณหภูมิและความชื้นเหมาะสม รวมทั้งมีออกซิเจนเพียงพอ จึงทำให้ปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาอันสั้น จากการศึกษาของ Rowan และ Anderson (1998) พบว่า เชื้อ *B. cereus* เจริญได้ในอาหาร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ถ้ามีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 100 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 7 ถึง 9 ชั่วโมง ทำให้เชื้อ *B. cereus* สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นถึง 5 log CFU/ml

2) การหมักเต้าเจี้ยว โดยนำโคจิบรรจุในโอ่งเคลือบ แล้วเติมน้ำเกลือ ที่ผ่านการให้ความร้อนและพักทิ้งให้เย็น หมักที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดมีปริมาณเท่ากับ 7-8 log CFU/g ในขณะที่ปริมาณสปอร์จะเพิ่มขึ้นเป็น 5 - 6 log CFU/g และมีปริมาณคงที่ตลอดเวลาหมัก 60 วัน (ภาพที่ 7)

การเติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นสูงลงในโคจิทำให้เซลล์เจริญของเชื้อ *B. cereus* จะหยุดการเพิ่มจำนวนเซลล์ เนื่องจากในสภาวะที่มีเกลือสูง เซลล์เจริญไม่สามารถแบ่งตัวได้ แต่จะเปลี่ยนให้มีการผลิตสปอร์เพิ่มขึ้นแทน (Kato *et al.*, 1999) ในการทดลองนี้เซลล์เจริญเปลี่ยนเป็นสปอร์ประมาณร้อยละ 75

3) การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว เมื่อหมักเป็นเวลา 2 – 4 เดือน เกษตรกรจะนำเต้าเจี้ยวที่ได้ ซึ่งตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมด7- 8 log CFU/g และสปอร์ 5-6 log CFU/g ต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที แล้วบรรจุขวดแก้วขณะร้อน ผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวที่ได้จะมีปริมาณเชื้อ *B. cereus* ลดลงในรูปเซลล์ทั้งหมดเหลือ 4.0-4.5 log CFU/g และสปอร์ 3.7-4.3 log CFU/g จากการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกรในจังหวัดตรัง พบว่ามีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อน ร้อยละ 64.3 การศึกษาของปรีชา และดวงดาว (2536) พบเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในซีอิ้วและเต้าเจี้ยว ปริมาณ 3 ถึง 6 log CFU/g ส่วนผลิตภัณฑ์อื่นที่ใช้ ถั่วเหลืองหรือแป้งสาลีเป็นส่วนประกอบในการผลิต มีเชื้อ *B. cereus*

ปนเปื้อน เช่น เต้าหู้ มีปริมาณ 1 ถึง 5.6 log CFU/g (Kramer and Gillbert, 1989 ; Han *et al.*, 2001) และ เทมเป้ ปนเปื้อนในปริมาณต่ำกว่า 6 log CFU/g (Samson *et a l.*, 1987)

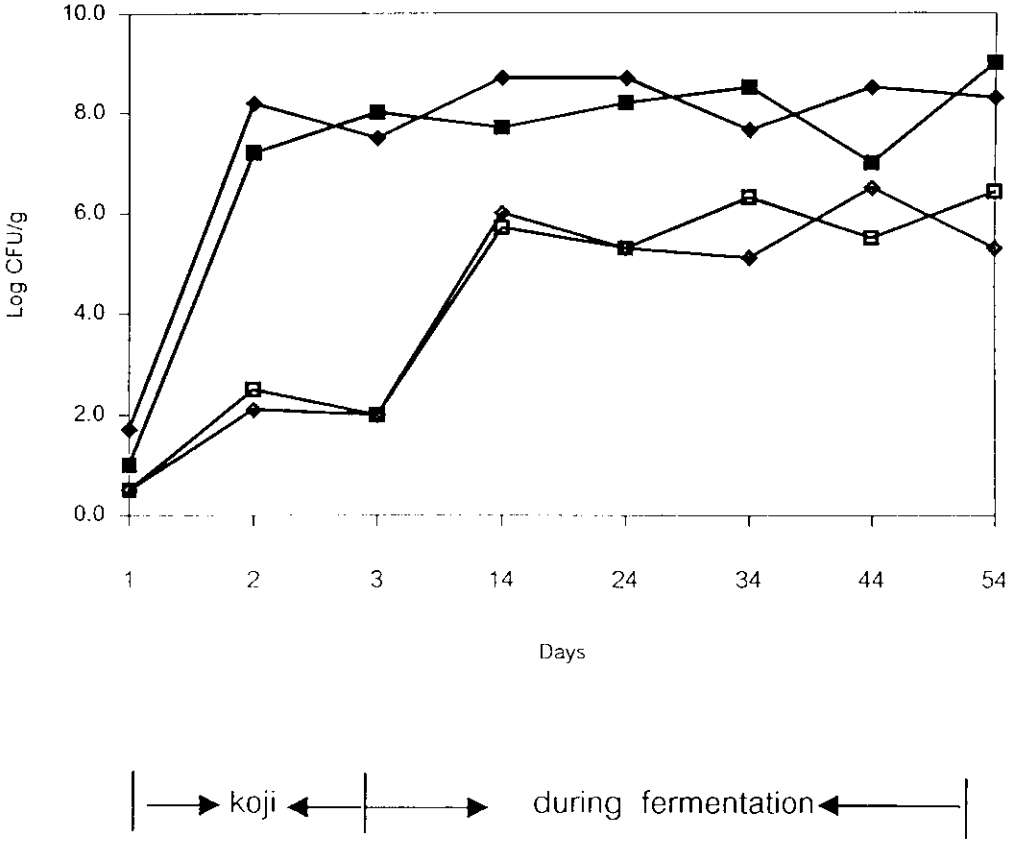


Figure 7 Growth of *B. cereus* in koji stage and during fermentation on fermented soybean .

-◆- ; total counts, -◇- ; spore counts on fermented soybean from Banparkkhom group ,

-■- ; total counts , -⊟- ; spore counts on fermented soybean from Watkangpattana group.

ภาพที่ 7 ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในการเตรียมโคจิและหมักเต้าเจี้ยว.

-◆- ; เซลล์ทั้งหมด , -◇- ; สปอร์ในเต้าเจี้ยวจากกลุ่มเกษตรกรบ้านปากคม

-■- ; เซลล์ทั้งหมด , -⊟- ; สปอร์ในเต้าเจี้ยวจากกลุ่มเกษตรกรวัดกลางพัฒนา

2. การปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลี

เมื่อสุ่มตัวอย่างแป้งสาลีชนิดต่าง ๆ คือ แป้งที่บดใหม่ แป้งดัดแปร (modified starch) และ แป้งที่มีจำหน่ายในร้านค้าของ จ.ตรัง 3 ยี่ห้อ ได้แก่ แป้งสาลีตราว่าว บรรจุในถุงพลาสติกสีขาวขุ่นปิดสนิท แป้งสาลีตราใบไม้ บรรจุในถุงพลาสติกใสปิดสนิท และแป้งสาลีตรากุหลาบ บรรจุในถุงพลาสติกใสมัดด้วยหนังยาง (ร้านค้าแบ่งบรรจุจากแป้งกระสอบใหญ่) พบว่าแป้งสาลีที่แบ่งบรรจุโดยร้านค้า มีความชื้นและการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* มากกว่า แป้งที่บรรจุโดยโรงงาน แป้งที่บดใหม่และแป้งดัดแปร ซึ่งปริมาณ *B. cereus* ในแป้งบดใหม่และแป้งจากตลาด 3 ยี่ห้อ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$)

แป้งสาลีที่บดใหม่มีความชื้นร้อยละ 11.50 และมีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในรูปของเซลล์ทั้งหมด 1.28 log CFU /g และสปอร์ 1.11 log CFU /g แป้งสาลีตรากุหลาบที่แบ่งบรรจุโดยร้านค้ามีความชื้นสูงกว่าแป้งที่บรรจุโดยโรงงานคือมีความชื้นร้อยละ 12.73 แต่ยังอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือไม่เกินร้อยละ 13 และมีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อน ในรูปของเซลล์ทั้งหมด 1.48 log CFU /g และสปอร์ 1.31 log CFU /g ส่วนแป้งสาลีตราว่าวและตราใบไม้ ซึ่งบรรจุโดยโรงงานมีความชื้นร้อยละ 11.97 และมีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อน ในรูปของเซลล์ทั้งหมด 1.28 log CFU /g และสปอร์ 1.11 log CFU /g จะเห็นได้ว่าความชื้นและเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลีที่แบ่งบรรจุโดยร้านค้ามีปริมาณเพิ่มขึ้นในปริมาณน้อย ซึ่งเนื่องมาจากการปนเปื้อนระหว่างการแบ่งบรรจุ (ภาพที่ 8)

ทั้งนี้การปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลีอาจเกิดจากการปนเปื้อนของวัตถุดิบระหว่างกระบวนการผลิตแป้ง จึงทำให้เชื้อ *B. cereus* เพิ่มปริมาณมากขึ้น เช่น การปรับความชื้นให้ได้ประมาณร้อยละ 16 – 17 ก่อนการโม่แป้ง (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2540) จากการศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในแป้งสาลีของ Berghofer และคณะ (2003) พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในแป้งสาลีได้แก่ โคลิฟอร์มในปริมาณ 1 MPN/g สปอร์ของจุลินทรีย์ปริมาณ 1 CFU/g, *Bacillus* spp.ในปริมาณ 100 CFU/g

B. cereus ปริมาณ 0.1 MPN/g ยีสต์และรา ปริมาณ 100 CFU/g และพบ *Salmonella* เป็นต้น

ส่วนแป้งดัดแปรมีความชื้นเท่ากับร้อยละ 10 - 11 และตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ต่ำกว่า 0.7 log CFU /g จะเห็นได้ว่าแป้งดัดแปรมีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* น้อยกว่าแป้งสาลีทั่วไป คาดว่าเชื้อถูกทำลายบางส่วนในกระบวนการดัดแปรแป้งด้วยสารเคมี ซึ่งในการทดลองนี้ใช้แป้งสาลีดัดแปรแบบออกซิไดซ์สตาร์ช โดยใช้คลอรีนในรูปโซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นสารที่ใช้ทำปฏิกิริยา

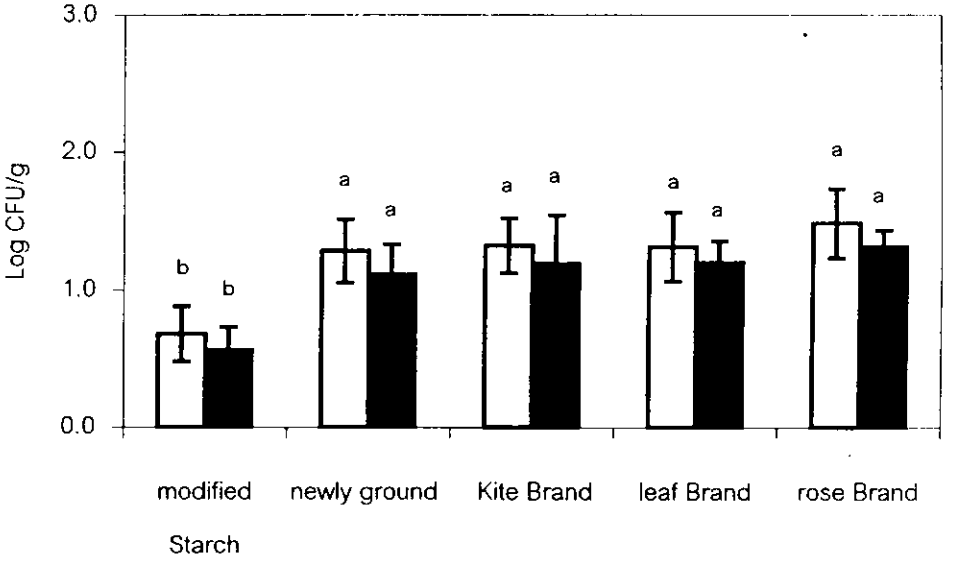


Figure 8 *B. cereus* on several types wheat flour. ☐; total counts, ■; spore counts. Data followed by different letters are significant by least difference at $P < 0.05$

ภาพที่ 8 ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลีชนิดต่าง ๆ ☐; เซลล์ทั้งหมด, ■; สปอร์

3. การควบคุมปริมาณ *B. cereus* ในวัตถุดิบ

จากผลการสำรวจพบว่าถั่วเหลือง แป้งสาลีและหัวเชื้อ *A. oryzae* มีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ดังนั้นการลดปริมาณเชื้อในถั่วเหลืองและแป้งสาลีเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการผลิตเต้าเจี้ยว

3.1 การลดปริมาณ *B. cereus* ในถั่วเหลือง

3.1.1 ศึกษาการลดปริมาณ *B. cereus* ในถั่วเหลืองด้วยน้ำ

การล้างทำความสะอาดถั่วเหลืองที่มีการปนเปื้อนของ เชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เท่ากับ 7.86 และ 4.69 log CFU/g ตามลำดับ ด้วยน้ำสะอาดในอัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อน้ำ เท่ากับ 1 : 2 จำนวน 3 ครั้ง พบว่ายังคงมีเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ 3.37 และ 1.87 log CFU/g เมื่อนำมาแช่น้ำสะอาด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จะเพิ่มขึ้นเป็น 3.57 และ 1.94 log CFU/g ตามลำดับ เปลี่ยนน้ำแล้วแช่ถั่วเหลืองอีก 12 ชั่วโมง ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เพิ่มขึ้นเป็น 6.89 และ 2.59 log CFU/g ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ดังนั้นในการเตรียมถั่วเหลืองถ้ามี *B. cereus* ปนเปื้อน การล้างและแช่ในน้ำสะอาด เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และเปลี่ยนน้ำแช่ 2 ครั้ง เชื้อ *B. cereus* จะยังคงมีการเพิ่มจำนวนขึ้นได้

ในขณะที่การเตรียมถั่วเหลืองที่มี *B. cereus* ปนเปื้อนในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เท่ากับ 7.86 และ 4.69 log CFU/g ตามลำดับ ล้างถั่วเหลืองต่อน้ำ เท่ากับ 1:2 จำนวน 3 ครั้งและแช่ในน้ำสะอาดในอัตราส่วนเดียวกัน เป็นเวลา 15 ชั่วโมง โดยไม่เปลี่ยนน้ำแช่ ปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จะเพิ่มขึ้นเป็น 7.40 และ 2.83 log CFU/g (ภาพที่ 9) แสดงว่าการเตรียมถั่วเหลืองโดยไม่เปลี่ยนน้ำแช่ปริมาณของเชื้อ *B. cereus* จะเพิ่มจำนวนได้มากกว่าการเปลี่ยนน้ำแช่

การแช่ถั่วเหลืองในน้ำเป็นเวลา 3 ถึง 15 ชั่วโมง เชื้อ *B. cereus* ที่เหลืออยู่จะเพิ่มปริมาณมากขึ้น เนื่องจากการแช่น้ำเป็นเวลานานทำให้เปลือกนอกของถั่วเหลืองหลุดออก เมล็ดสามารถดูดซึมน้ำเข้าไปทำให้ความชื้นของเมล็ดเพิ่มขึ้น ปริมาณสาร

อาหารในถั่วเหลืองละลายในน้ำที่ใช้แช่ ดังนั้นเมื่อมีสภาวะแวดล้อมและอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์เพิ่มปริมาณมากขึ้น (Thayer *et al* .,2003)

เมื่อใช้น้ำสะอาดล้างถั่วเหลืองที่มีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อน ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เท่ากับ 7.86 และ 4.69 log CFU/g ตามลำดับ ด้วยน้ำสะอาด ในอัตราส่วน ถั่วเหลืองต่อน้ำ เท่ากับ 1 : 2 จำนวน 3 ครั้ง จะลดเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ได้ 4.49 และ 2.82 log CFU/g ตามลำดับ และถ้าล้างด้วยน้ำไหลผ่านในอัตรา 200 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 15 ชั่วโมง (ปริมาณน้ำที่ใช้ทั้งหมด 180 ลิตร) พบว่าปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในถั่วเหลืองลดลงเหลือ 1.73 และ 1.25 log CFU/g (ภาพที่ 9) ในการทดลองปล่อยให้น้ำไหลล้นออกจากภาชนะที่บรรจุถั่วเหลือง ทำให้ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ลดลงได้ แต่ใช้น้ำปริมาณมาก จึงควรมีการพัฒนาการใช้แรงกลเข้าช่วยให้การชะล้างเกิดขึ้นได้ดี เช่น การกวนที่ก้นภาชนะ แล้วลดระยะเวลาของการล้างจะทำให้ประสิทธิภาพในการล้างดีขึ้น

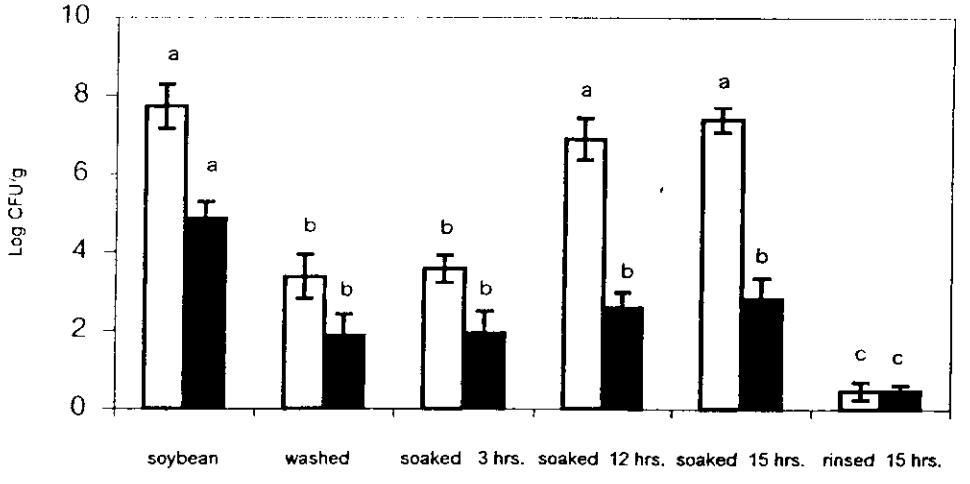


Figure 9 Effect of washing on *B. cereus* on inoculated soybean . ☐ ; total counts, ■ ; spore counts. Data followed by different letters are significant by least difference at $P < 0.05$

ภาพที่ 9 ผลของการล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำที่สภาวะต่างๆ ☐; เซลล์ทั้งหมด, ■; สปอร์

3.1.2 ผลของสารเคมีต่อการลดปริมาณ *B. cereus*

เมื่อแช่ถั่วเหลืองที่มีเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เท่ากับ 7.86 และ 4.69 log CFU/g ตามลำดับ ในสารทำความสะอาด (sanitizing agent) 3 ชนิด คือ trisodium phosphate sodium hypochorite และ calcium hypochorite และสารลดแรงตึงผิว (surfactant) 2 ชนิด คือ dialkyldimethylammonium chloride และ tween 80 ในอัตราส่วนถั่วเหลืองต่อสารละลาย เท่ากับ 1 : 2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสารละลายทุกชนิดสามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ได้เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม(แช่น้ำ) โดยปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ที่ลดลงขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของสารละลายแต่ละชนิด

การใช้สารละลาย sodium hypochorite และ calcium hypochorite เข้มข้น 200 พีพีเอ็ม สามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและ สปอร์ได้ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือลดได้ 4.38 - 4.41 และ 2.39 - 2.94 log CFU/g หรือคิดเป็นร้อยละ 55.91 และ 61.62 ตามลำดับ ส่วนสารเคมีชนิดอื่น เช่น สารละลาย trisodium phosphate เข้มข้น ร้อยละ 5 และ 10 สารละลาย Tween 80 เข้มข้น 100 และ 200 พีพีเอ็ม สารละลาย dialkyldimethylammonium chloride เข้มข้น 100 และ 200 พีพีเอ็ม สารละลาย sodium hypochorite และ สารละลาย calcium hypochorite เข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ลดปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ได้น้อยกว่า สารละลายsodium hypochorite และ calcium hypochorite เข้มข้น 200 พีพีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่8)

Table 8 Change of of *B. cereus* in inoculated soybean after washing with different chemical at ambient temperature for 3 hrs.

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงเชื้อ *B. cereus* ในการล้างถั่วเหลืองหลังจากล้างด้วยสาร-เคมีชนิดต่าง ๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

Treatment		Population recovered (log CFU/g) * ± SD		Population reduction (log CFU/g)**	
		Total counts	Spore counts	Total counts	Spore counts
Water		7.95±0.34	4.80±0.29	-	-
Tween 80	100 ppm	4.14±0.58	3.10±0.26	3.72^{b}	1.59^{ab}
Tween 80	200 ppm	3.86±0.26	2.85±0.36	4.00^{cd}	1.84^{bc}
Trisodium phosphate	5 %	5.00±0.24	3.70±0.41	2.86^{a}	0.99^{a}
Trisodium phosphate	10 %	4.76±0.29	3.00±0.28	3.00^{a}	1.69^{ab}
Dialkyldimethyl - ammonium chloride	100 ppm	4.83±0.28	2.81±0.30	3.03^{a}	1.88^{bc}
Dialkyldimethyl - ammonium chloride	200 ppm	3.87±0.35	2.59±0.45	3.99^{cd}	2.10^{bc}
Sodium hypochorite	100 ppm	3.80±0.27	2.12±0.30	4.06^{cd}	2.57^{c}
Sodium hypochorite	200 ppm	3.45+0.34	1.75±0.26	4.41^{d}	2.94^{cd}
Calcium hypochorite	100 ppm	3.89±0.30	2.30±0.34	3.97^{cd}	2.39^{c}
Calcium hypochorite	200 ppm	3.48±0.52	1.85±0.34	4.38^{d}	2.84^{cd}

* Initial inoculation levels on the soybeans were 7.86 and 4.69 log CFU/g for total counts and spore counts of *B. cereus*, respectively.

** Data followed by different letters are significant by least difference at $P < 0.05$

สำหรับสารลดแรงตึงผิว ทั้ง 2 ชนิด คือสารละลาย Tween 80 และสารละลาย dialkyldimethylammonium chloride สามารถลดปริมาณเซลล์ทั้งหมดได้ดีเช่นเดียวกับสารทำความสะอาดในกลุ่มคลอรีน แต่ลดปริมาณสปอร์ได้น้อยกว่าคลอรีน ทั้งนี้เนื่องจากสารทำความสะอาดในกลุ่มคลอรีนมีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง ออกฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยสามารถทำลาย เยื่อหุ้มเซลล์และเอนไซม์ที่สำคัญในดำรงชีพของจุลินทรีย์ ทำให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโตและตายในที่สุด ส่วน QAC มีคุณสมบัติเป็นสารที่ชอบน้ำและมีประจุบวกจะจับที่บริเวณผิวของแบคทีเรียซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำและมีประจุลบแล้วซึมผ่านผนังเซลล์และทำลายไซโตพลาสมิกเมมเบรน เป็นผลให้จุลินทรีย์หลุดออกได้ง่าย (Peng *et al.*, 2002) การศึกษาของ Peng และคณะ (2002) พบว่า เมื่อแช่แผ่นสเตนเลส เคลือบสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จำนวน 5.86 log CFU/g ในสารละลาย sodium hypochorite เข้มข้น 25 และ 50 พีพีเอ็ม จะลดปริมาณสปอร์ได้ 1.28 และ 1.51 log CFU/g ตามลำดับ ในขณะที่แช่ในสารละลาย dialkyldimethylammonium chloride เข้มข้น 100 และ 200 พีพีเอ็ม ลดปริมาณสปอร์ 0.98 และ 1.18 log CFU/g ตามลำดับ การศึกษาของ Beuchat และคณะ (2001) พบว่า การใช้คลอรีนเข้มข้นสูงเช่น 20,000 พีพีเอ็ม จะลดปริมาณเชื้อ Salmonella ที่ผิวเมล็ด alfalfa ได้มากกว่าคลอรีนเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ประมาณ 4.6 log CFU/g แต่การใช้คลอรีนความเข้มข้นสูง ๆ จะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ผลิตและสิ่งแวดล้อมได้

การใช้สารละลาย trisodium phosphate (TSP) เข้มข้นร้อยละ 5 และ10 จะลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ได้น้อยกว่าสารประกอบคลอรีนและสารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิด คาดว่าเนื่องจากเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* มีความต้านทานต่อสารทำความสะอาดชนิดด่างมากกว่าสารทำความสะอาดชนิดอื่น ทั้งนี้สาร TSP สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดแกรมลบได้ดี โดย TSP สามารถทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์หรือทำให้เซลล์ผิดปกติเพียงเล็กน้อย การทำงานของเซลล์ถูกทำลายบางส่วน (Lillard,1994) แต่ De Ledesma และคณะ (1996) อ้างจาก Sugarman (1992) กล่าวว่ากลไกการทำลายจุลินทรีย์ของ TSP ยังอธิบายไม่ได้ชัดเจนนัก แต่กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ คุณสมบัติของ TSP ที่ใช้ในการล้างจะลดชั้นของไขมัน

บริเวณพื้นผิวให้หลุดออกไป ทำให้เซลล์จุลินทรีย์หลุดจากพื้นผิวได้ดี เป็นผลให้จุลินทรีย์ลดลงไปด้วย

เมื่อล้างถั่วเหลืองที่มีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เท่ากับ 7.86 และ 4.69 log CFU/g ตามลำดับ ด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้งแล้วแช่ในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม อีกครั้ง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะสามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดเหลือ 0.62 log CFU/g และสปอร์ 0.47 log CFU/g ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าชุดควบคุม ที่แช่ในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และแช่ในน้ำสะอาดอีกครั้ง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* เพิ่มจำนวนเป็น 5.28 และ 1.28 log CFU/g ตามลำดับ (ภาพที่ 10)

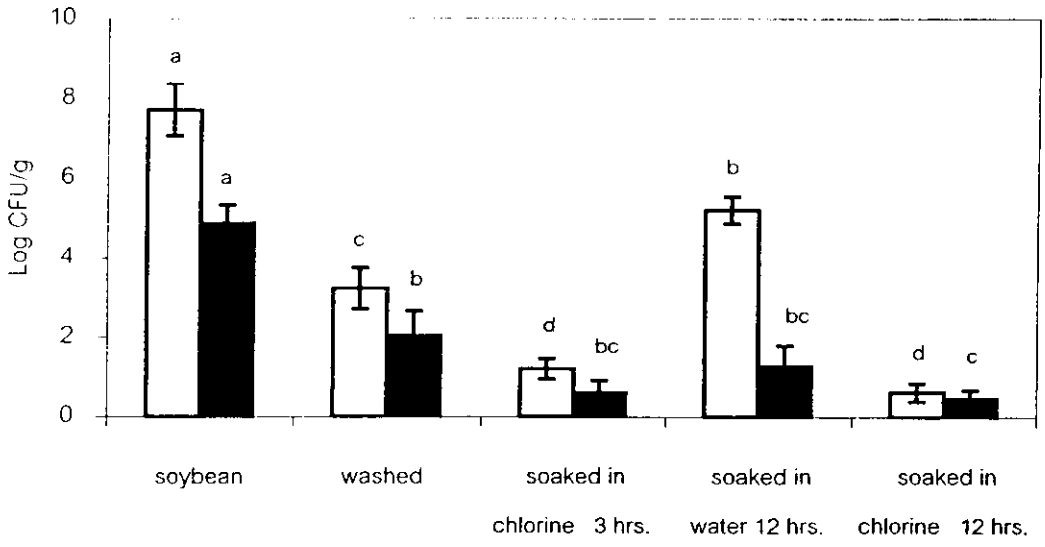


Figure 10 Effect of washing on *B. cereus* on inoculated soybean with chlorine solution and water . □ ; total counts, ■ ; spore counts. Data followed by different letters are significant by least difference at $P < 0.05$

ภาพที่ 10 ผลของการล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำและคลอรีน □; เซลล์ทั้งหมด, ■; สปอร์

อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ของเมล็ดพืช มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ ความแข็งและอายุของเมล็ด เปลือกหุ้มเมล็ดที่ถูกทำลายจากการเก็บเกี่ยว และองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่อยู่รอบๆ เซลล์เป้าหมายจะมีผลทำให้มีแรงยึดเกาะระหว่างเซลล์จุลินทรีย์และเมล็ดพืชแตกต่างกัน จึงทำให้อัตราการลดและทำลายเซลล์จุลินทรีย์ของสารทำความสะอาดแตกต่างกันด้วย (Beuchat *et al*., 2001)

จากการทดลองล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำและ/หรือแช่ในสารเคมีชนิดต่าง ๆ มีผลทำให้เชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ ถูกทำลายและลดลงได้ ทั้งนี้เกิดขึ้นจากกลไกของการล้างด้วยน้ำที่ชะล้างจุลินทรีย์ให้หลุดออกและการทำลายจุลินทรีย์ด้วยสารเคมี นอกจากนี้ยังมีอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการลดจุลินทรีย์ในการทดลองนี้ คือ การเติมเชื้อจุลินทรีย์ (inoculation) ในเมล็ดถั่วนั้นจะแตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาตามธรรมชาติ เนื่องจากเชื้อที่เติมจะติดอยู่เฉพาะบริเวณพื้นผิวที่ไม่เรียบหรือส่วนที่มีรอยขีดข่วนเท่านั้น ส่วนของเปลือกหุ้มเมล็ด ซึ่งมีกรดไขมันและแว๊กซ์อยู่ ทำให้เชื้อเติมลงไปไม่เกาะติดที่เปลือกหุ้มเมล็ด ดังนั้นการกระทำต่อเมล็ดที่มีการเติมเชื้อด้วยแรงกายภาพ เช่น การล้าง จะทำให้จุลินทรีย์หลุดออกจากเมล็ดได้ง่าย (Thayer *et al* .,2003) ในปัจจุบันพบว่า วิธีการลดจำนวน จุลินทรีย์ที่เกาะติดพื้นผิวควรใช้แรงกลเข้าช่วย เช่น แรงฉีดที่มีความดันสูง ทำให้เซลล์จุลินทรีย์หลุดออกได้ง่าย จึงควรพัฒนาเครื่องล้างที่อาศัยปัจจัยดังกล่าว

3.1.3 ผลของความร้อนต่อการลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในถั่วเหลือง

เมื่อนำถั่วเหลืองที่มีเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เท่ากับ 8.00 และ 4.81 log CFU/g ตามลำดับมาให้ความร้อน 2 วิธี คือ ต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา 45 นาที และนึ่งเป็นเวลา 60 นาที พบว่าความร้อนที่ใช้ในการต้ม (95 องศาเซลเซียส) และนึ่ง (85 องศาเซลเซียส) ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ได้ (ภาพที่ 11) ทั้งนี้เนื่องจากสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ทนความร้อนได้ดี ความร้อนที่ใช้ในการหุงต้มด้วยวิธีปกติ เช่น ต้ม นึ่ง ย่าง ไม่สามารถทำลาย สปอร์

ได้ (Roberts *et al.*, 1996) จากการศึกษาของ Oloyede และ Scholefield (1994) เมื่อให้ความร้อน 85 องศาเซลเซียส 30 นาที ให้กับสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ NICMB 6349 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 4.5 - 6.5 เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้แต่มีข้อสังเกตจากการศึกษาของ Fernandez และคณะ (2001) พบว่าการให้ความร้อนแบบ non-isothermal โดยค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิ ครั้งละ 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาที จากอุณหภูมิ 25 จนถึง 85 องศาเซลเซียส จะช่วยลดการเจริญของสปอร์ *B. cereus* สายพันธุ์ INRA AVTZ 415 ได้ คิดเป็นร้อยละ16 ส่วนการเพิ่มอุณหภูมิให้เร็วขึ้นครั้งละ 2 หรือ 8 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิที่ต้องการนั้นไม่ทำให้การเจริญของเชื้อลดลงแต่จะทำให้สปอร์ทนความร้อนได้มากขึ้น

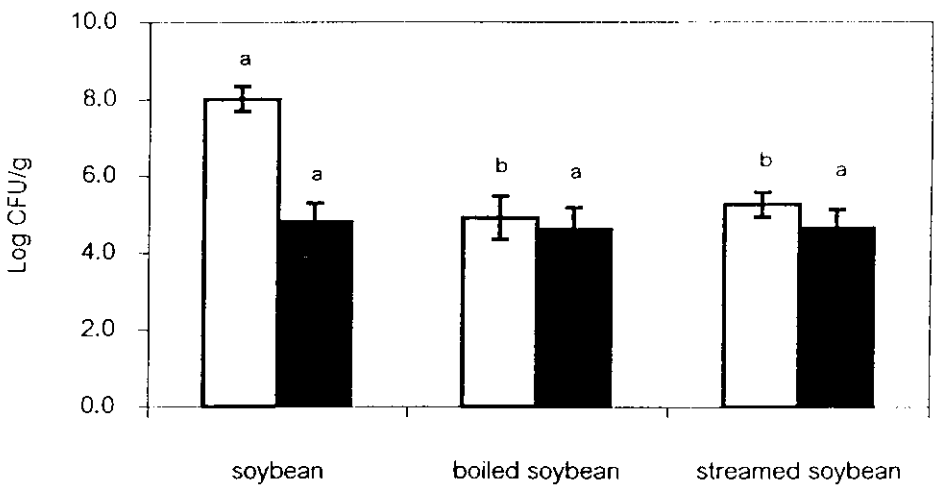


Figure 11 Effect of boiling and streaming on population of *B. cereus* on inoculated soybeans. ☐ , total counts ■ , spore counts. Data followed by different letters are significant by least difference at $P < 0.05$

ภาพที่ 11 ผลของการให้ความร้อนด้วยการต้มและนึ่งต่อการลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในถั่วเหลือง. ☐, ปริมาณเซลล์ทั้งหมด ; ■, ปริมาณสปอร์

3.2 การลดปริมาณ *B. cereus* ในแป้งสาลี

การยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมด 7.19 log CFU/g และสปอร์ 5.71 log CFU/g ในแป้งสาลี ด้วยวิธีฉายรังสีแกมมา 10 กิโลเกรย์ เปรียบเทียบกับการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 500 750 และ 900 วัตต์ เวลา 9 และ 15 นาทีและการคั่วธรรมดา พบว่าการฉายรังสีแกมมา 10 กิโลเกรย์ สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ได้มากกว่าการใช้ความร้อนด้วยไมโครเวฟและการคั่วอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 8) โดยตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลีฉายรังสี

การที่รังสีแกมมาสามารถทำลายเชื้อ *B. cereus* ได้ดีกว่าคลื่นไมโครเวฟ เนื่องจากทั้งรังสีแกมมาและคลื่นไมโครเวฟซึ่งเป็นคลื่นทำให้เกิดรังสีเช่นเดียวกัน แต่มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน จึงทำให้มีอำนาจการทะลุทะลวงแตกต่างกัน ทั้งนี้รังสีที่มีความยาวคลื่นสั้นจะทำลายจุลินทรีย์ได้ดีกว่ารังสีที่มีความยาวคลื่นยาว โดยรังสีแกมมาเป็นรังสีที่แตกตัวได้ มีความยาวคลื่นสั้น ๆ คือ ในช่วง 0.01 ถึง 1.4 อังสตรอม ยูนิค ในขณะที่คลื่นไมโครเวฟเป็นรังสีที่ไม่แตกตัว และมีความยาวคลื่นยาวกว่ารังสีแกมมาคือ อยู่ในช่วงรังสีอินฟราเรดและความถี่คลื่นวิทยุหรือ ประมาณ 4×10^6 ถึง 1×10^{11} อังสตรอม ยูนิค (Jay, 2000)

การฉายรังสีแกมมาปริมาณ 10 กิโลเกรย์ จัดเป็นการฉายรังสีระดับกลาง หรือที่เรียกว่า radicidation แต่สามารถทำลายเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ได้ทั้งหมด ซึ่งแสดงว่ารังสีแกมมาทำลายจุลินทรีย์ได้โดยตรงและเนื่องจากแป้งสาลีมีความชื้นประมาณร้อยละ 11-12 ดังนั้นเมื่อฉายรังสี น้ำในแป้งสาลีจะแตกตัวให้อนุมูลอิสระ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์และตัวรีดิวซ์ ทำให้ทำลายจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกัน (Diehl, 1990) นอกจากนี้ปัจจัยอื่นที่อาจจะมีต่อการทำลายจุลินทรีย์ได้แก่ ลักษณะ อายุของจุลินทรีย์ที่เติมในแป้งสาลีและองค์ประกอบในแป้งสาลีซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนใหญ่จึงทำให้การฉายรังสีปริมาณ 10 กิโลเกรย์ สามารถทำลายเชื้อ *B. cereus* ได้ ซึ่ง Jay (2000) กล่าวว่า องค์ประกอบของอาหารเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ในการฉายรังสี อาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก

มีค่าการต้านทานรังสีมากขึ้น เช่น ค่า D ในการทำลายเชื้อ *Clostridium perfringens* ในบัฟเฟอร์และอาหาร cooked-meat broth มีค่าเท่ากับ 0.23 และ 3 กิโลเกรย์ ตามลำดับ รวมทั้งสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ที่เติมในแป้งสาลีเป็นเซลล์เปียก ที่มีค่าการต้านทานรังสีน้อยกว่าเซลล์แห้ง รวมทั้งอายุของเซลล์ก่อนการฉายรังสีซึ่งอาจอยู่ในช่วง log phase หรือ stationary phase ที่มีค่าการต้านทานรังสีน้อยกว่าเซลล์ในช่วง lag phase ด้วย การศึกษาของ Farkas และคณะ (2002) พบว่าการฉายรังสีหมูรมควันด้วยรังสีแกมมา ปริมาณ 5 กิโลเกรย์ จะลดปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ได้ 0.5 log CFU/g ในขณะที่การพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะทำลายสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ได้เพียง 0.1 log CFU/g เท่านั้น และการศึกษาของชลธิชา ชวลิตนิติธรรม (2539) พบว่าการฉายรังสีเต้าเจี้ยวด้วยรังสีแกมมา ในปริมาณ 3 และ 6 กิโลเกรย์ สามารถลดเชื้อ *B. cereus* ได้ 1 และ 2 log CFU/g ตามลำดับ

การทดลองด้วยการให้ความร้อนแป้งสาลีด้วยคลื่นไมโครเวฟเพื่อทำลายเชื้อ *B. cereus* พบว่าที่กำลังไฟฟ้า 750 วัตต์ เวลา 15 นาที สามารถลดปริมาณสปอร์ได้ไม่แตกต่างจาก กำลังไฟฟ้า 900 วัตต์ เวลา 9 และ 15 นาที อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แสดงว่า สปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จะต้านทานคลื่นไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้า 750 วัตต์ เวลา 15 นาที และกำลังไฟฟ้า 900 วัตต์ เวลา 9 และ 15 นาที ได้ไม่แตกต่างกัน ถึงแม้ว่าที่กำลังไฟฟ้า 900 วัตต์ เวลา 15 นาที จะมีอุณหภูมิสูงที่สุด คือ 120 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงว่าการเพิ่มกำลังไฟฟ้าและเวลา ไม่ทำให้สปอร์ถูกทำลายมากขึ้น ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำลายด้วยกลไกของความร้อนและไม่ใช่ความร้อนของคลื่นไมโครเวฟ (Kozempel *et al.*, 1998)

ความชื้นของแป้งสาลีหลังจากให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่กำลังไฟฟ้าสูงมีค่าน้อยกว่าที่กำลังไฟฟ้าต่ำ เนื่องจากการระเหยของน้ำเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ความชื้นของแป้งสาลีที่ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจะสูงกว่าการคั่ว เนื่องจากไม่มีการถ่ายเทไอน้ำที่ระเหยออกจากแป้งสาลีออกสู่สภาวะแวดล้อมภายนอกในระยะเวลาสั้นๆ ได้

Table 8 Inactivation of total counts and spore counts of *B. cereus* population on inoculated wheat flour with roasted (85°C, 30 min.), heated with microwave and irradiation with 10 kGy gamma ray.

ตารางที่ 8 ผลของการให้ความร้อนโดยการคั่ว (85 องศาเซลเซียส, 30 นาที), ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟและการฉายรังสีแกมมา 10 กิโลเกรย์ต่อการทำลายเชื้อ *B. cereus* ในแป้งสาลี

Treatment of wheat flour	Temperature (°C)	Population recovered (log CFU/g)		Population reduction (log CFU/g)*		Moisture content (%)
		Total counts	Spore counts	Total counts	Spore counts	
Wheat flour	-	7.19	5.71	-	-	11.48
Roasted at 30 min	85	6.00±0.19	5.00 ±0.22	1.19 [a]	0.71 [a]	0.65
Microwave 500 W at 9 min	96	4.98 ±0.70	4.46 ± 0.66	2.21 [b]	1.25 [b]	10.32
Microwave 500 W at 15 min	100	4.68 ± 0.40	4.06± 0.50	2.51 [c]	1.65 [b]	7.94
Microwave 750 W at 9 min	105	4.39 ±0.53	3.76 ± 0.52	2.80 [d]	1.95 [b]	9.41
Microwave 750 W at 15 min	110	3.42 ±0.43	3.04 ± 0.80	3.77 [e]	2.67 [c]	5.18
Microwave 900 W at 9 min	110	3.26 ±0.85	2.93 ± 0.68	3.93 [e]	2.78 [c]	6.90
Microwave 900 W at 15 min	120	3.00 ±0.79	2.78 ± 0.71	4.19 [e]	2.93 [c]	5.02
Irradiation	-	0	0	7.19	5.71	2.30

* Data followed by different letters are significant by least difference at $P < 0.05$

อนึ่งยังไม่มีรายงานการใช้คลื่นไมโครเวฟเพื่อทำลายเชื้อ *B. cereus* ในอาหารโดยตรง มีเพียงรายงานเกี่ยวกับประสิทธิภาพของคลื่นไมโครเวฟที่ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และเชื้อชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Campylobacter jejuni* , *Clostridium perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Datta and Davidson, 2001) และใช้ไมโครเวฟในการทำความสะอาดขวดนมสำหรับเด็กพบว่า ที่ระดับกำลังไฟฟ้า 750 วัตต์ เวลา 9 นาทีสามารถลดสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ลงได้ 0.34 log CFU (Rowan and Anderson, 1998)

การให้ความร้อนกับแป้งสาลีที่มีเชื้อ *B. cereus* ด้วยคลื่นไมโครเวฟและการคั่วที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าคลื่นไมโครเวฟสามารถทำลายเชื้อ *B. cereus* ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยการคั่วจะลดเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมด 1.19 log CFU/g และสปอร์ 0.71 log CFU/g และจากผลการทดลองปริมาณสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* หลังจากคั่วแป้งสาลีมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ ซึ่งต่างจากผลสำรวจการผลิตเต้าเจี้ยวของกลุ่มเกษตรกร นั่นคือหลังจากคั่วแป้งสาลีปริมาณสปอร์เชื้อ *B. cereus* ไม่ลดลงหรือลดลงเพียง 0.09 log CFU/g เท่านั้น ทั้งนี้คาดว่าลักษณะการยึดเกาะของเซลล์จุลินทรีย์ ที่เติมในแป้งสาลีแตกต่างจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีตามธรรมชาติหรือเนื่องจากปริมาณ เริ่มต้นของสปอร์ที่เติมในแป้งสาลีมีปริมาณมากจึงทำให้เห็นการลดลงของสปอร์อย่าง ชัดเจน

4. ผลการศึกษาปริมาณ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตเต้าเจี้ยว

การหมักเต้าเจี้ยวด้วยถั่วเหลืองและแป้งสาลีที่มีเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมด 1.6 และ 1.32 log CFU/g และมีสปอร์ 1.25 และ 1.19 log CFU/g ตามลำดับ โดยล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง แช่ในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วแช่ในสารละลายคลอรีนเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม ใหม่อีก 12 ชั่วโมง แล้วต้มถั่วเหลืองให้สุก ใช้แป้งสาลี 3 ชนิด คือ แป้งสาลีฉายรังสีแกมมา 10 กิโลเกรย์ แป้งสาลีที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่กำลัง 750 วัตต์ และแป้งสาลีคั่ว คลุกผสมกับหัวเชื้อ *A. oryzae* เพื่อผลิตโคจิ และใช้น้ำเกลือความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 20

ในการหมัก โดยปริมาณเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในขั้นตอนเตรียมถั่วเหลือง แป้งสาลีและหัวเชื้อ *A. oryzae* (ตารางที่ 9)

การหมักเต้าเจี้ยวที่ใช้แป้งสาลีที่ผ่านการฉายรังสีและหัวเชื้อบริสุทธิ์ *A. oryzae* จะตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* ในเต้าเจี้ยว ตลอดระยะเวลาการหมัก 60 วัน แต่เมื่อใช้หัวเชื้อ *A. oryzae* ที่จำหน่ายทางการค้า เต้าเจี้ยวจะมีเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ เท่ากับ 7.2 และ 5.5 log CFU/g ตามลำดับ ส่วนการหมักด้วยแป้งสาลีที่ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่กำลัง 750 วัตต์ เวลา 15 นาที และหัวเชื้อบริสุทธิ์ของ *A. oryzae* พบว่าการทดลอง 4 ครั้ง ในจำนวน 5 ครั้ง คิดเป็นร้อยละ 80 ตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* ส่วนการทดลอง 1 ครั้ง พบเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมด 4.0 log CFU/g และสปอร์ 3.5 log CFU/g ในเต้าเจี้ยว เนื่องจากหลังจากให้ความร้อนแป้งสาลีด้วยไมโครเวฟมีสปอร์ *B. cereus* เหลืออยู่ปริมาณ 0.7 ถึง 0.8 log CFU/g (ภาพที่ 12)

การให้ความร้อนแป้งสาลีด้วยไมโครเวฟนั้นไม่สามารถทำลายสปอร์ได้ทั้งหมดในภาชนะหนึ่ง ๆ ต่อการใช้ไมโครเวฟ 1 ครั้งได้ทุกครั้ง เนื่องจากการให้ความร้อนของคลื่นไมโครเวฟมีรูปแบบ (uniform) ไม่แน่นอน จึงไม่สามารถหาจุด cold spot ได้ถูกต้อง ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างของอาหาร พื้นผิว องค์ประกอบของอาหารแต่ละชนิด และภาชนะบรรจุ (Ramaswamy and Pillet-Will , 1992) การศึกษาของ Ramaswamy และ Pillet-Will (1992) แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟนั้นอุณหภูมิของวัตถุในแต่ละจุดไม่สม่ำเสมอ เมื่อใช้ไมโครเวฟกำลัง 700 วัตต์ กับเจลแป้งเป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิที่บริเวณผิวบน ส่วนกลาง 2 จุด และส่วนล่างสุด มีค่าที่แตกต่างกันดังนี้คือ วัดได้ 48.6 66.0 61.9 และ 54.4 องศาเซลเซียส จึงเป็นผลให้การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุใด ๆ ไม่สม่ำเสมอด้วยเช่นกัน

การหมักเต้าเจี้ยวด้วยแป้งสาลีคั่วและหัวเชื้อบริสุทธิ์ *A. oryzae* พบว่าปริมาณของเชื้อ *B. cereus* เพิ่มขึ้นในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เท่ากับ 4.5 และ 3.3 log CFU/g ตามลำดับ เป็นเวลา 60 วัน ตลอดระยะเวลาการหมัก 60 วัน แต่เมื่อใช้

หัวเชื้อ *A. oryzae* ที่จำหน่ายทางการค้า เต้าเจี้ยวจะมีเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ เท่ากับ 7.3 และ 5.5 log CFU/g ตามลำดับ

การหมักเต้าเจี้ยวด้วยถั่วเหลืองแช่น้ำ 15 ชั่วโมงแล้วต้มให้สุก คลุกผสมกับแป้งสาลีคั่วและหัวเชื้อบริสุทธิ์ *A. oryzae* ตรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เท่ากับ 5.9 และ 4.2 log CFU/g ตามลำดับ ตลอดระยะเวลาการหมัก 60 วัน แต่เมื่อใช้หัวเชื้อ *A. oryzae* ที่จำหน่ายทางการค้า เต้าเจี้ยวจะมีเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ เท่ากับ 8.2 และ 5.7 log CFU/g ตามลำดับ

จากผลการทดลองพบว่าการลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในถั่วเหลืองด้วยคลอรีนเข้มข้น 200 พีพีเอ็ม และใช้แป้งสาลีฉายรังสีหรือให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจะลดเชื้อ *B. cereus* ที่ปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบได้ดีกว่าการผลิตเต้าเจี้ยวด้วยวิธีดั้งเดิม (ภาพที่ 13) ทั้งนี้ในการผลิตถ้าวัตถุดิบมีการปนเปื้อนและวิธีเตรียมวัตถุดิบไม่สามารถทำลายเชื้อนั้นได้ รวมทั้งกระบวนการหมักไม่สามารถชะลอการเจริญได้ก็จะทำให้เชื้อจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนมากขึ้นได้ การศึกษาของ Guinebretiere และคณะ (2003) พบว่าซุป zucchini ที่ผลิตจากนมผง แป้งและครีม ในน้ำเกลือร้อยละ 5 มีสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ปนเปื้อนในนมผง แป้งและครีมปริมาณ 1.6 – 2.8 log CFU/g เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 20 ถึง 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เชื้อจะเพิ่มจำนวนเป็น 7.8 $\pm$ 0.1 log CFU/g

การทดลองนี้เป็นการหมักเต้าเจี้ยวในห้องปฏิบัติการ จึงควบคุมสภาวะที่ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ได้ดี ส่วนการผลิตในอุตสาหกรรมนั้นมีปัจจัยต่าง ๆ ที่ไม่สามารถคาดเดาได้เช่น การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบและอุปกรณ์ที่ไม่สามารถทำลายได้ สภาวะแวดล้อมและสุขลักษณะของผู้ผลิต ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Iwuoha and Eke, 1996) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *B. cereus* ได้ทั่วไปในบรรยากาศ ดิน และน้ำ (Granum, 1997) และการผลิตในโรงเรือนที่ไม่ถูกสุขลักษณะ จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การหมักควบคุมการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ทำได้ค่อนข้างยาก

Table 9 Removal *B. cereus* on soybean and wheat flour processing step and *B. cereus* quality on starter culture *A. oryzae* for fermented soybean.

ตาราง 9 ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในขั้นตอนการเตรียมถั่วเหลือง ในแป้งสาลี และ ในหัวเชื้อ *A. oryzae* สำหรับการผลิตเต้าเจี้ยว

Sample	Population of *B. cereus* (MPN/g)	
	total counts	spore counts
1. Soybeans		
1.1 seeds	38	21
1.2 after washing	12	4
1.3 after soaking in chlorine solution overnight	<3	<3
1.4 after boiling	<3	<3
2. Wheat flour		
2.1 wheat flour	33	12
2.2 after roasted	13	11
2.3 after microwave 750 w/ 15min.	<3 - 8	<3 - 8
2.4 after irradiation with gamma ray	<3	<3
3. *A. oryzae* starter culture		
3.1 commercial starter culture	160	120
3.2 pure starter culture	<3	<3

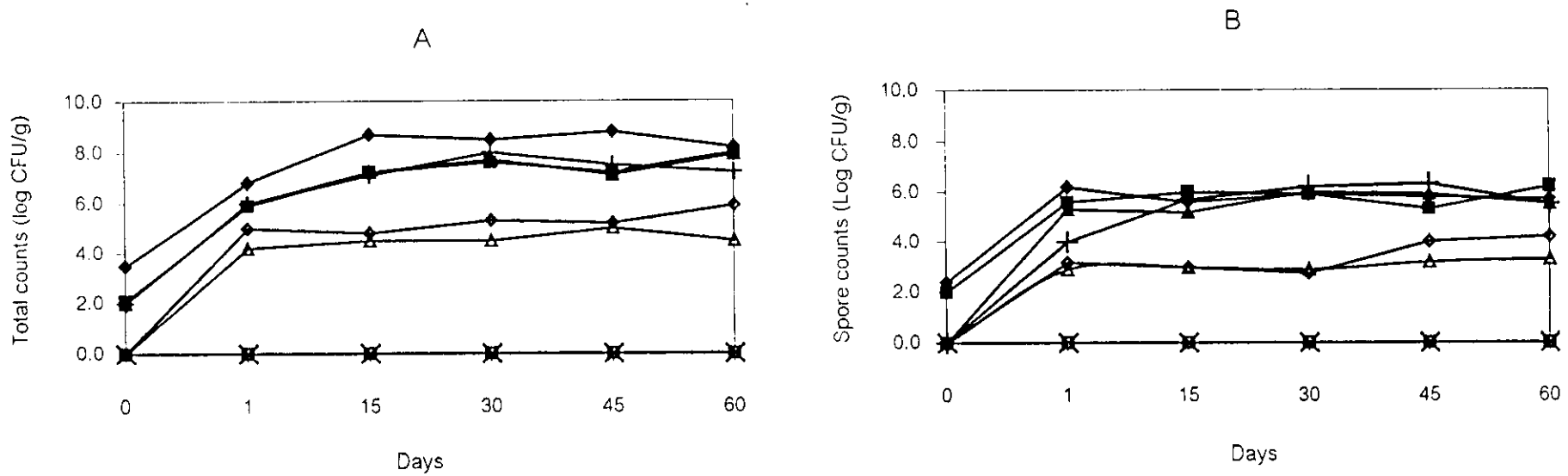


Figure 12 Growth of total counts (A) and spore counts (B) of *B. cereus* in during fermentation with difference preparation raw material and starter culture .

A = (soybean soaked in water, roasted wheat flour and *A. oryzae* commercial starter culture)

B = (soybean soaked in water, roasted wheat flour and *A. oryzae* pure starter culture)

C = (soybean soaked in chlorine solution, roasted wheat flour and *A. oryzae* commercial starter culture)

D = (soybean soaked in chlorine solution, roasted wheat flour and *A. oryzae* pure starter culture)

E = (soybean soaked in chlorine solution, microwaved wheat flour and *A. oryzae* commercial starter culture)

F = (soybean soaked in chlorine solution, microwaved wheat flour and *A. oryzae* pure starter culture)

G = (soybean soaked in chlorine solution, irradiated wheat flour and *A. oryzae* commercial starter culture.)

H = (soybean soaked in chlorine solution, irradiated wheat flour and *A. oryzae* pure starter culture)

ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างการหมักด้วยวัตถุดิบที่มีการเตรียมด้วยวิธีการแตกต่างกันและหัวเชื้อ A. oryzae ที่แตกต่างกัน

A = (ถั่วเหลืองแช่น้ำ , แป้งสาลีคั่วและหัวเชื้อ *A. oryzae* ทางการค้า)

B = (ถั่วเหลืองแช่น้ำ , แป้งสาลีคั่วและหัวเชื้อบริสุทธิ์ *A. oryzae*)

C = (ถั่วเหลืองแช่ในสารละลายคลอรีน , แป้งสาลีคั่วและหัวเชื้อ *A. oryzae* ทางการค้า)

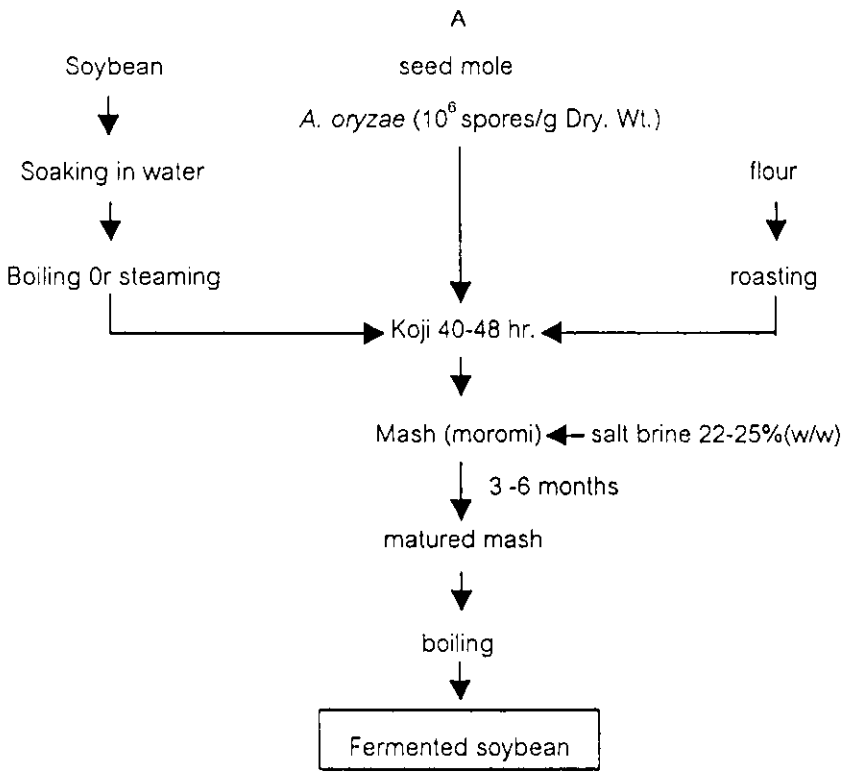
D = (ถั่วเหลืองแช่ในสารละลายคลอรีน , แป้งสาลีคั่วและหัวเชื้อบริสุทธิ์ *A. oryzae*)

E = (ถั่วเหลืองแช่ในสารละลายคลอรีน , แป้งสาลีให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟและหัวเชื้อ *A. oryzae* ทางการค้า

F = (ถั่วเหลืองแช่ในสารละลายคลอรีน , แป้งสาลีให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟและหัวเชื้อบริสุทธิ์ *A. oryzae*)

G = (ถั่วเหลืองแช่ในสารละลายคลอรีน , แป้งสาลีฉายรังสีแกมมาและหัวเชื้อ *A. oryzae* ทางการค้า)

H = (ถั่วเหลืองแช่ในสารละลายคลอรีน, แป้งสาลีฉายรังสีแกมมาและหัวเชื้อบริสุทธิ์ *A. oryzae*)



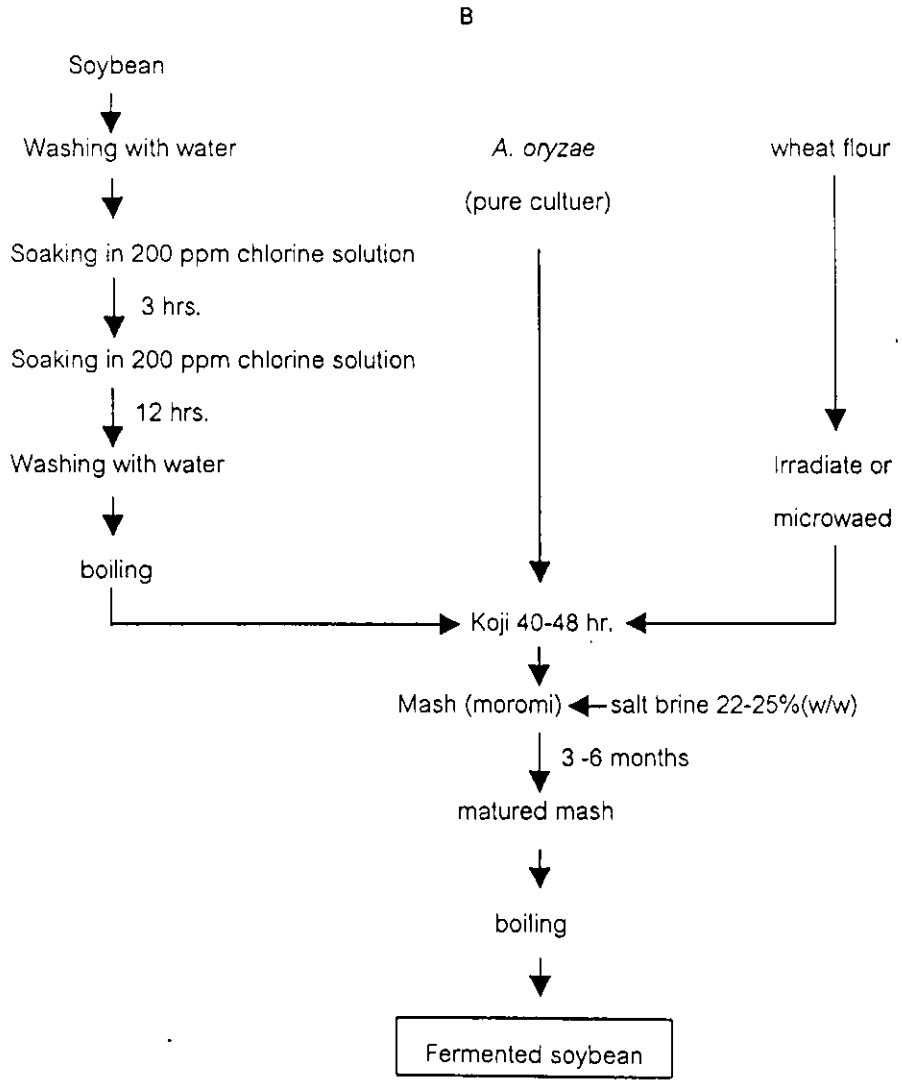


Figure 13 Fermented soybean production by traditional and developing process. A, Traditional process ; B, Developed process

ภาพที่ 13 กระบวนการผลิตเต้าเจี้ยวแบบดั้งเดิมและแบบปรับปรุง A, กระบวนการผลิตแบบดั้งเดิม ; B, กระบวนการผลิตที่ปรับปรุงแล้ว

5. ผลของวัตถุกันเสียและแบคเทอริโอซินต่อปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

5.1 ผลของวัตถุกันเสียต่อปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

เมื่อเติมวัตถุกันเสีย 2 ชนิด คือ โซเดียมเบนโซเอท และ โปแตสเซียมซอร์เบท ที่ระดับความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1000 พีพีเอ็ม ในเต้าเจี้ยวที่หมักสำเร็จ ซึ่งมีเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้นในรูปของเซลล์ทั้งหมด 7.60 log CFU/g และสปอร์ 4.96 log CFU/g แล้วต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที บรรจุในขวดแก้วขณะร้อน พบว่าโซเดียมเบนโซเอท เข้มข้น 1000 พีพีเอ็ม และโปแตสเซียมซอร์เบท เข้มข้น 800 พีพีเอ็ม สามารถทำลายเชื้อ *B. cereus* ได้ทั้งหมด และตรวจไม่พบเชื้อตลอดระยะเวลาการเก็บ 60 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เต้าเจี้ยวที่เติมโซเดียมเบนโซเอทความเข้มข้นต่ำกว่า 800 พีพีเอ็ม และโปแตสเซียมซอร์เบท ความเข้มข้นต่ำกว่า 600 พีพีเอ็ม จะทำลายเชื้อ *B. cereus* ได้บางส่วน และเมื่อเก็บรักษาในขวดแก้วปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน เชื้อ *B. cereus* จะเพิ่มจำนวนมากขึ้น (ภาพที่ 14 และ 15) ตามพระราชบัญญัติอาหาร ฉบับที่ 84 อนุญาตให้ใช้กรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือทั้งสองชนิดในเต้าเจี้ยวได้ไม่เกิน 1000 พีพีเอ็ม

จากผลการทดลองพบว่าวัตถุกันเสียทั้ง 2 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน กรดซอร์บิกจะมีประสิทธิภาพในการทำลาย *B. cereus* ได้ดีกว่ากรดเบนโซอิก เนื่องจากเต้าเจี้ยวมีพีเอชในช่วง 5.5 – 6.5 ซึ่งที่พีเอช 5 กรดซอร์บิกจะมีกรดที่ไม่แตกตัวร้อยละ 6 (Liewen and Marth, 1985 ; Sofoa and Busta, 1993) ส่วนกรดเบนโซอิกมีกรดที่ไม่แตกตัวร้อยละ 1 (Chipley, 1993) ซึ่งกรดที่ไม่แตกตัวจะซึมผ่านผนังเซลล์ไปรบกวนการทำงานรวมทั้งยับยั้งระบบเอนไซม์ของเซลล์ได้มากกว่า จึงทำให้กรดซอร์บิคสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ดีกว่า

นอกจากเกลือในเต้าเจี้ยวยังช่วยเสริมฤทธิ์วัตถุกันเสีย โดยทำให้จุลินทรีย์ทนความร้อนได้น้อยลง (Oloyede and Scholefield, 1994) ดังนั้นการให้ความร้อนร่วมกับเกลือและวัตถุกันเสีย จะเพิ่มประสิทธิภาพทำลายสปอร์ของเชื้อ *B. cereus*

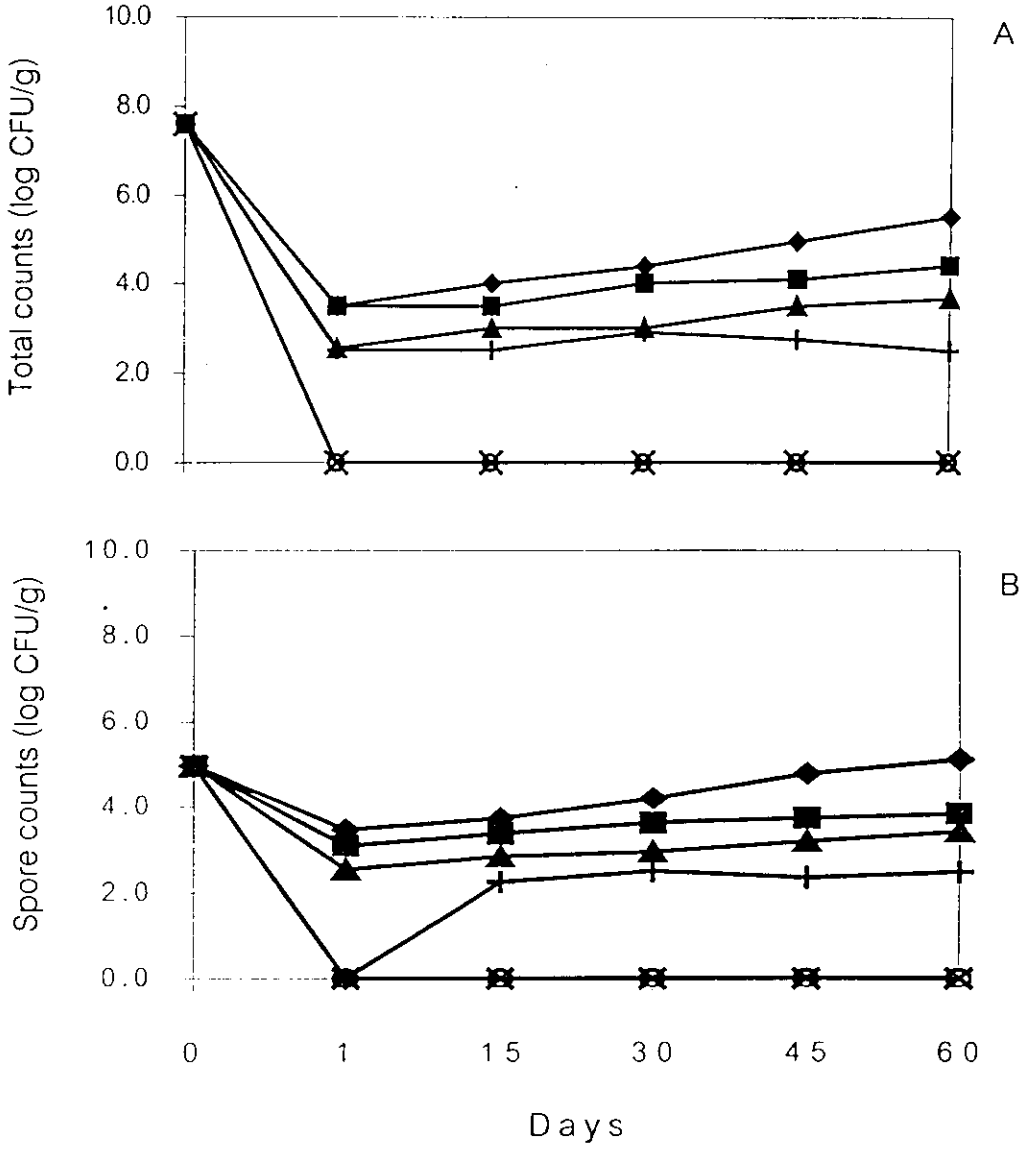


Figure 14 Effect of sodium benzoate on total counts (A) and spore counts (B) of *B. cereus* on fermented soybean boiled at 95° C 30 min and stored up to 60 days at ambient temperature. —◆— ; control, —■— ; 200 ppm, —▲— ; 400 ppm, —+— ; 600 ppm , —×— ; 800 ppm and —○— ; 1,000 ppm .

ภาพที่ 14 ผลของโซเดียมเบนโซเอทต่อปริมาณเซลล์ทั้งหมด (A) และ สปอร์ (B) ของเชื้อ *B. cereus* ในเต้าเจี้ยวหลังต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน —◆— ; ชุดควบคุม , —■— ; 200 พีพีเอ็ม, —▲— ; 400 พีพีเอ็ม, —+— ; 600 พีพีเอ็ม, —×— ; 800 พีพีเอ็ม และ —○— ; 1,000 พีพีเอ็ม

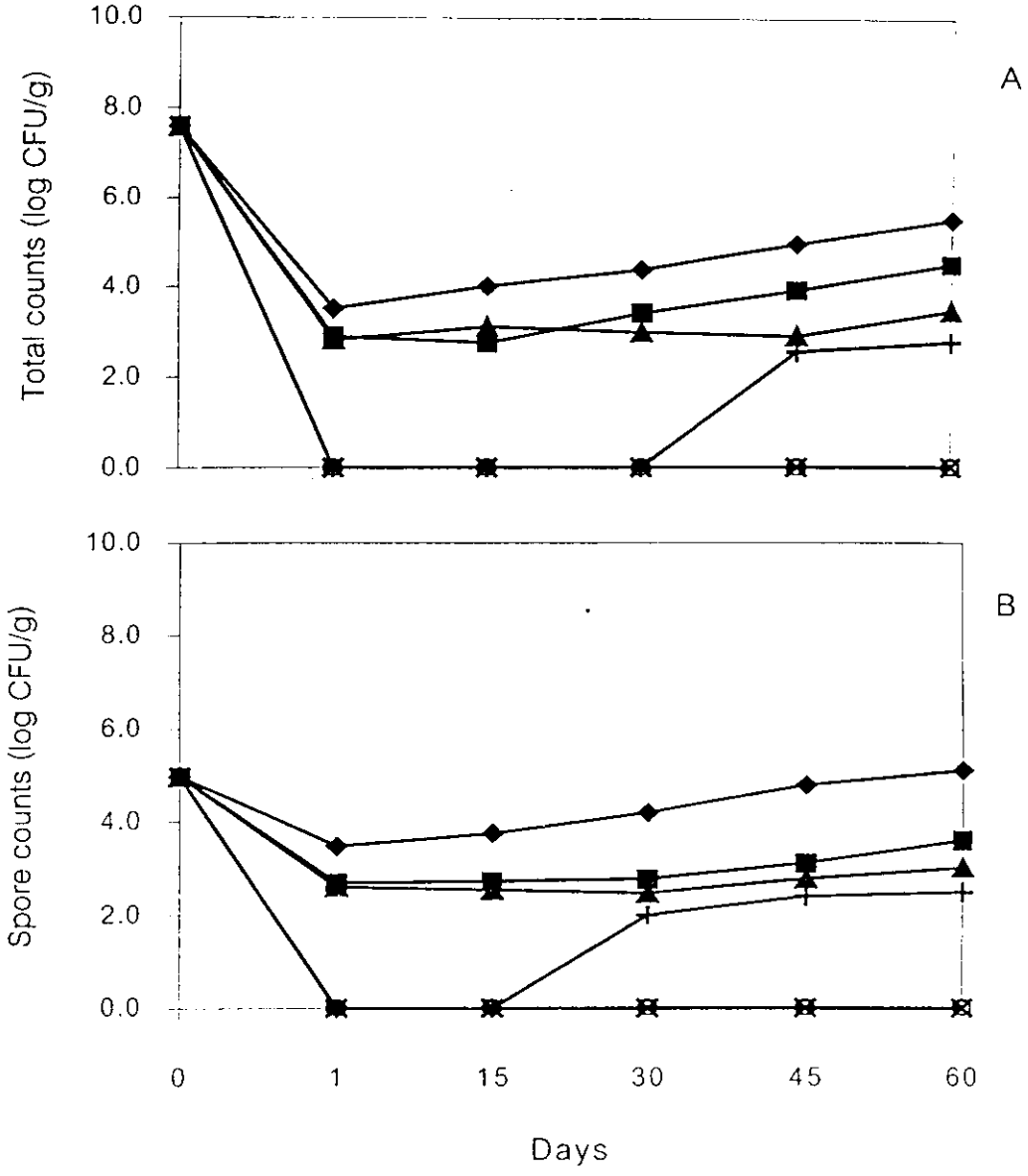


Figure 15 Effect of potassium sorbate on total counts (A) and spore counts (B) of *B. cereus* on fermented soybean boiled at 95° C 30 min and stored up to 60 days at ambient temperature . —◆— ; control , —■— ; 200 ppm, —▲— ; 400 ppm , —+— ; 600 ppm , —×— ; 800 ppm and —○— ; 1,000 ppm .

ภาพที่ 15 ผลของโปแตสเซียมซอร์เบทต่อปริมาณเซลล์ทั้งหมด (A) และ สปอร์ (B) เชื้อ *B. cereus* ในเต้าเจี้ยวหลังจากต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน —◆— ; ชุดควบคุม, —■— ;200 พีพีเอ็ม, —▲— 400 พีพีเอ็ม, —+— ; 600 พีพีเอ็ม, —×— ;800 พีพีเอ็ม และ —○— ; 1,000 พีพีเอ็ม

การศึกษาของ Thomas และคณะ (1993) พบว่า กรดซอร์บิกเข้มข้น 2000 พีพีเอ็มและเกลือเข้มข้นร้อยละ 2.5 ถึง 5.0 สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ CMCC 3322 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีพีเอช 5.0 ถึง 7.0 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เกลือเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 2.5 จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ของกรดซอร์บิก นอกจากนี้ที่อุณหภูมิเดียวกัน เช่น 20 หรือ 35 องศาเซลเซียส และเกลือเข้มข้นเท่ากัน กรดซอร์บิกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ดีกว่ากรดเบนโซอิก การศึกษาของ Stecchi และคณะ (2000) พบว่าโปแตสเซียมซอร์เบทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ ATCC 9139 ในอาหารแข็ง BHI ได้ และTorre และคณะ (2001) รายงานเมื่อเติมกรดซอร์บิกเข้มข้น 900 พีพีเอ็มในมันฝรั่งบดผสมนม สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ได้ 2.5 log CFU/g และสามารถเก็บรักษาอาหารไว้ได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 วัน โดยไม่มีการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างการเก็บรักษา และผลการวิเคราะห์เต้าเจี้ยวจากโรงงานอุตสาหกรรมจำนวน 7 ยี่ห้อพบว่าทุกยี่ห้อมีการใช้วัตถุกันเสียทั้งชนิดกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกชนิดใดชนิดหนึ่งในปริมาณ 600 ถึง 1000 พีพีเอ็ม หรือใช้ทั้งสองชนิดร่วมกัน โดยใช้ไม่เกิน 1000 พีพีเอ็ม และตรวจไม่พบจุลินทรีย์ตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (ภาคผนวก ค)

สำหรับเต้าเจี้ยวชุดควบคุม ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่ไม่ใช้วัตถุกันเสีย พบว่าเมื่อต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและ สปอร์คงเหลือ 3.50 และ 3.48 log CFU/g ตามลำดับ นั่นคือสามารถทำลายสปอร์ได้ 1.5 log CFU/g โดยประมาณ ทั้งนี้เนื่องจากเต้าเจี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นส่วนประกอบ เมื่อให้ความร้อนกับผลิตภัณฑ์ เกลือจะทำให้สปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ทนความร้อนได้น้อยลงจึงทำลายสปอร์ได้บางส่วน การศึกษาของ Hutton และคณะ (1991) พบว่าในช่วงพีเอช 5.0 ถึง 7.0 ความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ด้วยความร้อน ถ้าความเข้มข้นของเกลือเป็นร้อยละ 2 สปอร์จะถูกทำลายได้ดีมากกว่าความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 1 และจาก

การศึกษาของ Leguerinel และคณะ (2000) โดยการให้ความร้อนอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสกับสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ CNRZ 110 ในอาหารเหลว BHI พบว่าอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 4 สปอร์จะถูกทำลายได้มากกว่าที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1

เมื่อเก็บเต้าเจี้ยวชุดที่ไม่ใช้วัตถุกันเสียหลังจากต้ม ในขวดแก้วปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 วัน พบว่าปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เพิ่มจำนวนเป็น 5.5 และ 5.1 ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในเต้าเจี้ยวได้หมด ในระหว่างเก็บรักษา เชื้อ *B. cereus* จึงสามารถเจริญแบ่งเซลล์และสร้างสปอร์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้เชื้อ *B. cereus* สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Granum, 1997 ; Noterman and Batt, 1998) รวมทั้งอุณหภูมิของการเก็บรักษาอาหารจะมีผลต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* เช่น การศึกษาของ Aran (2001) เมื่อเก็บรักษาซุปเนื้อวัวที่มีสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* 4.0 log CFU/g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ในถุงสุญญากาศ พบว่ามีปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้น 1.6 log CFU/g แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นเพียง 1.0 log CFU/g การศึกษาของ Valero และคณะ (2003) พบว่าเมื่อให้ความร้อนแก่สปอร์ *B. cereus* สายพันธุ์ INRA TZ415 และ สายพันธุ์ INRA L2104 ปริมาณ 5-6 log CFU/ml ใน carrot broth ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7.5 – 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง และเก็บที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส จะมีระยะ lag phase ประมาณ 8 – 18 ชั่วโมง แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส จะยืดระยะ lag phase ได้มากกว่า 60 วัน

5.2 ผลของแบคเทอริโอซินต่อปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

5.2.1 การผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 1)

การผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) ในอาหาร medium I และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 2 ระดับ คือ อิ่มตัวร้อยละ 40 และ 80 นำตะกอนที่ได้ละลายในสารละลายฟอสเฟอร์บัฟเฟอร์ และกำจัดเกลือออกโดยการไดอะไลซิสด้วยถุงไดอะไลซิสขนาด 3,500 Da พบว่าแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากแต่ละส่วนในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์เจริญและสปอร์ เป็นหน่วย Arbitary Unit (AU/ml) เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของตะกอนในถุงไดอะไลซิสมีกิจกรรมยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์เจริญและสปอร์เท่ากับ 80 และ 40 AU/ml ตามลำดับ และเมื่อทำให้เข้มข้น ด้วย CM cellulose จะมีกิจกรรมยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์เจริญและสปอร์เท่ากับ 640 และ 160 AU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) มีขนาดเล็ก คือ มีขนาด 3,500 ถึง 10,000 Da และทนความร้อนได้ 90 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที (ศิรินาถ หนูเอก, 2539) กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณ และลักษณะของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ด้วย (Meghrous *et al.*, 1999 ; Brink *et al.*, 1994 ; Parente and Hill, 1992) และแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งได้เซลล์เจริญได้ดีกว่าสปอร์ เนื่องจากลักษณะของสปอร์ที่มีชั้นของโปรตีนล้อมรอบหรือที่เรียกว่า "spore coat" ที่ทำให้สปอร์ทนต่อสภาวะแวดล้อมและสารเคมีได้ดี (Nester *et al.*, 1998)

Table 10 Protein content and bacteriocin activity assay of vegetative cells and spores of *B. cereus* from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11).

ตารางที่ 10 ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์เจริญและ สปอร์ ของแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) ในแต่ละขั้นตอนการสกัด

Production of bacteriocins	Protein content (mg/ml)	Bacteriocin activity assay of *B. cereus* (AU/ml)	
		Vegetative cells	Spores
Supernatants			
- removed cells by centrifugation	24.20	20	5
- filtered through 0.2 μm pore-size filters	22.15	20	5
Precipitation with 40 % $(NH_4)_2SO_4$			
- pellets	18.16	0	0
- supernatants	2.20	20	10
Precipitation with 80 % $(NH_4)_2SO_4$			
- pellets	14.97	160	80
- supernatants	0.62	0	0
Dialysis	4.98	80	40
Concentrated with CM-Cellulose	36.61	640	160

Table 11 Bacteriocin activity assey for vegrtative cells and spore counts of *B. cereus* from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11).

ตารางที่ 11 กิจกรรมยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในรูปของเซลล์เจริญและ สปอร์ ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) ในแต่ละขั้นตอนการสกัด

Production of bactericins	Volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity (AU/mg protein)		Yield (%)	Fold	
			Vegetative cells	spores		Vegetative cells	spores
Supernatants							
- removed cells by centrifugation	1,000	24,200	0.83	0.21	100	1.00	1.00
- filtered through membrene filter (0.2 μm)	900	19,935	0.90	0.23	90	1.09	1.07
Precipitation with 40 % $(NH_4)_2SO_4$							
- pellets	40	727	0	0	0	0	0
- supernatants	860	1,892	9.09	4.55	86	10.95	21.65
Precipitation with 80 % $(NH_4)_2SO_4$							
- pellets	20	300	10.69	5.34	2	12.88	25.45
- supernatants	840	521	0	0	0	0	0
Dialysis (3500 Da)	50	249	16.06	8.03	5	19.35	38.25

การศึกษาของ Meghrous และคณะ (1999) พบว่าปริมาณแบคเทอริโอซิน 3 ชนิด คือ ไนซิน A ไนซิน B และพีดิโอซิน ที่ใช้ยับยั้งเซลล์เจริญของเชื้อ *Cl. perfringens* สายพันธุ์ ATCC 3628 จำนวน 5 log CFU/ml เท่ากับ 0.75 0.50 และ 9.8 μg/ml ตามลำดับ ในขณะปริมาณที่ใช้ยับยั้งสปอร์ของเชื้อดังกล่าว เท่ากับ 23 35 และ 69 μg/ml ตามลำดับ จากการศึกษาของ Okereke และ Montville (1991) พบว่าแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของ สปอร์ของเชื้อ *Cl. botulinum* ได้ ซึ่ง De Vuyst และ Vandamme (1994) กล่าวว่าไนซินมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้ง sporocidal หรือ sporostatic ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของสปอร์ นอกจากนี้ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งของไนซินต่อการเจริญของสปอร์ ได้แก่ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต สปอร์ เวลาและอุณหภูมิในขั้นตอน heat – shock เชื้อจุลินทรีย์ และปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ (Scott and Talor, 1981) Meghrous และคณะ (1999) อ้างจาก Hitchins (1963) และ Gould (1964) กล่าวว่า ไนซินไม่มีผลยับยั้งการเจริญของสปอร์ แต่ไนซินทำให้เซลล์หลังการเจริญมีลักษณะบวมและยับยั้งขั้นตอนการสร้างสปอร์ของเซลล์นั้น ๆ

5.2.2 ผลของแบคเทอริโอซินต่อปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยว

การเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) ปริมาณ 12 AU/g ในเต้าเจี้ยวที่หมักสำเร็จมีเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและ สปอร์เท่ากับ 6.40 และ 4.85 log CFU/g ตามลำดับ และเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ลดลงเหลือ 4.96 และ 4.35 log CFU/g ตามลำดับ แสดงว่าแบคเทอริโอซินทำลายเชื้อ *B. cereus* ในเต้าเจี้ยวก่อนให้ความร้อนได้ โดยลดเซลล์ทั้งหมด 1.44 log CFU/g และ สปอร์ 0.5 log CFU/g จึงทำให้ปริมาณเชื้อ *B. cereus* เริ่มต้นในเต้าเจี้ยวมีน้อยกว่าชุดควบคุม คือชุดที่ไม่ได้เติมแบคเทอริโอซิน

เมื่อต้มเต้าเจี้ยวที่เติมแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที พบว่าเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ลดลงเหลือ 3.15 และ 2.98 log CFU/g ตามลำดับ ในขณะที่การต้มเต้าเจี้ยวชุดควบคุมเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์ลดลงเหลือ 3.74 และ 3.58 log CFU/g ตามลำดับ แสดงว่าปริมาณ *B. cereus* ที่ลดลงเป็นผลของความร้อนร่วมกับแบคเทอริโอซิน (ภาพที่ 16)

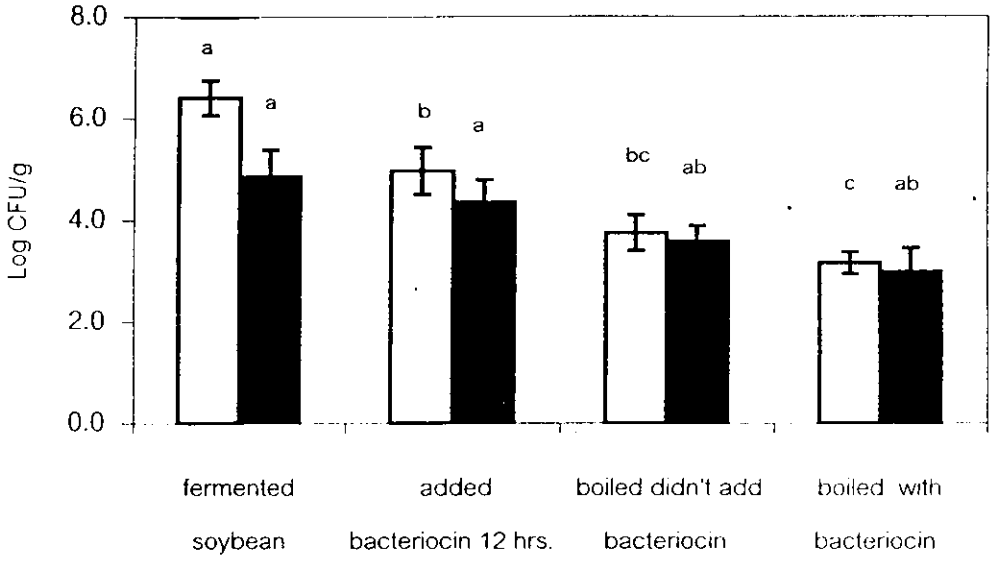


Figure 16 Change of *B. cereus* on fermented soybean before and after boiled with added bacteriocin at 95° C 30 min. compare with fermented soybean didn't add bacteriocin after boiled at 95° C 30 min. □, Total counts ; ■ ,Spore counts. . Data followed by different letters are significant by least difference at $P < 0.05$

ภาพที่ 16 ปริมาณเชื้อ *B. cereus* ในในเต้าเจี้ยวก่อนและหลังเติมแบคเทอริโอซินแล้วต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 นาที เปรียบเทียบกับเต้าเจี้ยวชุดที่ไม่เติมแบคเทอริโอซินแล้วต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 30 นาที. □, ปริมาณเซลล์ทั้งหมด ; ■ ,สปอร์.

การเก็บรักษาเต้าเจี้ยวชุดที่เติมแบคเทอริโอซินแล้วให้ความร้อนในขวดแก้วปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน พบว่าเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เพิ่มปริมาณขึ้นเท่ากับ 3.84 และ 3.26 log CFU/g ตามลำดับ แต่ชุดควบคุมเชื้อ *B. cereus* ในรูปเซลล์ทั้งหมดและสปอร์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.33 และ 4.12 log CFU/g ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเต้าเจี้ยวชุดที่เติมแบคเทอริโอซินแล้วให้ความร้อนไม่สามารถควบคุมเชื้อ *B. cereus* ในระหว่างการเก็บรักษาได้

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแบคเทอริโอซินมีแนวโน้มในการที่จะยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในเต้าเจี้ยวได้ระดับหนึ่ง แต่จะต้องเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอซินเพื่อให้มีกิจกรรมยับยั้งมากขึ้น ดังนั้นการใช้แบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารจากธรรมชาติจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้เพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ หรืออาจใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับวัตถุกันเสียประเภทสารเคมีและความร้อนเพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีในอาหาร

การศึกษาของ Wandiling และคณะ (1999) ได้รายงานการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 97 100 และ103 องศาเซลเซียส ร่วมกับไนซินความเข้มข้น 2000 และ 4000 IU/ml จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายของสปอร์ของ *B. cereus* ในนมได้ และการศึกษาของ Farkas และคณะ (2002) ถึงผลของการใช้ไนซิน ร่วมกับความร้อนต่อสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เนื้อในซอสมะเขือเทศ พบว่า ไนซิน ปริมาณ 80 IU/g ร่วมกับความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถลดสปอร์ลงได้ 1.8 log CFU/g ในขณะที่เมื่อใช้ไนซินเพียงอย่างเดียวสปอร์จะลดลง 1.0 log CFU/g และเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลา 14 วัน อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เชื้อ *B. cereus* เพิ่มสูงขึ้นประมาณ 3 log CFU/g การศึกษาของ Penna และ Moraes (2002) พบว่าการใช้ไนซินที่ความเข้มข้น 25 μg / ml ร่วมกับความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 80 ถึง 100 องศาเซลเซียส จะลดค่า D – values สปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในนมได้ร้อยละ 40 และการศึกษาของ Thomas และคณะ (2002) พบว่าไนซินปริมาณ 25 μg/g จะช่วยควบคุมการเจริญ สปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในมันบดได้ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วัน