



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

สาขา

จุลชีววิทยา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของความร้อนและค่าความเป็นกรดต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes* ในผลิตภัณฑ์หน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง

Effect of Thermal and pH Inactivation on Spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium sporogenes* in Boiled Bamboo Shoots in Plastic Bag

نامผู้วิจัย นางสาวเสาวคนธ์ ต่วนเทศ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์มรณิ ดุ้ยเต็มวงศ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ประเวทย์ ดุ้ยเต็มวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของความร้อนและค่าความเป็นกรดด่างต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* และ
Clostridium sporogenes ในผลิตภัณฑ์หน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง

Effect of Thermal and pH Inactivation on Spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium sporogenes*
in Boiled Bamboo Shoots in Plastic Bag

โดย

นางสาวเสาวคนธ์ ต่วนเทศ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2551

เสาวคนธ์ ส่วนเทศ 2551: ผลของความร้อนและค่าความเป็นกรดต่ำต่อการยับยั้งสปอร์
ของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes* ในผลิตภัณฑ์หน่อไม้รวกต้มบรรจุ
ถุง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ฉรรณี ดุ้ยเต็มวงศ์, Ph.D. 120 หน้า

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาผลร่วมของความร้อนและค่าความเป็นกรดต่ำในการทำลายสปอร์
Bacillus cereus และ *Clostridium sporogenes* ในผลิตภัณฑ์หน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง ที่นิยมผลิตใน
จังหวัดกาญจนบุรี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตที่ปลอดภัยของหน่อไม้ขนาดเล็ก (S)/ ใหญ่
(B) ด้วยการปรับสภาพกรด (A), ให้ความร้อนจนอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (CT, 90 และ 95 องศา
เซลเซียส) และจำลองการปนเปื้อนด้วยจำนวนสปอร์เริ่มต้น (Low 10^4 /มิลลิลิตร และ High 10^8 /
มิลลิลิตร) พบว่าใช้เวลาให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ขนาดเล็กมาถึงจุดที่ต้องการ (Come-up time)
เร็วกว่าหน่อไม้ขนาดใหญ่ การปรับด้วยกรดชนิดร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก ทำให้หน่อไม้มีค่า
ความเป็นกรดต่ำต่ำกว่า 4.5 ได้ ผลการตรวจนับสปอร์ของ *Bacillus cereus* และ *Clostridium*
sporogenes มีแนวโน้มลดลงหลังการให้ความร้อนและการใช้ความร้อนร่วมกับการปรับกรดทำ
ให้ค่า D (Decimal Reduction Time) และ TDT (Thermal death time) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทาง
สถิติ ($p < 0.01$) ในการยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ตัวอย่างหน่อไม้ S-A-CT90 มีค่า D-value
และ TDT เป็น 7.66 ± 0.58 นาทีและ 62.66 ± 2.08 นาที ตามลำดับ และ S-A-CT95 มีค่า $6.17 \pm$
 0.76 นาทีและ 50.00 ± 5.29 นาที ตามลำดับ ค่า D และ TDT ของหน่อไม้ปรับกรดต่ำกว่ากรณีไม่
ปรับกรดถึงร้อยละ 40-50 ($P < 0.05$) ดังนั้น ควรปรับกรดให้มีค่าความเป็นกรดต่ำต่ำกว่า 4.5 เมื่อต้ม
ด้วยเวลา 5D และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสและ 55 องศาเซลเซียสนาน 2 และ 1 สัปดาห์ ตามลำดับ
ตรวจไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ ในการผลิตหน่อไม้ต้มบรรจุถุงที่ปลอดภัย (5D) ควรต้ม
หน่อไม้ปรับด้วยกรดร้อยละ 0.3 ในน้ำเดือดนานไม่ต่ำกว่า 40 นาที เพื่อให้มีอุณหภูมิใจกลางไม่
ต่ำกว่า 90 องศาเซลเซียส

Sowvakon Tuanted 2008: Effect of Thermal and pH Inactivation on Spores of *Bacillus cereus* and *Clostridium sporogenes* in Boiled Bamboo Shoots in Plastic Bag. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology.

Thesis Advisor: Associate Professor Kooranee Tuitemwong, Ph.D. 120 pages.

The objective of this study was to investigate combination effects of heating and pH on the inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium sporogenes* spores in boiled Gamble bamboo shoots, *Thysostachys siamensis*, in plastic bags commonly practiced in Kanjanaburi province. Decimal reduction time (D) and thermal death time (TDT) values were determined from bamboo shoots treated by pH adjustment with acid (A), core temperature (CT90/95°C), diameter of the shoots (Small 1.8-2.4 cm., and Big 2.9-3.5 cm.) and with low (10^4 /ml) and high (10^8 /ml) spore loads. Small diameter bamboo shoots had a shorter core temperature come up time than the bigger size. Citric acid at 0.3% by weight could adjust the pH of the shoots to acidic condition, lower than 4.5. *Bacillus cerues* and *Clostridium sporogenes* spores tended to decrease greater with the combination of heat and acid adjustment than those with only heat treatment. The D and TDT values of *Bacillus cerues* spores of S-A-CT90 and S-A-CT95 bamboo shoot were 7.66 ± 0.58 and 62.66 ± 2.08 min and 6.17 ± 0.76 and 50 ± 5.29 min for 90 and 95 °C, respectively. The growth of microorganisms was undetectable after incubation of the product at 37 °C and 55 °C for 2 and 1 week, respectively. The recommendation to produce safe boiled bamboo shoots (5D) was adjusting the pH with 0.3% citric acid and placed in boiling water for not less than 40 min to get the core temperature of 90 °C or higher.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ /

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์มนตรี ดุ้ยเต็มวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและรองศาสตราจารย์ประเวทย์ ดุ้ยเต็มวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้การปรึกษาในด้านการเรียน ค้นคว้าวิจัย ความเมตตาที่มีให้ลูกศิษย์ ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สุรางค์ สุทธิราช ประธานกรรมการที่ได้ให้คำแนะนำระหว่างการวิจัยและให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์สมคิด รื่นภาควุฒิ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัยที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและมอบความรู้ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้องวริษา ศรีสะอาด ที่เป็นกำลังใจและให้คำแนะนำที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ชาญวิทย์ วัชรพุกก์ อดีตคณบดีฯ และรองศาสตราจารย์ นิศย์ศรี แสงเดือน คณบดีคณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร ที่อนุญาตให้ข้าพเจ้าได้ลาศึกษาต่อในครั้งนี้ และขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานในสาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหารทุกท่านที่ให้ความสนใจและคำแนะนำที่ดีในระหว่างที่ข้าพเจ้าลาศึกษาต่อ

ที่สำคัญที่สุดขอกราบขอบพระคุณพ่อและแม่ ผู้ซึ่งเลี้ยงดู ให้ความรัก ให้กำลังใจและมีพระคุณกับข้าพเจ้าอย่างหาที่สุดมิได้ ขอขอบคุณ คุณชาติสยาม ผลวิสัย สำหรับกำลังใจ ความสบายใจ และให้ความรักโดยไม่มีเงื่อนไขกับข้าพเจ้าตลอดมา ขอขอบคุณน้องสาวและน้องเขยสำหรับกำลังใจที่ดีและการดูแลพ่อและแม่แทนข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาที่ลาศึกษาต่อในครั้งนี้

เสาวคนธ์ ต่วนเทศ

ตุลาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	38
ผล	38
วิจารณ์	64
สรุปและข้อเสนอแนะ	70
สรุป	70
ข้อเสนอแนะ	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	78
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	79
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง	83
ภาคผนวก ค กราฟอัตราการรอดชีวิต	103
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	120

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณค่าทางโภชนาการของหน่อไม้รวกต้ม	9
2	เกณฑ์ตัดสินคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนหน่อไม้ต้ม	10
3	การสำรวจผลิตภัณฑ์อาหารที่ตรวจพบเชื้อ <i>Bacillus cereus</i>	13
4	ลักษณะของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ <i>Bacillus cereus</i>	14
5	การจัดกลุ่มของ <i>Clostridium botulinum</i> ตามชนิดของการสร้างสารพิษ	17
6	จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ <i>Clostridium botulinum</i> ในระหว่างปี พ.ศ. 2539-2549	19
7	ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ Proteolytic <i>Clostridium botulinum</i> และ <i>Clostridium sporogenes</i>	21
8	ผลของอุณหภูมิต่อค่า Thermal Death Time ของสปอร์	25
9	ผลของจำนวนสปอร์ของ <i>Clostridium botulinum</i> ต่อค่า Thermal Death Time ที่ 100 องศาเซลเซียส	26
10	ผลของอุณหภูมิ ค่า a_w และ pH ต่อค่า D-value ของสปอร์เชื้อ <i>Bacillus cereus</i>	28
11	การทนความร้อนของจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ที่มีความสำคัญในอาหาร	29
12	ระยะเวลา Come-up time เพื่อให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส และ 95 องศาเซลเซียส	38
13	ค่าความเป็นกรดค้างเมื่อปรับด้วยสารละลายกรดซิตริกและผ่านการต้มตามเวลา come-up time ในสภาวะต่างๆ	41
14	ค่า D-value และ Thermal Death Time ในการยับยั้งสปอร์ของ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 ด้วยสภาวะต่างๆ โดยเฉพาะสปอร์ที่มีจำนวนตั้งต้นมาก (ประมาณ 8 Log CFU/ml)	44
15	ค่า D-value และ Thermal Death Time ในการยับยั้งสปอร์ของ <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437 ด้วยสภาวะต่างๆ โดยเฉพาะสปอร์ที่มีจำนวนตั้งต้นมาก (ประมาณ 8 Log CFU/ml)	48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ค่า 5D ที่ได้จากการทดลองยับยั้งสปอร์ของ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 และ <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437 ที่นำมาจำลองสภาวะการบ่มตามวิธีการตรวจลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของอาหารกระป๋อง	51
17	การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรด เมื่อต้มตามระยะเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	52
18	การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ปรับกรด เมื่อต้มตามระยะเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	53
19	การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรด เมื่อต้มตามระยะเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	54
20	การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ปรับกรด เมื่อต้มตามระยะเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	55
21	การทดสอบความใช้ได้ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Orange Serum Broth โดยเฉพาะสปอร์ของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i>	56
22	การทดสอบความใช้ได้ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Orange Serum Broth โดยเฉพาะสปอร์ของเชื้อ <i>Clostridium sporogenes</i>	57
23	ค่าความเป็นกรดค้างของหน่อไม้ที่ต้มตามเวลา 5D เชื้อ <i>Clostridium sporogenes</i>	58
24	ค่าความเป็นกรดค้างของหน่อไม้ที่ต้มตามเวลา 5D เชื้อ <i>Bacillus cereus</i>	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข1 การบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ขนาดเล็กถึง 90 องศาเซลเซียส	84
ข2 การบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ขนาดเล็กถึง 95 องศาเซลเซียส	85
ข3 การบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ขนาดใหญ่ถึง 90 องศาเซลเซียส	86
ข4 การบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ขนาดใหญ่ถึง 95 องศาเซลเซียส	88
ข5 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 0.65% ซ้ำที่ 1	90
ข6 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 0.65% ซ้ำที่ 2	91
ข7 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 0.65% ซ้ำที่ 3	92
ข8 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 2.5% ซ้ำที่ 1	93
ข9 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 2.5% ซ้ำที่ 2	94
ข10 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 2.5% ซ้ำที่ 3	95
ข11 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.0% ซ้ำที่ 1	96
ข12 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.0% ซ้ำที่ 2	97
ข13 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.0% ซ้ำที่ 3	98
ข14 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.5% ซ้ำที่ 1	99
ข15 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.5% ซ้ำที่ 2	100
ข16 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้น้ำคั้นสดด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.5% ซ้ำที่ 3	101
ข17 ค่าความเป็นกรดค่าเฉลี่ยของน้ำหน่อไม้คั้นสดเมื่อปรับด้วยสารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.65%, 2.5%, 3.0% และ 3.5% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที	102

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	หน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงที่จำหน่ายในจังหวัดกาญจนบุรี	7
2	โครงสร้างของ Taxiphillin	7
3	การระบาดของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> ในประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1993-1997	15
4	Phylogenetic dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของ <i>Clostridium sporogenes</i> และ <i>Clostridium botulinum</i> type A และ B	22
5	โครงสร้างของสปอร์	22
6	ค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ยของน้ำหน่อไม้คั้นสดเมื่อปรับด้วยสารละลายกรดซิตริก ที่ความเข้มข้น 0.65%, 2.5%, 3.0% และ 3.5% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที	40
7	ค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ยของน้ำหน่อไม้คั้นสดเมื่อปรับด้วยสารละลายกรดซิตริก ที่ความเข้มข้น 3.5% ในปริมาณที่ต่างกัน	41
8	การยับยั้งสปอร์ของ <i>Bacillus cereus</i> ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นน้อยด้วยสภาวะต่างๆ เมื่อทำให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ได้ตามที่ต้องการ (90 องศาเซลเซียส และ 95 องศาเซลเซียส)	45
9	การยับยั้งสปอร์ของ <i>Clostridium sporogenes</i> ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นน้อยด้วยสภาวะต่างๆ เมื่อทำให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ได้ตามที่ต้องการ (90 องศาเซลเซียส และ 95 องศาเซลเซียส)	49
10	ค่าการวัดสีของหน่อไม้ที่ผ่านการต้มตามเวลา 5 D ของเชื้อ <i>Clostridium sporogenes</i>	60
11	ค่าการวัดสีของหน่อไม้ที่ผ่านการต้มตามเวลา 5 D ของเชื้อ <i>Bacillus cereus</i>	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก1 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด	104
ก2 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด	105
ก3 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด	106
ก4 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด	107
ก5 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ปรับกรด	108
ก6 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ปรับกรด	109
ก7 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ปรับกรด	110
ก8 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ปรับกรด	111
ก9 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด	112
ก10 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด	113
ก11 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด	114
ก12 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด	115

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ค13 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ปรับกรด	116
ค14 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ปรับกรด	117
ค15 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ปรับกรด	118
ค16 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลาง ขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ปรับกรด	119

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

°C	=	องศาเซลเซียส
D-value	=	Decimal Reduction Time
TDT	=	Thermal Death Time
pH	=	ค่าความเป็นกรดด่าง
Core temperature	=	อุณหภูมิใจกลาง
mg	=	มิลลิกรัม
g	=	กรัม
kg	=	กิโลกรัม

ผลของความร้อนและค่าความเป็นกรดต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus*
และ *Clostridium sporogenes* ในผลิตภัณฑ์หน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง

Effect of Thermal and pH Inactivation on Spores of *Bacillus cereus* and
Clostridium sporogenes in Boiled Bamboo Shoots in Plastic Bag

คำนำ

หน่อไม้เป็นหน่ออ่อนที่เกิดจากต้นไผ่ เป็นส่วนที่สามารถรับประทานได้ของไผ่ มีรสชาติดี ได้มีการนำมาประกอบอาหารหลากหลายชนิด แต่เนื่องจากหน่อไม้จะแตกหน่อเฉพาะช่วงฤดูฝน ตั้งแต่เดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคมของปีเท่านั้น จึงได้มีการคิดค้นการถนอมอาหารประเภทหน่อไม้ในหลายรูปแบบ อาทิ หน่อไม้ปิ้ง หน่อไม้ขวด และหน่อไม้บรรจุถุง

จากการทำโครงการพัฒนาระบบความปลอดภัยอาหารให้แก่กลุ่ม OTOP ในปี พ.ศ. 2549-2550 พบว่าในเขตจังหวัดกาญจนบุรีการผลิตหน่อไม้บรรจุถุงนั้นมักใช้หน่อไม้ที่เกิดจากไผ่รวก (*Thysostachys siamensis* Gamble) ในการผลิตเนื่องจากมีวัตถุดิบเป็นจำนวนมาก ในระยะเวลาเพียง 3-4 เดือน การผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านอย่างหนึ่งเพื่อที่จะเก็บหน่อไม้ไว้รับประทานตลอดทั้งปี มีการผลิตในระดับครัวเรือนซึ่งอาจไม่ถูกสุขลักษณะอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิต กระบวนการผลิตนั้นไม่มีความซับซ้อนเพียงนำหน่อไม้ที่บรรจุในถุงไปต้มในน้ำเดือดประมาณ 15 นาทีและไม่มีการเติมสารใดเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ยังสามารถเก็บไว้ในถุงพลาสติกซึ่งรัดแน่นงอได้ประมาณหนึ่งปีโดยไม่มีลักษณะของการเสื่อมเสียแต่อย่างใด แต่จากกรณีที่เกิดขึ้นที่ ตำบลปากาหลวง อำเภอบ้านหลวง จังหวัดน่าน ในวันที่ 16 มีนาคม พ.ศ. 2549 ซึ่งชาวบ้านได้รับประทานหน่อไม้บรรจุถุงที่ผลิตโดยนำหน่อไม้บรรจุปิ้ง จากนั้นต้มบนเตาไฟถ่านโดยตรงนาน 15 นาทีและปิดฝาปิดโดยการมัดกริ เมื่อนำมาบริโภคนั้นชาวบ้านไม่ได้ให้ความร้อนก่อนเป็นเหตุให้มีผู้ป่วยที่ต้องเข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลประมาณ 200 ราย และมีผู้เสียชีวิตเนื่องจากสารพิษของเชื้อ *Clostridium botulinum* จำนวน 2 ราย ซึ่งเกิดจากการได้รับสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้สร้างขึ้น (ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค, 2549) แต่ยังไม่มียางานการระบาดอันเนื่องมาจากการบริโภคหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงซึ่งใช้ความร้อนจากการต้มในการฆ่าเชื้อเท่านั้นดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันการเกิดโรคซึ่งเกิดจากหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มให้ความร้อนที่เหมาะสมที่

สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงได้ โดยใช้สปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* เป็นตัวแทนของเชื้อที่ต้องการอากาศและสปอร์ของเชื้อ *Clostridium sporogenes* เป็นตัวแทนของเชื้อที่ไม่ต้องการอากาศ เนื่องจากเชื้อ *Clostridium sporogenes* นั้นมีลักษณะทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีที่เหมือนกับเชื้อ *Proteolytic Clostridium botulinum* ต่างกันเพียงเชื้อ *Clostridium sporogenes* นั้นไม่สร้างสารพิษจึงมีความปลอดภัยในการทดลอง และเพื่อพัฒนาการผลิตผู้วิจัยจึงได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดต่างตามที่คณะกรรมการอาหารและยานำมาประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง เพื่อให้เกิดความปลอดภัยจากการสร้างสารพิษของเชื้อจุลินทรีย์และเป็นแนวทางในการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงที่ปลอดภัยให้กับชาวบ้านต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาค่าดีแวลู (Decimal Reduction Time; D-value) และ เทอร์มอลเดทไทม์ (Thermal death time; TDT) ของสปอร์ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 ในแบบจำลองของหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง โดยศึกษาถึงความแตกต่างของการปรับกรด, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง, อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้และจำนวนสปอร์ตั้งต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงให้มีความปลอดภัย
2. เพื่อประยุกต์ใช้การปรับกรดของหน่อไม้ป้อนตามคำแนะนำของสำนักงาน คณะกรรมการอาหารและยา มาใช้กับการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงเพื่อให้เกิดความปลอดภัยยิ่งขึ้น

การตรวจเอกสาร

หน่อไม้

ไผ่เป็นพืชที่สามารถนำทุกส่วนมาใช้ประโยชน์ได้ ไม่ว่าจะเป็นราก ลำต้น หรือใบ แต่ประโยชน์ส่วนใหญ่ที่คนทั่วไปรู้จักนั้น นอกจากจะเอาลำต้นมาใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ เช่น การก่อสร้างและหัตถกรรมแล้ว ลำต้นอ่อนของไผ่หรือที่เรียกว่า “หน่อไม้” นั้นก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยนำมาประกอบอาหารบริโภค เนื่องจากมีรสชาติดีสามารถประกอบอาหารได้หลายชนิด และไผ่ส่วนมากใช้หน่อในการบริโภคได้ สำหรับไผ่ที่นิยมนำหน่อมาบริโภคและมีจำหน่ายอยู่ทั่วไปนั้น ได้แก่ ไผ่ตง ไผ่รวก ไผ่สีสุก และไผ่ป่า เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีไผ่อีกหลายชนิดนอกจากที่กล่าวนี้ ที่นิยมนำมาบริโภคกันในท้องถิ่น เช่น ไผ่จืด ไผ่หวาน เป็นต้น ผลผลิตหน่อไม้ส่วนใหญ่เป็นผลผลิตจากปายกเว้นไผ่ตงเท่านั้นที่ส่วนใหญ่มีการปลูกเพื่อการค้า ดังนั้นช่วงที่มีหน่อไม้ออกสู่ตลาดมากจึงเป็นช่วงฤดูฝนซึ่งมีระยะเวลาเพียง 4-5 เดือนเท่านั้น การบริโภคนิยมนำมาบริโภคสด แต่เนื่องจากมีผลผลิตออกสู่ตลาดเฉพาะช่วงฤดูฝนเท่านั้น การแปรรูปหรือการถนอมรักษาหน่อไม้ให้สามารถเก็บไว้บริโภคได้ตลอดทั้งปี จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ซึ่งส่วนใหญ่มี 2 วิธีคือ ต้มบรรจุปี๊บหรือเรียกว่าอัดปี๊บและดอง แต่ละผลิตภัณฑ์ถ้ามีการผลิตและเก็บรักษาที่เหมาะสมจะสามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 2 ปี หน่อไม้แต่ละชนิดเหมาะสำหรับการแปรรูปที่แตกต่างกันไป กล่าวคือ

ไผ่ตง นิยมนำมาผลิตหน่อไม้อัดปี๊บมีน้ำหนักปี๊บละประมาณ 20 กิโลกรัม และมีน้ำหนักเนื้อประมาณ 12 กิโลกรัม มีแหล่งผลิตที่สำคัญในจังหวัดปราจีนบุรี เนื่องจากจังหวัดดังกล่าวเป็นแหล่งเพาะปลูกไผ่ตงมากที่สุดของประเทศ มีผลผลิตออกสู่ตลาดประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนสิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงที่มีหน่อไม้ไผ่ตงสดมากที่สุด

ไผ่สีสุก นิยมนำมาผลิตหน่อไม้อัดปี๊บเช่นกัน มีลักษณะและรสชาติเหมือนกับไผ่ตง แต่เป็นที่นิยมน้อยกว่าไผ่ตง ราคาจำหน่ายต่ำกว่าเล็กน้อย น้ำหนักปี๊บละประมาณ 20 กิโลกรัม แหล่งผลิตส่วนใหญ่ มาจากจังหวัดตากและอุดรธานี มีผลผลิตออกสู่ตลาดประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน

ไผ่ป่า ไม่นิยมนำมาต้มบรรจุปี๊บ ส่วนใหญ่นำมาผลิตหน่อไม้ดอง ผลผลิตส่วนมากมาจาก จังหวัดกาญจนบุรีและจังหวัดพิษณุโลก ซึ่งออกสู่ตลาดประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนสิงหาคม หรือระยะเวลาเดียวกับไผ่ตง

ไผ่รวก การแปรรูปมีทั้งอัดปี๊บและหน่อไม้ดอง สำหรับไผ่รวกอัดปี๊บ มีน้ำหนักปี๊บละ ประมาณ 20 กิโลกรัม มีการผลิตจากหลายแหล่งมีน้ำหนักเนื้อแตกต่างกันไปคือ จากจังหวัด กาญจนบุรี และสุพรรณบุรีมีน้ำหนักเนื้อประมาณปี๊บละ 13 กิโลกรัม จากอำเภอภูเขียว จังหวัด ชัยภูมิ อำเภอหล่มสัก จังหวัดเพชรบูรณ์ และอำเภอชุมแพ จังหวัดขอนแก่น มีน้ำหนักเนื้อประมาณ ปี๊บละ 14-15 กิโลกรัม (สุทัศน์, 2544)

ไผ่รวก

ไผ่รวกมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Thysostachys siamensis* Gamble และมีชื่อพ้องทาง พฤกษศาสตร์คือ *Bambusa siamensis* Kutz และ *B. Regia* Thoms. อยู่ในวงศ์ Gramineae มีชื่อ พื้นเมืองคือ ตีโย ไผ่รวก ไผ่รวก รวก (ภาคกลาง) ว่าบอบอ แวเป้ง (กะเหรี่ยง แม่ฮ่องสอน) แวบ้าง (กะเหรี่ยง เชียงใหม่) สะลอม (ชาน แม่ฮ่องสอน) ฮวก (ภาคเหนือ) (ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน, มมป.)

การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติอยู่บริเวณประเทศพม่าเขตติดต่อกับประเทศไทย ฉะนั้นจึง พบมากอยู่ทั้งภาคกลางและภาคเหนือ มีน้อยในภาคใต้ ในภาคตะวันตกแถบจังหวัดกาญจนบุรีก็มี มากเช่นกัน ไผ่รวกเป็นไม้ที่มีความสวยงามในตัวของมันเอง ขึ้นเป็นกอชิดทึบแน่น พุ่มเตี้ย ส่วน ใหญ่ลำต้นเล็ก ลำสูงราว 2-7 เมตร ลำตรงจะมีกิ่งเรียวยาวเล็กๆ ตอนปลาย ลำมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.5 เซนติเมตร แต่ถ้าพื้นดินอุดมสมบูรณ์ดีขนาดจะค่อนข้างใหญ่ ข้อค่อนข้างเรียบ มีวงได้ข้อสีขาว ปล้องมีความยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร ใบเล็กยาวเรียวยาว หน้าใบมีขนเล็กๆ กาบหุ้มลำบางแบบ ชิดกับลำไม้ หลุดร่วงเมื่อแก่ ดอกคล้ายรวงข้าว หน่อขนาดเล็ก แตกหน่อในเดือนสิงหาคมถึงเดือน กันยายน (สุทัศน์, 2544)

ลักษณะโดยทั่วไปของไผ่รวกคือมี กาบหุ้มลำ ยาวประมาณ 22-28 เซนติเมตร กว้าง ประมาณ 11-20 เซนติเมตร กาบมักจะติดต้นอยู่นาน สีมักจะเป็นสีฟาง บาง อ่อน ด้านหลังจะปก คลุมด้วยขนอ่อนสีขาว มีร่องเป็นแนวเล็กๆ สอบน้อยๆ ขึ้นไปหาปลาย ซึ่งเป็นรูปที่ตัดเป็นลูกคลื่น ครีบกาบมีรูปสามเหลี่ยมอาจจะเห็นไม่ชัดก็ได้ หรือเล็กมาก กระจังกาบมีเล็กน้อยและหยาบ

สมำเสมอ มีขนละเอียดเล็กน้อย ใบยอดกาวยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร เป็นรูปสามเหลี่ยมมุมแหลม ยาวและแคบ ขอบงอโค้งเข้า ในส่วนของใบ รูปใบเป็น Linear-lanceolate ปลายใบเรียวแหลม โคนใบป้านหรือเกือบกลม ยาว 7-22 เซนติเมตร กว้าง 0.5-1.5 เซนติเมตร ท้องใบมีขน เส้นกลางใบข้างบนแบน เส้นลายใบ 4-6 เส้น ขอบใบสากและคม ก้านใบสั้น 0.5 เซนติเมตร ครัวใบเล็ก ขอบใบมีหนามเล็ก ๆ สองสามอัน กาบใบแคบไม่มีขน นอกจากตามขอบ ๆ อาจจะมีขนอ่อนส่วนที่สามารถนำมารับประทานได้คือ หน่อ เมื่อต้มหลายครั้งหรือต้มใส่ใบย่านางด้วย จะทำให้หน่อไม้ไผ่รวก มีรสชาติดีขึ้นและเป็นที่นิยม นอกจากนั้นเมื่อปอกทำความสะอาดหน่อแล้ว ต้มอัดใส่ปิ๊บไม่ให้อากาศเข้าสามารถเก็บเอาไว้ขายได้นอกฤดูปลูก ทำให้มีการทำ “หน่อไม้ปิ๊บ” ออกจำหน่าย ปีละหลายร้อยล้านบาท จากป่าต่าง ๆ ทั่วประเทศ (ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน, มมป.)

ไผ่รวกใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้ในการตกแต่งบริเวณบ้านหรือสวน ทำรั้ว เป็นวัสดุในการก่อสร้าง การประมง ทำเยื่อกระดาษ หน่อรับประทานได้ ประโยชน์ที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ปลูกเป็นแนวบังลมหรือกำแพงพืชสวนต่าง ๆ เพราะการขยายพันธุ์ไผ่รวกเป็นไปได้ง่าย ทนแล้งได้ดี จึงสามารถปลูกได้ทั่วทุกพื้นที่ของประเทศ (สุทัศน์, 2544)

การผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง

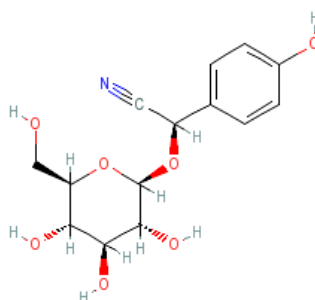
ขั้นตอนการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงเริ่มจากการนำหน่อไม้รวกมาล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดเศษดินที่ติดมากับหน่อไม้ ออกไปจากนั้นปอกเปลือกที่หุ้มหน่อไม้ ออก และล้างทำความสะอาดอีกครั้ง นำหน่อไม้บรรจุในถุงพลาสติกใสโดยมีน้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัมรัดปากถุงให้แน่นด้วยหนังยาง จากนั้นนำถุงพลาสติกใส่มาซ้อนทับอีกชั้นหนึ่งและรัดด้วยหนังยาง นำไปต้มในน้ำที่ต้มจนเดือดแล้วประมาณ 15 นาที ซึ่งจะยังมีความขมเหลืออยู่ นำออกมาวางไว้ให้มีอุณหภูมิที่เย็นลงแล้วรัดด้วยเชือกพลาสติก ชาวบ้านจะแขวนหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงนี้ไว้ภายในห้องครัวที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานานประมาณ 1 ปี เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงนั้นยังไม่สามารถกำจัดความขมในหน่อไม้ได้หมด ฉะนั้นก่อนที่จะนำมารับประทานจะต้องนำหน่อไม้ไปต้มก่อนที่จะบริโภค เพื่อกำจัดความขมให้หมดไป

การผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงนี้เป็นการถนอมอาหารรูปแบบหนึ่งที่สามารถเก็บหน่อไม้ไว้รับประทานได้ตลอดทั้งปี โดยการเสื่อมเสียของหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงนี้สามารถสังเกตได้ง่ายจากน้ำที่อยู่ภายในถุงหากน้ำขุ่นแสดงว่าเกิดการเสื่อมเสียของหน่อไม้และจะทิ้งหน่อไม้ถุงนั้นไปซึ่งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้าน เพื่อที่จะได้รับความปลอดภัยจากการบริโภคอาหาร



ภาพที่ 1 หน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงที่จำหน่ายในจังหวัดกาญจนบุรี

Taxiphyllin



ภาพที่ 2 โครงสร้างของ Taxiphyllin

ที่มา: Look for chemical (2008)

Taxiphyllin หรือ (R)-p-Hydroxymandelonitrile-D-glucopyranoside ($C_{14}H_{17}NO_7$) (Look for chemical, 2008) เป็นสารที่พบในหน่อไม้จัดเป็นประกอบพวก cyanogenic glycosides (Food Standards Australia New Zealand, 2003) ซึ่งพบในพืชชั้นสูงมากกว่า 2000 สปีชีส์ แบ่งออกเป็น 110 แฟมมิลี ซึ่งสารนี้จะมีคามเสถียรเมื่อค่าความเป็นกรดต่างนั้นเป็นกลางและจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยกรดที่อุณหภูมิสูงขึ้น และ cyanogenic glycosides จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen cyanide (HCN) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อคนและสัตว์ เมื่อเนื้อเยื่อของพืชถูกทำลาย (เช่น การหั่น การ

บด หรือการทุบ) เอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์พืชคือ β -glucosidase จะถูกปล่อยออกมาและจับกับ glycoside (Speijers, 2007) ซึ่งสาร Taxiphyllin นั้นจะถูกไฮโดรไลซ์เป็น glucose และ hydroxybenzaldehyde cyanohydrinlyase ซึ่งต่อมา hydroxybenzaldehyde cyanohydrin จะถูกแตกตัวโดยเอนไซม์ hydroxynitrile เปลี่ยนเป็น hydroxybenzaldehyde และ hydrogen cyanide (HCN) (Food Standards Australia New Zealand, 2003)

Taxiphyllin ที่พบในหน่อไม้ซึ่งจะเป็นพิษต่อคนเมื่อทำการรับประทานหน่อไม้สด เนื่องจาก HCN จะจับกับอะตอมของเหล็กที่มีในเอนไซม์ cytochrome oxidase ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ทำให้ฤทธิ์ของเอนไซม์หมดไป ซึ่งเอนไซม์นี้มีความสำคัญมากต่อกระบวนการหายใจจึงเป็นสาเหตุให้การใช้ออกซิเจนในเนื้อเยื่อลดลง ไซยาไนด์จะทำให้ระดับของกลูโคสและกรดแลคติกในเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ระบบหายใจล้มเหลวและอาจเสียชีวิตได้ (Food Standards Australia New Zealand, 2003) ปริมาณของ HCN ในลำต้นอ่อนของไผ่มีประมาณ 300 mg./100 g. ส่วนที่ปลายยอดของหน่อไม้มีสูงถึง 800 mg./100 g. โดยที่ปริมาณต่ำที่สุดที่สามารถทำให้ตายได้อยู่ในช่วง 0.5-3.5 mg./kg. ของน้ำหนักร่างกาย อาการของคนที่ได้รับ HCN ในปริมาณที่ทำให้ตายได้คือ เกิดอาการชา ปวดหัว มึนงง ผิวหนังเป็นสีเขียวเนื่องจากการขาดออกซิเจน ชัก และหมดสติ ซึ่ง HCN นั้นจะลดลงเมื่อผ่านการปรุงสุกหรือการให้ความร้อน โดยที่สาร glycoside ที่มีในหน่อไม้นั้นจะถูกทำลายด้วยความร้อนได้ง่ายและจะสลายไประหว่างการต้ม (Deshpande, 2002) โดยที่สภาวะที่เหมาะสมในการลดปริมาณ HCN คือ 98-102 องศาเซลเซียสนาน 148-180 นาที ดังนั้นกระบวนการปรุงอาหารนั้นเพียงพอต่อการทำลายพิษของหน่อไม้ ซึ่งทำให้ผู้บริโภคนั้นปลอดภัยในการบริโภค (Food Standards Australia New Zealand, 2003)

คุณค่าทางโภชนาการของหน่อไม้รวกต้ม

ตารางที่ 1 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของหน่อไม้รวกต้ม

ส่วนประกอบ	จำนวนต่อ 100 กรัมของส่วนที่กินได้
จำนวนแคลอรี	24.0 แคลอรี
ความชื้น	93.2 กรัม
โปรตีน	2.5 กรัม
ไขมัน	0.4 กรัม
คาร์โบไฮเดรต	2.5 กรัม
ไฟเบอร์	0.8 กรัม
แคลเซียม	12.0 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	40.0 มิลลิกรัม
วิตามินบี 1	0.01 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2	0.08 มิลลิกรัม

ที่มา: กองโภชนาการ กรมอนามัย (2530)

เกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนหน่อไม้ต้ม

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้มีขอบข่ายครอบคลุมหน่อไม้ต้มที่บรรจุในภาชนะที่ไม่ใช่ปี๊บ โดยกำหนดความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ดังนี้ หน่อไม้ต้มหมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำหน่อไม้ชนิดต่างๆ ที่บริโภคได้ เช่น ฝ่ตง ฝ่รวก ฝ่ซาง ฝ่ไร่ มาปอกเปลือกอาจหั่นเป็นชิ้นตามต้องการ ต้มให้สุก และน้ำหนักเนื้อ (drained weight) หมายถึง น้ำหนักเนื้อของหน่อไม้ต้มในภาชนะบรรจุที่ไม่รวมส่วนที่เป็นน้ำ

คุณลักษณะที่ต้องการ ประกอบด้วย

1. ลักษณะทั่วไปต้องไม่เป็นเสี้ยน มีลักษณะที่ดีตามธรรมชาติของหน่อไม้ต้ม อาจมีขึ้นที่มีตำหนิจากการตัดแต่งบ้างเล็กน้อย กรณีมีน้ำบรรจุด้วย น้ำต้องไม่ขุ่น
2. สี ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของหน่อไม้ต้ม ไม่คล้ำ

3. กลิ่น รส ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของหน่อไม้ต้ม ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นเน่า รสขื่น
4. ลักษณะเนื้อสัมผัส ต้องไม่เละหรือเปื่อยยุ่ย
5. สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์
6. วัตถุเจือปนอาหาร ห้ามใช้สีสังเคราะห์ทุกชนิด และถ้าหากมีการใช้วัตถุกันเสียให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด
7. ความเป็นกรด-ด่างต้องน้อยกว่า 4.6
8. มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ไม่เกิน 1×10^4 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ไม่พบ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่าง 1 กรัม มี *Escherichia coli* โดยวิธีเอ็มพีเอ็นต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม และมียีสต์และราไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

ตารางที่ 2 แสดงเกณฑ์ตัดสินคุณภาพตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนหน่อไม้ต้ม

คุณลักษณะ	เกณฑ์	ระดับการตัดสิน (คะแนน)			
		ดีมาก	ดี	พอใช้	ต้องปรับปรุง
ลักษณะทั่วไป	มีลักษณะที่ดีตามธรรมชาติของหน่อไม้ต้ม	4	3	2	1
	อาจมีชิ้นที่มีตำหนิจากการตัดแต่งบ้างเล็กน้อย กรณีมีน้ำบรรจุด้วย น้ำต้องไม่ขุ่น				
สี	ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของหน่อไม้ต้ม ไม่คล้ำ	4	3	2	1
กลิ่น รส	ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของหน่อไม้ต้ม ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นเน่า รสขื่น	4	3	2	1
ลักษณะเนื้อสัมผัส	ต้องไม่เละหรือเปื่อยยุ่ย	4	3	2	1

ที่มา: มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (2549)

การผลิตหน่อไม้ป๊อบปรับกรดตามคำแนะนำของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ผลิตภัณฑ์หน่อไม้ป๊อบนั้นเป็นการถนอมอาหารที่มีอายุการเก็บรักษาได้นาน ซึ่งผู้ผลิตส่วนใหญ่มักเป็นกลุ่มแม่บ้านและผู้ประกอบการขนาดเล็กที่ยังขาดความรู้และอุปกรณ์ที่จำเป็นในการฆ่าเชื้ออย่างถูกวิธี ซึ่งบางครั้งอาจทำให้หน่อไม้ป๊อบนั้นปนเปื้อนสารพิษของเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ เช่นเดียวกับเหตุการณ์เมื่อวันที่ 16 มีนาคม 2549 ที่อำเภอบ้านหลวง จังหวัดน่าน พบผู้ป่วยจากโรคโบทูลิซึมประมาณ 200 ราย และเสียชีวิต 2 รายเนื่องจากการบริโภคหน่อไม้ป๊อบที่ปนเปื้อนสารพิษของเชื้อ *Clostridium botulinum* เข้าไป ด้วยเหตุนี้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาร่วมกับสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล จึงได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับการปรับกรดหน่อไม้ป๊อบที่ปลอดภัย ดังนี้

นำหน่อไม้สดมาทำความสะอาดและแกะเปลือก นำไปล้างในน้ำสะอาดแล้วนำหน่อไม้ที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดจนสุก จากนั้นนำมาบรรจุลงในปี๊บประมาณร้อยละ 60 ของน้ำหนักที่บรรจุได้ หรือประมาณ 12 กิโลกรัมในปี๊บขนาดบรรจุ 20 กิโลกรัม ซึ่งปี๊บที่ใช้ต้องเป็นปี๊บใหม่และต้องทนต่อกรดที่มีค่า pH น้อยกว่า 4.5 ได้ ส่วนน้ำที่ใช้บรรจุร่วมกับหน่อไม้ในปี๊บต้องปรับให้เป็นกรดโดยใช้กรดซิตริก ในปริมาณร้อยละ 0.65 ของน้ำหนักน้ำที่ใช้เตรียม นำน้ำที่ผสมกรดแล้วเทลงในปี๊บที่บรรจุหน่อไม้แล้ว และนำปี๊บไปต้มในหม้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตรที่มีน้ำเปล่าอยู่ประมาณสามส่วนสี่ของหม้อ ปิดฝาหม้อและรองอน้ำในหม้อเดือด จับเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง เพื่อให้หน่อไม้ที่อยู่ด้านบนสุดของปี๊บมีอุณหภูมิอย่างน้อย 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการปิดฝาปี๊บโดยใช้อุปกรณ์เฉพาะที่ไม่ใช่ตะกั่ว แล้วจึงนำปี๊บไปทำให้เย็นในน้ำสะอาด (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขและสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, ม.ป.ป.)

Bacillus cereus

Bacillus cereus ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1949 โดย Hauge ได้ทำการแยกเชื้อนี้จากชอสวานิลลาซึ่งได้เตรียมขึ้นนานเป็นวันและเก็บในอุณหภูมิห้องก่อนนำมารับประทาน พบว่ามีการระบาดของโรคท้องร่วงในโรงพยาบาลเมืองออสโล ประเทศนอร์เวย์ ต่อมา Hauge ได้ทำการทดลองด้วยตนเองโดยการแยกเชื้อ *Bacillus cereus* และเพาะเชื้อจนมีความเข้มข้น 4×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและดื่มสารละลายนั้นลงไป 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 13 ชั่วโมงเขามีอาการปวดท้องและถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ และอาการเหล่านี้คงอยู่ประมาณ 8 ชั่วโมงซึ่งอาการเหล่านี้เป็นผลมาจากเชื้อ

Bacillus cereus ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับว่าเชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีลักษณะอาการ 2 ชนิดคือ diarrheal syndrome เป็นชนิดที่ก่ออาการช้า ทำให้เกิดการถ่ายท้อง และ emetic syndrome เป็นชนิดที่ก่ออาการเร็วและทำให้เกิดการอาเจียน (Granum *et al.*, 2000)

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ในช่วง 28-35 องศาเซลเซียสนั้นเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ ในช่วง pH 4.9-9.3 และค่า Water activity ต่ำที่สุดคือ 0.95 สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ จึงสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ (Rajkowski and Bennett, 2003)

แหล่งที่พบเชื้อ

สามารถพบเชื้อ *Bacillus cereus* ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนโดสปอร์จึงทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ ซึ่งแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากดิน อากาศและน้ำ รวมไปถึงวัตถุดิบมาจากสัตว์และพืช (Griffiths and Schraft, 2002)

ในส่วนของการปนเปื้อนในอาหารมักพบในนมและผลิตภัณฑ์นม เนื้อและผลิตภัณฑ์ ข้าว ผักพร้อมบริโภคและเครื่องเทศ แต่ปริมาณที่จะทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษนั้นจะต้องได้รับปริมาณของเชื้อ *Bacillus cereus* ในปริมาณที่มากพอสมควร จากการสำรวจการพบเชื้อ *Bacillus cereus* ในผลิตภัณฑ์อาหารดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การสำรวจผลิตภัณฑ์อาหารที่ตรวจพบเชื้อ *Bacillus cereus*

ผลิตภัณฑ์อาหาร	เปอร์เซ็นต์ที่ตรวจพบ	ประเทศที่พบ
ข้าวและผลิตภัณฑ์ข้าว	28.5	อินเดีย
ข้าวต้ม	100	อินเดีย
ผลิตภัณฑ์นม	100	อินเดีย
ผลิตภัณฑ์เนื้อและไก่	80	อินเดีย
เนื้อควาย	35	อินเดีย
อาหารเหลวพร้อมบริโภค	83	สหราชอาณาจักร
นมผงสำหรับทารก	75	สหราชอาณาจักร
นมผงไร้ไขมัน	100	สหราชอาณาจักร
นมผงที่สกัดเอาไขมันออก	10.3	ญี่ปุ่น
ชีสเหลว	69	เวเนซุเอลา
ตัวอย่างเมล็ดพืช	67.3	สหราชอาณาจักร
ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก	6.9	อังกฤษ
ตัวอย่างอาหารหลากหลายชนิด	14.7 (เซลล์)	
จากตลาดสดของสเปน	82.4 (สปอร์)	สเปน
ตัวอย่างเทมเป้	16	เนเธอร์แลนด์
เนื้อดิบ	7.9	ญี่ปุ่น
เนื้อหมู	4.4	ญี่ปุ่น
เนื้อไก่	7.2	ญี่ปุ่น
แฮม	3.8	ญี่ปุ่น
ไส้กรอก	14.9	ญี่ปุ่น

ที่มา: Rajkowski and Smith (2001)

การก่อโรคและการระบาด

การก่อโรคของเชื้อชนิดนี้เกิดจากสารพิษซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ซึ่งเชื่อจะสร้างขึ้นในช่วงปลายของ stationary phase (บุษบา, 2540) เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษซึ่งเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คืออาการท้องร่วง (Diarrheal syndrome) และ อาการอาเจียน (Emetic syndrome) ดังตารางที่ 4

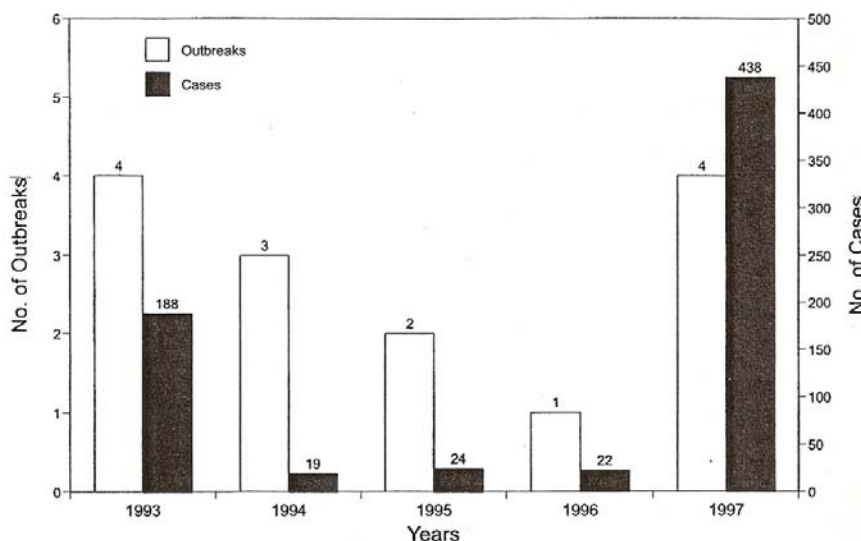
ตารางที่ 4 ลักษณะของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus cereus*

ลักษณะ	Diarrheal syndrome	Emetic syndrome
ปริมาณของเชื้อ	$10^5 - 10^7$ (total)	$10^5 - 10^8$ (cells per g.)
บริเวณที่ผลิตสารพิษ	สร้างในลำไส้เล็กของโฮสต์	สร้างในอาหาร
ประเภทของสารพิษ	Protein; Enterotoxin	Cyclic peptide; emetic toxin
ระยะฟักตัว	8 - 16 ชั่วโมง (บางครั้งมากกว่า 24 ชั่วโมง)	0.5 - 5 ชั่วโมง
ระยะเวลาการเจ็บป่วย	12 - 24 ชั่วโมง (บางครั้งนานหลายวัน)	6 - 24 ชั่วโมง
อาการของโรค	ปวดท้อง ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ	คลื่นไส้ อาเจียน
อาหารที่เป็นสาเหตุ	ผลิตภัณฑ์เนื้อ ชุป พุดดิ้ง นม และผลิตภัณฑ์นม ผักและซอส	ข้าว ข้าวผัด พาสต้า ถั่วเขียว

ที่มา: Granum (1994); Kramer and Gilbert (1989); Shinagawa (1993)

จะเห็นได้ว่าอาการของโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Bacillus cereus* นั้นเป็นอาการที่ไม่รุนแรงและสามารถหายเองได้ จึงทำให้ไม่มีรายงานการเจ็บป่วยเนื่องจากเชื้อ *Bacillus cereus* มากนัก และช่วงปี ค.ศ. 1983-1992 ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบการเจ็บป่วยเนื่องจากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้งหมด 83,510 ราย สาเหตุจากเชื้อ *Bacillus cereus* ทั้งหมด 694 ราย การรับประทานอาหารจีนและข้าวผัดนั้นเป็นสาเหตุของการระบาดของเชื้อ *Bacillus cereus* ในประเทศสหรัฐอเมริกาคิดเป็น 45.9 % ของการระบาดเนื่องจากเชื้อดังกล่าวทั้งหมดและการระบาดของเชื้อชนิดนี้จะมากที่สุดประมาณ 67.6 % ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม ซึ่งจะพบในร้านอาหาร ร้านขายอาหารสำเร็จรูปและภัตตาคารประมาณ 43.2 % และพบการระบาดในบ้าน

21.6% ซึ่งโดยส่วนมากการระบาดนั้นเกิดจากการใช้อุณหภูมิในการปรุงอาหารไม่เหมาะสม (Rajkowski and Smith, 2001) และในช่วงปี 1993-1997 การระบาดของเชื้อ *B.cereus* ในประเทศสหรัฐอเมริกาแสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การระบาดของเชื้อ *Bacillus cereus* ในประเทศสหรัฐอเมริกา ระหว่างปี ค.ศ. 1993-1997

ที่มา: Rajkowski and Bennett (2003)

ในประเทศไทย ปี 2547 พบการระบาดของเชื้อ *Bacillus cereus* จากการบริโภคนมพาสเจอร์ไรส์ของนักเรียนโรงเรียนประถมศึกษาในจังหวัดนครปฐม 2 แห่ง ในวันที่ 18 พฤศจิกายน 2547 โรงเรียนแห่งแรกคือโรงเรียนวัดหัวเอน มีผู้ป่วยจำนวน 16 รายซึ่งมีอาการปวดท้อง ถ่ายเหลว คลื่นไส้ อาเจียน และโรงเรียนวัดโพรงมะเดื่อมีผู้ป่วยทั้งสิ้น 24 รายมีอาการเช่นเดียวกับผู้ป่วยจากโรงเรียนวัดหัวเอน ซึ่งเมื่อทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระโดยทำ Rectal swab เก็บตัวอย่างถุงนมที่เหลือหลังการดื่ม นมสดพาสเจอร์ไรส์ที่ยังไม่เปิดถุงน้ำแข็งที่ใช้แช่ถุงนม และทำการ swab ตู้เย็น ผลตรวจจากห้องปฏิบัติการโรงพยาบาลนครปฐมพบว่า พบเชื้อ *Bacillus cereus* ในตัวอย่างน้ำแข็งที่ใช้แช่นมและถุงนม ซึ่งจากการสอบสวนพบว่า ในช่วงบ่ายของทุกวันผู้ประกอบการจะขนส่งนมสดพาสเจอร์ไรส์บรรจุถุงพลาสติกขนาด 200 มิลลิลิตร ไปส่งที่โรงเรียนก่อนรับประทาน 1 วัน จากนั้นโรงเรียนได้จัดเก็บนมทั้งหมดในตู้เย็น เช้าวันรุ่งขึ้นจึงแจกให้นักเรียนดื่ม ซึ่งสภาพตู้เย็นที่ใช้ในการจัดเก็บนมที่มีความเย็นไม่เพียงพอ อาจทำให้นมเน่าเสียเป็นเหตุให้เกิดอาการป่วยดังกล่าวได้ (กลุ่มระบาดวิทยา สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1, 2547)

ในปี ค.ศ. 2006 Iurlina และคณะได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อ *Bacillus* spp. ในตัวอย่างอาหารที่จำหน่ายในประเทศอาร์เจนตินาทั้งหมด 279 ตัวอย่าง พบเชื้อ *Bacillus cereus* 23% ในผลิตภัณฑ์น้ำผึ้งทั้งหมด 70 ตัวอย่าง ส่วนในผลิตภัณฑ์ Port sault Argentino Cheeses ทั้งหมด 30 ตัวอย่างพบเชื้อ *Bacillus cereus* 50% แต่ไม่พบเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์แป้ง (rye flours และ wheat flours) Quartirolo Argentino cheeses ปลาแอนโชวีสด และในเครื่องเทศ (Iurlina *et al.*, 2006)

Valero *et al.* (2002) ได้สำรวจและแยกเชื้อ *Bacillus cereus* จากผักสดและอาหารแช่เย็นที่ผ่านกระบวนการน้อยที่มีส่วนประกอบของผัก พบว่าในผักสดโดยในพริกไทย พบ *Bacillus cereus* 11 ตัวอย่างจากทั้งหมด 11 ตัวอย่าง, ในแตงร้านพบ 3 ตัวอย่างจากทั้งหมด 9 ตัวอย่าง, ในมะเขือเทศพบ 9 ตัวอย่างจากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง, ในหัวหอมใหญ่พบ 1 ตัวอย่างจากทั้งหมด 7 ตัวอย่าง, ในแคโรทพบ 3 ตัวอย่างจากทั้งหมด 7 ตัวอย่างและในแตงกวาพบ 2 ตัวอย่างจากทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ทั้งนี้เมื่อนำสปอร์ของ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากผักดังกล่าวมาหาค่าการทนความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส พบว่าสปอร์ของ *Bacillus cereus* ที่พบใน พริกไทย, แตงร้าน, มะเขือเทศ, หัวหอมใหญ่ และแตงกวามีค่า D_{90} เท่ากับ 4.4-21.2 นาที, 4.3-5.4 นาที, 1.5-2.3 นาที, 6.6 นาที และ 3.5 นาที ตามลำดับ และเมื่อทำการสำรวจหาเชื้อ *Bacillus cereus* ในอาหารแช่เย็นที่ผ่านกระบวนการน้อยที่มีส่วนประกอบของผักคือ gazpacho พบ *Bacillus cereus* 2 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่าง, salmorejo พบ *Bacillus cereus* 4 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่าง และ ajablanco พบ *Bacillus cereus* 1 ตัวอย่างจาก 4 ตัวอย่าง ซึ่งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ที่พบใน gazpacho, salmorejo และ ajablanco มีค่า D_{90} เท่ากับ 1.4-5.5 นาที, 2.8-6.4 นาที และ 5.1 นาที ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากผักชนิดต่างๆ ซึ่งมีค่าการทนความร้อนต่างกัน (Valero *et al.*, 2002)

การป้องกัน

การป้องกันการปนเปื้อนของอาหารจากเชื้อนี้ทำได้โดยการป้องกันการงอกของสปอร์และลดการเจริญของเซลล์ให้มีจำนวนน้อยที่สุด ซึ่งการปรุงอาหารนั้นต้องมีอุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส การทำให้เย็นต้องอย่างรวดเร็วและให้มีอุณหภูมिन้อยกว่า 7 องศาเซลเซียส และอุ่นบริโภคอาหารต้องอุ่นก่อนด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสม (Griffiths and Schraft, 2002)

Clostridium botulinum

ลักษณะทั่วไปของเชื้อ

Clostridium botulinum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ รูปร่างท่อน สามารถสร้างสปอร์ได้โดยสปอร์เป็นรูปไข่ อยู่ปลายหรือค่อนข้างปลายเซลล์ (subterminal spore) เคลื่อนที่ได้โดยแซ่ที่มีอยู่รอบตัว (peritrichous flagella) (Jay *et al.*, 2005) การเจริญของเชื้อ *Clostridium botulinum* สามารถจัดจำแนกกลุ่มตามการสังเคราะห์ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การจัดกลุ่มของ *Clostridium botulinum* ตามชนิดของการสังเคราะห์

Characteristic	Group I	Group II	Group III	Group IV
Neurotoxin type	A,B,F	B,E,F	C,D	G
Proteolytic / Non-proteolytic	Proteolytic	Non-proteolytic	Non-proteolytic	Proteolytic
Minimal Growth temperature (°C)	10	3.3	15	ND
Optimum Growth temperature (°C)	35-40	18-25	40	37
Minimal pH	4.7	5.0	ND	ND
Minimal a _w (% NaCl)	0.94	0.97	ND	ND
D ₁₀₀ of spores(min)	25	<0.1	0.1-0.9	0.8-1.1
D ₁₂₁ of spores(min)	0.1-0.2	<0.001	ND	ND

หมายเหตุ ND= not determinated

ที่มา: Paul (2002)

แหล่งที่พบเชื้อ

สามารถพบเชื้อนี้ได้ทั่วไปในดิน น้ำ ปุ๋ยคอก และตะกอนทะเล พบเชื้อได้ในพื้นดินในส่วนที่มีการระบายน้ำจากแม่น้ำและในที่ที่มีการเคลื่อนที่ของน้ำน้อย เช่น ทะเลสาบดิคและชายฝั่งของประเทศสแกนดิเนเวียและบางพื้นที่ของ Great Lakes ในอเมริกาเหนือ (Paul, 2002)

การจัดจำแนกประเภทของเชื้อ

การจัดจำแนกตามการสร้างสารพิษโดยอาศัยเทคนิคทางซีโรวิทยาแบ่งได้ 8 ชนิดคือ A, B, C1, C2, D, E, F และ G ซึ่งสารพิษนี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1. ประเภทที่ย่อยโปรตีน (Proteolytic type) เป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยเคซีน ให้ก๊าซไข่เน่า
2. ประเภทที่ไม่ย่อยโปรตีน (Non-proteolytic type) เป็นสายพันธุ์ที่ใช้น้ำตาลแมนโนสในการหมัก (Jay *et al.*, 2005)

การระบาดของโรค

จากการสรุปรายงานเฝ้าระวังโรคประจำปี 2549 ของกระทรวงสาธารณสุขพบการระบาดของโรคอาหารพิษจากการรับประทานหน่อไม้ดองดิบ ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Clostridium botulinum* มีผู้ป่วยจำนวน 148 ราย ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่มีผู้ป่วยมากที่สุดเท่าที่เคยมีรายงานในประเทศไทย รวมถึงมีผู้ป่วยหนักที่ต้องใช้ท่อช่วยหายใจกว่า 40 ราย นอกจากนั้น ยังเป็นครั้งแรกที่มีการนำ botulinum toxin มาใช้ในประเทศไทย ซึ่งจากสถิติของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อ *Clostridium botulinum* ในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2539-2549 ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 จำนวนผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Clostridium botulinum* ในระหว่างปี พ.ศ. 2539-2549

ปี พ.ศ.	จำนวนผู้ป่วย
2549	148
2548	0
2547	27
2546	30
2545	0
2544	17
2543	3
2542	1
2541	128
2540	46
2539	66

ที่มา: ระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข (2549)

Ozlem *et al.* (2006) ได้ตรวจหาสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ขายในตลาด Ankara ประเทศตุรกีพบสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* ในตัวอย่างน้ำผึ้ง 6 ตัวอย่างจากทั้งหมด 48 ตัวอย่าง

Maria *et al.* (2008) ได้สำรวจพบสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* 7.5% จากตัวอย่างทั้งสิ้น 200 ตัวอย่างในผลิตภัณฑ์ชา Chamomile ในประเทศอาร์เจนตินา และจากการจัดจำแนกพบว่าพบสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* ชนิด A 53.3%, ชนิด B 6.7% และชนิด F 13.3% ซึ่งเป็นตัวอย่างชาที่ไม่มีการบรรจุในถุงปิดสนิท มีความเสี่ยงในการก่อโรค Infant botulism

อาการของโรค

โรค Botulism ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิษที่เชื้อชนิดนี้สร้างขึ้นนั่นคือ Botulinum toxin ที่เชื้อขับออกมาปะปนกับอาหารโดยผู้ป่วยจะได้รับสารพิษจะมีอาการหลังจากรับประทานอาหารประมาณ 12-72 ชั่วโมง สารพิษจะส่งผลต่อระบบประสาท (Neurotoxin) ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ มึนงง ผิวหนัง

ปาก และคอแห้ง ไม่มีไข้ มองเห็นภาพซ้อน หายใจติดขัดและหากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องวิธีและ
ทันเวลาอาจทำให้เสียชีวิตได้

Clostridium sporogenes

ลักษณะทั่วไปและการเจริญเติบโต

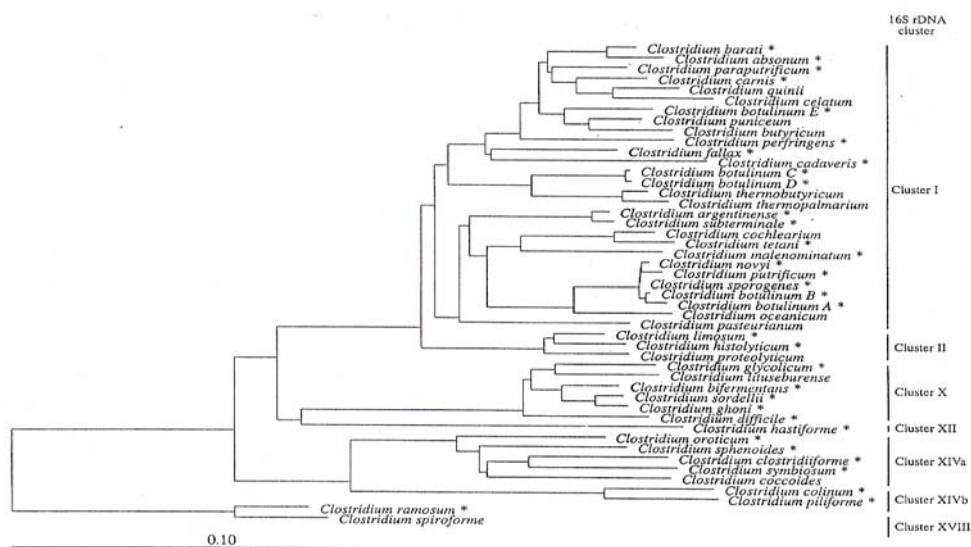
เชื้อ *Clostridium sporogenes* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนตรง มีขนาด
กว้าง 0.3-0.4 μm และยาว 1.4-6.6 μm สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ peritrichous flagella สร้างสปอร์
ได้โดยสปอร์มีรูปร่างไขว่อยู่ก่อนไปทางปลายเซลล์ (Subterminal spore) ลักษณะโคโลนีบนอาหาร
เลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง มีขนาด 2-6 มิลลิเมตร ตรงกลางโคโลนีมีลักษณะนูนสีขาวเหลืองและมีไรซอยด์สี
เทา อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส สามารถพบเชื้อนี้ได้在地
อาหาร และในลำไส้ (Buchanan and Gibbons, 1974)

เนื่องจากสารพิษที่เกิดจากเชื้อ *Clostridium botulinum* นั้นมีอันตรายมากและสามารถสร้าง
สารพิษได้ จึงได้นำเชื้อ *Clostridium sporogenes* มาใช้ในการวิจัยแทนเนื่องจากลักษณะทาง
สรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Clostridium sporogenes* นั้นเหมือนกับสายพันธุ์ Proteolytic *Clostridium*
botulinum ยกเว้นการสร้างสารพิษ จึงทำให้เกิดความปลอดภัยในการทดลอง ดังตารางที่ 7 และภาพ
ที่ 4

ตารางที่ 7 ลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ Proteolytic *Clostridium botulinum* และ *Clostridium sporogenes*

ลักษณะทางชีวเคมี	Proteolytic	
	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>
Gelatin digestion	+	+
Milk digestion	+	+
Lecitinase production	-	-
Lipase production	+	+
Indol production	-	-
Glucose fermentation	+	+
Lactose fermentation	-	-
Maltose fermentation	v	v
Mannitol fermentation	-	-
Mannose fermentation	-	-
Salicin fermentation	-	-
Sucrose fermentation	-	-
Toxin production	+	-

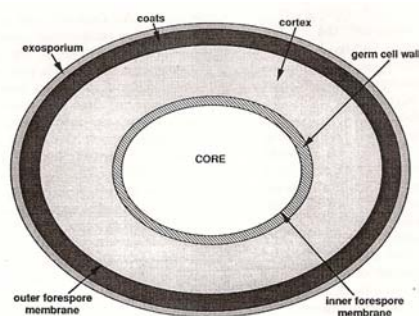
ที่มา: O' Leary (1989)



ภาพที่ 4 Phylogenetic dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของ *Clostridium sporogenes* และ *Clostridium botulinum* type A และ B

ที่มา: Collin et al. (1994)

สปอร์ของแบคทีเรีย



ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของสปอร์

ที่มา: Setlow and Johnson (2007)

สปอร์เป็นโครงสร้างที่สร้างขึ้นเพื่อเข้าสู่ระยะพักสร้างโดยแบคทีเรีย เช่น *Bacillus*, *Clostridium* และ *Sporosarcina* ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จะมีวงจรชีวิต 2 ช่วงคือ เซลล์ปกติและเอนโด

สปอร์ โดยที่เอนโดสปอร์จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทนต่อความร้อนและสารเคมีสูง (Talaro, 2008)

โครงสร้างของสปอร์

โครงสร้างของสปอร์จากชั้นนอกสุดเข้าไปชั้นในสุดประกอบด้วย

1. Exosporium

เป็นชั้นนอกสุดของสปอร์ ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้ขนาดของสปอร์แต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ประกอบด้วยโปรตีนและไขมัน ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอน

2. Spore coat

เป็นชั้นที่เซลล์แม่สร้างขึ้นเพื่อห่อหุ้มสปอร์ ประกอบด้วยโปรตีนที่มีโครงสร้างคล้ายเคราติน (keratin-like protein) ที่มี disulfide group สูง มีบทบาทช่วยปกป้องส่วน cortex จากการทำลายโดย lytic enzyme ในชั้นนี้เป็นด่านแรกที่จะป้องกันสารเคมี เช่น oxidizing agent

3. Outer forespore membrane

เป็นชั้นของโปรตีนที่มีโครงสร้างแตกต่างจากชั้น inner forespore membrane ทำหน้าที่ป้องกันการผ่านเข้าออกของโมเลกุลขนาดเล็ก

4. Cortex

เป็นชั้นของ peptidoglycan ที่มีโครงสร้างต่างจาก peptidoglycan ของเซลล์ปกติ ซึ่งชั้นนอกของ peptidoglycan ของสปอร์ประกอบด้วย diaminopimelic acid แต่ในเซลล์ปกติประกอบด้วยไลซีน

5. Germ cell wall

เป็นส่วนที่มีโครงสร้างเหมือนกับเซลล์ปกติ อยู่ระหว่างชั้นของ cortex และ inner forespore membrane

6. Inner forespore membrane

เป็นเยื่อเลือกผ่านของโมเลกุลที่ขบ่น้ำ ชั้นนี้ประกอบด้วย phospholipid ที่เหมือนกับเซลล์ที่กำลังเจริญ เป็นชั้นที่ล้อมรอบส่วน core เอาไว้ ซึ่งจะรองรับการขยายตัวของ core ในระหว่างการงอก (Germination)

7. Core

เป็นส่วนที่อยู่ตรงกลางชั้นในสุดของสปอร์ ประกอบด้วย DNA ribosome และเอนไซม์หลายชนิด นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งสะสมของ diaminopimelic acid (DPA) และ divalent cation อีกด้วย และมีอินทรีย์ที่จำเพาะในระยะพักของสปอร์รวมถึง Small acid soluble protein (SASP) จำนวนมาก (10-20% ของโปรตีนในสปอร์) SASP นั้นจะจับกับ DNA ช่วยป้องกัน DNA จากการถูกทำลาย Core เป็นส่วนที่มีน้ำน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ (ประมาณ 0.4 กรัมต่อ 1 กรัมของเซลล์แห้ง) จึงทำให้สปอร์ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ (Setlow and Johnson, 2007)

การถนอมอาหารโดยใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนเพื่อถนอมอาหารเป็นวิธีหนึ่งที่จะทำให้อาหารมีคุณภาพบริโภคตามต้องการ โดยมีวัตถุประสงค์หลักในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในอาหาร ความร้อนจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของอาหาร ทำลายองค์ประกอบของอาหารทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง นอกจากนี้ความร้อนยังช่วยทำลายจุลินทรีย์ในอาหาร โดยทำให้โปรตีนในเซลล์เสียสภาพ (denaturation) หรือเกิดการตกตะกอน (coagulation) ของโปรตีน ส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์ตาย จึงสามารถยับยั้งการเน่าเสียของอาหาร และการสร้างสารพิษจากจุลินทรีย์ทำให้ผู้บริโภคได้รับความปลอดภัย

ปัจจัยที่มีผลต่อการทนความร้อนของจุลินทรีย์

1. ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อน

ระยะเวลาและอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กันคือ หากเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น จะทำให้ระยะเวลาในการให้ความร้อนลดลง (ดังตารางที่ 8) ในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจะต้องคำนึงถึงขนาดของภาชนะ หากมีภาชนะมีขนาดใหญ่จะต้องใช้เวลาในการให้ความร้อนนานกว่าภาชนะขนาดเล็ก (Jay *et al.*, 2005)

2. จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น

หากมีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นมากพบว่าจะทนความร้อนได้มากกว่า เนื่องจากมีกลไกการป้องกันความร้อนจากจำนวนจุลินทรีย์ที่มาก ซึ่งจะผลิตหรือหลั่งสารออกมาปกป้องตัวเอง เช่น โปรตีน จากตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่าหากมีจำนวนสปอร์เริ่มต้นมากจะต้องใช้เวลาในการทำลายหรือให้ความร้อนนานกว่าจำนวนสปอร์เริ่มต้นน้อย ดังนั้นจึงควรกำจัดสิ่งสกปรกออกจากวัตถุดิบให้มากที่สุดก่อนนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเพื่อช่วยลดระยะเวลาในการผลิตลง (Jay *et al.*, 2005)

ตารางที่ 8 ผลของอุณหภูมิต่อค่า Thermal Death Time ของสปอร์

Temperature	<i>Clostridium botulinum</i> (60 billion spores suspended in buffer at pH 7)	A Thermophile (150,000 spores per ml of corn juice at pH 6.1)
100 °C	260 minutes	1,140 minutes
105 °C	120	-
110 °C	36	180
115 °C	12	60
120 °C	5	17

ที่มา: Jay *et al.* (2005)

ตารางที่ 9 ผลของจำนวนสปอร์ของ *Clostridium botulinum* ต่อค่า Thermal Death Time ที่ 100 องศาเซลเซียส

จำนวนสปอร์	Thermal Death Time (นาที)
72,000,000,000	240
1,640,000,000	125
32,000,000	110
650,000	85
16,400	50
328	40

ที่มา: ดัดแปลงจาก Carpenter (1967)

3. สถานะการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ก่อนการให้ความร้อน

3.1 ความเป็นกรดค้าง

จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH ต่างกันจะทนความร้อนได้ไม่เท่ากัน เมื่อเลี้ยงใน pH ที่เป็นกลางจะทนความร้อนได้มากกว่าที่เลี้ยงใน pH ที่เป็นกรดหรือด่าง

3.2 อุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

การทนความร้อนของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นหากอุณหภูมิที่ใช้บ่มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับพวกที่สามารถสร้างสปอร์ได้

3.3 อายุของเชื้อจุลินทรีย์

เซลล์ของแบคทีเรียจะทนความร้อนมากที่สุดเมื่ออยู่ในระยะ stationary phase และจะทนความร้อนได้น้อยที่สุดเมื่ออยู่ในระยะ log phase และการทนความร้อนจะสูงขึ้นเมื่อเริ่มระยะ

lag phase แต่จะเริ่มลดลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ log phase นอกจากนี้สปอร์ของแบคทีเรียที่มีอายุมากจะทนความร้อนมากกว่าสปอร์ที่มีอายุน้อย (Jay *et al.*, 2005)

4. องค์ประกอบของอาหารที่จุลินทรีย์อยู่ขณะให้ความร้อน

4.1 น้ำ

การทนความร้อนของเซลล์จุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความชื้นสัมพัทธ์ ความชื้น หรือค่า water activity (a_w) ลดลง ดังตารางที่ 10 พบว่าสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* จะทนความร้อนมากขึ้นเมื่อค่า a_w ลดลง (Jay *et al.*, 2005)

4.2 ความเป็นกรดด่างของอาหาร

จุลินทรีย์จะทนความร้อนได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH ที่เหมาะสม (โดยทั่วไปประมาณ 7) แต่เมื่อลดหรือเพิ่ม pH จะทำให้เชื้อนั้นไวต่อความร้อนมากขึ้น ซึ่งเป็นผลดีต่อกระบวนการให้ความร้อนของอาหารกรดสูง จะทำให้ลดเวลาการให้ความร้อนลงได้ เมื่อ pH ลดลงโดยใช้กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติกหรือ กรดแลคติกจะทำให้ค่าการทนความร้อนนั้นลดลง (Jay *et al.*, 2005) ดังตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่าสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* เมื่อให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส ค่า a_w 1.00 ในอาหารที่มี pH 6.5 มีค่า D เท่ากับ 2.386 นาที แต่เมื่อลด pH ให้ลดลงเป็น 4.5 พบว่าค่า D ลดลงเหลือเพียง 0.511 นาที

ตารางที่ 10 ผลของอุณหภูมิ ค่า a_w และ pH ต่อค่า D-value ของสปอร์เชื้อ *Bacillus cereus*

อุณหภูมิ (°C)	a_w	D (นาที)		
		pH = 6.5	pH = 5.5	pH = 4.5
95	1.00	2.386	1.040	0.511
95	0.95	5.010	2.848	1.409
95	0.86	18.842	14.513	7.776
85	1.00	63.398	13.085	5.042
85	0.86	68.909	91.540	33.910

ที่มา: คัดแปลงจาก Gaillard (1998)

ค่าดี (D-value) หรือ Decimal Reduction Time

ค่า D หรือค่าคงที่อัตราการตาย หมายถึง เวลาเป็นนาทีที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ที่จะทำลายจุลินทรีย์ลง 90 % หรือ 1 log cycle

การหาค่า D ทำได้โดยใส่สปอร์หรือเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ทราบจำนวนลงในภาชนะแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่โดยใช้เวลาต่างกัน นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟความอยู่รอด (Survivor curve) บนกระดาษเซมิล็อกโดยพลอตค่าระหว่าง $\log_{10}$ ของจำนวนเชื้อที่อยู่รอดบนแกนลอگ (แกน Y) และเวลาที่ใช้ในการฆ่าที่อุณหภูมิหนึ่งๆ บนแกนธรรมดา (แกน X) กราฟที่ได้จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (Madigan *et al.*, 2003) สามารถหาค่า D จากสมการดังนี้

$$D = \frac{t}{\text{Log } (N/N_0)}$$

D คือเวลา (นาที)

t คือเวลาที่ใช้ให้ความร้อน (นาที)

N_0 คือปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น

N คือปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป t นาที

ค่าการทนต่อความร้อนของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 11 ซึ่งได้แสดงการทนความร้อนของจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ที่มีความสำคัญในอาหาร

ตารางที่ 11 การทนความร้อนของจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ที่มีความสำคัญในอาหาร

Organism	Approx. D value at temperature (°C)						
	80	85	90	95	100	110	120
Spores of public health significance							
Group I <i>Clostridium botulinum</i> types A and B			50		7-30	1-3	0.1-0.2
Group II <i>C. botulinum</i> type B			0.1-3	0.03-2			
<i>C. botulinum</i> type E					0.01		
<i>Bacillus cereus</i>					3-200	0.03-2.4	
<i>Clostridium perfringens</i>			3-145		0.3-18	2.3-5.2	
Mesophilic aerobes							
<i>Bacillus subtilis</i>					7-70	6.9	0.5
<i>Bacillus licheniformis</i>					13.5	0.5	
<i>Bacillus megaterium</i>					1		
<i>Bacillus thermoacidurans</i>			11-30		2-3		
Thermophilic aerobes							
<i>Bacillus stearothermophilus</i>					100-1600		1-6
<i>Bacillus coagulans</i>					20-300		2-3
Mesophilic anaerobes							
<i>Clostridium butyricum</i>	4-5	0.4-0.8					
<i>Clostridium sporogenes</i>					80-100	21	0.1-1.5
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	13						
Thermophilic anaerobes							
<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>					400		3-4

ที่มา: คัดแปลงจาก Setlow and Johnson (2007)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หน่อไม้รวกดิบ
2. ไม้บรรทัด
3. มีด
4. เขียง
5. ขากรรไกร
6. ถังพลาสติกใสทนร้อนขนาด 5x8 นิ้ว
7. ตะแกรงอะลูมิเนียม
8. นาฬิกาจับเวลา
9. อ่างน้ำแข็ง
10. จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
11. หลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
12. แ่งแก้ว
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) บริษัท Buchi รุ่น B-490
14. เครื่องตีปั่นอาหาร (Stomacher) บริษัท Seward
15. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง บริษัท Sartorius
16. เครื่อง pH meter บริษัท Orion รุ่น 210A
17. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase Contrast บริษัท Nikon
18. เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ บริษัท Sorvall® RC 26 Plus
19. เทอร์โมมิเตอร์แบบก้านเสียบ
20. Anaerobic Jar บริษัท Lock&Lock
21. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บริษัท Gallenkamp
22. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert
23. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert
24. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) ช่วง 10-100 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf
25. ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette) ช่วง 100-1000 ไมโครลิตร บริษัท Bohit
26. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Toshiba GA-A1701

27. เครื่องวัดสี HunterLab ยี่ห้อ MiniScan® XE plus

เชื้อจุลินทรีย์

1. เชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 11778
2. เชื้อ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid Thiglycollate Broth ของบริษัท Merck
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Reinforced Clostridial Agar ของบริษัท Merck
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar ของบริษัท Merck
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Dextrose Tryptone Broth
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ Orange serum broth
8. สารละลายกรดซิตริก
9. น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ
10. สารละลาย 0.85% Normal saline 225 มิลลิลิตร
11. สารละลาย 0.85% Normal saline 9 มิลลิลิตร
12. วุ้น 3 %

วิธีการ

1. การคัดเลือกหน่อไม้รวกตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

นำหน่อไม้รวกมาปอกเปลือกและล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาด จากนั้นทำการคัดเลือกหน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.9 – 3.5 เซนติเมตร จัดเป็นหน่อไม้รวกที่มีขนาดใหญ่และคัดเลือกหน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.8 – 2.4 เซนติเมตร จัดเป็นหน่อไม้รวกที่มีขนาดเล็ก ตัดท่อนหน่อไม้แต่ละท่อนให้มีความยาว 6 เซนติเมตรเท่าๆ กัน

2. การศึกษาระยะเวลาในการต้มเพื่อให้ได้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางของหน่อไม้ตามที่ต้องการ (Come-up time)

นำหน่อไม้ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กและใหญ่ที่เตรียมในข้อ 1. มาเสียบด้วยเทอร์โมมิเตอร์แบบก้านเสียบโดยเสียบที่จุดกึ่งกลางของหน่อไม้ให้ก้านของเทอร์โมมิเตอร์เข้าไปในหน่อไม้ 3 เซนติเมตร จากนั้นรัดปากถุงพลาสติกด้วยหนังยางแล้วซ่อนทับด้วยถุงพลาสติกอีกชั้น และรัดปากถุงด้วยหนังยางอีกที นำหน่อไม้มาต้มให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิโดยให้มีอุณหภูมิของน้ำ 95 และ 100 องศาเซลเซียส อ่านอุณหภูมิที่หน้าปัดของเทอร์โมมิเตอร์และจดบันทึกเมื่อเวลาผ่านไปทุกๆ 2 นาที ทำไปจนกระทั่งอุณหภูมิของจุดกึ่งกลางหน่อไม้ถึง 90 และ 95 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นำค่าที่ได้มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การประยุกต์การปรับกรดหน่อไม้ตามคำแนะนำของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.)

นำหน่อไม้รวกดิบมาปอกเปลือกและล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาดนำมาคั้นน้ำสด จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปรับด้วยสารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.65%, 2.5%, 3.0%, และ 3.5% โดยเติมลงไป 0-500 ไมโครลิตร และทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างเมื่อเวลาผ่านไป 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ตามลำดับ

นำความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกและจำนวนหยดที่ทำให้ น้ำคั้นสดของหน่อไม้มีค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 4.5 ตามคำแนะนำของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยามาประยุกต์ใช้ในการปรับกรดหน่อไม้รวกต้มบรรจุลงในขั้นตอนต่อไป

4. การเตรียมตัวอย่างหน่อไม้รวกบรรจุถุงก่อนการต้มให้ความร้อน

4.1 การเตรียมตัวอย่างหน่อไม้รวกบรรจุถุงที่ไม่ผ่านการปรับกรด

นำหน่อไม้ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กและขนาดใหญ่ที่เตรียมดังข้อ 1. มาล้างให้มือน้ำหนัก 24 กรัมบรรจุในถุงพลาสติกใสทนร้อนขนาด 5x8 นิ้ว เตรียมไว้

4.2 การเตรียมตัวอย่างหน่อไม้รวกบรรจุถุงที่ผ่านการปรับกรด

นำหน่อไม้ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กและขนาดใหญ่ที่เตรียมดังข้อ 1. มาล้างให้มือน้ำหนัก 24 กรัมบรรจุในถุงพลาสติกใสทนร้อนขนาด 5x8 นิ้ว ปรับด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นและจำนวนหยดที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 3. เตรียมไว้

5. การเตรียมซัสเพนชันสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus*

นำเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 11778 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast เมื่อพบว่ามีการสร้างสปอร์ประมาณ 90% ให้เก็บสปอร์โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 15 นาที จากนั้นล้างสปอร์ 2-3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 15 นาที เก็บสปอร์ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้

หาจำนวนสปอร์เริ่มต้นของ *B. cereus* โดยนำเชื้อมาให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีเพื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์และทำลายเซลล์ปกติ จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและ spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีที่งอกจากสปอร์เริ่มต้น

ทำการเจือจางสปอร์โดยใช้ 0.85% Normal saline ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่ำ (ประมาณ 10^4 CFU/ml) และจำนวนสปอร์เริ่มต้นสูง (ประมาณ 10^8 CFU/ml)

6. การเตรียมซัสเพนชันสปอร์ของเชื้อ *Clostridium sporogenes*

นำเชื้อ *Clostridium sporogenes* มาเลี้ยงในอาหาร Fluid thioglycollate broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ และนำซัสเพนชันสปอร์ของเชื้อ 100 ไมโครลิตรมา spread บนอาหาร Reinforced clostridial agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้อากาศ ทำการตรวจการสร้างสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast เมื่อพบว่าการสร้างสปอร์ประมาณ 90% แล้วให้ทำการเก็บสปอร์โดยปั่นน้ำกลั่นมาเชื้อ 1 มิลลิลิตรใส่ในจานอาหาร Reinforced clostridial agar ใช้แท่งแก้วอุดลากเอาสปอร์ของเชื้อออกจากผิวหน้าอาหารและเก็บซัสเพนชันสปอร์ในหลอดทดลองปลอดเชื้อที่ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำมาใช้

การหาจำนวนสปอร์เริ่มต้นของเชื้อ *Clostridium sporogenes* นำมาให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีเพื่อกระตุ้นการงอกของสปอร์ จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและทำการ Pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Reinforced clostridial agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ และตรวจนับจำนวนสปอร์เริ่มต้น

ทำการเจือจางสปอร์โดยใช้ 0.85% Normal saline ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่ำ (ประมาณ 10^4 CFU/ml) และจำนวนสปอร์เริ่มต้นสูง (ประมาณ 10^8 CFU/ml)

7. วิธีการศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มให้ความร้อนที่เหมาะสมในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Bacillus cereus*

7.1 การต้มให้ความร้อนในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Bacillus cereus*

นำหน่อไม้ที่เตรียมดังข้อ 4.1 – 4.2 มาทำการเติมซัสเพนชันสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* จำนวน 1 มิลลิลิตร โดยแบ่งออกเป็นจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่ำ (ประมาณ 10^4 CFU/ml) และจำนวนสปอร์เริ่มต้นสูง (ประมาณ 10^8 CFU/ml) รัดปากถุงด้วยหนังยางจากนั้นซ้อนทับด้วยถุงพลาสติกอีกชั้นและรัดปากถุงด้วยหนังยาง นำหน่อไม้ที่เตรียมไว้มาต้มให้ความร้อนโดยเริ่มต้นจับเวลาเมื่ออุณหภูมิของจุดกึ่งกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 และ 95 องศาเซลเซียส ตามเวลาดังนี้ โดยมีหน่อไม้ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนเป็นชุดควบคุม

1. 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (Come-up time), 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที
2. 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (Come-up time), 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

เมื่อให้ความร้อนตามเวลาที่กำหนดแล้วนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 2 นาที

7.2 การตรวจนับจำนวนสปอร์ *Bacillus cereus* ที่รอดชีวิต

ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิตหลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ โดยทำการเติม 0.85% Normal saline 225 มิลลิลิตร และตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher ที่ความเร็ว 200 สตโรคต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เจือจางต่อด้วย 0.85% Normal saline 9 มิลลิลิตร จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับๆ ละ 2 ซ้ำ นำมา Spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต

นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) กับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต (Log CFU/ml) เพื่อหาค่า D-value หรือ Decimal Reduction Time คือเวลาเป็นนาทีที่จะลดจำนวนแบคทีเรียหรือสปอร์ลงไป 90 เปอร์เซ็นต์หรือ 1 log cycle และหาค่า Thermal Death Time (TDT)

8. วิธีการศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาในการต้มให้ความร้อนที่เหมาะสมในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Clostridium sporogenes*

8.1 การต้มให้ความร้อนในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Clostridium sporogenes*

นำหน่อไม้ที่เตรียมดังข้อ 4.1 – 4.2 มาทำการเติมซัสเพนชันสปอร์ของเชื้อ *Clostridium sporogenes* จำนวน 1 มิลลิลิตร โดยแบ่งออกเป็นจำนวนสปอร์เริ่มต้นต่ำ (ประมาณ 10^4 CFU/ml) และจำนวนสปอร์เริ่มต้นสูง (ประมาณ 10^8 CFU/ml) รัดปากถุงด้วยหนังยางจากนั้นซ่อนทับด้วยถุงพลาสติกอีกชั้นและรัดปากถุงด้วยหนังยาง นำถุงหน่อไม้ที่เตรียมไว้มาต้มให้ความร้อนโดยเริ่มต้นจับเวลาเมื่ออุณหภูมิของจุดกึ่งกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 และ 95 องศาเซลเซียส ตามเวลาดังนี้ โดยมีหน่อไม้ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนเป็นชุดควบคุม

1. 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (Come-up time), 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที
2. 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 (Come-up time), 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที

เมื่อให้ความร้อนตามเวลาที่กำหนดแล้วนำมาแช่ในอ่างน้ำแข็งนาน 2 นาที

8.2 การตรวจนับจำนวนสปอร์ *Clostridium sporogenes* ที่รอดชีวิต

ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิตหลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ โดยทำการเติม 0.85% Normal saline 225 มิลลิลิตร และตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher ที่ความเร็ว 200 สโตรคต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ทำการเจือจางต่อด้วย 0.85% Normal saline 9 มิลลิลิตร และนำมา Pour plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Reinforced clostridial agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นตรวจนับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต

นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) กับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต (Log CFU/ml) เพื่อหาค่า D-value หรือ Decimal Reduction Time คือเวลาเป็นนาทีที่จะลดจำนวนแบคทีเรียหรือสปอร์ลงไป 90 เปอร์เซ็นต์หรือ 1 log cycle และหาค่า Thermal Death Time (TDT)

9. การทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้จากการยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes* โดยจำลองสถานการณ์การบ่มตามวิธีการตรวจลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของอาหารกระป๋อง

นำตัวอย่างหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงของแต่ละสถานะมาต้มด้วยเวลา 5 เท่าของค่า Decimal Reduction Time (5D) (เนื่องจากเป็นมาตรฐานในการถนอมอาหารกระป๋องซึ่งต้องลดจำนวนจุลินทรีย์ตั้งแต่ 5 Log ขึ้นไป) ที่ได้จากการทดลองในข้อ 7.2 และ 8.2 มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน และอีกชุดหนึ่งบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน โดยมีตัวอย่างหน่อไม้รวกบรรจุถุงที่ไม่ผ่านการต้มเป็นชุดควบคุม หลังจากบ่มครบตามระยะเวลาแล้ว นำมาตรวจวิเคราะห์ดังนี้

9.1 ตรวจลักษณะของหน่อไม้

โดยตรวจดูความผิดปกติของหน่อไม้จาก ค่า pH และวัดสีด้วยเครื่อง Hunter Lab

9.2 การตรวจหาจุลินทรีย์

หน่อไม้ที่จัดเป็นอาหารประเภทกรดสามารถตรวจสอบหาจุลินทรีย์โดยนำตัวอย่างหน่อไม้มาหั่นหรือสับให้ละเอียดผสมลงในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตรเข้าให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตของผสมใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังนี้

ตัวอย่างหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรด เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dextrose Tryptone Broth โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-5 วันในสภาวะที่มีอากาศและบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 วันในสภาวะที่มีอากาศ ส่วนการตรวจหาเชื้อที่ไม่ต้องการอากาศนั้นให้เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thiglycollate broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-5 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง โดยทุกสภาวะการบ่มทำ 2 ซ้ำ

ตัวอย่างหน่อไม้ที่ปรับกรดให้เพาะเชื้อในอาหาร Orange serum broth โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-5 วันในสภาวะที่มีอากาศและบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 วันในสภาวะที่มีอากาศ ส่วนการตรวจหาเชื้อที่ไม่ต้องการอากาศนั้นให้เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Orange serum broth ที่ปิดทับผิวหน้าอาหารด้วยวุ้น 3% บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-5 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง โดยทุกสภาวะการบ่มทำ 2 ซ้ำ

10. วิจัยรณัผลการทดลอง

วิจัยรณัผลการทดลองโดยเชื่อมโยงผลการวิเคราะห์ที่ได้กับโปรแกรมทางสถิติ ANOVA แบบ Factorial in CRD

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่เดือน สิงหาคม 2550 สิ้นสุดการวิจัยเดือน สิงหาคม 2551

ผลและวิจารณ์

ผล

1. การศึกษาระยะเวลาในการต้มเพื่อให้ได้อุณหภูมิใจกลางของหน่อไม้ตามที่ต้องการ (Come-up time)

ระยะเวลาในการต้มเพื่อให้ได้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส และ 95 องศาเซลเซียส หาได้โดยนำหน่อไม้ทั้งเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก (1.8 – 2.4 เซนติเมตร) และเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ (2.9 – 3.5 เซนติเมตร) มาต้มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 95 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ จากตารางที่ 12 แสดงผลดังนี้

ตารางที่ 12 ระยะเวลา Come-up time เพื่อให้ได้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส และ 95 องศาเซลเซียส

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ หน่อไม้	อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้	Come-up time (นาทิจ)
ขนาดเล็ก (1.8 – 2.4 cm.)	90 °C	24.30 ^a ± 1.71 ^b
	95 °C	21.77 ± 2.17
ขนาดใหญ่ (2.9 – 3.5 cm.)	90 °C	37.83 ± 3.99
	95 °C	32.89 ± 1.46

หมายเหตุ a คือ ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 8 ซ้ำ (ข้อมูลดังตารางภาคผนวกที่ 1-4)

b คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ระยะเวลาในการต้มเพื่อให้ได้อุณหภูมิใจกลาง (Come-up time) ของหน่อไม้ขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ค่า Come-up time เพื่อให้ได้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (Core temperature) เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส ของหน่อไม้ขนาดเล็ก เท่ากับ 24.30 ± 1.71 นาทิจ แต่หน่อไม้ขนาดใหญ่เท่ากับ 37.83 ± 3.99 นาทิจ แตกต่างกันถึง 13.56 นาทิจ ส่วนค่า Come-up time เพื่อให้ได้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (Core temperature) เท่ากับ 95 องศา

เซลเซียส ของหน่อไม้ขนาดเล็กเท่ากับ 21.77 ± 2.17 นาฬิกา แต่หน่อไม้ขนาดใหญ่เท่ากับ 32.89 ± 1.46 นาฬิกา แตกต่างกันถึง 11.12 นาฬิกา

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างเวลาในการทำให้อุณหภูมิของใจกลางหน่อไม้ (Core temperature) เท่ากับ 90 องศาเซลเซียสนั้นพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หน่อไม้ขนาดใหญ่, Core temperature เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส มีค่า Come-up time เฉลี่ย 37.83 ± 3.99 นาฬิกา ส่วน Core temperature เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส มีค่า Come-up time เฉลี่ย 32.89 ± 1.46 นาฬิกา แตกต่างกัน 4.97 นาฬิกา

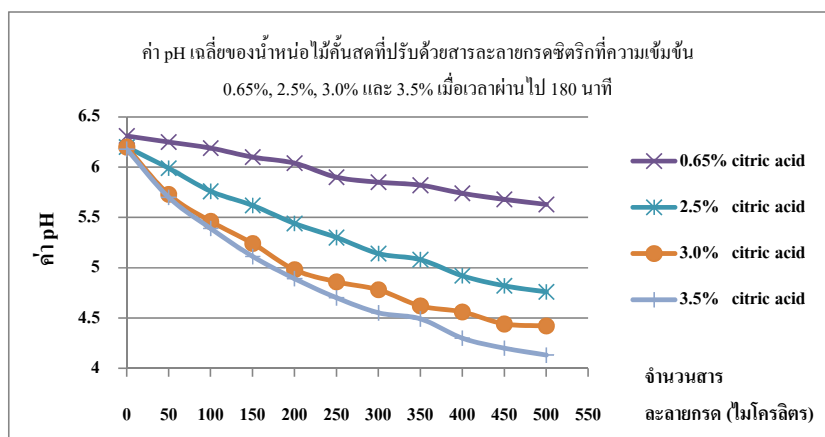
2. การประยุกต์การปรับกรดหน่อไม้ตามคำแนะนำของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.)

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแนะนำให้ใช้กรดซิตริก 0.65% ปรับสภาพกรดของหน่อไม้ปิ้งเพื่อให้ได้ pH < 4.5 (ประมาณ 4.3-4.5) เมื่อทดลองปรับสภาพกรดของน้ำคั้นสดของหน่อไม้ 5 มิลลิตร โดยเติมสารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.65% จำนวน 0-500 ไมโครลิตร และทำการวัดค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ 30 นาทีจนครบ 180 นาที พบว่าเมื่อเติมสารละลายกรดซิตริกจำนวนมากที่สุดคือ 500 ไมโครลิตร มีค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ยเท่ากับ 5.63 (นาฬิกาที่ 180) ซึ่งไม่สามารถทำให้ค่าความเป็นกรดต่างน้ำคั้นสดของหน่อไม้ต่ำกว่า 4.5 ได้ (ภาพที่ 6)

เมื่อทดลองปรับสภาพกรดน้ำคั้นสดของหน่อไม้ 5 มิลลิตร โดยใช้สารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 2.5%, 3.0% และ 3.5% จำนวน 0-500 ไมโครลิตร และทำการวัดค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ 30 นาทีจนครบ 180 นาที พบว่าเมื่อใช้สารละลายกรดซิตริก 3.5% จำนวน 400 ไมโครลิตรทำให้น้ำคั้นสดของหน่อไม้มีค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ย 4.31 (นาฬิกาที่ 0) และเมื่อเวลาผ่านไปครบ 180 นาที น้ำคั้นสดของหน่อไม้มีค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ยคงที่ที่ 4.30 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดต่างที่น้อยกว่า 4.5 ตามคำแนะนำของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

ภาพที่ 6 แสดงให้เห็นได้ว่าเมื่อเติมสารละลายกรดซิตริก 3.0% จำนวน 450 และ 500 ไมโครลิตร ทำให้น้ำคั้นสดของหน่อไม้มีค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ย 4.44 และ 4.42 (นาฬิกาที่ 180) ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างน้อยกว่า 4.5 แต่เมื่อนำความเข้มข้นนี้มาประยุกต์ใช้กับหน่อไม้ 24 กรัมและต้มตามเวลา come-up time เพื่อให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส

และ 95 องศาเซลเซียส นั้นหลังจากต้มในถุงพลาสติก แล้วพบว่าค่าความเป็นกรดต่างเพิ่มขึ้นสูงกว่า 4.5 (ตารางที่ 13)



ภาพที่ 6 ค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ยของน้ำหน่อไม้คั้นสดเมื่อปรับด้วยสารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.65%, 2.5%, 3.0% และ 3.5% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที

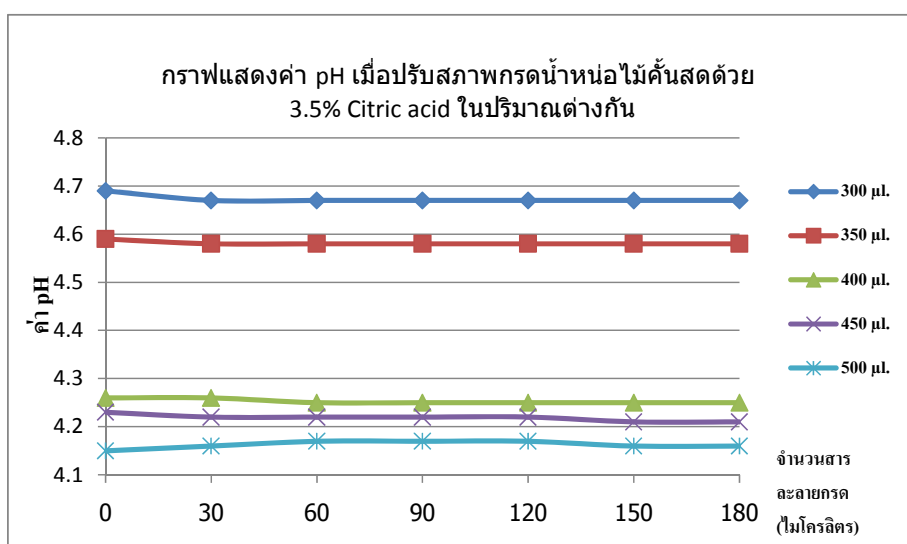
หมายเหตุ ข้อมูลดังตารางภาคผนวกที่ 5-17

แต่เมื่อพิจารณาจากการปรับกรดด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.5% จำนวน 400 ไมโครลิตร ทำให้น้ำคั้นสดของหน่อไม้มีค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ย 4.30 (นาทีที่ 180) ดังภาพที่ 7 และเมื่อนำความเข้มข้นดังกล่าวมาประยุกต์ใช้กับหน่อไม้ 24 กรัมและต้มตามเวลา come-up time ตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ นั้นพบว่า ในทุกๆ สภาวะที่ได้ทดลองมีค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.5 (ตารางที่ 13) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้นำความเข้มข้นและปริมาณของสารละลายกรดซิตริกนี้ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 13 แสดงค่าความเป็นกรดต่างเมื่อปรับด้วยสารละลายกรดซิตริกและผ่านการต้มตามเวลา come-up time ในสภาวะต่างๆ

อุณหภูมิ			ค่า pH เฉลี่ยเมื่อปรับด้วยสารละลายกรดซิตริก		
กลางหน่อไม้ (Core Temperature)	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง หน่อไม้	Come-up Time	2.16 ml. ของ 3.0 % citric acid	2.40 ml. ของ 3.0 % citric acid	1.92 ml. ของ 3.5 % citric acid
ไม่ต้ม	ขนาดเล็ก	-	4.31	4.27	3.76
	ขนาดใหญ่	-	4.36	4.29	3.75
90 °C	ขนาดเล็ก	24.30 นาที	4.65	4.63	4.22
	ขนาดใหญ่	37.83 นาที	4.67	4.61	4.17
95 °C	ขนาดเล็ก	21.77 นาที	4.75	4.69	4.34
	ขนาดใหญ่	32.89 นาที	4.76	4.69	4.34

หมายเหตุ หน่อไม้ขนาดเล็กมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.8 – 2.4 เซนติเมตร และ หน่อไม้ขนาดใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.9- 3.5 เซนติเมตร



ภาพที่ 7 ค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ยของน้ำหน่อไม้คั้นสดเมื่อปรับด้วยสารละลายกรดซิตริกที่ความเข้มข้น 3.5% ในปริมาณที่ต่างกัน

ภาพที่ 7 (ต่อ)

หมายเหตุ ข้อมูลดังตารางภาคผนวกที่ 14-16

3. การยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ในแบบจำลองหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงในสถานะต่างๆ

3.1 ผลของการปรับกรด

การศึกษาความแตกต่างของการปรับกรด ในตัวอย่างที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นสูง (ประมาณ 8 Log CFU/ml) ดังตารางที่ 14 เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า D และ TDT ของหน่อไม้ที่ผ่านการปรับกรดพบว่ามีค่าน้อยกว่าหน่อไม้ที่ไม่ผ่านการปรับกรดอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) เช่น S-NA-CT 90 มีค่า D และ TDT เท่ากับ 13.00 ± 1.0 และ 105.00 ± 8.18 นาทีตามลำดับ ส่วน S-A-CT 90 มีค่า D และ TDT เท่ากับ 7.66 ± 0.58 และ 62.66 ± 2.08 นาทีตามลำดับ ซึ่งต่างกัน 1.70 และ 1.68 เท่าตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการปรับกรดส่งผลให้ค่า D ลดลง

ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับในตัวอย่างที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำ (ประมาณ 4 Log CFU/ml) ดังภาพที่ 8 (A) พบว่า เมื่อไม่ปรับกรดสามารถทำลายสปอร์ได้ 100 % ในเวลาที่ 29 แต่หากทำการปรับด้วยกรดซิดริกแล้วจะสามารถทำลายสปอร์ได้ทั้งหมดในเวลาที่ 24 ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในแนวทางเดียวกันทุกสถานะ ดังภาพที่ 8 (B, C และ D)

3.2 ผลของอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้

ในส่วนของอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ที่แบ่งเป็น 90 องศาเซลเซียส (CT 90) และ 95 องศาเซลเซียส (CT 95) ซึ่งหากทำการเปรียบเทียบค่า D และค่า TDT ของตัวอย่างที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นสูง (ประมาณ 8 Log CFU/ml) ดังตารางที่ 14 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) ในสถานะ B-NA-CT 90 มีค่า D และ TDT เท่ากับ 15.33 ± 0.58 และ 140.66 ± 5.69 นาทีตามลำดับ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เป็น 95 องศาเซลเซียส (B-NA-CT 95) มีค่า D และ TDT ลดลงเท่ากับ 9.33 ± 0.58 และ 80.33 ± 6.11 นาที ตามลำดับ

ส่วนในตัวอย่างหน่อไม้ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำ (ประมาณ 4 Log CFU/ml) สภาวะ S-NA-CT 90 (ภาพที่ 8 A) พบว่าในนาที่ที่ 24 สามารถยับยั้งสปอร์ได้ 71.19% (3.37 Log CFU/ml) และยับยั้งได้ 100% ในนาที่ที่ 29 ในสภาวะเดียวกันนี้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 95 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 8 B) นั้นจะสามารถยับยั้งสปอร์ได้ 86.67 % (4.04 Log CFU/ml) และใช้เวลาเพียง 26 นาที่ก็สามารถยับยั้งสปอร์ได้หมด เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นทำให้ใช้เวลาในการทำลายสปอร์ลดลง

3.3 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหน่อไม้

ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางหน่อไม้ให้ผลชัดเจนในตัวอย่างหน่อไม้ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำ ดังเช่นในสภาวะ B-NA-CT 90 ดังภาพที่ 8 (C) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ S-NA-CT 90 ดังภาพที่ 8 (A) แสดงให้เห็นว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีผลต่ออัตราการทำลายสปอร์ โดยที่เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่จะทำลายสปอร์ได้ยากกว่าและใช้เวลานานกว่า ซึ่งต้องใช้เวลานานถึง 52 นาที่จึงจะทำลายสปอร์ได้ 100% ส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กใช้เวลาเพียง 29 นาที่ แต่ตัวอย่างหน่อไม้ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นสูงนั้น ค่า D และ TDT ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

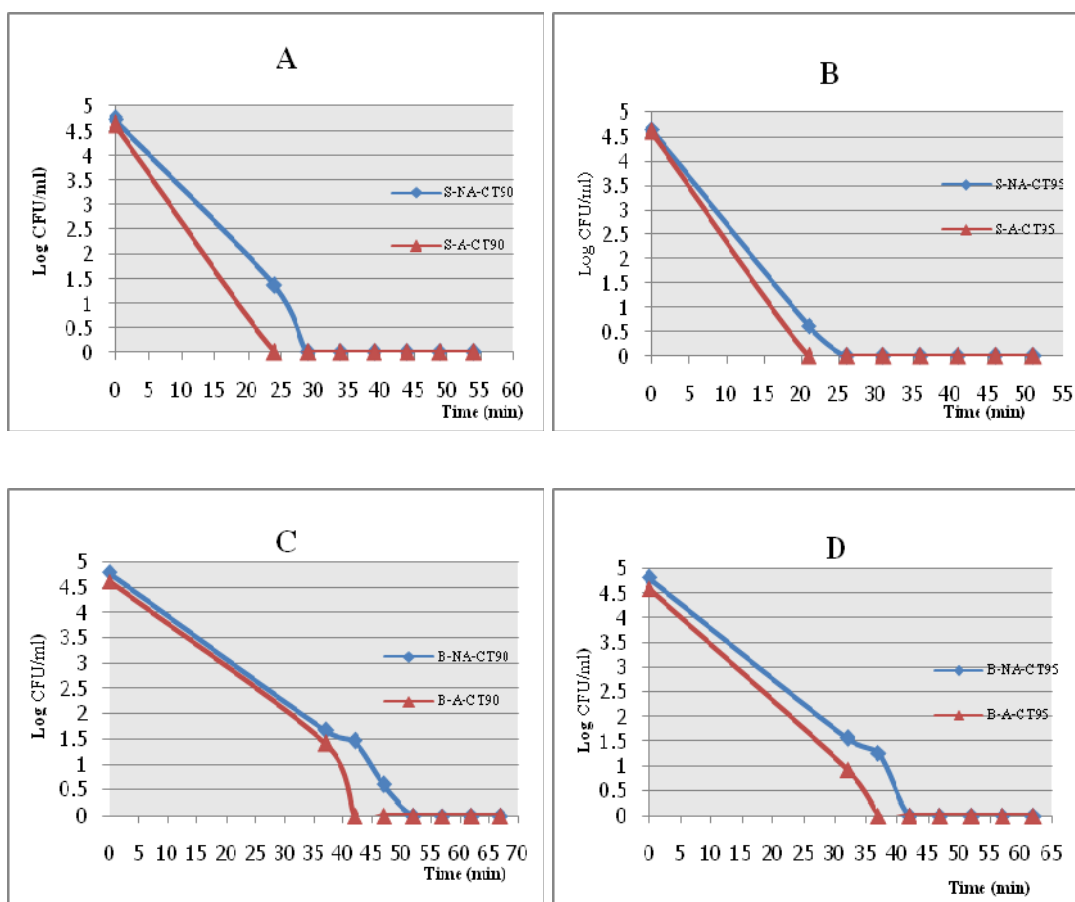
3.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการปรับกรด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้

ความสัมพันธ์ระหว่างการปรับกรด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ให้ค่า D และค่า TDT ของตัวอย่างที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นสูงที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) B-NA-CT 90 มีค่า D และ TDT เท่ากับ 15.33 ± 0.58 และ 140.66 ± 5.69 นาที ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ S-A-CT 95 ซึ่งมีค่า D และ TDT เท่ากับ 6.17 ± 0.76 และ 50 ± 5.29 นาที ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลการทดลองในตัวอย่างที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำ (ประมาณ 4 Log CFU/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ S-A-CT 90 ดังภาพที่ 8 (A) ซึ่งสามารถทำลายสปอร์ได้ทั้งหมดในนาที่ที่ 24 แต่ในสภาวะ B-NA-CT 95 ดังภาพที่ 8 (D) นั้นจะต้องใช้เวลานานถึง 42 นาที่จึงจะทำลายสปอร์ได้ 100%

ตารางที่ 14 แสดงค่า D-value และ Thermal Death Time ในการยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ด้วยสภาวะต่างๆ โดยเพาะสปอร์ที่มีจำนวนตั้งต้นมาก (ประมาณ 8 Log CFU/ml)

การปรับ กรด	ขนาดเส้นผ่าน ศูนย์กลาง หน่อไม้	อุณหภูมิ กลาง หน่อไม้	อักษรย่อ	D-value (นาที)	Thermal Death Time (TDT) (นาที)
ไม่ปรับกรด	ขนาดเล็ก (1.8 – 2.4 cm.)	90 °C	S-NA-CT 90	13.00 ^a ± 1.0 ^b	105.00 ± 8.18
		95 °C	S-NA-CT 95	9.50 ± 0.5	78.33 ± 3.79
	ขนาดใหญ่ (2.9 – 3.5 cm.)	90 °C	B-NA-CT 90	15.33 ± 0.58	140.66 ± 5.69
		95 °C	B-NA-CT 95	9.33 ± 0.58	80.33 ± 6.11
ปรับกรด	ขนาดเล็ก (1.8 – 2.4 cm.)	90 °C	S-A-CT 90	7.66 ± 0.58	62.66 ± 2.08
		95 °C	S-A-CT 95	6.17 ± 0.76	50.00 ± 5.29
	ขนาดใหญ่ (2.9 – 3.5 cm.)	90 °C	B-A-CT 90	7.17 ± 0.29	65.33 ± 0.58
		95 °C	B-A-CT 95	6.33 ± 0.29	56.33 ± 1.15

หมายเหตุ	a	คือ ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ
	b	คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	S	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
	B	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
	A	คือ ปรับกรด
	NA	คือ ไม่ปรับกรด
	CT 90	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
	CT 95	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 8 แสดงการยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นน้อยด้วยสภาวะต่างๆ เมื่อทำให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ได้ตามที่ต้องการ (90 องศาเซลเซียส และ 95 องศาเซลเซียส)

หมายเหตุ	S	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
	B	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
	A	คือ ปรับกรด
	NA	คือ ไม่ปรับกรด
	CT 90	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
	CT 95	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

4. การยับยั้งสปอร์ของ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 ในแบบจำลองหน่อไม้รวกคัมบรรจุ ถุงในสถานะต่างๆ

4.1 ผลของการปรับกรด

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า D และค่า TDT ระหว่างหน่อไม้ที่ผ่านการปรับกรดและไม่ปรับกรด ในตัวอย่างที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นสูง (ประมาณ 8 Log CFU/ml) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยที่สภาวะ B-A-CT 90 มีค่า D และ TDT เท่ากับ 7.5 ± 0.5 นาทีและ 64.83 ± 1.89 นาที ตามลำดับ แต่สภาวะหน่อไม้ที่ไม่ผ่านการปรับกรด (B-NA-CT 90) จะมีค่า D และ TDT เท่ากับ 11.83 ± 1.18 นาที และ 86.33 ± 2.52 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการปรับกรดทำให้ค่า D และ TDT ลดลง (ดังตารางที่ 15)

ผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกันในตัวอย่างที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำ (ประมาณ 4 Log CFU/ml) ในหน่อไม้ที่ผ่านการปรับกรดนั้น สามารถทำลายสปอร์ทั้งหมดได้เร็วกว่าหน่อไม้ที่ไม่ผ่านการปรับกรด ดังเช่นภาพที่ 9 (B) แสดงการยับยั้งสปอร์ในสภาวะ S-A-CT 95 พบว่าสามารถยับยั้งสปอร์ได้ 100% ในนาที่ที่ 21 แต่ในสภาวะไม่ปรับกรด S-NA-CT 95 สามารถยับยั้งสปอร์ได้ 100% ในนาที่ที่ 26

4.2 ผลของอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้

หากเปรียบเทียบอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ที่เพาะจำนวนสปอร์ตั้งต้นสูง ดังตารางที่ 15 ระหว่าง S-NA-CT 90 ซึ่งมีค่า D และ TDT เท่ากับ 13.16 ± 1.16 นาที และ 85.33 ± 3.06 นาที ตามลำดับ กับ S-NA-CT 95 มีค่า D และ TDT เท่ากับ 8.66 ± 1.16 นาทีและ 59.16 ± 1.90 นาที ตามลำดับ พบว่าอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ที่มากกว่ามีผลทำให้ค่า D และ TDT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$)

ส่วนในตัวอย่างหน่อไม้ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำ (ประมาณ 4 Log CFU/ml) สภาวะ B-NA-CT 90 ดังภาพที่ 9 (C) นั้นสามารถยับยั้งสปอร์ได้ 100% ในนาที่ที่ 47 แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เป็น 95 องศาเซลเซียส ในสภาวะ B-NA-CT 95 ดังภาพที่ 9 (D) นั้นสามารถยับยั้งสปอร์ได้ 100% ในนาที่ที่ 37 ซึ่งเร็วกว่าถึง 10 นาที

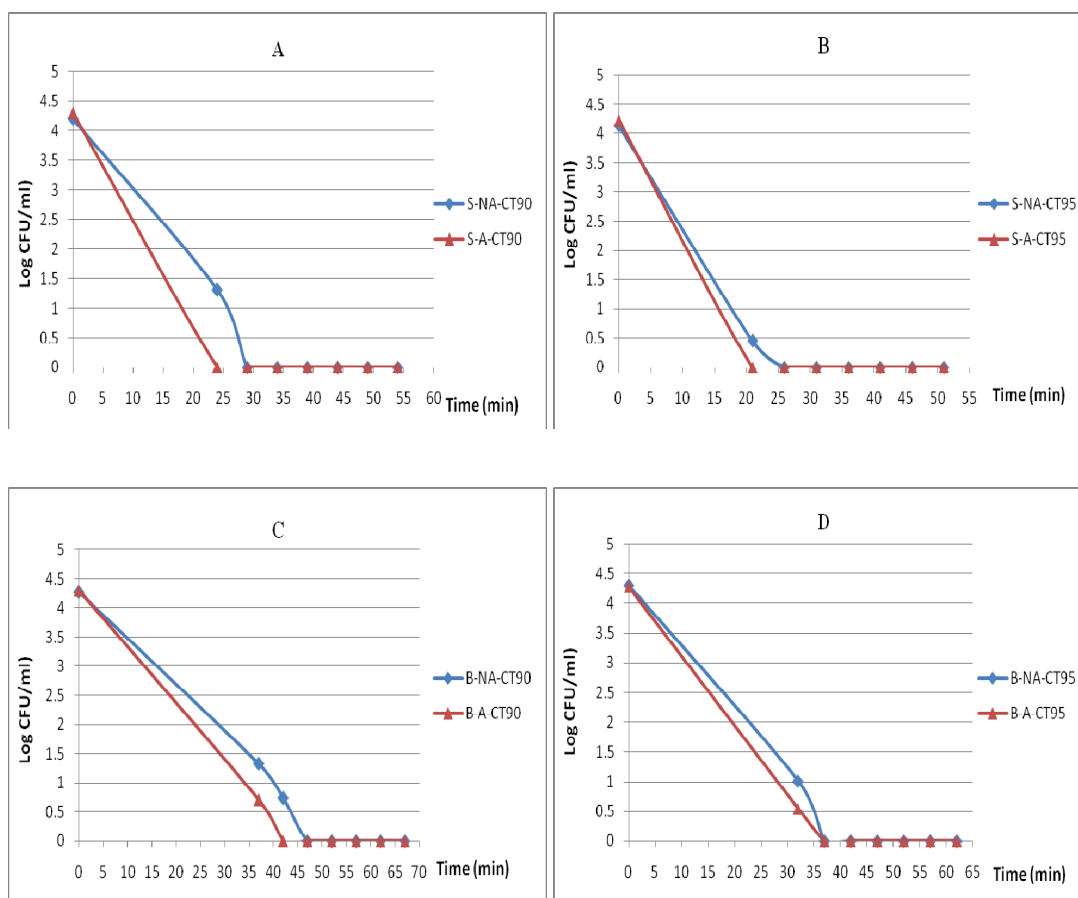
4.3 ผลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหน่อไม้

ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางหน่อไม้ต่อการยับยั้งสปอร์ของ *Clostridium sporogenes* ให้ผลชัดเจนในตัวอย่างหน่อไม้ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำเช่นเดียวกับผลของการยับยั้งสปอร์ *Bacillus cereus* ดังเช่นในสภาวะ B-NA-CT 90 (ภาพที่ 9 C) เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะ S-NA-CT 90 (ภาพที่ 9 A) แสดงให้เห็นว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีผลต่ออัตราการทำลายสปอร์ โดยที่เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่จะทำลายสปอร์ได้ยากกว่าและใช้เวลานานกว่า ซึ่งต้องใช้เวลาจนถึง 47 นาทีจึงจะทำลายสปอร์ได้ 100% ส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กใช้เวลาเพียง 29 นาที ส่วนในตัวอย่างหน่อไม้ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นสูงนั้น ค่า D และ TDT ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 15 แสดงค่า D-value และ Thermal Death Time ในการยับยั้งสปอร์ของ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 ด้วยสภาวะต่างๆ โดยเพาะสปอร์ที่มีจำนวนตั้งต้นมาก (ประมาณ 8 Log CFU /ml)

การปรับกรด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง หน่อไม้	อุณหภูมิใจกลาง หน่อไม้	อักษรย่อ	D-value (นาที)	Thermal Death Time (TDT) (นาที)
ไม่ปรับกรด	ขนาดเล็ก	90 °C	S-NA-CT 90	13.16 ^a ± 1.16 ^b	85.33 ± 3.06
	(1.8 – 2.4 cm.)	95 °C	S-NA-CT 95	8.66 ± 1.16	59.16 ± 1.89
	ขนาดใหญ่	90 °C	B-NA-CT 90	11.83 ± 1.18	86.33 ± 2.52
	(2.9 – 3.5 cm.)	95 °C	B-NA-CT 95	8.83 ± 1.26	65 ± 0.00
ปรับกรด	ขนาดเล็ก	90 °C	S-A-CT 90	6.5 ± 0.50	52 ± 1.73
	(1.8 – 2.4 cm.)	95 °C	S-A-CT 95	5.83 ± 0.29	47.33 ± 1.26
	ขนาดใหญ่	90 °C	B-A-CT 90	7.5 ± 0.50	64.83 ± 1.89
	(2.9 – 3.5 cm.)	95 °C	B-A-CT 95	7.17 ± 0.29	54.33 ± 0.58

หมายเหตุ	a	คือ ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ
	b	คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	S	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
	B	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
	A	คือ ปรับกรด
	NA	คือ ไม่ปรับกรด
	CT 90	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
	CT 95	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 9 แสดงการยับยั้งสปอร์ของ *Clostridium sporogenes* ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นน้อยด้วยสภาวะต่างๆ เมื่อทำให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ได้ตามที่ต้องการ (90 องศาเซลเซียส และ 95 องศาเซลเซียส)

หมายเหตุ	S	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
	B	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
	A	คือ ปรับกรด
	NA	คือ ไม่ปรับกรด
	CT 90	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
	CT 95	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

5. การทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่หาได้จากการยับยั้งการงอกของสปอร์ของ

Bacillus cereus ATCC 11778 และ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 โดยจำลองสถานการณ์
 ปมตามวิธีการตรวจลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของอาหารกระป๋อง

5.1 การตรวจลักษณะทางชีวภาพของหน่อไม้ที่ผ่านการต้มโดยใช้เวลา 5D ที่ได้จากการ
 ทดลองยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437

การทดลองในขั้นตอนนี้ได้ทำการต้มหน่อไม้รวกดิบที่ไม่ได้เพาะเชื้อและต้มในสภาวะ
 ต่างๆ ตามเวลา 5D ที่ได้จากการทดลองยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ
Clostridium sporogenes ATCC 11437 ดังตารางที่ 16 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์
 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดแล้วนำหน่อไม้มาเพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
 โดยตัวอย่างหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรด เพาะในอาหาร Dextrose Tryptone Broth เพาะเลี้ยงในสภาวะมี
 อากาศโดยบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2-5 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ส่วนการ
 ตรวจหาเชื้อที่ไม่ต้องการอากาศนั้นให้เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thiglycollate broth บ่มที่
 อุณหภูมิห้องนาน 2-5 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง โดยทุกสภาวะ
 การบ่มทำ 2 ซ้ำ

ตัวอย่างหน่อไม้ที่ปรับกรด เพาะเชื้อในอาหาร Orange serum broth โดยบ่มที่อุณหภูมิ
 ห้อง นาน 2-5 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 วันในสภาวะที่มีอากาศ ส่วนการ
 ตรวจหาเชื้อที่ไม่ต้องการอากาศนั้น เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Orange serum broth ที่ปิดทับ
 ผิวหน้าอาหารด้วยวุ้น 3% บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2-5 วัน และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน
 24-48 ชั่วโมง โดยทุกสภาวะการบ่มทำ 2 ซ้ำ

ตารางที่ 16 แสดงค่า 5D ที่ได้จากการทดลองยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 ที่นำมาจำลองสภาวะการต้มตามวิธีการตรวจลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของอาหารกระป๋อง

การปรับกรด	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง หน่อไม้	อุณหภูมิใจกลาง หน่อไม้	5D ของการยับยั้ง	
			สปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778 (นาที่)	5D ของการยับยั้งสปอร์ <i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437(นาที่)
ไม่ปรับกรด	ขนาดเล็ก	90 °C	65.00	65.80
	(1.8 – 2.4 cm.)	95 °C	47.50	43.30
	ขนาดใหญ่	90 °C	76.65	59.15
	(2.9 – 3.5 cm.)	95 °C	46.65	44.15
ปรับกรด	ขนาดเล็ก	90 °C	38.30	32.5
	(1.8 – 2.4 cm.)	95 °C	30.85	29.15
	ขนาดใหญ่	90 °C	35.85	37.5
	(2.9 – 3.5 cm.)	95 °C	31.65	35.85

จากผลการทดลองดังตารางที่ 17-20 พบว่าในทุกสภาวะที่ต้ม และระยะเวลาที่ใช้ต้มหน่อไม้นั้นไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เลย อาจเนื่องมาจากการล้างทำความสะอาดหน่อไม้ก่อนการต้ม สามารถช่วยกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากดินได้ในส่วนหนึ่ง ทำให้เมื่อผ่านการต้มแล้วเชื้อที่หลงเหลืออยู่ถูกทำลายได้หมด

ตารางที่ 17 แสดงการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรด เมื่อต้มตามระยะเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ *Bacillus cereus* ATCC 11778

การปรับกรด	สภาวะ	ระยะเวลาในการต้ม (นาท)	Dextrose Tryptone	Fluid Thioglycollate
			Broth	Broth
ไม่ปรับกรด	Control	-	อาหารเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง	อาหารขุ่นที่ก้นหลอด, มีกลิ่นเหม็น
	S : CT 90	65.00	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	S : CT 95	47.50	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	B : CT 90	76.65	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	B : CT 95	46.65	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น

หมายเหตุ S คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
 B คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
 CT 90 คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
 CT 95 คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 18 แสดงการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ปรับกรด เมื่อต้มตามระยะเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ *Bacillus cereus* ATCC 11778

การปรับกรด	สภาวะ	ระยะเวลาในการต้ม (นาที)	Orange Serum Broth	Orange Serum Broth ปิดทับด้วย 3% agar
ปรับกรด	Control	-	อาหารขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	S : CT 90	38.30	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	S : CT 95	30.85	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	B : CT 90	35.85	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	B : CT 95	31.65	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
หมายเหตุ	S	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก		
	B	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่		
	CT 90	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส		
	CT 95	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส		

ตารางที่ 19 แสดงการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรด เมื่อต้มตามระยะเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437

การปรับกรด	สถานะ	ระยะเวลาในการต้ม (นาที)	Dextrose Tryptone	Fluid Thioglycollate
			Broth	Broth
ไม่ปรับกรด	Control	-	อาหารเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง	อาหารขุ่นที่ก้นหลอด
	S : CT 90	65.80	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	S : CT 95	43.30	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	B : CT 90	59.15	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น
	B : CT 95	44.15	อาหารไม่ขุ่น	อาหารไม่ขุ่น

หมายเหตุ S คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
 B คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
 CT 90 คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
 CT 95 คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 20 แสดงการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ปรับกรด เมื่อต้มตามระยะเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437

การปรับกรด	สภาวะ	ระยะเวลาในการต้ม (นาทีก)	Orange Serum	Orange Serum
			Broth	Broth ปิดทับด้วย 3% agar
ปรับกรด	Control	-	อาหารไม่บูเน่	อาหารไม่บูเน่
	S : CT 90	32.5	อาหารไม่บูเน่	อาหารไม่บูเน่
	S : CT 95	29.15	อาหารไม่บูเน่	อาหารไม่บูเน่
	B : CT 90	37.5	อาหารไม่บูเน่	อาหารไม่บูเน่
	B : CT 95	35.85	อาหารไม่บูเน่	อาหารไม่บูเน่

หมายเหตุ	S	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
	B	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
	CT 90	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
	CT 95	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองพบว่าในสภาวะควบคุมของการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ของหน่อไม้ที่ปรับกรดที่เพาะเชื้อในอาหาร Orange Serum Broth ปิดทับด้วย 3% agar (ดังตารางที่ 18) และ สภาวะควบคุมของตัวอย่างปรับกรด ที่เพาะเชื้อในอาหาร Orange Serum Broth และ Orange Serum Broth ปิดทับด้วย 3% agar (ดังตารางที่ 20) ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงได้นำมาทดสอบโดยเพาะซัสเพนชันสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes* ลงไปพบว่าเมื่อเพาะซัสเพนชันสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ในทุกๆ สภาวะของการบ่มนั้นไม่ได้ทำให้จำนวน *Bacillus cereus* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังตารางที่ 21 และเมื่อเพาะซัสเพนชันสปอร์ของ *Clostridium sporogenes* ลงในอาหาร Orange Serum Broth พบว่าในสภาวะการบ่มแบบไร้อากาศก็ไม่ได้ทำให้จำนวน *Clostridium sporogenes* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน แต่เมื่อบ่มในสภาวะมีอากาศทำให้จำนวนของเชื้อลดลงประมาณ 3 Log CFU/ml ดังตารางที่ 22 อาจเนื่องมาจาก *Clostridium sporogenes* เป็นเชื้อที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ เมื่ออยู่ในสภาวะมีอากาศจึงทำให้เชื้อตายได้ จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้เห็นได้ว่าอาหาร Orange Serum Broth ที่ปรับด้วยกรดซิตริกและไม่ปรับกรดนั้นไม่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และในสภาวะควบคุมที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากในหน่อไม้ที่นำมาทดลองมีจำนวนจุลินทรีย์น้อยจึงตรวจไม่พบ

จุลินทรีย์ใดๆเลย

ตารางที่ 21 การเปรียบเทียบสภาวะปรับกรดและไม่ปรับกรดของสปอร์ *Bacillus cereus* ในอาหาร
เลี้ยงเชื้อ Orange Serum Broth

จำนวนสปอร์ตั้งต้น 1.00×10^8 CFU/ml

อาหารเลี้ยง เชื้อ	การ ปรับ กรด	ค่า pH เมื่อ เพาะเชื้อแล้ว	สภาวะ การบ่ม	อุณหภูมิ บ่ม ($^{\circ}\text{C}$)	ลักษณะ ของอาหาร หลังจาก บ่ม	จำนวน จุลินทรีย์ ที่รอดชีวิตใน จานเพาะเชื้อ
Orange Serum Broth	ไม่ปรับ	5.95	มีอากาศ	37	ขุ่น	5.5×10^7
		5.95		55	ขุ่น	3.9×10^7
	กรด	5.95	ไร้อากาศ	37	ขุ่น	7.15×10^7
		5.95		55	ขุ่น	5.8×10^7
	ปรับ	4.66	มีอากาศ	37	ขุ่น	1.35×10^8
		4.66		55	ขุ่น	3.6×10^7
		4.66	ไร้อากาศ	37	ขุ่น	1.16×10^8
		4.66		55	ขุ่น	8.1×10^8

ตารางที่ 22 การเปรียบเทียบสภาวะปรับกรดและไม่ปรับกรดของสปอร์ *Clostridium sporogenes*
ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ Orange Serum Broth

จำนวนสปอร์ตั้งต้น 5.40×10^8 CFU/ml

อาหารเลี้ยงเชื้อ	การปรับกรด	ค่า pH เมื่อเพาะเชื้อแล้ว	สภาวะการบ่ม	อุณหภูมิ บ่ม (°C)	ลักษณะของอาหารหลังจากบ่ม	จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตในงานเพาะเชื้อ
Orange Serum Broth	ไม่ปรับกรด	6.00	มีอากาศ	37	ขุ่น	4.1×10^5
		6.00		55	ขุ่น	4.5×10^5
		6.00	ไร้อากาศ	37	ขุ่น	3.2×10^8
		6.00		55	ขุ่น	2.7×10^8
	ปรับกรด	4.70	มีอากาศ	37	ขุ่น	3.9×10^5
		4.70		55	ขุ่น	3.2×10^5
		4.70	ไร้อากาศ	37	ขุ่น	3.4×10^8
		4.70		55	ขุ่น	1.3×10^6

5.2 การตรวจลักษณะทางกายภาพของหน่อไม้ที่ผ่านการต้มโดยใช้เวลา 5D ที่ได้จากการทดลองยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437

5.2.1 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

เมื่อนำหน่อไม้ที่ผ่านการต้มตามเวลา 5D ของเชื้อ *Clostridium sporogenes* และ *Bacillus cereus* มาวัดค่า pH ก่อนบ่ม, หลังบ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์และหลังบ่ม 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ ดังตารางที่ 23 และ 24 พบว่าหลังบ่ม 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ ค่า pH ที่วัดได้มีค่าต่ำลงเล็กน้อย เช่นเดียวกับค่า pH เมื่อบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์

ตารางที่ 23 ค่าความเป็นกรดต่างของหน่อไม้ที่ต้มตามเวลา 5D เชื้อ *Clostridium sporogenes*

สถานะของหน่อไม้	ค่า pH ก่อน บ่ม	ค่า pH หลังบ่ม 37 °C นาน 2 สัปดาห์	ค่า pH หลังบ่ม 55 °C นาน 1 สัปดาห์
หน่อไม้ดิบ, ไม่ปรับกรด	6.48	6.21	5.52
หน่อไม้ดิบ, ปรับกรด	3.92	4.94	4.81
S-NA-CT 90	6.36	5.86	5.86
S-NA-CT 95	6.38	5.97	5.94
B-NA-CT 90	6.41	5.74	5.79
B-NA-CT 95	6.41	5.85	5.82
S-A-CT 90	4.4	4.41	4.34
S-A-CT 95	4.37	4.35	4.31
B-A-CT 90	4.40	4.38	4.34
B-A-CT 95	4.35	4.29	4.25

หมายเหตุ	S	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
	B	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
	A	คือ ปรับกรด
	NA	คือ ไม่ปรับกรด
	CT 90	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
	CT 95	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

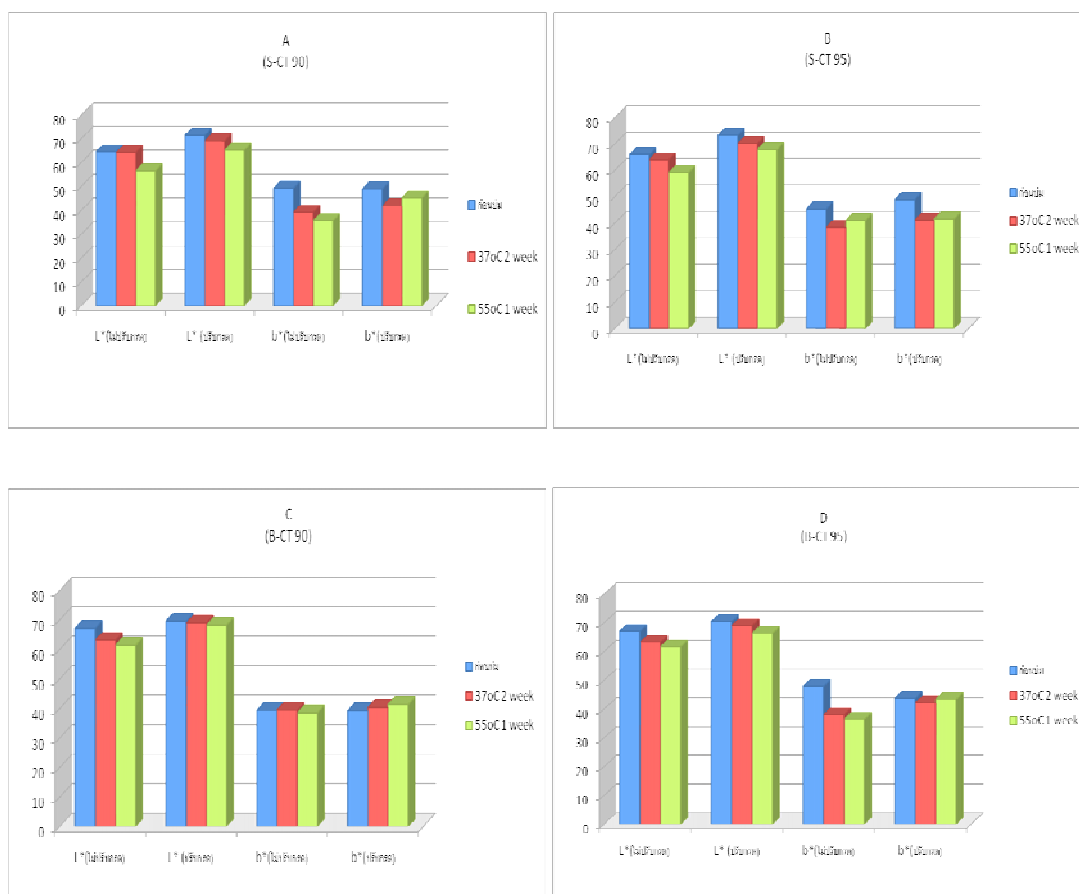
ตารางที่ 24 ค่าความเป็นกรดต่างของหน่อไม้ที่ต้มตามเวลา 5D เชื้อ *Bacillus cereus*

สถานะของหน่อไม้	ค่า pH ก่อน บ่ม	ค่า pH หลังบ่ม 37 °C นาน 2 สัปดาห์	ค่า pH หลังบ่ม 55 °C นาน 1 สัปดาห์
หน่อไม้ดิบ, ไม่ปรับกรด	6.48	6.21	5.52
หน่อไม้ดิบ, ปรับกรด	3.92	4.94	4.81
S-NA-CT 90	6.32	5.90	5.82
S-NA-CT 95	6.30	5.98	5.87
B-NA-CT 90	6.39	5.80	5.78
B-NA-CT 95	6.42	5.92	5.80
S-A-CT 90	4.45	4.40	4.38
S-A-CT 95	4.40	4.37	4.30
B-A-CT 90	4.42	4.36	4.30
B-A-CT 95	4.41	4.34	4.30

หมายเหตุ	S	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก
	B	คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่
	A	คือ ปรับกรด
	NA	คือ ไม่ปรับกรด
	CT 90	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส
	CT 95	คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

5.2.2 การวัดค่าสีของหน่อไม้

ก. ค่าการวัดสีหน่อไม้ที่ผ่านการต้มตามเวลา 5D ของเชื้อ *Clostridium sporogenes*



ภาพที่ 10 แสดงค่าการวัดสีของหน่อไม้ที่ผ่านการต้มตามเวลา 5 D ของเชื้อ *Clostridium sporogenes*

หมายเหตุ ค่า b* คือค่าสีเหลือง (Yellowness) เมื่อมีค่าเป็นบวก หรือค่าสีน้ำเงินเมื่อมีค่าเป็นลบ

ค่า L* คือค่าความสว่าง (Lightness) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 คือไม่มีความสว่างหรือสีดำ ถึง 100 คือมีค่าความสว่างสูงสุดหรือสีขาว

S คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, B คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่

CT 90 คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส, CT 95 คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

1. การปรับกรด

1.1 ค่าความสว่าง (L^*)

เมื่อเปรียบเทียบค่า L^* ระหว่างตัวอย่างที่ปรับกรดและไม่ปรับกรดนั้น มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการปรับกรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.000$) ดังภาพที่ 10 (A) สภาวะไม่ปรับกรด ซึ่งมีค่า L^* ก่อนบ่มเท่ากับ 64.48 แต่เมื่อปรับกรดมีค่า L^* ก่อนบ่มเท่ากับ 71.35 จะเห็นได้ว่าค่า L^* ของหน่อไม้เพิ่มขึ้นหลังการปรับกรด

1.2 ค่าสีเหลือง – น้ำเงิน (b^*)

เมื่อเปรียบเทียบค่า b^* นั้นพบว่าค่าเฉลี่ยโดยรวมของตัวอย่างหน่อไม้ที่ปรับกรดมีค่า b^* มากกว่าหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ดังภาพที่ 10 (B) สภาวะไม่ปรับกรด มีค่า b^* ก่อนบ่มเท่ากับ 45.39 แต่เมื่อปรับกรดมีค่า b^* เท่ากับ 48.91 เช่นเดียวกับเมื่อบ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ ไม่ปรับกรด มีค่า b^* เท่ากับ 38.43 แต่เมื่อปรับกรดมีค่า b^* เท่ากับ 41.12 เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าการปรับกรดนั้นทำให้ค่า b^* สูงขึ้น

2. สภาวะการบ่ม

2.1 ค่าความสว่าง (L^*)

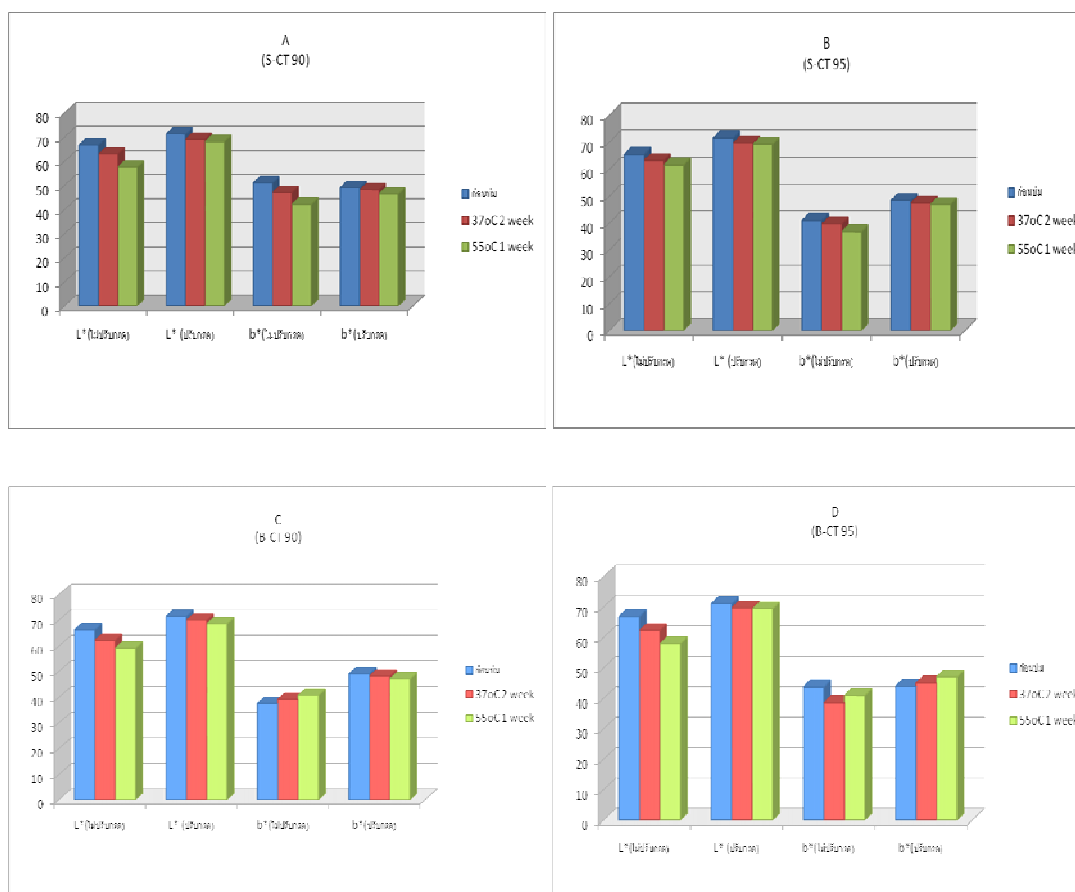
เมื่อเปรียบเทียบค่า L^* ระหว่างสภาวะก่อนบ่ม, บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ และบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.000$) ดังภาพที่ 10 (C) สภาวะไม่ปรับกรดมีค่า L^* ก่อนบ่ม, บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ และบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เท่ากับ 67.15, 63.06 และ 61.36 ตามลำดับ

2.2 ค่าสีเหลือง – น้ำเงิน (b^*)

พบว่าค่า b^* ของหน่อไม้หลังบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์และบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ มีแนวโน้มลดลงซึ่งแตกต่างจากค่า b^* ของหน่อไม้ก่อนบ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) แต่เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 10 (C) จะพบว่าในสภาวะปรับกรด นั้นมีค่า

b* หลังบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์มากกว่าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์และมากกว่าก่อนบ่ม แต่ในทางสถิติแล้วนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p=0.355$)

ข. ค่าการวัดสีของหน่อไม้ผ่านการต้มตามเวลา 5D ของเชื้อ *Bacillus cereus*



ภาพที่ 11 แสดงค่าการวัดสีของหน่อไม้ผ่านการต้มตามเวลา 5 D ของเชื้อ *Bacillus cereus*

หมายเหตุ ค่า b* คือค่าสีเหลือง (Yellowness) เมื่อมีค่าเป็นบวก หรือค่าสีน้ำเงินเมื่อมีค่าเป็นลบ

ค่า L* คือค่าความสว่าง (Lightness) ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0 คือไม่มีความสว่างหรือสีดำ ถึง 100 คือมีค่าความสว่างสูงสุดหรือสีขาว

S คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, B คือ หน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่

CT 90 คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส, CT 95 คือ อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส

1. การปรับกรด

1.1 ค่าความสว่าง (L^*)

เมื่อเปรียบเทียบค่า L^* ของหน่อไม้ที่ปรับกรดและไม่ปรับกรดนั้น พบว่าแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการปรับกรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.000$) ดังภาพที่ 11 (B) สภาวะไม่ปรับกรดซึ่งมี L^* ก่อนบ่มเท่ากับ 66.87 ซึ่งค่าความสว่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อทำการปรับกรด โดยมีค่า L^* ก่อนบ่มเท่ากับ 71.13 เป็นต้น

1.2 ค่าสีเหลือง – น้ำเงิน (b^*)

ค่า b^* ของหน่อไม้ที่ผ่านการปรับกรดมีค่ามากกว่าหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ดังภาพที่ 11 (D) สภาวะไม่ปรับกรดหลังบ่ม 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ มีค่า b^* เท่ากับ 36.73 แต่ในหน่อไม้ที่ปรับกรด สภาวะเดียวกันนี้มีค่า b^* เพิ่มขึ้นเป็น 46.96

2. สภาวะการบ่ม

2.1 ค่าความสว่าง (L^*)

เมื่อเปรียบเทียบค่า L^* ระหว่างสภาวะก่อนบ่ม, บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ และบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ พบว่าค่า L^* มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.000$) ทั้งในหน่อไม้ที่ปรับกรดและไม่ปรับกรด ดังภาพที่ 11 (A) สภาวะไม่ปรับกรดมีค่า L^* ก่อนบ่ม, บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ และบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เท่ากับ 66.71, 62.97 และ 57.59 ตามลำดับ เช่นเดียวกับสภาวะที่ปรับกรดมีค่า L^* ก่อนบ่ม, บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ และบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เท่ากับ 71.20, 69.11 และ 68.11 ตามลำดับ

2.2 ค่าสีเหลือง – น้ำเงิน (b^*)

จากกราฟจะเห็นได้ว่าค่า b^* ของหน่อไม้หลังบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ และ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์มีค่าน้อยกว่าค่า b^* ของหน่อไม้ก่อนบ่ม มีเพียงค่า b^* ของ

ภาพที่ 11 (C) สภาวะไม่ปรับกรดและค่า b^* ของภาพที่ 11 (D) สภาวะที่ปรับกรดเท่านั้นที่มีค่า b^* ของหน่อไม้หลังบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์และ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์สูงกว่าค่า b^* ของหน่อไม้ก่อนบ่ม แต่เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยโดยรวมของค่า b^* ก่อนบ่ม, บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์และบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เท่ากับ 45.48, 44.16 และ 43.52 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามีแนวโน้มที่ลดลงและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)

วิจารณ์

1. การศึกษาระยะเวลาในการต้มเพื่อให้ได้อุณหภูมิใจกลางของหน่อไม้ตามที่ต้องการ (Come-up time)

ค่า Come-up time นั้นขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ต้มและขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของหน่อไม้ เมื่อใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าในการต้มทำให้ค่า Come-up time น้อยกว่าการใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ใหญ่กว่าส่งผลให้ค่า Come-up time นั้นมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอาหารชิ้นขนาดใหญ่ต้องการเวลาในการฆ่าเชื้อมากกว่าอาหารชิ้นขนาดเล็ก (วิล, 2546) จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงนั้นต้องคำนึงถึงขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของหน่อไม้ที่บรรจุในถุงด้วย หากในถุงนั้นมีหน่อไม้ที่เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่เวลาในการต้มควรจะเพิ่มเวลาในการต้มให้มากกว่าเดิม

2. การประยุกต์การปรับกรดหน่อไม้ตามคำแนะนำของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา

เมื่อปรับสภาพกรดน้ำคั้นสดของหน่อไม้ 5 ml. ตามคำแนะนำของ อย. โดยใช้สารละลายกรดซิตริก 0.65% พบว่าไม่สามารถทำให้ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.5 ได้ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกเป็น 3.0% จำนวน 450 และ 500 ไมโครลิตรทำให้น้ำคั้นสดมี pH เฉลี่ย 4.44 และ 4.42 (นาที่ที่ 180) ตามลำดับ แต่เมื่อนำมาประยุกต์ใช้กับหน่อไม้ 24 กรัม และต้มตามเวลา Come-up time ของแต่ละสภาวะ พบว่าที่ความเข้มข้นและจำนวนของสารละลายกรดดังกล่าวไม่สามารถทำให้ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.5 ได้ อาจเนื่องมาจากหน่อไม้บรรจุในถุงพลาสติกซ้อนทับ 2 ชั้น โดยรัดปากถุงด้วยหนังยาง เมื่อให้ความร้อนกรดสามารถระเหยออกจากถุงพลาสติกได้ ประกอบกับการให้ความร้อนนั้นทำให้น้ำออกจากชิ้นหน่อไม้เพิ่มขึ้น น้ำที่ออกมาสามารถเจือจางความเป็นกรดให้ลดลงส่งผลให้ค่า pH เพิ่มขึ้น ประกอบกับในหน่อไม้มีสารให้

ความขมที่ชื่อ Taxiphyllin ซึ่งมีสภาพเป็นด่าง จากคำแนะนำของ อย. ให้ต้มหน่อไม้ให้สุกก่อนนำมาบรรจุและฆ่าเชื้อในป๊อปเพื่อกำจัดความขมทำให้เมื่อปรับกรดด้วยสารละลายกรดซิตริก 0.65% ค่า pH จึงต่ำกว่า 4.5 ได้ แต่ในหน่อไม้รวกต้มบรรจุลงไม่มีขั้นตอนในการต้มหน่อไม้เพื่อกำจัดความขมก่อน สารชนิดนี้จึงละลายในถุงของหน่อไม้การปรับกรดจึงต้องใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นมากกว่าการปรับกรดในป๊อป (ณรงค์, 2531; มณฑาทิพย์ และคณะ, 2549)

ด้วยเหตุนี้จึงเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดเป็น 3.5% พบว่าเมื่อใช้จำนวน 400 ไมโครลิตร ทำให้น้ำคั้นสดของหน่อไม้มีค่า pH เฉลี่ย 4.30 (นาที่ที่ 180) เมื่อนำมาประยุกต์ใช้กับหน่อไม้ 24 กรัมและต้มตามเวลา Come-up time ของแต่ละสภาวะ พบว่าทำให้ค่า pH ต่ำกว่า 4.5 ได้ จึงนำความเข้มข้นและจำนวนของสารละลายกรดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. ผลของการปรับกรดและอุณหภูมิต่อการยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes*

การปรับกรดและการเพิ่มอุณหภูมิส่งผลให้ค่า D ลดลงจากตัวอย่างที่ไม่ปรับกรดและให้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า ซึ่งจากผลการทดลองที่กล่าวมาในข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gaillard *et al.* (1998) ซึ่งได้ศึกษาผลของ pH ต่อการทนความร้อนของสปอร์ *Bacillus cereus* CNRZ 110 พบว่าใน Citrate-phosphate buffer ที่มี pH 6.5 มีค่า D_{95} เท่ากับ 188.5 นาที แต่เมื่อลด pH ของ Citrate-phosphate buffer เป็น 4.5 ทำให้ค่า D_{95} ลดลงเป็น 48.65 นาทีซึ่งต่างกัน 3.87 เท่า นอกจากนี้พบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า D นั้นลดลง ในอาหารที่มี pH 4.5 มีค่า D_{95} เท่ากับ 157.3 นาที เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 101 องศาเซลเซียส พบว่าค่า D นั้นลดลงเหลือเพียง 10.75 นาทีซึ่งต่างกันถึง 14.63 เท่า และงานวิจัยของ Leguerinel and Mafart (2001) เมื่อปรับ pH ของ Tryptone salt broth ด้วยกรดซิตริกให้มี pH ต่างกันพบว่าอาหารที่มี pH ต่ำลงทำให้ค่า D ลดลง โดยสปอร์ *Bacillus cereus* CNRZ 110 ใน Tryptone salt broth ที่มี pH 6.5 มีค่า D_{95} เท่ากับ 1.02 นาที แต่เมื่อลด pH ลงเป็น 5.5 และ 4.5 ทำให้ค่า D_{95} เท่ากับ 0.81 และ 0.64 นาที ตามลำดับ

Moussa-Boudjemaa *et al.* (2006) ได้ศึกษาการปรับกรดในสารสกัดแคโรททีนต่อการทนความร้อนของสปอร์ *Bacillus cereus* ATCC 7004 และ ATCC 4342 โดยใช้กรดชนิดต่างๆ พบว่าการทนความร้อนของสปอร์ *Bacillus cereus* ATCC 7004 ที่ถูกปรับด้วยกรดซิตริกให้มี pH เท่ากับ 5.2, 4.5 และ 4.0 มีค่า D_{96} เท่ากับ 0.7, 0.5 และ 0.42 นาที ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่า D_{100} เท่ากับ 0.23, 0.17 และ 0.14 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าถึงแม้จะเป็นสปอร์

ของเชื้อสปีชีส์เดียวกัน หากลด pH ของอาหารลงจะทำให้ค่า D นั้นลดลง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นก็ทำให้ค่า D นั้นลดลงเช่นเดียวกัน ส่วนสปอร์ของเชื้อต่างสปีชีส์กันพบว่าการทนต่อความร้อนนั้นก็ให้ผลที่แตกต่างกัน

การยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงนั้นให้ผลเป็นไปในแนวทางเดียวกับการยับยั้งสปอร์ของ *Clostridium sporogenes* ซึ่ง ค่า D ของตัวอย่างที่ปรับกรดนั้นลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ปรับกรด และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นทำให้ค่า D นั้นลดลงเช่นเดียวกัน Ocio *et al.* (1994) ได้ศึกษาผลของการทนความร้อนของสปอร์ *Clostridium sporogenes* PA3679 ที่ผ่านการให้ความร้อน 110, 115, 118 และ 121 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างเห็ดบดซึ่งถูกปรับด้วยกรดซิตริกให้มี pH 6.7, 6.22, 5.34 และ 4.65 พบว่าเมื่อ pH ลดต่ำลงค่า D มีแนวโน้มที่ลดลง เช่นเดียวกับเมื่อเพิ่มความร้อนให้สูงขึ้นค่า D มีแนวโน้มที่ลดลงเช่นกัน ค่า D ของเห็ดที่ไม่ผ่านการปรับกรด (pH = 6.7) นั้นสูงกว่าตัวอย่างที่ผ่านการปรับด้วยกรดซิตริกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้มียานวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าแม้จะเป็นการยับยั้งสปอร์ของเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน (*Clostridium sporogenes* ATCC 11437) นั้นจะให้ค่า D ที่แตกต่างกันในอาหารต่างชนิดกัน ดังงานวิจัยของ Naim *et al.* (2008) ได้ศึกษาผลรวมของความร้อน, ปริมาณ nisin และการปรับกรดต่อการยับยั้งสปอร์ของ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 ในผลิตภัณฑ์แคโรท พบว่าเมื่อให้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส, ปรับ pH = 5 และเติม nisin 750 IU/g มีค่า $D_{80} = 32.1$ นาที เมื่อลด pH=4, ปริมาณ nisin 750 IU/g มีค่า $D_{80} = 13.23$ นาที แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส, ปรับ pH = 4.5 และเติม nisin 500 IU/g พบว่ามีค่า $D_{90} = 10.84$ นาที ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า D_{90} มีค่าน้อยกว่าค่า D_{80} และเมื่อปรับ pH ให้ลดลงส่งผลให้ค่า D ลดลง จากผลการทดลองของ Naim *et al.* (2008) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ได้ พบว่ามีค่า D ที่ให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ 90 องศาเซลเซียส ในสภาวะปรับกรด ในหน่อไม้ขนาดเล็กและขนาดใหญ่เท่ากับ 6.5 และ 7.5 นาที ซึ่งให้ค่า D ที่แตกต่างกันแม้จะเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกันก็ตาม ดังนั้นในการหาค่าการทนความร้อนของสปอร์ของเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน หากเป็นอาหารต่างชนิดกัน จะต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ในอาหารชนิดนั้นๆ เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารแตกต่างกัน

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลรวมของการปรับกรดและความร้อนในการยับยั้งสปอร์ ซึ่งการทนความร้อนของสปอร์ขึ้นกับ 3 ปัจจัย คือการปรับตัวต่อความร้อน (Thermal adaptation), การสร้างแร่ธาตุ (mineralization) และ การลดลงของน้ำ (Dehydration) โดยปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือการลดลงของน้ำ หรือการที่มีน้ำในส่วน core น้อย ซึ่งจำกัดการเคลื่อนที่ของส่วนประกอบใน core จึง

ทำให้สปอร์ทนความร้อนได้ (Juneja, 2002) เมื่อสปอร์อยู่ในสิ่งแวดล้อมหรืออาหารที่เป็นกรด กรดจะทำลายเยื่อเลือกผ่านของสปอร์ นั่นคือชั้นของ inner forespore membrane ทำให้มีการปลดปล่อย dipicolinic acid (DPA) ออกมาจากส่วน core เมื่อส่วน core ขาด DPA น้ำจะเข้ามาแทนที่ ทำให้สปอร์ไวต่อความร้อนมากขึ้น (Setlow *et al.*, 2002) และจากงานวิจัยของ Gould และ Dring (1975) พบว่าการทนความร้อนของสปอร์ในอาหารที่มี pH กรดลดลงเนื่องจากเกิด protonization ของหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ในส่วน cortex ทำให้ cortex ถูกทำลาย และทำให้ส่วน core มีน้ำเข้ามามากขึ้นส่งผลให้สปอร์ไวต่อความร้อน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Okereke *et al.* (1990) ซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องดูโครงสร้างสปอร์ *Clostridium sporogenes* พบว่าความร้อนนั้นทำให้ความหนาของ cortex ลดลงและในส่วน core มีปริมาตรเพิ่มขึ้น ความร้อนจะทำลายเยื่อเลือกผ่านของสปอร์เช่นเดียวกับผลของกรด ทำให้ส่วนประกอบภายในสปอร์รวมถึง calcium และ DPA ไหลออกส่งผลให้สปอร์นั้นไวต่อความกดดันของสิ่งแวดล้อมมากขึ้น (Juneja, 2002) เมื่อใช้ทั้งกรดและความร้อนร่วมกันจึงทำให้การอัตราการตายของสปอร์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่ปรับกรด

4. ผลของจำนวนสปอร์ตั้งต้น

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการยับยั้งสปอร์ในตัวอย่างหน่อไม้ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นมากและที่มีจำนวนตั้งต้นน้อย พบว่าในตัวอย่างหน่อไม้ที่มีจำนวนสปอร์ตั้งต้นมากต้องใช้เวลาในการยับยั้งสปอร์มากกว่าทั้งการยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes* โดยที่การเพาะจำนวนสปอร์สูงสามารถหาค่า D และ TDT ได้ แต่ในตัวอย่างที่มีการเพาะสปอร์น้อยนั้นไม่สามารถหาค่า D และ TDT ได้ ซึ่งในงานวิจัยของ Mucchetti *et al.* (2008) ได้ศึกษาความแตกต่างของจำนวนเชื้อตั้งต้นของ *Listeria innocua* ต่อการลดลงของเชื้อเมื่อล้างด้วยน้ำที่มีแรงดันน้ำ 3 MPa พบว่าสามารถกำจัดเชื้อที่มีจำนวนมาก (7 Log CFU/g) ได้ 95.92% แต่สามารถกำจัดเชื้อที่มีจำนวนน้อย (2 Log CFU/g) ได้ถึง 99.50% ฉะนั้นก่อนนำหน่อไม้มาทำการต้มควรจะล้างให้หน่อไม้สะอาดปราศจากดินและสิ่งปนเปื้อนต่างๆ เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่อาจปนเปื้อนมากับดิน เพื่อให้ระยะเวลาที่ใช้ต้มหน่อไม้นั้นสามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาอย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด

5. การทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการต้มหน่อไม้ต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์

จากผลการทดลองต้มหน่อไม้ตามเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes* นั้นไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เลยแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาที่ใช้ใน

การดม้นั้นเหมาะสมต่อการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุง เนื่องจากก่อนที่จะบรรจุหน่อไม้รวกดิบลงในถุงนั้นได้ทำการล้างหน่อไม้ด้วยน้ำประปา ก่อน จึงทำให้ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งจากการทดลองที่ได้นั้นชี้ให้เห็นว่าก่อนการผลิตหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงควรจะต้องล้างหน่อไม้ให้สะอาด ไม่ให้มีสิ่งปนเปื้อน โดยเฉพาะดิน เนื่องจากหน่อไม้เจริญเติบโตในดิน อาจมีสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ซึ่งจะทำให้หน่อไม้เกิดการเน่าเสียได้ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ มณฑาทิพย์และคณะ (2550) ได้ทดลองปรับสภาพกรดของหน่อไม้ ใฝ่หยกและใฝ่หวานอย่างขางในถุงเพาะและในขวดแก้วซึ่งมีค่าความเป็นกรดค่าระหว่าง 4.15-4.36 เมื่อตรวจหาจุลินทรีย์พวก Flat sour mesophile และ Flat sour thermophile พบว่าไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่ม

ระยะเวลาน้อยที่สุดที่ใช้ในการต้มตามเวลา 5D ของการยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 ในหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรดคือ 46.65 และ 43.30 นาที ตามลำดับ ส่วนในหน่อไม้ที่ปรับกรดคือ 30.85 และ 29.15 นาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการปรับกรดสามารถลดระยะเวลาในการต้มได้ ทำให้ประหยัดทั้งเวลาและเชื้อเพลิงในการต้มซึ่งสามารถลดต้นทุนในการผลิตได้

6. ผลของการปรับกรดต่อสีของหน่อไม้

เมื่อหน่อไม้ผ่านการปรับกรด ค่า L^* และค่า b^* นั้นเพิ่มขึ้น ซึ่งสรุปได้ว่าหน่อไม้มีสีเหลืองและความสว่างมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรด จากการสังเกตด้วยตาเปล่านั้นพบว่าหน่อไม้ที่ปรับกรดมีสีที่น่านรับประทานมากกว่าหรือมีสีเหลืองและใสมากกว่าหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรดที่มีสีเหลืองและคล้ำเล็กน้อย ซึ่งค่าความสว่าง (L^*) ของหน่อไม้รวกปรับกรดที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่า L ของใฝ่หยกและใฝ่หวานอย่างขางปรับกรดที่บรรจุถุงเพาะ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 74.34 และ 72.50 ตามลำดับ (มณฑาทิพย์ และคณะ, 2550) กาญจนา (2549) พบว่าผลรวมของกรดซิตริกและโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ค่า L , a และ b ของหน่อไม้รวกมีค่ามากกว่าหน่อไม้ที่ไม่ผ่านการปรับกรด

การปรับกรดนั้นนอกจากจะมีประโยชน์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์, ยับยั้งจุลินทรีย์ และลดระยะเวลาในการต้มลงแล้ว จะเห็นได้ว่ายังช่วยปรับปรุงสีของหน่อไม้ให้น่านรับประทานมากยิ่งขึ้นอีกด้วย แต่ยังไม่มียางานใดๆ ที่ศึกษาถึงผลของกรดที่มีผลต่อโครงสร้างของสีเหลืองในหน่อไม้ ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วนั้นกรดจะช่วยให้สีของอาหารและกลิ่นรสของอาหารดีขึ้น เช่นการป้องกันการสีกถั่วหรือปฏิกิริยาสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ผักแห้งหรือผลไม้แห้ง หรือผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้

แปรรูปอื่นๆ กรดจัดเป็น Chelating agents หรือ Sequestrants ซึ่งจะรวมตัวกับไอออนของโลหะที่พบในส่วนประกอบของอาหาร เช่น Mg^{2+} ในองค์ประกอบของคลอโรฟิลล์; Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Mn^{2+} ในเอนไซม์หลายชนิด; Fe^{2+} ใน วง porphyrin ของไมโอโกลบินและฮีโมโกลบิน เมื่อไอออนเหล่านี้ถูกปลดปล่อยออกมาโดยปฏิกิริยาการย่อยสลายต่างๆ จะอยู่ในรูปอิสระ ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี, เกิดกลิ่นหืน, ขุ่น และเปลี่ยนแปลงรสชาติของอาหารได้ สาร Chelating จะเข้าไปรวมตัวกับไอออนเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งจะรักษาสภาพของสี, กลิ่นและรสชาติของอาหารได้ (Lindsay, 2008) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของหน่อไม้รวกต้ม พบว่ามีปริมาณฟอสฟอรัส 40.0 มิลลิกรัมและแคลเซียม 12.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของหน่อไม้รวกต้ม เมื่อหน่อไม้ผ่านการต้มทำให้ฟอสฟอรัสและแคลเซียมถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในรูปอิสระซึ่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของหน่อไม้ให้คล้ำลงในหน่อไม้ที่ไม่ปรับกรด ในขณะที่หน่อไม้ที่ผ่านการปรับด้วยกรดซิตริก ซึ่งกรดซิตริกจัดเป็น Chelating agent หรือ sequestrants สามารถรวมตัวกับฟอสฟอรัสและแคลเซียมในรูปอิสระได้ช่วยป้องกันการทำลายสีของหน่อไม้ได้

7. ผลของอุณหภูมิที่แช่บ่มต่อสีของหน่อไม้

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่า L^* และค่า b^* ก่อนบ่ม, หลังบ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์และหลังบ่ม 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ ค่า L^* และ b^* หลังบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ < บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ < ก่อนบ่ม ซึ่งชี้ให้เห็นได้ว่าหน่อไม้จะมีสีเหลืองลดลง (จากค่า b^* ลดลง) และค่าความสว่างลดลงหรือทำให้สีของหน่อไม้คล้ำลง (จากค่า L^* ลดลง) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของวิลาวรรณ (2550) พบว่าค่าสีของหน่อไม้รวกปรับกรดบรรจุถุงลามิเนตมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิสูงขึ้น (30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส) โดยที่ค่าความสว่าง (L) และค่าสีเหลือง (b) ลดลง แสดงให้เห็นว่าหน่อไม้มีสีที่คล้ำและสีเหลืองของหน่อไม้ลดลงตามระยะเวลาการเก็บและอุณหภูมิที่สูงขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาผลรวมของความร้อนและความเป็นกรดต่างในการทำลายสปอร์ *Bacillus cereus* และ *Clostridium sporogenes* ในผลิตภัณฑ์หน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงที่นิยมผลิตกันในจังหวัดกาญจนบุรี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการผลิตที่ปลอดภัย ซึ่งแสดงด้วยค่าดีแวลู (Decimal Reduction Time; D-value) และเทอร์มอลเดทไทม์ (Thermal death time ; TDT) ของหน่อไม้ที่ปรับสภาพกรด, อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ (90 องศาเซลเซียส/95 องศาเซลเซียส), ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (เล็ก/ใหญ่) และจำนวนสปอร์เริ่มต้น (ต่ำ 10^4 /มิลลิลิตร และสูง 10^8 /มิลลิลิตร) ผลการทดลองพบว่า

1. ระยะเวลา Come-up time เพื่อให้อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้เท่ากับ 90 องศาเซลเซียส มากกว่า 95 องศาเซลเซียส และหน่อไม้ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็กมี Come-up time น้อยกว่าหน่อไม้ขนาดใหญ่ ซึ่งการฆ่าเชื้อหน่อไม้รวกต้มบรรจุถุงควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่ใช้ต้มและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางด้วย
2. การปรับกรดหน่อไม้รวกบรรจุถุงต้องใช้ความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริก (3.5%) มากกว่าหน่อไม้ปืบตามคำแนะนำของ อย. (0.65%) เนื่องจากก่อนการบรรจุปืบมีขั้นตอนการต้มเพื่อกำจัดความขม (Taxiphyllin) ของหน่อไม้ดิบก่อนที่จะปรับกรด แต่ในหน่อไม้บรรจุถุงพลาสติกไม่มีขั้นตอนดังกล่าวจึงต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกรดซิตริกเพื่อให้ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 4.5 ตามคำแนะนำของ อย.
3. การยับยั้งสปอร์ของ *B. cereus* ATCC 11778 และ *C. sporogenes* ATCC 11437 มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันคือ การปรับกรดสามารถยับยั้งสปอร์ได้มากกว่า โดยในหน่อไม้ที่เพาะด้วยจำนวนสปอร์ตั้งต้นสูงมีค่า D และ TDT น้อยกว่าในสถานะที่ไม่ปรับกรด ส่วนหน่อไม้ที่เพาะด้วยจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำในสถานะปรับกรดสามารถยับยั้งสปอร์ได้เร็วกว่าในสถานะไม่ปรับกรด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหน่อไม้ให้ผลชัดเจนในตัวอย่างที่เพาะจำนวนตั้งต้นสปอร์ต่ำ โดยที่หน่อไม้ขนาดใหญ่ใช้เวลาในการยับยั้งสปอร์มากกว่าหน่อไม้ขนาดเล็ก และอุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ที่ 95 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งสปอร์ได้เร็วกว่าที่ 90 องศาเซลเซียส ทั้งในหน่อไม้ที่เพาะด้วยจำนวนสปอร์ตั้งต้นต่ำและสูง

4. การทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยดัดแปลงตามเวลา 5D ที่หาได้จากการยับยั้งสปอร์ของ *B. cereus* ATCC 11778 และ *C. sporogenes* ATCC 11437 โดยจำลองสถานการณ์บ่มตามวิธีการตรวจลักษณะทางกายภาพและชีวภาพของอาหารกระป๋อง พบว่าตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์เลย ทั้งหน่อไม้ที่บ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์และ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ ซึ่งระยะเวลาในการดัดแปลงเพียง 5D เหมาะสมกับการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับหน่อไม้ และระยะเวลาในการดัดแปลงของสภาวะที่ปรับกรดนั้นน้อยกว่าสภาวะไม่ปรับกรดประมาณร้อยละ 40-50

5. การวัดค่าสีของหน่อไม้ก่อนบ่ม, หลังบ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์และหลังบ่ม 55 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ พบว่าหน่อไม้ที่ปรับกรดทำให้ค่าความสว่าง (L^*) และค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b^*) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทั้งสภาวะก่อนบ่มและหลังบ่มทั้ง 2 อุณหภูมิ และเปรียบเทียบระหว่างอุณหภูมิที่ใช้บ่มพบว่าค่า L^* และ b^* ของหน่อไม้หลังบ่มที่ 55 °C นาน 1 สัปดาห์ < บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ < ก่อนบ่ม

6. ในการผลิตหน่อไม้รวกดัดแปลงบรรจุควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการดัดแปลง, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหน่อไม้ที่บรรจุในถุง และควรปรับกรดให้มีค่าความเป็นกรดต่ำกว่า 4.5 นอกจากจะช่วยฆ่าเชื้อและยับยั้งการสร้างสารพิษของเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ได้แล้ว การปรับกรดยังช่วยให้สีของหน่อไม้ไม่รับประทานยิ่งขึ้น และอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาหน่อไม้บรรจุถุงนั้นไม่ควรเก็บที่อุณหภูมิสูงจนเกินไปนอกจากจะเร่งการเน่าเสียแล้วยังทำให้สีของหน่อไม้คล้ำขึ้นไม่รับประทานอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยครั้งนี้เป็นแบบจำลองของหน่อไม้ที่ได้หาสภาวะที่เหมาะสมในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตหน่อไม้รวกดัดแปลงบรรจุที่ปลอดภัย หากจะนำการวิจัยครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์จริงควรจะทำการศึกษาทดลองในผลิตภัณฑ์น้ำหนักรจริงอีกครั้งเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมกับการผลิต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กาญจนา อุดม. 2549. การผลิตหน่อไม้ปรับกรดบรรจุถุงโดยใช้วิธีการถนอมอาหารแบบผสมผสาน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

กองโภชนาการ กรมอนามัย. 2530. ไข่รวก. ไข่ชนิดต่างๆ. แหล่งที่มา:

http://www.rakbankerd.com/agriculture/in_agricultural/sub_agricultural_1.html?sub_id=2359&head=ไข่รวก&click_center=1, 1 ตุลาคม 2551.

กลุ่มระบาดวิทยา สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 1. 2547. ข่าวการระบาดที่น่าสนใจประจำ

สัปดาห์ที่ 47. ข่าวการระบาดที่น่าสนใจประจำสัปดาห์ที่ 47. แหล่งที่มา:

http://www.dpcl.in.th/epidemic/news_47/week47_47.pdf, 1 มีนาคม 2551.

ณรงค์ นิยมวิทย์. 2531. หน่อไม้และผลิตภัณฑ์จากหน่อไม้ ตอนที่ 2 : ผลิตภัณฑ์จากหน่อไม้.

อาหาร 18(1): 183-189.

บุษบา ขงสมิทธิ์. 2540. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ

วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มณฑาทิพย์ ชุ่มฉลาด, มาลัย บุญรัตนกรกิจ, กรุณา วงษ์กระจ่างและ พิสมัย ศรีชาเยช. 2549. การ

ยกระดับการผลิตผลิตภัณฑ์หน่อไม้ในภาชนะบรรจุปิดสนิทเพื่อความปลอดภัยต่อการบริโภค. (รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์). สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มณฑาทิพย์ ชุ่มฉลาด, สิริพร สธนเสาวภาคย์, รัศมี ศุกศรี และ งามจิต โลวิฑูร. 2550. การแปรรูป

หน่อไม้จากไผ่บนที่สูง : หน่อไม้ปรับกรดในภาชนะบรรจุปิดสนิท. วารสารวนศาสตร์ 26: 1-12.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2549. หน่อไม้ต้ม (มผช. 1165/2549). กรุงเทพฯ: สำนักงานมาตรฐาน

ผลิตภัณฑ์กระทรวงอุตสาหกรรม.

ระบบเฝ้าระวังทางระบาดวิทยา สำนักระบาดวิทยา กองควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข. 2549.

โรคอาหารเป็นพิษ. โรคอาหารเป็นพิษ. แหล่งที่มา: www.epid.moph.go.th, 22 พฤศจิกายน 2550.

วิลาวรรณ ชำนาญ. 2550. กระบวนการผลิตหน่อไม้ปรับกรดบรรจุถุงลามิเนตและการศึกษาอายุการเก็บรักษา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิไล รังสาดทอง. 2546. เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค. 2549. หน่อไม้ป๊อป พืชแรงถึงตาย. ก้าวทันโรค. แหล่งที่มา: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_3_001c.asp?info_id=1024, 22 พฤษภาคม 2549.

ส่วนปลูกป่าภาคเอกชน. มมป. ไร่รวก. ไร่. แหล่งที่มา:

<http://www.forest.go.th/Private/bamboo7.htm>, 20 เมษายน 2550.

สุทัศน์ เดชวิสิทธิ์. 2544. ความรู้เกี่ยวกับการปลูกไม้ไผ่. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์เกษตรสาส์น. นนทบุรี.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขและสถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. ม.ป.ป. คู่มือวิธีการผลิตอาหารที่บรรจุในภาชนะปิดสนิทสำหรับกลุ่มแม่บ้านเกษตรกร. ม.ป.ท.

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed. WAVERLY PRESS, INC., USA.

Carpenter, P.L. 1967. **Microbiology**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders.

- Collin, M.D., P.A. Lawson, A. Willems, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe and J.A.E. Farrow. 1994. The Phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44: 812-826.
- Deshpande, S.S. 2002. **Handbook of Food Toxicology**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Food Standards Australia New Zealand. 2003. **Advice on the preparation of cassava and bamboo shoots**. Draft assessment report proposal P257. Available Source: www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/28_Cyanogenic_glycosides.pdf, November 20, 2007.
- Gaillard, S., I. Leguerinel and P. Mafart. 1998. Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. **Food Microbiol.** 15: 625-630.
- Granum, P.E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.** 76: 61S-66S.
- Granum, P.E. and T.C. Baird-Parker. 2000. *Bacillus* species., pp. 1029-1039. In Lund, B.M., T.C. Baird-Parker and G.W. Gould, eds. **The Microbiological Safety and Quality of Food**. Aspen Publishers, Inc. U.S.A.
- Griffiths, M.W. and H. Schraft. 2002. *Bacillus cereus* Food Poisoning, pp. 261-270. In Cliver, D.O. and H.P. Riemann, eds. **Foodborne Disease**. ELSEVIER SCIENCE, LTD., New York.
- Gould, G.W. and G.J. Dring. 1975. Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. **Nat.** 258: 402-405.

- Iurlina, M.O., I.S. Amelia, R.F. Sandra and F. Rosalia. 2006. Prevalence of *Bacillus* spp. In different food products collected in Argentina. **LWT**. 39: 105-110.
- Jay, M.J., M.J. Loessner and D.A. Golden. 2005. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. Springer Science Business Media, Inc. New York.
- Juneja, V.K. 2002. Thermal inactivation of microorganisms, pp. 13-53. In Juneja, V.K. and J.N. Sofos, eds. **Control of Foodborne Microorganism**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Kramer, J.M. and R.J. Gilbert. 1989. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. pp. 21-70. In Doyle, M.P., ed. **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Leguerinel, I. and P. Mafart. 2001. Modelling the influence of pH and organic acid type on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. **Int. J. Food Microbiol.** 63: 29-34.
- Lindsay, R.C. 2008. Food Additives. pp. 689-749. In Damodaran, S., K.L. Parkin and O.R. Fennema, eds. **Food Chemistry**. 4th ed. Tayler & Francis Group, LLC., New York.
- Look for chemical. 2008. **(R)-p-Hydroxymandelonitrile-D-glucopyranoside**. Look chem. Available Source: <http://www.lookchem.com/cas-214/21401-21-8.html>, March 28, 2008.
- Mandigan, M.T., J.M. Martinko and J. Parker. 2003. **Brock Biology of Microorganisms**. 10th ed. Pearson Education, Inc., U.S.A.
- Maria, I.B., I.T. Laura and R.A. Fernandez. 2008. Presence of *Clostridium botulinum* spores in *Matricaria chamomilla* (chamomile) and its relationship with infant botulism.. **Int. J. Food Microbiol.** 121: 357-360.
- Mazas, M., M. Lopez, I. Gonzalez, J. Gonzalez, A. Bernardo and R. Martin. 1997. Effects of the heating medium pH on heat resistance of *Bacillus cereus* spores. **J. Food Saf.** 18: 25-36.

- Moussa-Boudjema, B., J. Gonzalez and M. Lopez. 2006. Heat resistance of *Bacillus cereus* spores in carrot extract acidified with different acidulants. **Food Control**. 17: 819-824.
- Mucchetti, G., B. Bonvini, S. Francolino, E. Neviani and D. Carminati. 2008. Effect of washing with a high pressure water spray on removal of *Listeria innocua* from Gorgonzola cheese rind. **Food Control**. 19: 521-525.
- Ocio, M.J., T. Sanchez, P.S. Fernandez, M. Roddrigo and A. Martinez. 1994. Thermal resistance characteristics of PA 3679 in the temperature range of 110-121 °C as affected by pH, type of acidulant and substrate. **Int. J. Food Microbiol**. 22: 239-247.
- Okereke, O., R.B. Beelman, S. Doores and R. Walsh. 1990. Elucidation of the mechanism of the acid-blanch and EDTA process inhibition of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores. **J. Food Sci**. 55: 1137-1142.
- O'Leary, W.M. 1989. **Practical Handbook of Microbiology**. 2nd ed. CRC PRESS, Inc., New York.
- Ozlem K., G. Muammer, O. Haydar and K. Ahmet. 2006. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in turkey. **Food Control** 17: 222-224.
- Paul, G.L. 2002. Characteristics of spore-forming bacteria, p. 418. In Chis, B. and K. Alec, eds. **Foodborne Pathogens**. CRC PRESS, LLC., USA.
- Rajkowski, K.T. and J.L. Smith. 2001. Update: Food Poisoning and Other Diseases Induced by *Bacillus cereus*, pp.61-76. In Hui, Y.H., M.D. Pierson and J.R. Gorham, eds. **Foodborne Disease Handbook**. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Rajkowski, K.T. and R.W. Bennett. 2003. *Bacillus cereus*, pp. 27-39. In Miliotis, M.D. and J.w. Bier, eds. **International Handbook of Foodborne Pathogens**. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Setlow, B., C.A. Loshon, P.C. Genest, A.E. Cowan, C. Setlow and P. Setlow. 2002. Mechanism of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. **J. Appl. Microbiol.** 92: 362-375.
- Setlow, P. and E.A. Johnson. 2007. Spores and their Significance, pp.35-67. *In* Doyle, M.P., L.R. Beuchat, eds. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. ASM Press, Washington D.C.
- Shinagawa, K. 1993. Serology and characterization of *Bacillus cereus* in relation to toxin production. **Bull. Int. Dairy Fed.** 287: 42-49.
- Speijers, G. 2007. **Cyanogenic glycosides**. Inchem. Available Source: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je18.htm>, April 28, 2007.
- Talaro, K.P. 2008. **Foundations in Microbiology**. 6th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York.
- Valero, M., L.A. Hernandez-Herrero, P.S. Fernandez and M.C. Salmeron. 2002. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. **J. Food Microbiol.** 19: 491-499.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Dextrose Tryptone Broth

Pancreatic digest of casein	10.0	g.
Glucose	5.0	g.
Bromcresol purple	0.04	g.

ปรับ pH สุดท้ายให้เท่ากับ 6.9 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำ 1 ลิตรให้ความร้อนจนเดือดในอ่างควบคุมอุณหภูมิและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

2. Fluid Thioglycollate Medium

Peptone from casein	15.0	g.
Yeast Extract	5.0	g.
D(+) glucose	5.5	g.
L-cystine	0.5	g.
Sodium Chloride	2.5	g.
Sodium Thioglycollate	0.5	g.
Resazurin sodium	0.001	g.
Agar-agar	0.75	g.

ละลาย 30 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดในอ่างควบคุมอุณหภูมิ แบ่งใส่หลอดและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ($\text{pH } 7.1 \pm 0.2$ at 25°C)

3. Nutrient Agar

Beef extract	3.0	g.
Peptone	5.0	g.
Agar	15.0	g.

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำ 1 ลิตรให้ความร้อนจนเดือดในอ่างควบคุมอุณหภูมิและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที

4. Nutrient Broth

Beef extract	3.0	g.
--------------	-----	----

Peptone	5.0	g.
---------	-----	----

ปรับ pH เป็น 6.8-7.0

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำ 1 ลิตรให้ความร้อนจนเดือดในอ่างควบคุมอุณหภูมิและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที

5. Orange Serum Broth

Tryptone	10.0	g.
----------	------	----

Yeast Extract	3	g.
---------------	---	----

Glucose	4	g.
---------	---	----

Dipotassium phosphate	3	g.
-----------------------	---	----

Orange serum	200	ml.
--------------	-----	-----

Distilled water	800	ml.
-----------------	-----	-----

ปรับ pH สุดท้ายให้เท่ากับ 5.5 ± 0.2 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ซึ่งส่วนประกอบอาหารทั้งหมด เติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ต้มอาหารจนเดือดและคนจนสารอาหารหลอมเป็นเนื้อเดียวกัน เติม Orange serum 200 มิลลิลิตร ผสมกันให้ทั่ว นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 13 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาริบนำออกจากหม้อนึ่งทันที

วิธีการเตรียม Orange serum

คั้นน้ำส้มสด 1 ลิตร ให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิประมาณ 93 องศาเซลเซียส เติม filter aid 30 กรัม ผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรองแบบหยาบ จะได้ Orange serum ตามต้องการ

6. Reinforced Clostridial Medium (RCM)

Meat Extract	10.0	g.
Peptone from casein	10.0	g.
Yeast Extract	3.0	g.
D(+) glucose	5.0	g.
Starch	1.0	g.
Sodium chloride	5.0	g.
Sodium acetate	3.0	g.
L-cysteinium chloride	0.5	g.
Agar-agar	12.5	g.

ละลาย 50 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดในอ่างควบคุมอุณหภูมิและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที (pH 6.8± 0.2 at 25 °C)

7. Tryptic Soy Agar

Peptone from casein	17.0	g.
Peptone from soymeal	3.0	g.
D (+) glucose	2.5	g.
Sodium chloride	5.0	g.
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	g.
Agar	15	g.

ละลาย 50 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดในอ่างควบคุมอุณหภูมิและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข
ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 แสดงการบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ขนาด
เล็กถึง 90 องศาเซลเซียส

นาฬิกาที่	อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (°C)							
	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 4	ชั่วโมงที่ 5	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 7	ชั่วโมงที่ 8
0	29.7	29.7	29.7	29.8	29.7	29.8	29.7	29.8
2	34.4	36.9	34	38.9	35.1	34.3	33.2	34.1
4	46.3	48.4	47.9	52	47.2	47.7	47	47
6	58.2	59.3	59.4	64.9	57.1	58.4	59.1	58.7
8	68.6	68.1	68.5	72.8	68	69.1	64.5	66.1
10	74.1	73.9	75	79.1	73.5	74.9	69.1	72.2
12	79.4	79.6	80.6	84.1	80.1	81.1	77	78.9
14	82.9	83.4	84.4	86.9	83.7	85.7	79.8	80.9
16	85.2	86	87.6	89	85.1	87.8	85.7	83.5
18	87	87.4	89.1	89.7	87.7	89	87.7	87.1
20	88.1	88.6	89.6	89.9	88.7	89.4	89.3	88.4
22	89.1	89.3	89.7	90	89	89.8	89.5	89
24	89.6	89.8	90.2	90.2	89.6	90.3	89.9	89.4
26	90.2	90.1	91	90.9	89.9	90.5	90.2	90.2
28	90.8	90.4	91.3	91.1	90.2	90.7	90.8	90.3
30	91.2	90.6	91.5	91.5	90.5	90.9	91.2	90.7
32	91.5	90.9	91.6	91.6	90.8	90.9	91.3	90.9
34	91.8	91	91.7	91.7	91.2	90.9	91.5	91.2
36	91.9	91.1	92	91.9	91.4	90.9	91.5	91.3
38	91.9	91.1	92.1	91.9	91.6	90.9	91.5	91.3
40	91.9	91.1	92.1	91.9	91.8	90.9	91.5	91.3
42	91.9	91.1	92.1	91.9	91.8	90.9	91.5	91.3
Come-up time (นาฬิกาที่)	25.08	25.00	22.37	21.57	26.49	23.21	25.44	25.27

ตารางผนวกที่ ข2 แสดงการบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ขนาด
เล็กถึง 95 องศาเซลเซียส

นาทีที่	อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (°C)							
	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 4	ชั่วโมงที่ 5	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 7	ชั่วโมงที่ 8
0	27.9	29.7	29.7	29.6	29.7	29.7	29.8	29.8
2	32.2	37	37.1	39.5	39	37	36.4	36
4	46.8	50	49.5	58	52.6	48.7	47.9	49
6	59.8	61.9	60.3	70.1	66.1	60.8	61	61.1
8	70.1	71	68.9	77.2	75.6	70.9	68.1	67.2
10	78.1	78.2	75.8	83.5	83.5	74.2	74.3	75.1
12	84.3	83.5	81.1	87.7	88.3	79.1	81.1	78.3
14	88.5	87.5	85.9	90.8	91	84.7	84.9	81.4
16	91.5	90.3	88.5	93	93.1	87.3	86.5	85.5
18	93.6	92.5	90.6	94.3	94.2	89.2	88.7	88.9
20	94.5	94	92.3	95.1	95.2	92.1	90.1	91.7
22	95.1	95.1	94.5	95.6	95.5	94.6	93.4	93.4
24	95.5	95.9	95.2	96.1	95.8	95.2	94.5	94.6
26	96	96.4	96	96.3	96	95.8	95.4	95.4
28	96.3	96.7	96.2	96.4	96	96.3	95.7	95.7
30	96.7	96.9	96.3	96.7	96.2	96.7	95.9	95.8
32	96.8	97	96.5	96.9	96.3	97	96.2	95.9
34	96.9	97	96.8	97	96.5	97.1	96.4	96.2
36	97.1	97	97	97	96.5	97.1	96.7	96.4
38	97.1	97	97	97	96.5	97.1	96.9	96.5
40	97.1	97	97	97	96.5	97.1	96.9	96.8
42	97.1	97	97	97	96.5	97.1	96.9	96.8
44	97.1	97	97	97	96.5	97.1	96.9	96.8
Come-up time (นาที)	19.54	21.40	22.30	19.34	19.41	23.51	24.20	24.45

ตารางผนวกที่ ข3 แสดงการบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ขนาด
ใหญ่ถึง 90 องศาเซลเซียส

นาฬิกาที่	อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (°C)							
	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 4	ชั่วโมงที่ 5	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 7	ชั่วโมงที่ 8
0	26.7	26.6	27.7	28.4	28.4	28.4	28.5	28.3
2	28.3	28.4	31.7	29.6	30.3	30	29.5	30
4	32.9	33.4	39.6	38.4	38.6	36.3	36.5	34.5
6	41.2	42	49.1	45.4	46.4	44.1	45.6	41.6
8	49.2	51.5	56.3	53.1	54.6	52.3	54.1	50.1
10	56	58.5	63.5	60.3	63	59.8	61.5	56.8
12	62.1	63.9	68.9	66.5	68	68	67.5	62.8
14	67.5	68.1	73.5	71.8	73	70.9	72.7	68.7
16	72.3	71.9	77.6	76.1	76.7	75.2	76.5	73.9
18	75.6	75.1	81	79.8	80	79.5	79.7	77.8
20	78.4	78.8	83.3	82.4	82.5	81.3	82.6	81.8
22	80.8	80.6	84.9	84.6	84.5	83.3	84.4	84.1
24	82.5	82.9	86.1	86.4	86	84.3	85.3	86
26	83.8	84.8	87	87.4	87.1	85.7	87.2	87.9
28	85	86.2	88	88.2	87.8	86.7	88.4	89
30	85.9	87.5	88.5	88.9	88.6	87.5	88.9	89.1
32	86.5	88.5	89	89.5	89.2	88	89.4	89.5
34	87.2	89.3	89.3	90	89.6	88.6	89.7	89.9
36	87.4	89.8	89.6	90.3	90.1	88.9	90.1	90
38	87.7	90.3	90	90.7	90.4	89.3	90.2	90.2
40	88.1	90.5	90.5	90.9	90.7	89.9	90.3	90.4
42	88.5	90.9	90.8	91.1	90.9	90.4	90.4	90.7
44	89.2	91.1	91	91.2	91.2	90.7	90.5	91
46	89.8	91.2	91.1	91.4	91.4	90.8	90.9	91.2
48	90.3	91.3	91.1	91.4	91.5	90.9	91	91.3
50	91	91.3	91.1	91.4	91.5	90.9	91.1	91.4
52	91	91.3	91.1	91.4	91.5	91.1	91.4	91.4
54	91	91.3	91.1	91.4	91.5	91.1	91.5	91.4

ตารางผนวก ข3 (ต่อ)

นาฬิกา	อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (°C)							
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6	ซ้ำที่ 7	ซ้ำที่ 8
56	91	91.3	91.1	91.4	91.5	91.1	91.5	91.4
Come-up time (นาฬิกา)	46.33	38.00	38.00	34.00	35.20	40.24	35.35	35.49

ตารางผนวกที่ ข4 แสดงการบันทึกอุณหภูมิทุกๆ 2 นาทีเพื่อให้อุณหภูมิจุดกึ่งกลางหน่อไม้ขนาด
ใหญ่ถึง 95 องศาเซลเซียส

นาทีที่	อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (°C)							
	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3	ชั่วโมงที่ 4	ชั่วโมงที่ 5	ชั่วโมงที่ 6	ชั่วโมงที่ 7	ชั่วโมงที่ 8
0	29	28.7	28.9	28.9	28.8	28.9	28.9	28.9
2	31.8	33	32	31.9	31.9	32	31.4	32.1
4	39.4	39.6	42.8	42.5	39.3	41.1	39.7	40.9
6	50.1	52.4	54.9	54.1	47.9	52.7	46.2	53.1
8	59.4	62.9	64.9	65	55.9	63	53.7	62.1
10	67.1	69	72.3	71.9	63.1	68.9	62.1	67.2
12	73.2	75.6	79	78.1	71.8	73.5	70.9	72.9
14	78.6	80.3	83.1	82.5	80.1	80.7	80.9	80.1
16	82.2	84.1	86.7	85.9	83.5	84.5	83.4	84.7
18	85.5	86.8	89.3	88.1	85.7	87.2	85.1	88.3
20	88.3	88.2	91	90.7	89.4	89.1	88.4	89.7
22	90.2	90.5	91.5	91.3	91.7	90.9	89.9	90.6
24	91.6	91.9	92.3	91.9	92.1	92	91.1	91.9
26	92.6	92.9	93.4	93	93.4	93.1	92.6	92.9
28	93.4	94	94.4	93.7	93.9	93.6	93.7	93.4
30	93.9	94.7	94.6	94.3	94.5	94.4	94.2	94.4
32	94.4	95.3	94.9	94.7	94.8	94.9	94.6	94.9
34	94.7	95.9	95.1	95.2	95.3	95.3	94.9	95.2
36	95.1	96.3	95.8	95.6	95.7	95.4	95.2	95.6
38	95.3	96.6	96.1	95.8	95.9	95.7	95.4	95.9
40	95.6	97	96.5	96.1	96.1	95.9	95.7	96.1
42	95.8	97.1	97	96.3	96.4	96.3	96	96.2
44	95.9	97.2	97.1	96.7	96.7	96.5	96.3	96.4
46	96	97.2	97.1	96.8	96.8	96.8	96.7	96.7
48	96	97.2	97.1	96.9	96.8	97	96.9	96.7
50	96	97.2	97.1	96.9	96.8	97	97.1	96.8
52	96.1	97.2	97.1	96.9	96.8	97	97.1	96.8
54	96.2	97.2	97.1	96.9	96.8	97	97.1	96.8

ตารางผนวก ข4 (ต่อ)

นาฬิกาที่	อุณหภูมิใจกลางหน่อไม้ (°C)							
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	ซ้ำที่ 4	ซ้ำที่ 5	ซ้ำที่ 6	ซ้ำที่ 7	ซ้ำที่ 8
56	96.3	97.2	97.1	96.9	96.8	97	97.1	96.8
Come-up time (นาฬิกา)	34.40	30.49	32.15	33.12	33.51	32.08	35.10	32.31

ตารางผนวกที่ ข5 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสละลายกรดซิตริก 0.65% ซ้ำที่ 1

ค่า pH เริ่มต้น ของ 2.5% citric acid = 2.46

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.42	6.36	6.36	6.35	6.31	6.27	6.27
50	6.36	6.31	6.29	6.29	6.25	6.23	6.22
100	6.30	6.28	6.27	6.26	6.22	6.20	6.19
150	6.13	6.10	6.09	6.08	6.06	6.05	6.03
200	6.10	6.08	6.08	6.08	6.04	6.03	6.01
250	5.93	5.94	5.93	5.93	5.91	5.90	5.89
300	5.90	5.87	5.87	5.87	5.83	5.83	5.82
350	5.89	5.91	5.90	5.90	5.86	5.86	5.84
400	5.77	5.79	5.79	5.79	5.76	5.75	5.75
450	5.71	5.76	5.76	5.76	5.73	5.72	5.72
500	5.65	5.70	5.69	5.69	5.66	5.66	5.66

ตารางผนวกที่ ข6 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสละลายกรดซิตริก 0.65% ซ้ำที่ 2

ค่า pH เริ่มต้น ของ 2.5% citric acid = 2.46

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.39	6.37	6.34	6.34	6.30	6.28	6.28
50	6.33	6.32	6.30	6.29	6.25	6.23	6.23
100	6.22	6.25	6.21	6.21	6.16	6.15	6.15
150	6.13	6.18	6.15	6.14	6.11	6.09	6.08
200	6.03	6.09	6.07	6.07	6.02	6.01	6.01
250	5.93	5.98	5.96	5.95	5.90	5.90	5.90
300	5.88	5.94	5.92	5.90	5.86	5.86	5.86
350	5.80	5.85	5.84	5.83	5.81	5.81	5.80
400	5.74	5.77	5.77	5.76	5.75	5.75	5.74
450	5.64	5.70	5.69	5.69	5.66	5.66	5.65
500	5.61	5.64	5.64	5.62	5.61	5.60	5.60

ตารางผนวกที่ ข7 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 0.65% ซ้ำที่ 3

ค่า pH เริ่มต้น ของ 2.5% citric acid = 2.46

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.38	6.40	6.40	6.39	6.39	6.38	6.38
50	6.35	6.34	6.32	6.32	6.31	6.31	6.31
100	6.26	6.29	6.24	6.24	6.24	6.23	6.22
150	6.19	6.21	6.20	6.20	6.20	6.19	6.19
200	6.09	6.13	6.12	6.12	6.11	6.09	6.09
250	5.94	5.97	5.95	5.95	5.94	5.93	5.92
300	5.89	5.91	5.89	5.89	5.88	5.87	5.87
350	5.85	5.87	5.85	5.84	5.84	5.83	5.83
400	5.74	5.77	5.74	5.73	5.73	5.73	5.73
450	5.70	5.72	5.69	5.69	5.69	5.68	5.68
500	5.63	5.65	5.64	5.63	5.63	5.62	5.62

ตารางผนวกที่ ข8 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 2.5% ซ้ำที่ 1

ค่า pH เริ่มต้น ของ 2.5% citric acid = 2.39

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.24	6.27	6.21	6.20	6.20	6.15	6.14
50	5.95	6.02	6.01	6.01	6.01	5.97	5.97
100	5.59	5.82	5.79	5.79	5.79	5.76	5.75
150	5.36	5.62	5.61	5.62	5.62	5.60	5.59
200	5.10	5.50	5.49	5.49	5.48	5.45	5.45
250	5.08	5.42	5.39	5.37	5.36	5.34	5.33
300	5.07	5.12	5.11	5.11	5.08	5.06	5.07
350	5.00	5.07	5.05	5.06	5.06	5.03	5.04
400	4.81	4.90	4.88	4.89	4.89	4.87	4.88
450	4.79	4.81	4.80	4.80	4.79	4.79	4.80
500	4.76	4.79	4.79	4.78	4.77	4.77	4.76

ตารางผนวกที่ ข9 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 2.5% ซ้ำที่ 2

ค่า pH เริ่มต้น ของ 2.5% citric acid = 2.39

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.20	6.24	6.23	6.23	6.21	6.21	6.21
50	5.90	5.93	5.91	5.91	5.90	5.90	5.89
100	5.62	5.65	5.64	5.63	5.63	5.62	5.61
150	5.41	5.43	5.43	5.42	5.42	5.42	5.40
200	5.20	5.22	5.21	5.20	5.20	5.20	5.19
250	5.11	5.13	5.12	5.12	5.11	5.11	5.11
300	5.05	5.08	5.08	5.07	5.06	5.06	5.06
350	5.02	5.05	5.05	5.04	5.03	5.03	5.02
400	4.81	4.83	4.82	4.82	4.82	4.81	4.80
450	4.79	4.84	4.82	4.80	4.78	4.78	4.77
500	4.75	4.77	4.77	4.76	4.75	4.75	4.74

ตารางผนวกที่ ข10 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 2.5% ซ้ำที่ 3

ค่า pH เริ่มต้น ของ 2.5% citric acid = 2.39

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.26	6.29	6.28	6.28	6.27	6.26	6.25
50	6.13	6.14	6.14	6.13	6.12	6.12	6.12
100	5.94	5.96	5.94	5.93	5.93	5.92	5.91
150	5.86	5.89	5.88	5.87	5.87	5.86	5.86
200	5.69	5.71	5.71	5.70	5.69	5.69	5.67
250	5.47	5.49	5.49	5.48	5.47	5.47	5.47
300	5.31	5.34	5.33	5.33	5.32	5.31	5.30
350	5.21	5.22	5.21	5.21	5.20	5.20	5.19
400	5.09	5.12	5.11	5.11	5.10	5.08	5.08
450	4.90	4.92	4.92	4.91	4.91	4.90	4.88
500	4.81	4.82	4.81	4.81	4.80	4.80	4.79

ตารางผนวกที่ ข11 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.0% ซ้ำที่ 1

ค่า pH เริ่มต้น ของ 3.0% citric acid = 2.30

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.24	6.26	6.24	6.24	6.23	6.23	6.22
50	5.79	5.81	5.80	5.80	5.79	5.78	5.77
100	5.48	5.52	5.52	5.51	5.50	5.49	5.49
150	5.28	5.31	5.30	5.30	5.29	5.27	5.27
200	5.08	5.13	5.13	5.12	5.12	5.12	5.12
250	4.95	4.98	4.97	4.97	4.96	4.96	4.95
300	4.83	4.85	4.85	4.84	4.82	4.82	4.81
350	4.75	4.76	4.77	4.74	4.74	4.74	4.73
400	4.70	4.73	4.73	4.73	4.72	4.71	4.69
450	4.49	4.52	4.49	4.49	4.49	4.47	4.47
500	4.44	4.46	4.47	4.45	4.45	4.44	4.43

ตารางผนวกที่ ข12 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.0% ซ้ำที่ 2

ค่า pH เริ่มต้น ของ 3.0% citric acid = 2.30

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.20	6.23	6.20	6.19	6.17	6.18	6.18
50	5.74	5.77	5.77	5.74	5.73	5.72	5.71
100	5.42	5.50	5.49	5.48	5.48	5.48	5.46
150	5.14	5.21	5.21	5.21	5.22	5.21	5.21
200	4.89	4.92	4.90	4.89	4.89	4.88	4.88
250	4.76	4.82	4.81	4.80	4.80	4.80	4.80
300	4.68	4.80	4.80	4.79	4.79	4.79	4.78
350	4.45	4.49	4.50	4.51	4.52	4.52	4.52
400	4.42	4.46	4.44	4.44	4.44	4.43	4.43
450	4.38	4.41	4.41	4.40	4.40	4.40	4.40
500	4.38	4.42	4.41	4.40	4.40	4.40	4.40

ตารางผนวกที่ ข13 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.0% ซ้ำที่ 3

ค่า pH เริ่มต้น ของ 3.0% citric acid = 2.30

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.22	6.24	6.23	6.23	6.22	6.21	6.20
50	5.74	5.76	5.76	5.74	5.73	5.72	5.72
100	5.44	5.45	5.43	5.43	5.42	5.42	5.42
150	5.26	5.28	5.25	5.25	5.25	5.25	5.24
200	4.96	4.97	4.96	4.96	4.95	4.95	4.95
250	4.86	4.87	4.84	4.84	4.83	4.83	4.83
300	4.77	4.79	4.77	4.77	4.75	4.75	4.75
350	4.64	4.65	4.64	4.64	4.63	4.63	4.62
400	4.54	4.57	4.57	4.57	4.56	4.56	4.56
450	4.47	4.48	4.47	4.47	4.46	4.46	4.45
500	4.45	4.46	4.44	4.44	4.44	4.43	4.42

ตารางผนวกที่ ข14 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.5% ซ้ำที่ 1

ค่า pH เริ่มต้น ของ 3.5% citric acid = 2.28

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.34	6.22	6.23	6.20	6.20	6.20	6.19
50	5.76	5.73	5.73	5.73	5.72	5.72	5.72
100	5.47	5.41	5.41	5.41	5.41	5.41	5.41
150	5.14	5.13	5.13	5.14	5.14	5.14	5.14
200	4.93	4.91	4.91	4.91	4.91	4.91	4.90
250	4.80	4.78	4.78	4.78	4.78	4.77	4.77
300	4.69	4.67	4.67	4.67	4.67	4.67	4.67
350	4.59	4.58	4.58	4.58	4.58	4.58	4.58
400	4.26	4.26	4.25	4.25	4.25	4.25	4.25
450	4.23	4.22	4.22	4.22	4.22	4.21	4.21
500	4.15	4.16	4.17	4.17	4.17	4.16	4.16

ตารางผนวกที่ ข15 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.5% ซ้ำที่ 2

ค่า pH เริ่มต้น ของ 3.5% citric acid = 2.28

ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.32	6.21	6.21	6.19	6.18	6.18	6.17
50	5.63	5.62	5.62	5.62	5.62	5.62	5.61
100	5.16	5.18	5.18	5.18	5.18	5.17	5.17
150	4.96	4.97	4.97	4.96	4.96	4.96	4.96
200	4.81	4.83	4.82	4.82	4.82	4.82	4.82
250	4.61	4.64	4.64	4.63	4.63	4.62	4.62
300	4.49	4.49	4.49	4.49	4.49	4.48	4.48
350	4.47	4.48	4.47	4.45	4.45	4.44	4.44
400	4.32	4.32	4.33	4.33	4.33	4.33	4.33
450	4.20	4.22	4.22	4.22	4.22	4.21	4.21
500	4.17	4.15	4.15	4.15	4.15	4.15	4.14

ตารางผนวกที่ ข16 การปรับกรดหน่อไม้โดยใช้ น้ำส้มสายชูรสด้วยสารละลายกรดซิตริก 3.5% ซ้ำที่ 3

ค่า pH เริ่มต้น ของ 3.5% citric acid = 2.28

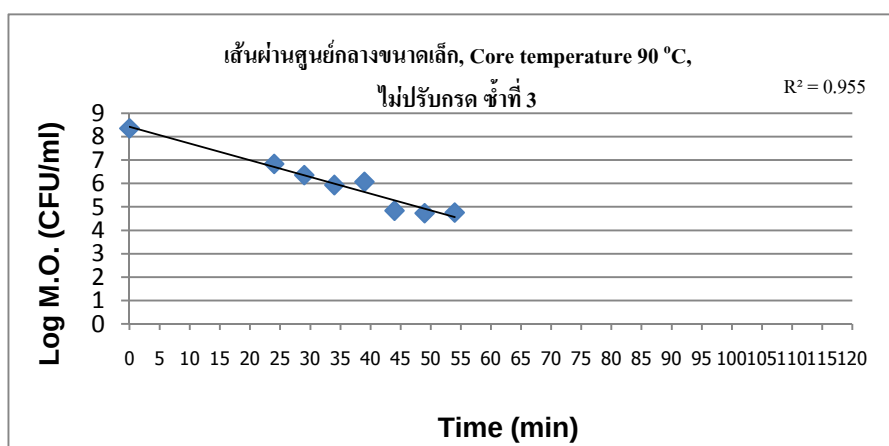
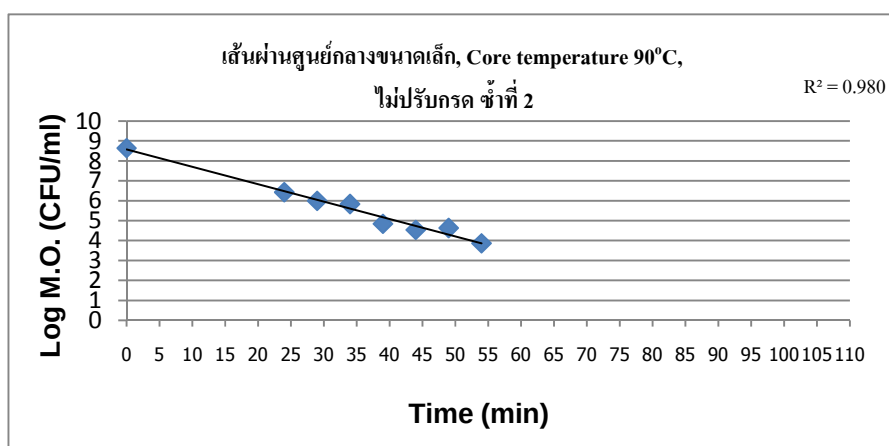
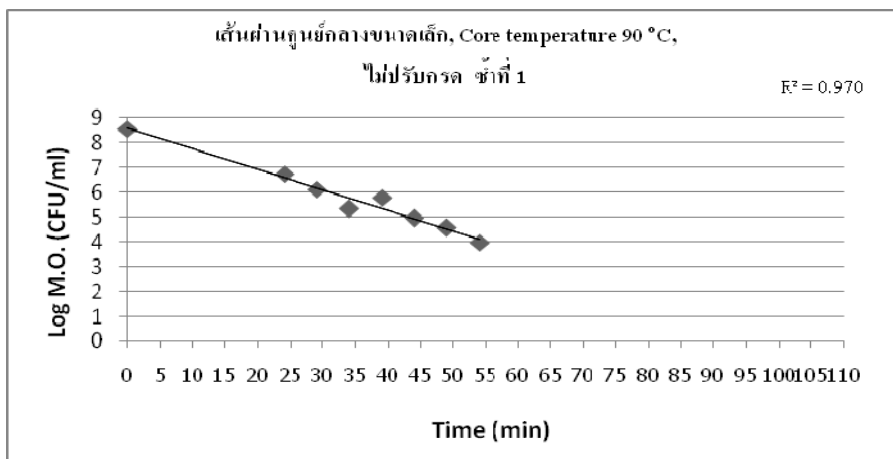
ปริมาณของ สารละลาย ซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เมื่อเวลาผ่านไป						
	0 นาที	30 นาที	60 นาที	90 นาที	120 นาที	150 นาที	180 นาที
0	6.33	6.29	6.25	6.23	6.20	6.20	6.19
50	5.79	5.81	5.78	5.78	5.78	5.78	5.77
100	5.55	5.58	5.57	5.58	5.58	5.58	5.58
150	5.24	5.26	5.25	5.24	5.24	5.24	5.24
200	4.99	5.00	4.98	4.97	4.97	4.97	4.96
250	4.74	4.74	4.73	4.73	4.72	4.72	4.72
300	4.51	4.52	4.50	4.50	4.50	4.49	4.49
350	4.49	4.49	4.48	4.48	4.47	4.46	4.46
400	4.34	4.36	4.33	4.33	4.33	4.33	4.32
450	4.21	4.22	4.20	4.19	4.18	4.18	4.18
500	4.12	4.13	4.11	4.11	4.11	4.11	4.10

ตารางผนวกที่ ข17 แสดงค่าความเป็นกรดต่างเฉลี่ยของน้ำหน่อไม้คั้นสดเมื่อปรับด้วยสารละลาย กรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.65%, 2.5%, 3.0% และ 3.5% เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที

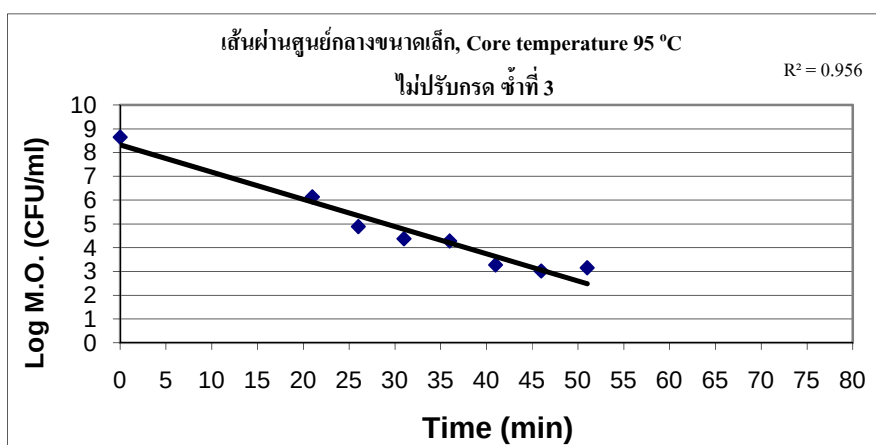
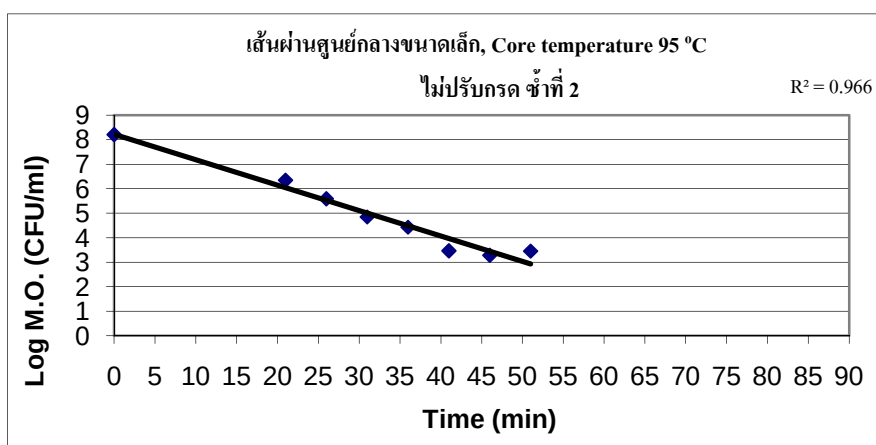
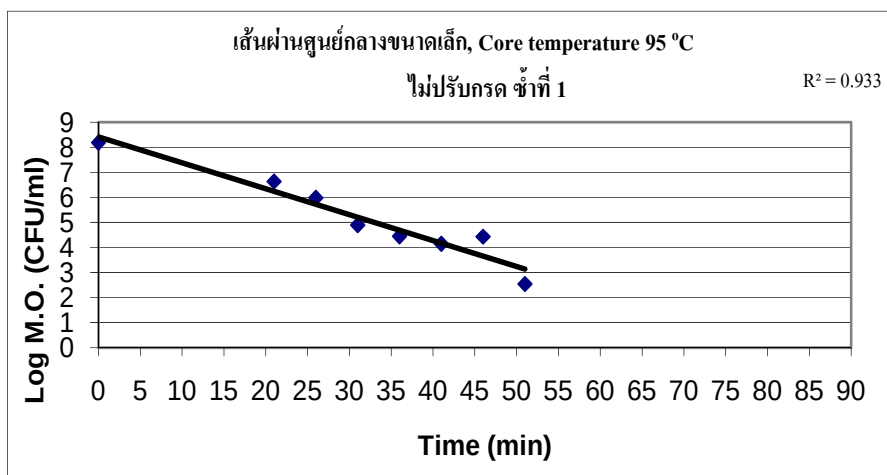
ปริมาณของ สารละลายซิตริก (ไมโครลิตร)	ค่า pH เฉลี่ยเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที			
	0.65%	2.5%	3.0%	3.5%
	Citric acid	Citric acid	Citric acid	Citric acid
0	6.31	6.20	6.20	6.18
50	6.25	5.99	5.73	5.70
100	6.19	5.76	5.46	5.39
150	6.10	5.62	5.24	5.11
200	6.04	5.44	4.98	4.89
250	5.90	5.30	4.86	4.70
300	5.85	5.14	4.78	4.55
350	5.82	5.08	4.62	4.49
400	5.74	4.92	4.56	4.30
450	5.68	4.82	4.44	4.20
500	5.63	4.76	4.42	4.13

ภาคผนวก ค
กราฟอัตราการรอดชีวิต

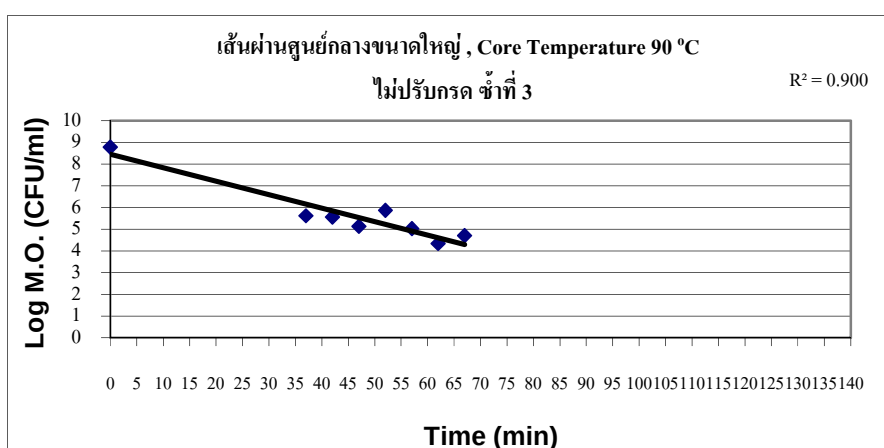
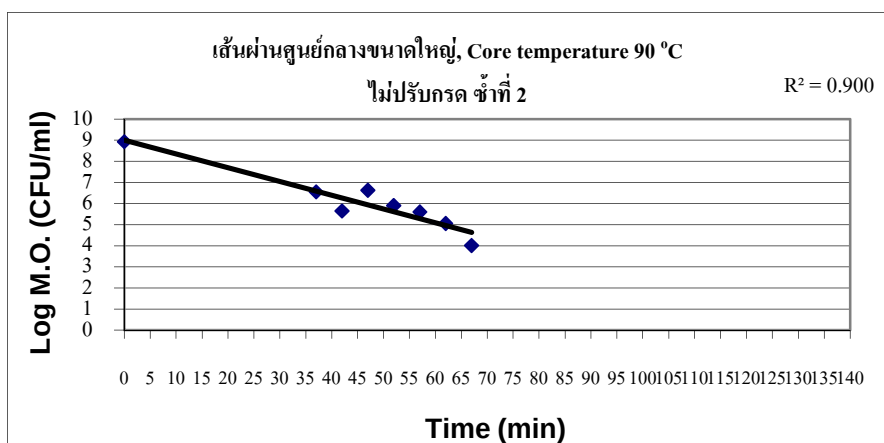
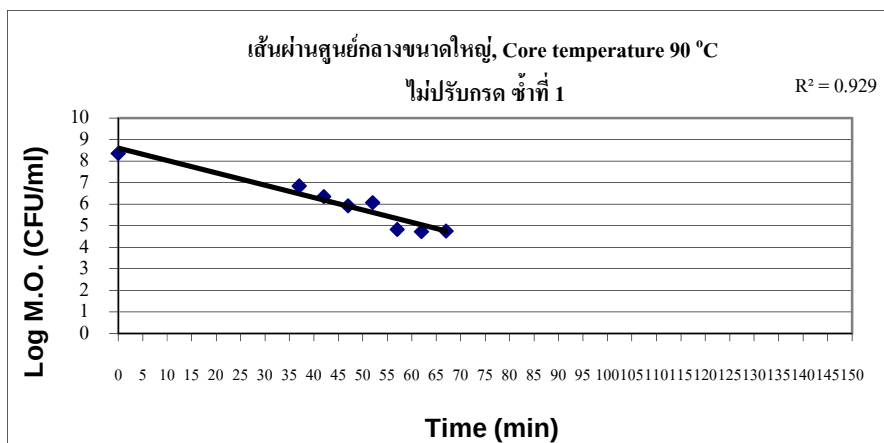
ภาพผนวกที่ ค1 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด



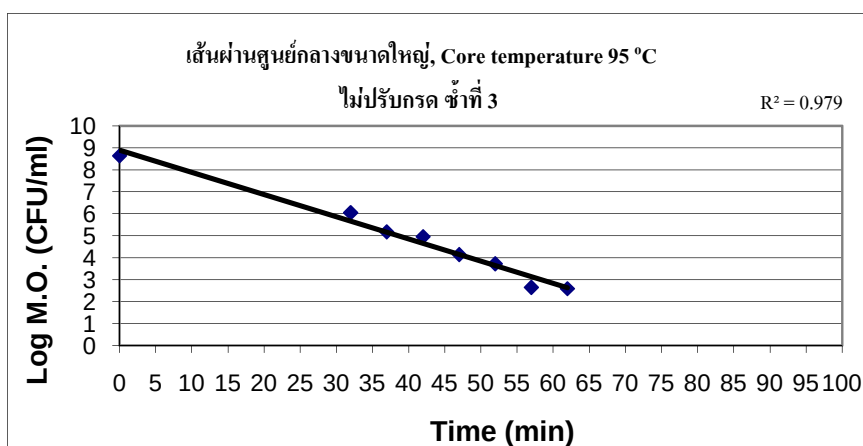
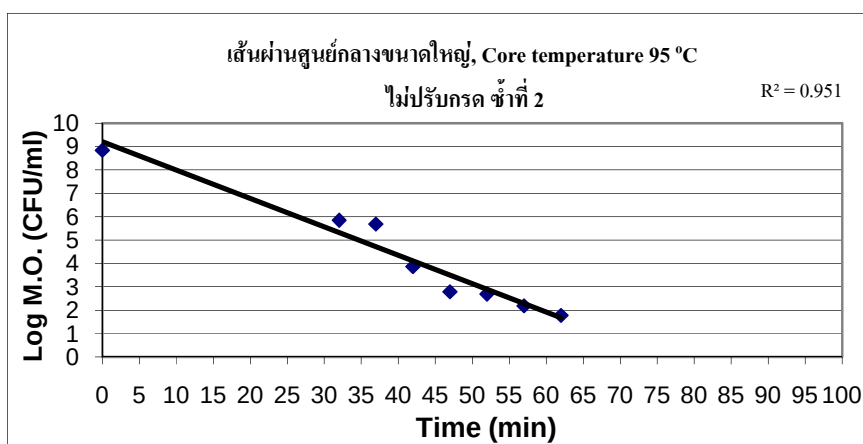
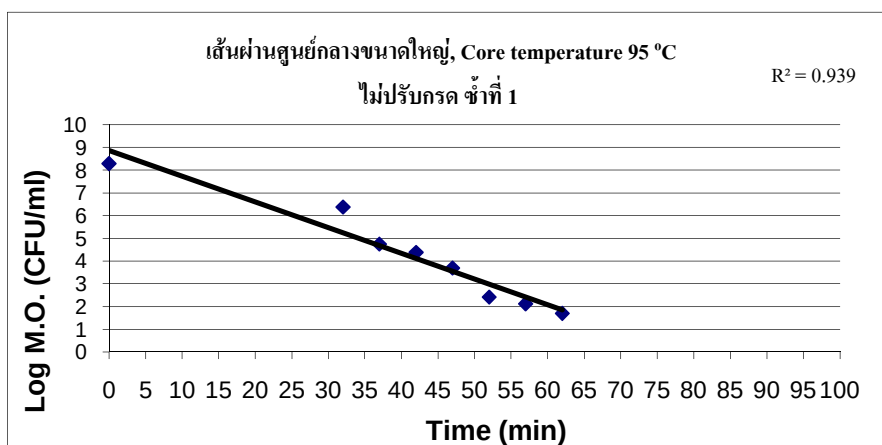
ภาพผนวกที่ ค2 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด



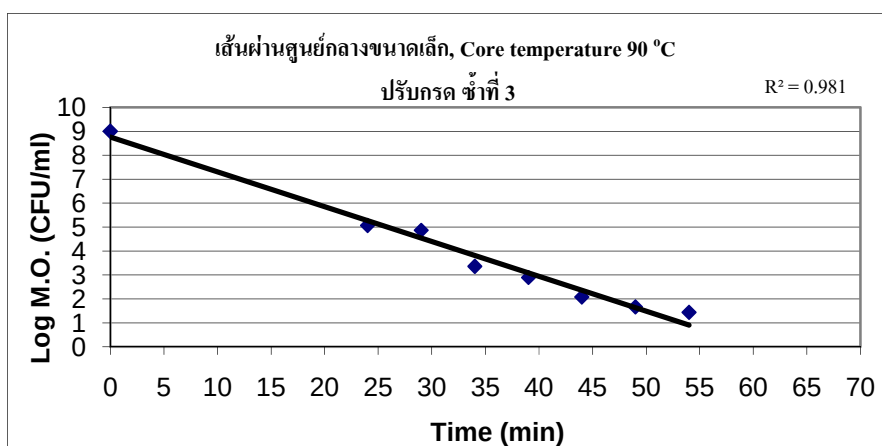
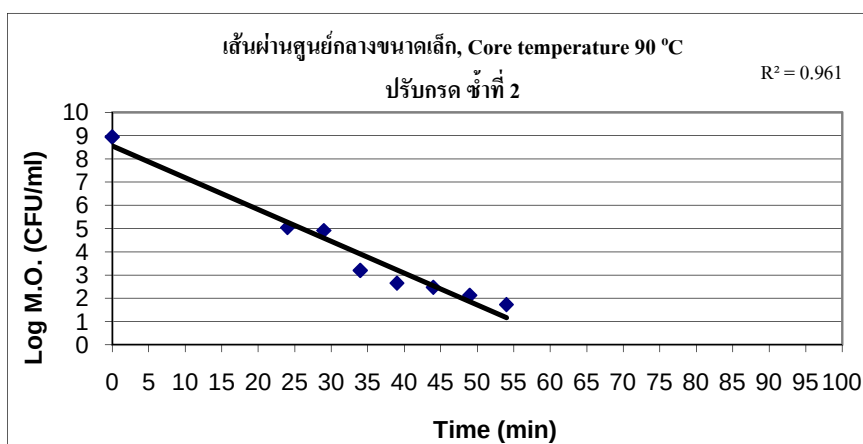
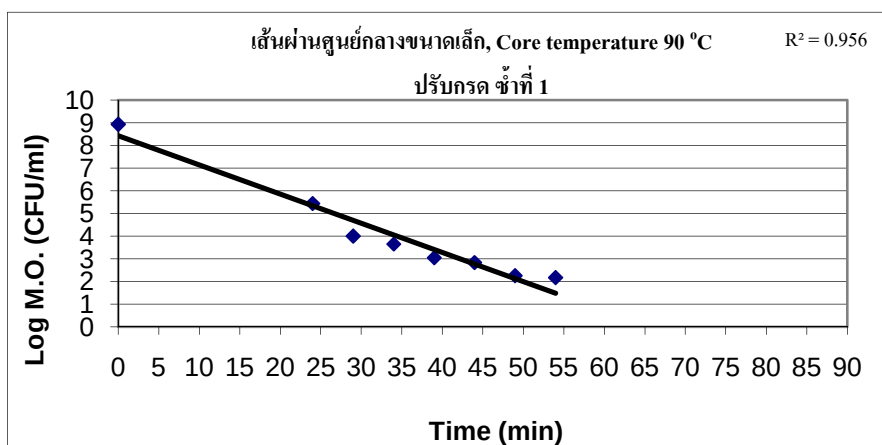
ภาพผนวกที่ ค3 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลาง
ขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด



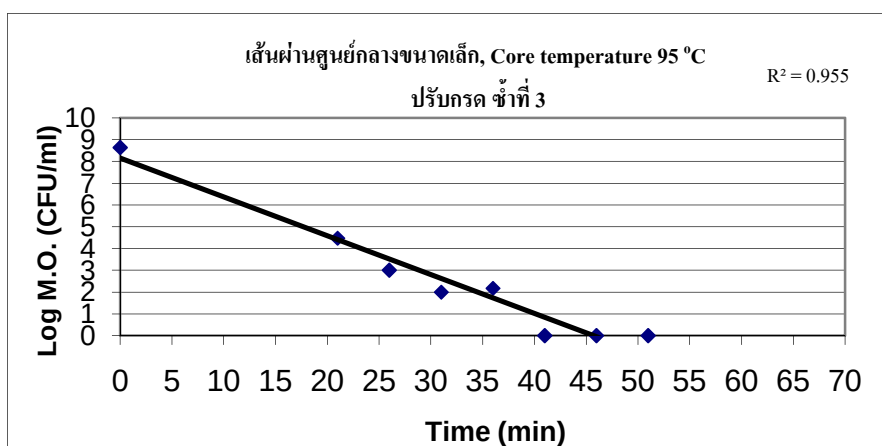
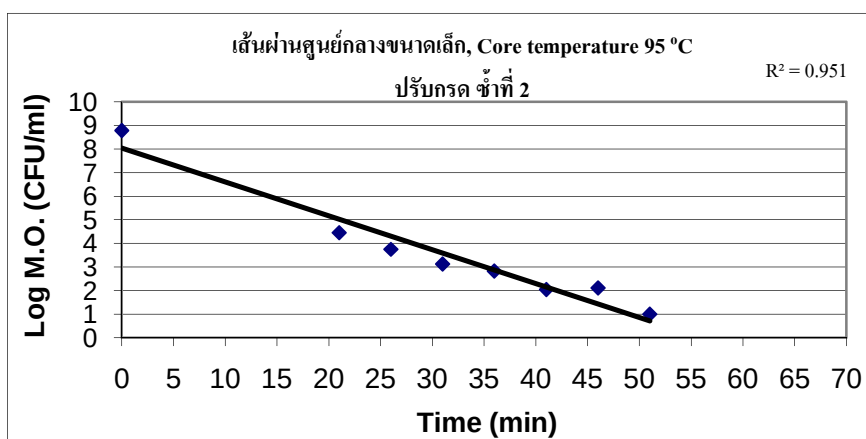
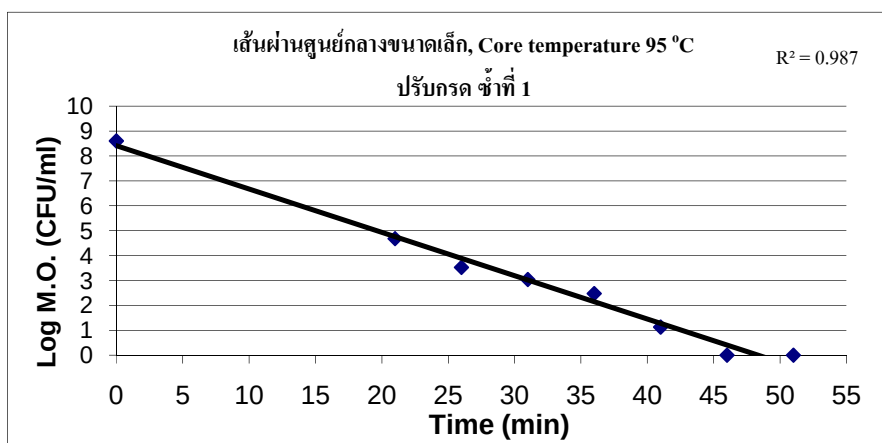
ภาพผนวกที่ ค4 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลาง
ขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด



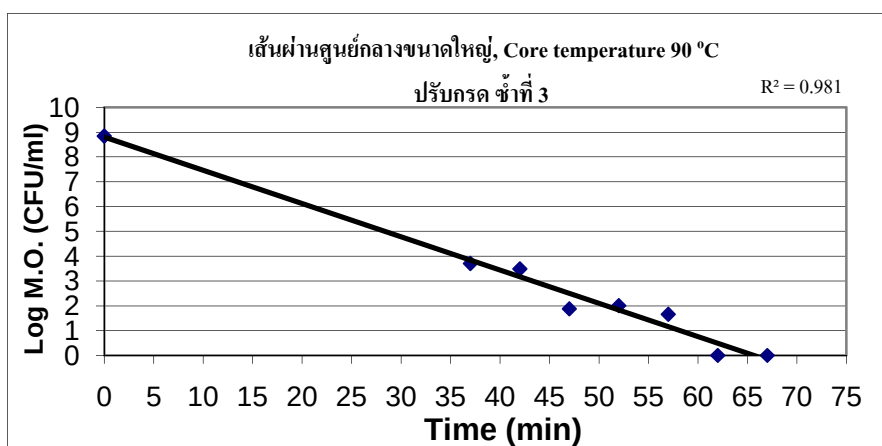
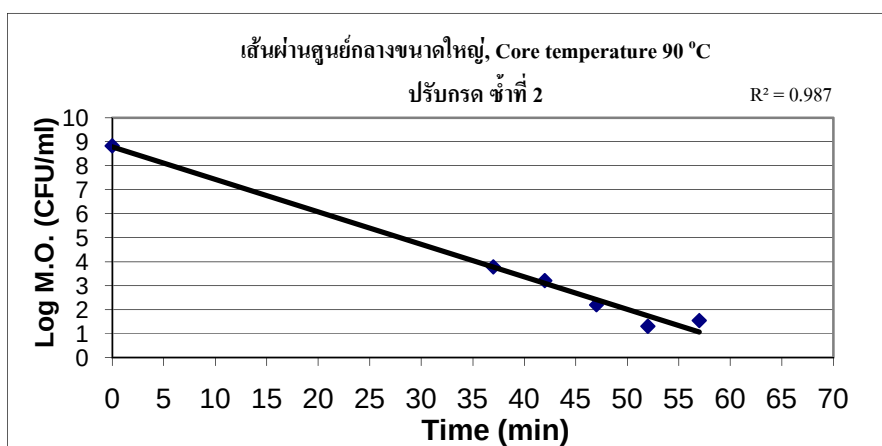
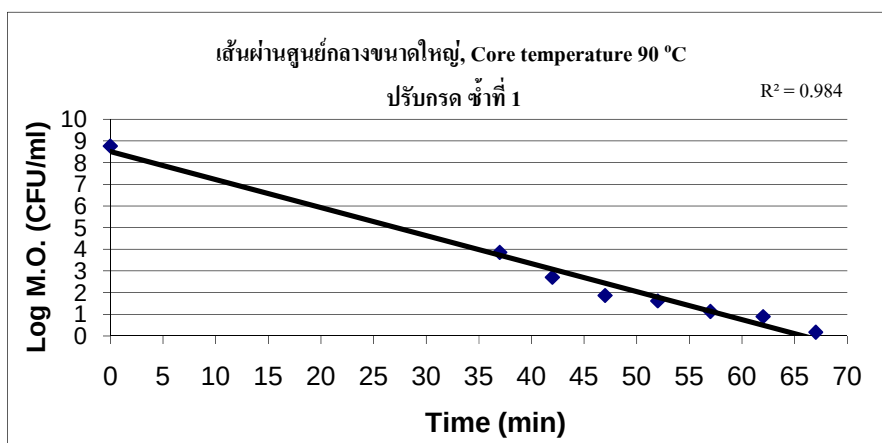
ภาพผนวกที่ ค5 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ปรับกรด



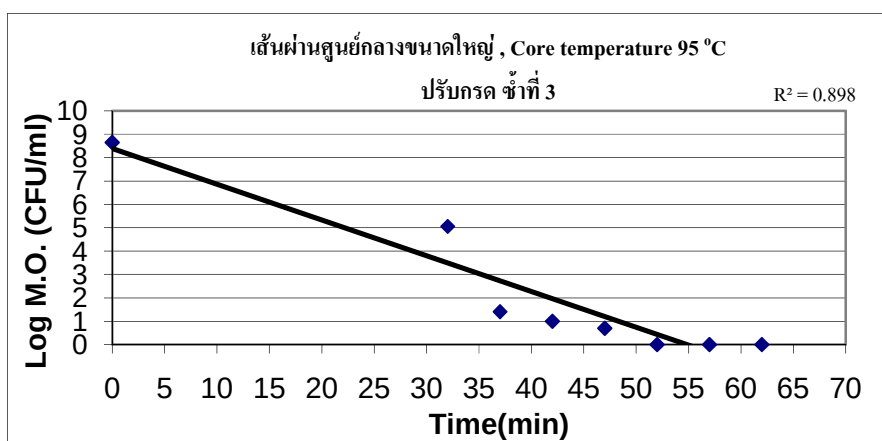
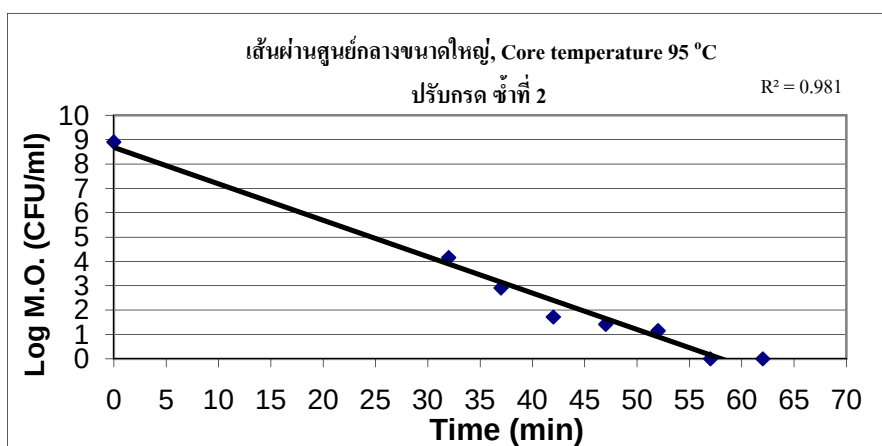
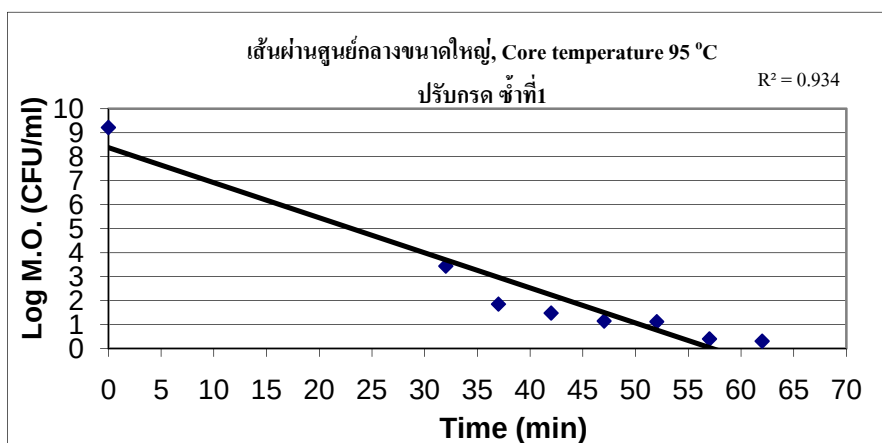
ภาพผนวกที่ ค6 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ปรับกรด



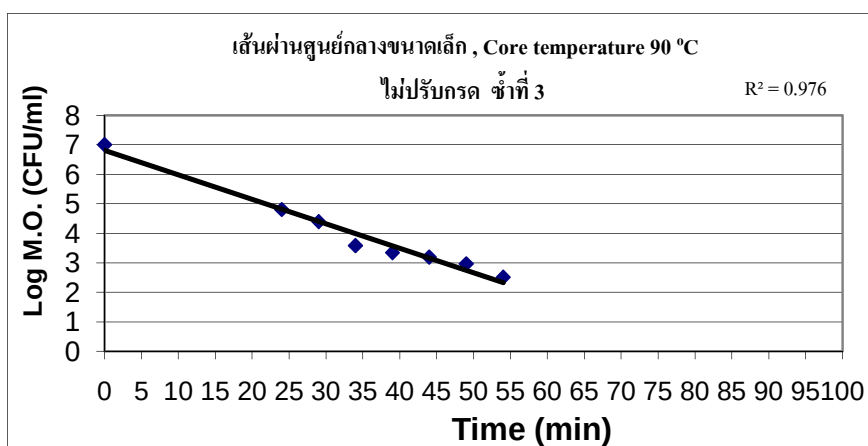
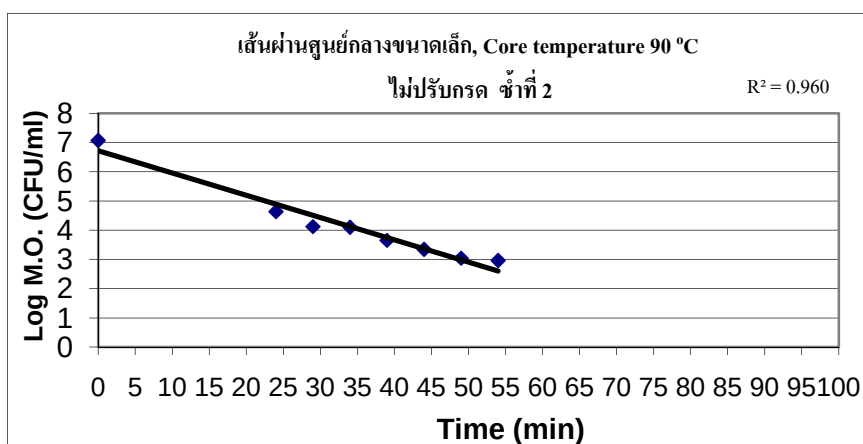
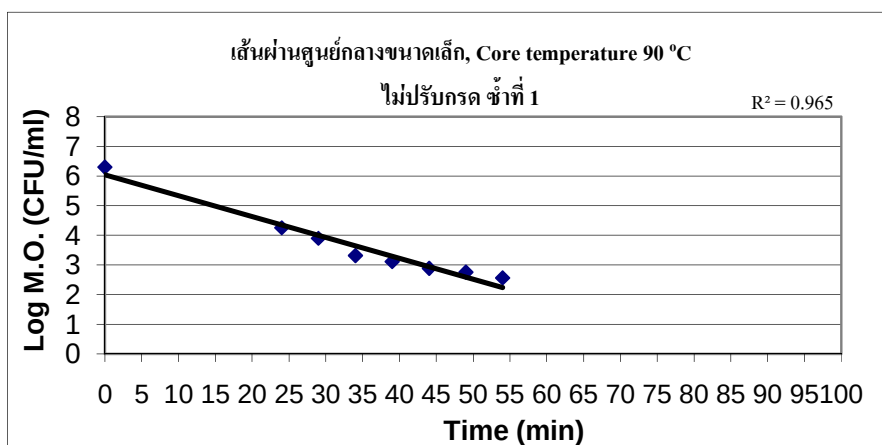
ภาพผนวกที่ ค7 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลาง
ขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ปรับกรด



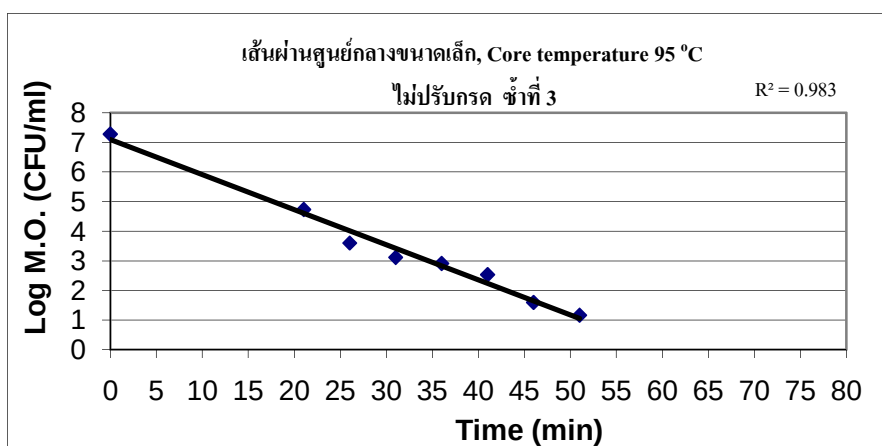
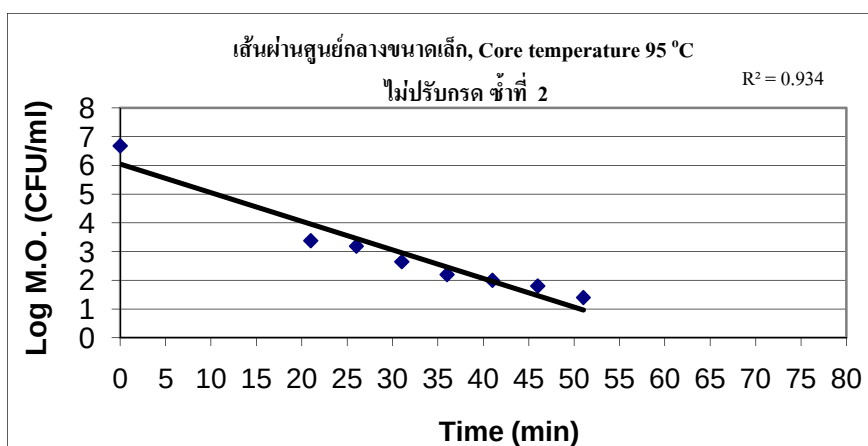
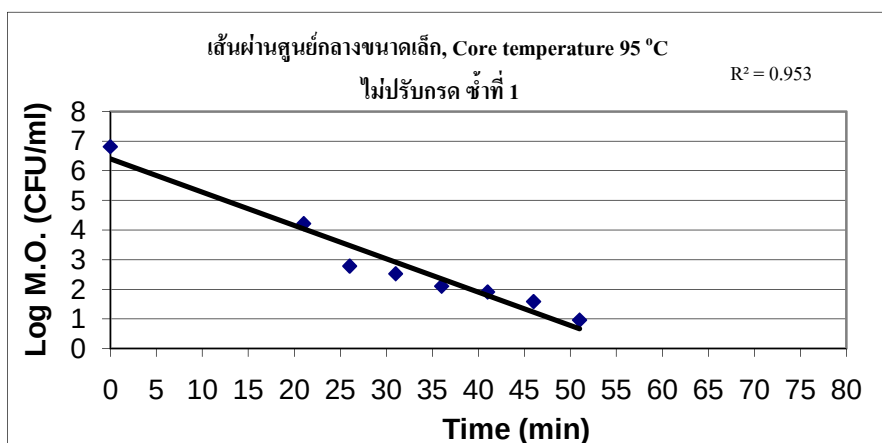
ภาพผนวกที่ ค8 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Bacillus cereus* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลาง
ขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ปรับกรด



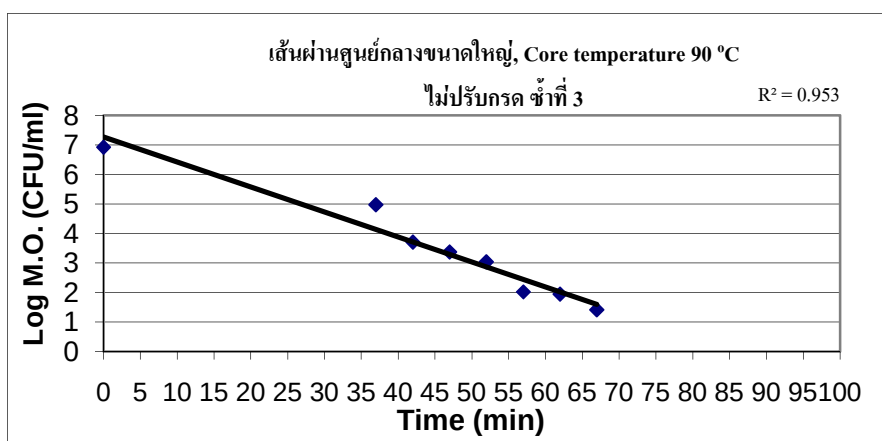
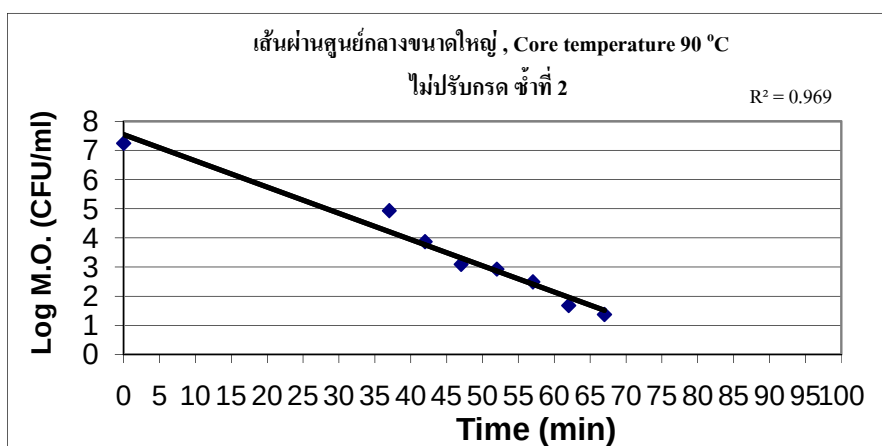
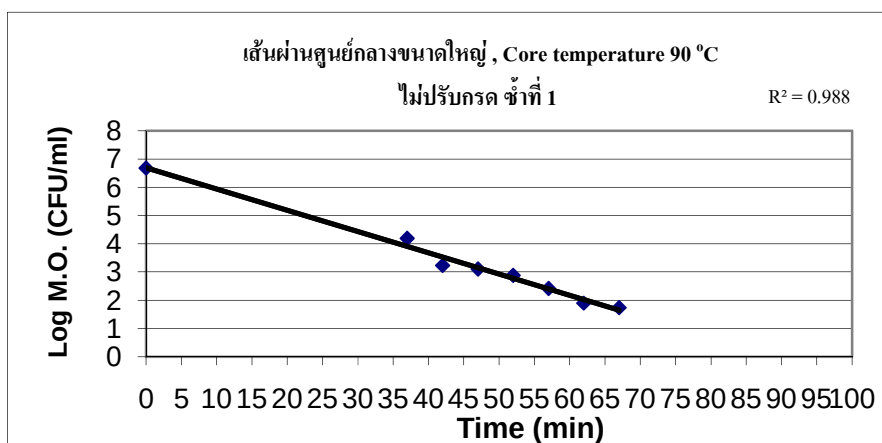
ภาพผนวกที่ ค9 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด



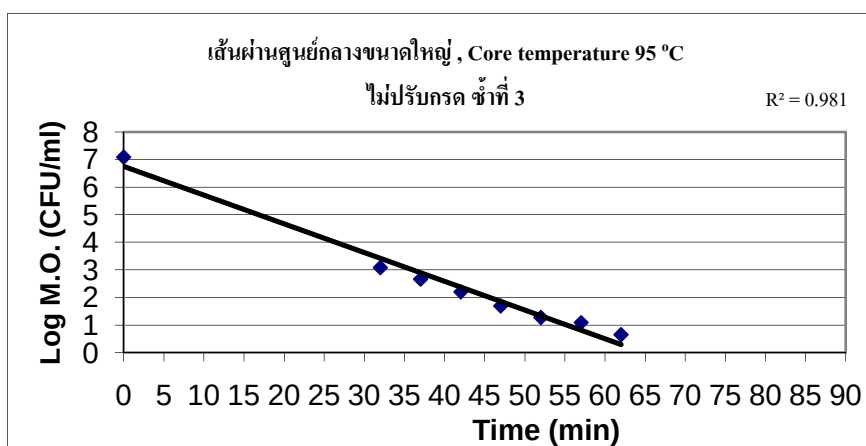
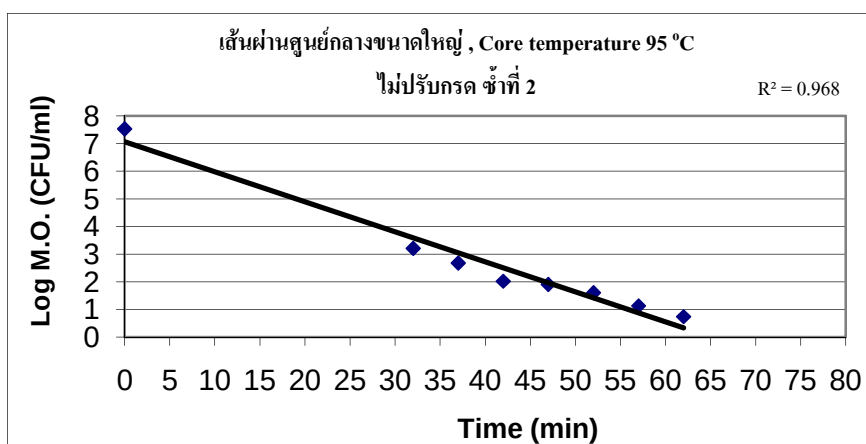
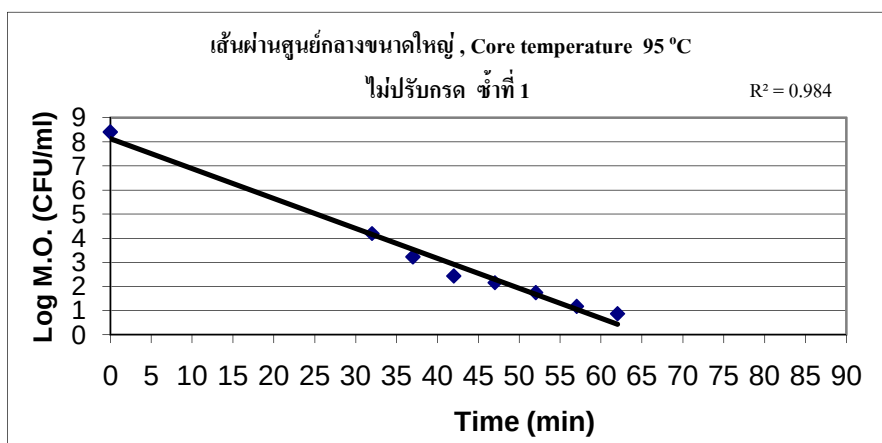
ภาพผนวกที่ ค10 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด



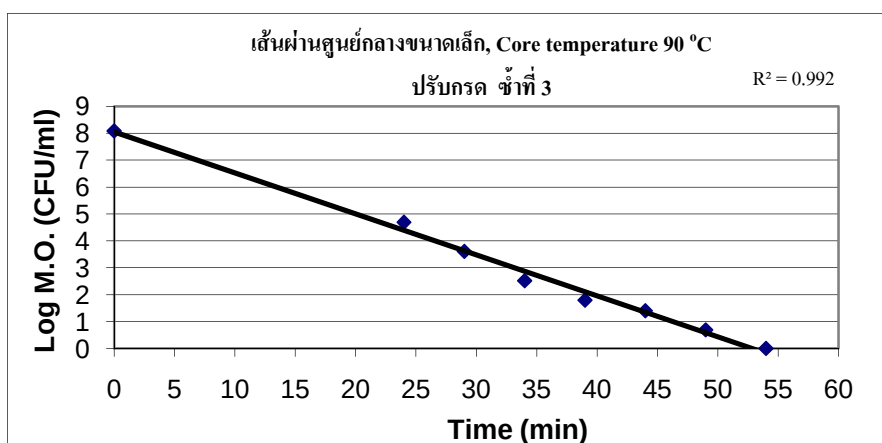
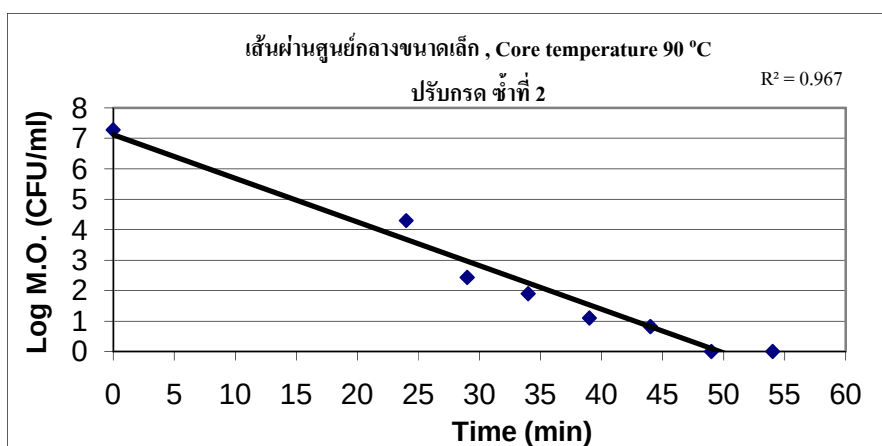
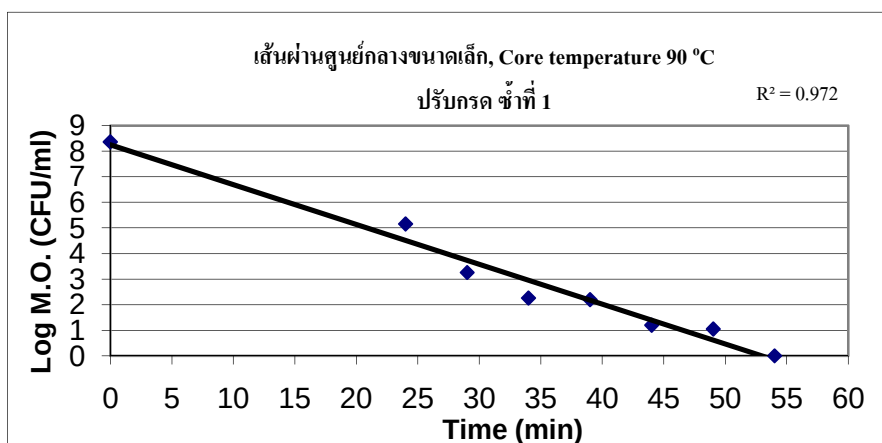
ภาพผนวกที่ ค11 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด



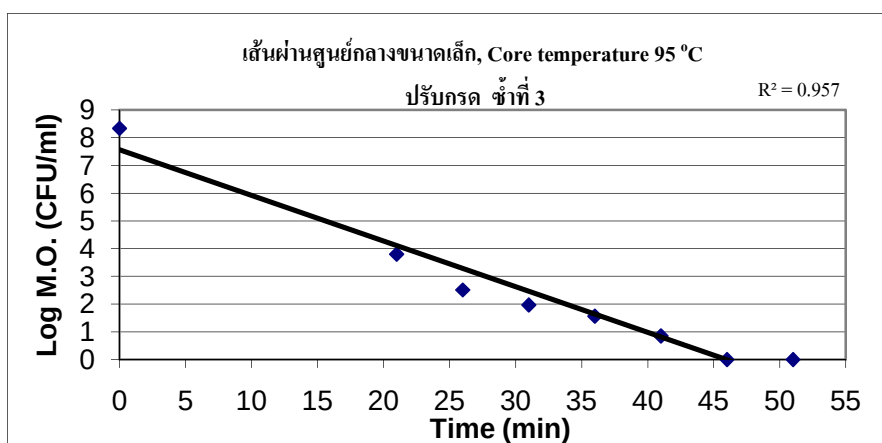
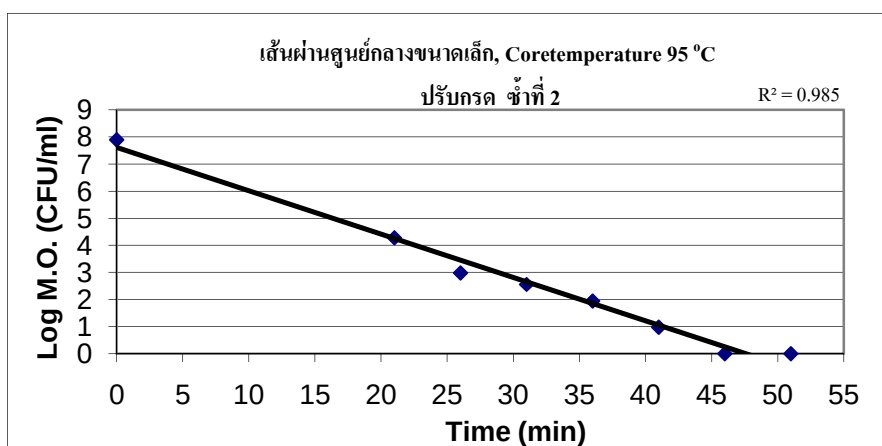
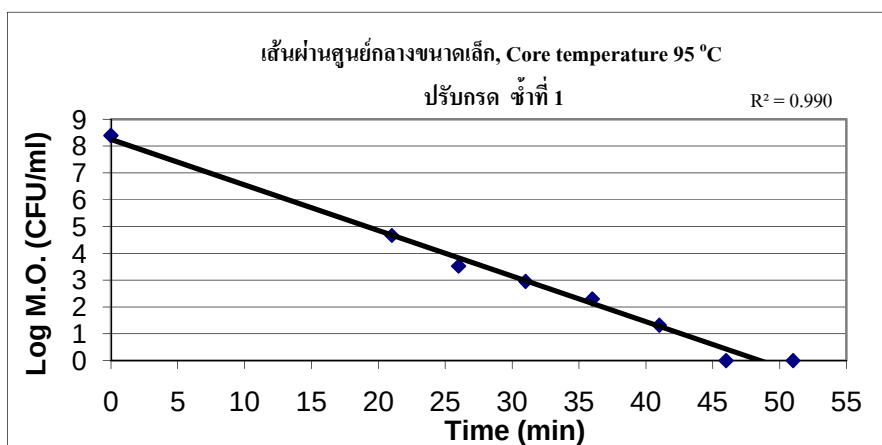
ภาพผนวกที่ ค12 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ไม่ปรับกรด



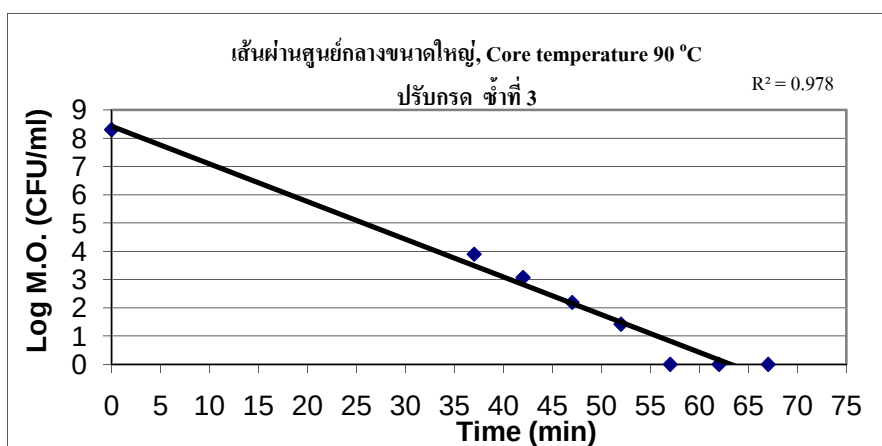
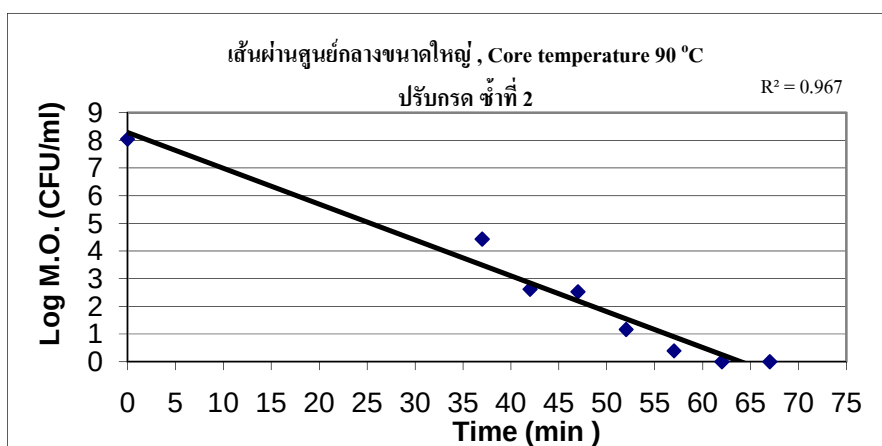
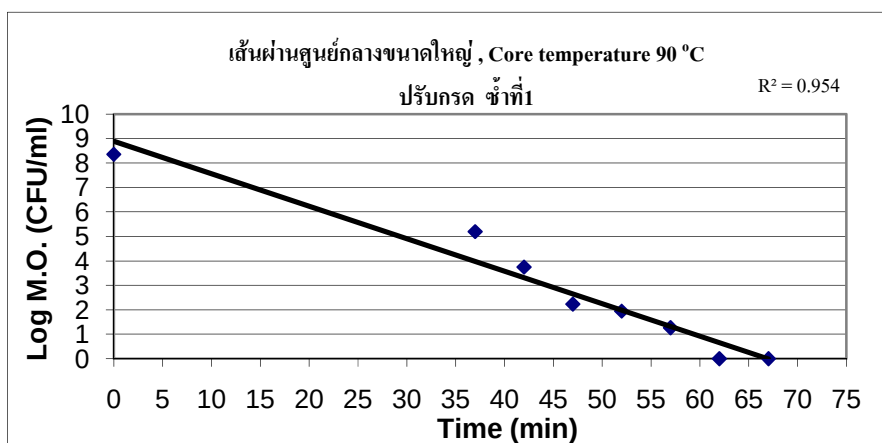
ภาพผนวกที่ ค13 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ปรับกรด



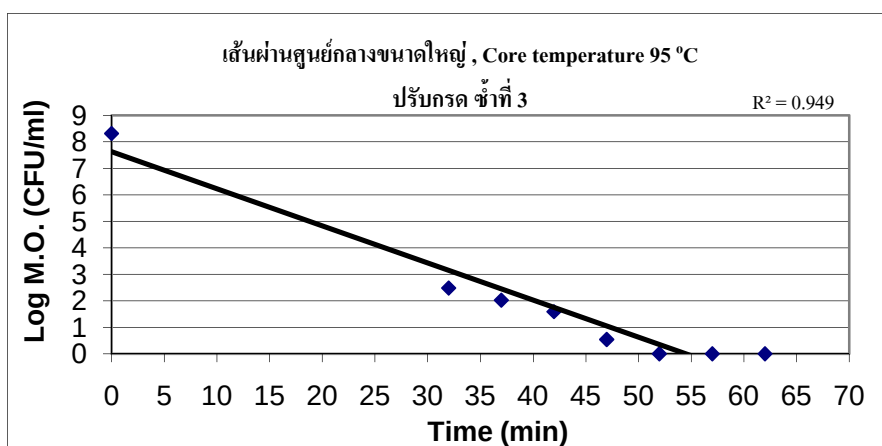
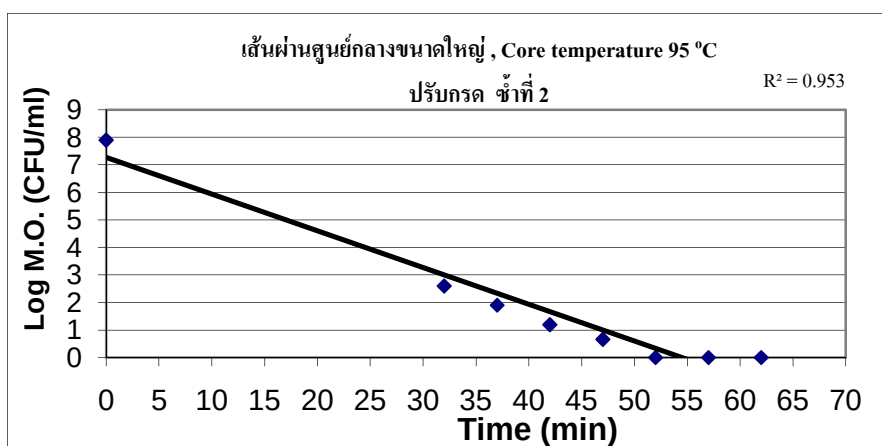
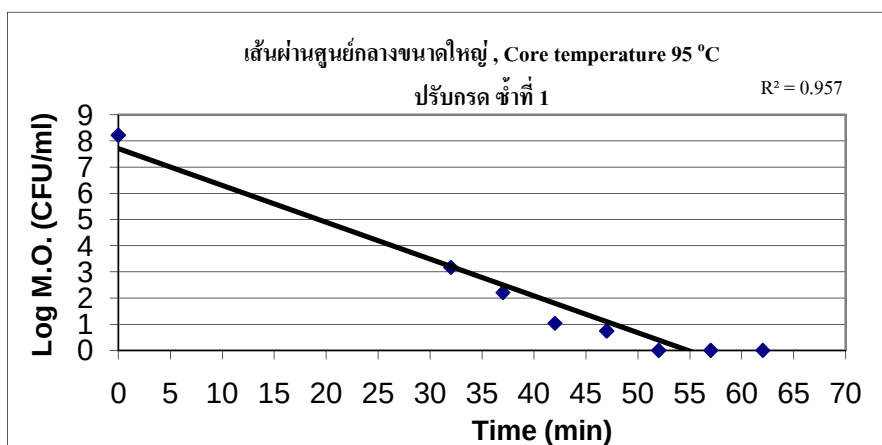
ภาพผนวกที่ ค14 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ปรับกรด



ภาพผนวกที่ ค15 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 90 องศาเซลเซียส, ปรับกรด



ภาพผนวกที่ ค16 กราฟอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในหน่อไม้เส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่, อุณหภูมิใจกลาง 95 องศาเซลเซียส, ปรับกรด



ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวเสาวคนธ์ ต่วนเทศ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	28 พฤศจิกายน 2523
สถานที่เกิด	จังหวัดอุดรธานี
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะทรัพยากรธรรมชาติ และอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยา เขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนพัฒนาบุคลากร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต เฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการ ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ ประจำปี งบประมาณ 2551 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์