



**ผลของการใช้โอโซนร่วมกับความร้อนในการกำจัดเชื้อ
Salmonella Typhimurium, *Escherichia coli*
และ *Saccharomyces cerevisiae* ในน้ำตาลสด
น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว**

**Combination Effect of Ozone and Heat Treatments for the
Inactivation of *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*
and *Saccharomyces cerevisiae* in Coconut Syrup,
Dried Longan Drink and Coconut Juice**

วรพรรณี เผ่าทองสุข*

จำริญศรี พุ่มเทียน*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการทดลองใช้โอโซนร่วมกับอุณหภูมิในการกำจัดแบคทีเรีย (*Salmonella Typhimurium* และ *Escherichia coli*) และยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ในน้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว ที่ความหนาแน่นเชื้อเริ่มต้น 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยหลังจากเติมหัวเชื้อแบคทีเรียหรือยีสต์ลงในน้ำหวานผลไม้ปริมาตร 1 ลิตร ได้พ่นโอโซนความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง ด้วยอัตรา 2.5 ลิตรต่อนาที โดยทดลองในอุณหภูมิแตกต่างกัน ได้แก่ อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิสูง (50 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) โดยใช้การพ่นอากาศที่ผ่านการกรองกำจัดเชื้อแล้วเป็นชุดควบคุม ผลการทดลองพบว่า โอโซนสามารถยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ในเครื่องดื่มน้ำหวานทั้ง 3 ชนิดได้ โดยมีผลลดจำนวนเชื้อลงระหว่าง 1.2-6.5 log CFU ต่อมิลลิลิตร การลดหรือเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดจุลินทรีย์ของโอโซนได้ โดยโอโซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Salmonella Typhimurium* และ *Escherichia coli* ได้ในระดับใกล้เคียงกัน แต่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีความทนทานต่อโอโซนมากกว่า สภาวะที่ดีที่สุดในการยับยั้ง

*อาจารย์ประจำคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ



แบคทีเรียและยีสต์ คือ การใช้โอโซนร่วมกับอุณหภูมิสูง (50 องศาเซลเซียส) ซึ่งจะลดจำนวนเชื้อลงได้มากกว่า 7 log CFU ต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : โอโซน เชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร เครื่องดื่ม น้ำตาลสด น้ำลำไย น้ำมะพร้าว

Abstract

The purpose of this study involved the use of ozone in combination with temperature for the treatment of bacteria (*Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli*) and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in coconut syrup, dried longan drink and coconut juice at the initial density of 10^7 CFU/mL. After inoculation with bacteria or yeast, fruit drinks were ozonated with 300 mg-O₃/h into 1 L of juice at 2.5 L/min flow rate. The experiments were operated in combination with low (4°C), high (50°C) and room (30°C) temperatures. Sterile air bubbling was used as a control. It was found that bacteria and yeast in juice could be inactivated by 1.2 - 6.5 log CFU/mL after ozone treatment. Altering in temperature by either low or high temperature significantly enhanced the efficiencies of ozone. Ozone could inactivate *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli* at comparable efficiency but *Saccharomyces cerevisiae* had higher ozone tolerance. The optimal condition for both bacterial and yeast treatment obtained from this study was the combination of ozone at high temperature (50°C) which could inactivate the microorganisms at more than 7 log CFU/mL.

Keywords : Ozone, foodborne pathogens, fruit drink, coconut syrup, dried longan drink, coconut juice

บทนำ

น้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว เป็นเครื่องดื่มพื้นบ้านไทยมีจำหน่ายกันอย่างแพร่หลายในแหล่งชุมชน แต่การบริโภคเครื่องดื่มที่ผลิตอย่างไม่ถูกสุขลักษณะนั้น อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ จากรายงานสถานการณ์

การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มพื้นบ้านไทย เช่น น้ำใบเตย น้ำกระเจียบ น้ำดอกอัญชัญ น้ำตะไคร้ และน้ำมะตูม จากโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบลจังหวัดมหาสารคาม จำนวน 55 แห่ง พบการปนเปื้อนของโคลิฟอร์มแบคทีเรีย (*coliform*), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ยีสต์และรา เกินเกณฑ์มาตรฐานร้อยละ 85.7,



85.7, 71.4 และ 42.9 ตามลำดับ (ดาภิรรณ เสรฐจิธรรม และเนตรนภา เจียรระแม. กันยายน-ธันวาคม 2555 : 87) ในภาคใต้ของประเทศไทย ใน 14 จังหวัด พบเครื่องดื่มพื้นบ้าน เช่น น้ำมะพร้าว และ น้ำลำไย ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์แล้วบรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิทจากผู้ผลิต จำนวน 35 แห่ง พบว่ามีการปนเปื้อนของยีสต์ รา โคลิฟอร์ม และ *Escherichia coli* คิดเป็นร้อยละ 86, 69, 59 และ 13 ตามลำดับ (Chavasit, Kunhawattana and Jirarattanarangsri. August 2006 : 622) ในประเทศไทย โรคอุจจาระร่วงพบมากในกลุ่มผู้สูงอายุและเด็กเล็กอายุต่ำกว่า 5 ขวบ โดยเชื้อจะปนเปื้อนในอาหารและน้ำดื่ม ซึ่งสถานการณ์โรคอุจจาระร่วงจากรายงานของสำนักระบาดวิทยา ปี พ.ศ. 2556 พบว่า มีผู้ป่วยโรคอุจจาระร่วงทั้งสิ้น 1,130,763 ราย จาก 77 จังหวัด คิดเป็นอัตราป่วย 1780.03 ต่อแสนประชากร เสียชีวิต 13 ราย คิดเป็นอัตราตาย 0.02 ต่อแสนประชากร

การผลิตเครื่องดื่มให้ปลอดภัยจำเป็นต้องมีการบวนการผลิตที่ดี (good manufacturing practice) ปลอดภัยจากเชื้อก่อโรค กระบวนการฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ เช่น กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ต้องสามารถลดจำนวนเชื้อก่อโรคได้อย่างน้อย 5 log (U.S. Food and Drug Administration. January 2001 : 6138) โอโซน (O_3) มีสถานะเป็นก๊าซ ในโมเลกุลประกอบด้วยออกซิเจน 3 อะตอม เป็นสารออกซิไดส์อย่างแรง เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันอย่างรวดเร็ว มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยไม่ทิ้งสารตกค้างที่เป็นพิษ ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม เป็นที่ยอมรับขององค์การอาหารและยาของ

ประเทศสหรัฐอเมริกา (Guzel-Seydim, Greene and Seydiml. June 2004 : 453-456) มีรายงานวิจัยถึงผลของการนำโอโซนไปใช้ในการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนในน้ำผลไม้ เช่น น้ำแอปเปิล น้ำส้ม น้ำสตรอว์เบอร์รี่ (Torlak. February 2014 : 1 ; Sung et al. February 2014 : 147, Choi et al. October 2012 : 191 ; Patil et al. September 2010 : 835 ; Tiwari et al. April 2009 : 1119 ; Williams, Summer and Golden. November 2004 : 2381) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโอโซนในการทำลายและยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่ก่อโรค และชนิดที่ทำให้อาหารและเครื่องดื่มบูดเสีย โดยทำการศึกษาฤทธิ์ของโอโซนร่วมกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเครื่องดื่มได้ โดยมีค่าใช้จ่ายต่ำ ช่วยเพิ่มความปลอดภัยให้ผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโอโซนภายใต้ปัจจัยเวลาและอุณหภูมิที่กำหนด
2. เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ชนิดก่อโรค และชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่ปนเปื้อนในเครื่องดื่มพื้นบ้าน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย *Escherichia coli* TISTR 780 (ATCC 25922), *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 (ATCC 4132) จากศูนย์



จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Salmonella* Typhimurium DMST 562 (ATCC 13311) จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

2. การตรวจการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเครื่องดื่มที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ทำการเก็บตัวอย่างน้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว ที่เป็นเครื่องดื่มแบบตักขายจากร้านค้าในท้องตลาด ในเขตอำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนจุลินทรีย์โดยดัดแปลงวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM) (U.S. FDA. 2000 : Online) โดยตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค pour plate ด้วยอาหารเพาะเชื้อ TSA (tryptic soy agar) ทำการตรวจนับเชื้อในกลุ่มโคลิฟอร์มและฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliform) โดยวิธี MPN (most probable number technique) โดยใช้ LST (lauryl tryptose) broth ที่มีหลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ทดสอบยีนยีนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม โดยถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดแก๊สลงในอาหารเพาะเชื้อ BGLB (brilliant green lactose bile) broth ที่มีหลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกหลอดที่เกิดแก๊สนำไปอ่านค่าจากตาราง MPN และยีนยีนผลฟีคัลโคลิฟอร์มด้วยอาหารเพาะเชื้อ EC (*Escherichia coli*) medium ที่มีหลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ขีดเชื้อในหลอดที่ให้ผลบวกลงบนอาหารเพาะเชื้อ EMB (eosin methylene blue) agar ตรวจโคโลนี (colony) ของเชื้อที่มีลักษณะ

ผิวมีสีเขียวมันวาว (metallic sheen) ทดสอบยีนยีน *Escherichia coli* ด้วย IMViC (indole test, methyl red, Voges-Proskauer, citrate) test การตรวจวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* ใส่ตัวอย่างลงในอาหารเพาะเชื้อ buffered peptone water บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน tetrathionate (TT) broth บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นขีดเชื้อลงบนอาหารเพาะเชื้อ xylose lysine deoxycholate (XLD) agar ตรวจเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีสีชมพูมีจุดสีดำตรงกลางบนจานเพาะเชื้อ ทดสอบยีนยีนด้วย TSI (triple sugar iron) agar และ LIA (lysine iron agar) ตรวจนับจำนวนเชื้อยีสต์และราทั้งหมดด้วยวิธีนับบนจานเพาะเชื้อโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารเพาะเชื้อ PDA (potato dextrose agar) ที่เติมยาปฏิชีวนะ chloramphenicol ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 เพื่อยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

3. การศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมของการพ่นไอโซนในเครื่องดื่มตัวอย่างเพื่อยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ เตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium ในอาหารเพาะเชื้อ Tryptic soy agar (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหัวเชื้อมาทำให้เป็นสารแขวนลอยเซลล์ปรับความขุ่น (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.9 จากนั้น นำหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากด้วย



ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนเซลล์เพื่อใช้เติมลงในเครื่องตีหมักที่บ้าน สำหรับการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ทำโดยเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง PDA ชะเชื้อออกจากอาหารแข็งเพาะเชื้อ ทำให้เป็นสารแขวนลอยเซลล์ ปรับค่า O.D. ให้เท่ากับ 1.2 แล้วนำหัวเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนเซลล์เพื่อใช้เติมลงในเครื่องตีหมักที่บ้าน จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร

เตรียมเครื่องตีหมักที่บ้าน โดยนำเครื่องตีหมักปริมาตร 1 ลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมหักเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ และทำการนับจำนวนเชื้อเริ่มต้นโดยวิธี pour plate หลังจากนั้น จึงนำเครื่องตีหมักที่บ้านที่สร้างการปนเปื้อนด้วยการเติมจุลินทรีย์ไว้ก่อน มาพ่นไอโซนความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง ด้วยเครื่องผลิตไอโซน OZZON รุ่น OZ-553 บริษัท แอคทีฟขายน์ จำกัด โดยควบคุมอัตราการไหล 2.52 ลิตรต่อนาที ทำการทดลองโดยควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่

อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิสูง (50 องศาเซลเซียส) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พ้นอากาศ (air) ปราดจากเชื้อในอุณหภูมิ 3 ระดับเช่นเดียวกัน เก็บตัวอย่างทุก 30 นาที จนครบ 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างน้ำมานับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอดในเครื่องตีโดยใช้เทคนิค Pour Plate ด้วยอาหารเพาะเชื้อ TSA สำหรับแบคทีเรีย และ PDA สำหรับยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในทุกชุดการทดลอง

ผลการวิจัย

1. การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเครื่องตีที่มีจำหน่ายในท้องตลาด จากการเก็บตัวอย่างเครื่องตี ได้แก่ น้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด ชนิดละ 5 ตัวอย่างที่จำหน่ายในเขตอำเภอบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ และน้ำตาลสดจากจังหวัดเพชรบุรี พบว่า ผู้ขายน้ำตาลสดจะบรรจุผลิตภัณฑ์ในถังที่มีความเย็น ในขณะที่น้ำลำไยและน้ำมะพร้าวจะบรรจุในขวดโหลเปิดซึ่งจะสัมผัสอากาศโดยตรง ผลการตรวจนับจุลินทรีย์ในตัวอย่างเครื่องตีพบว่า มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในทุกตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 1



ตารางที่ 1 การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในตัวอย่างเครื่องดื่มพื้นบ้าน

ชนิดเครื่องดื่ม	แหล่งที่มา	จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/mL)	ยีสต์และรา (CFU/mL)
น้ำตาลสด	สมุทรปราการและเพชรบุรี	2.23X10 ⁵ (3.4x10 ⁴ – 6.4x10 ⁵)	1.90X10 ² (2.9x10 ¹ – 3.5x10 ²)
น้ำลำไย	สมุทรปราการ	6.03X10 ⁴ (2.1x10 ³ – 2.3x10 ⁵)	1.30X10 ⁴ (1.6x10 ² – 5.4x10 ⁴)
น้ำมะพร้าว	สมุทรปราการ	6.85X10 ⁷ (2.1x10 ⁴ – 9.3x10 ⁷)	6.78X10 ⁵ (4.2X10 ¹ – 1.1X10 ⁶)

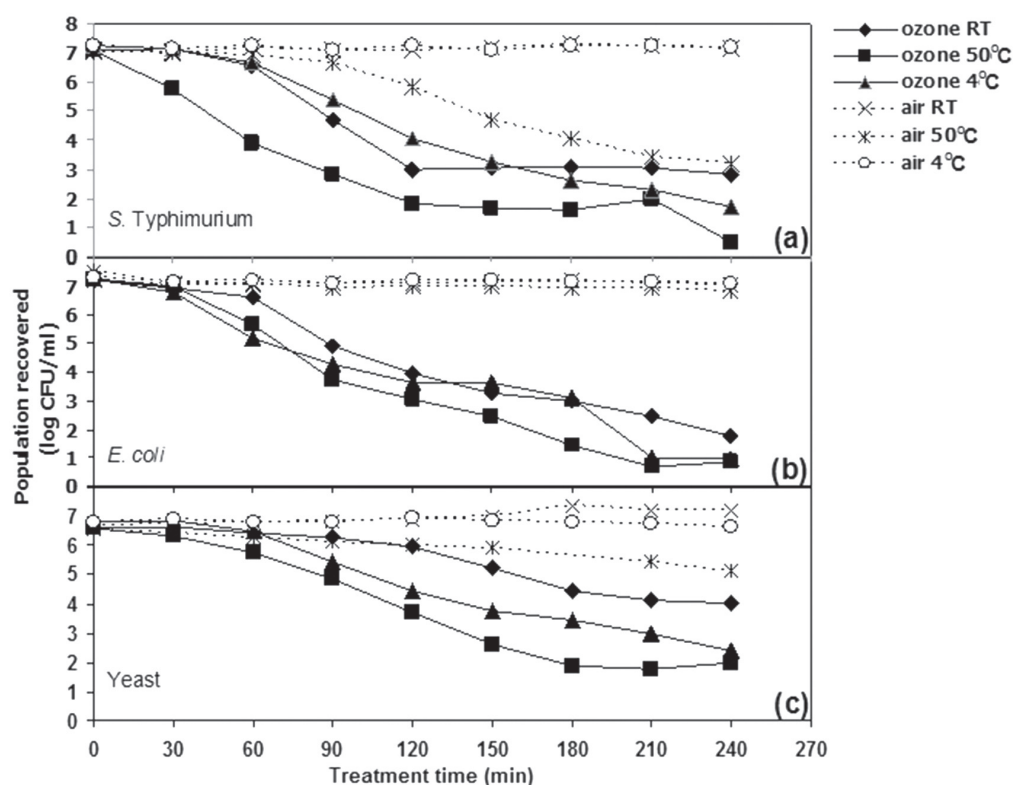
หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวเลขในวงเล็บแสดงค่าต่ำสุด – ค่าสูงสุด

เมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร และภาชนะสัมผัสอาหารสำหรับเครื่องดื่มที่ไม่บรรจุในภาชนะปิดสนิท เช่น เครื่องดื่มรดเย็น ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2553 พบว่าเครื่องดื่มทั้ง 3 ชนิดมีคุณภาพไม่ตรงตามเกณฑ์ที่กำหนด เนื่องจากตามเกณฑ์คุณภาพแล้ว แล้วต้องไม่พบเชื้อ *Escherichia coli* แต่ในเครื่องดื่มทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบตรวจพบเชื้อ *Escherichia coli* นอกจากนี้ในน้ำลำไยและน้ำมะพร้าว บางตัวอย่างพบเชื้อยีสต์จำนวนสูงกว่าเกณฑ์คุณภาพที่กำหนดไว้ คือมีจำนวนเชื้อมากกว่า 5,000 CFU/mL แต่ในเครื่องดื่มทุกตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp.

2. ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมของการใช้โอโซนเพื่อยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium และ *Saccharomyces cerevisiae* ในน้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว หลังจากการสร้างการปนเปื้อนของเชื้อ

Salmonella Typhimurium, *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในตัวอย่างเครื่องดื่มน้ำตาลสด จะมีปริมาณจุลินทรีย์ประมาณ 10⁷CFU ต่อมิลลิลิตร จึงทำการพ่นโอโซน โดยควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 30, 4 และ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 พบว่า ชุดทดลองที่มีการพ่นโอโซนทุกอุณหภูมิ จะพบการลดลงของเชื้อได้มากกว่าชุดที่พ่นอากาศอย่างชัดเจน โดยชุดทดลองที่มีการพ่นโอโซนในระดับอุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส จะพบการลดลงของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ได้มากที่สุด เท่ากับ 6.55, 6.36 และ 4.55 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงการพ่นโอโซนที่ 4 องศาเซลเซียส คือ ลดลง 5.54, 6.29 และ 4.42 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ และการพ่นโอโซนที่อุณหภูมิห้อง ลดจำนวนเชื้อได้น้อยที่สุด คือ 4.24, 5.45 และ 2.58 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการพ่นอากาศในน้ำตาลสดที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส เชื้อทุกชนิดลดจำนวนลงน้อยกว่า 1 log CFU ต่อ

มิลลิลิตร การปนเปื้อนอากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สามารถลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* Typhimurium และ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ 3.87 และ 1.37 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ลดจำนวนเชื้อ *Escherichia coli* ได้น้อยกว่า 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างน้ำตาลสด หลังจากพ่นโอโซนและพ่นอากาศ เป็นระยะเวลา 240 นาที ที่อุณหภูมิ 3 ระดับได้แก่ อุณหภูมิห้อง 30, 4 และ 50 องศาเซลเซียส กับเชื้อ *Salmonella* Typhimurium (รูป a), *Escherichia coli* (รูป b) และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (รูป c)

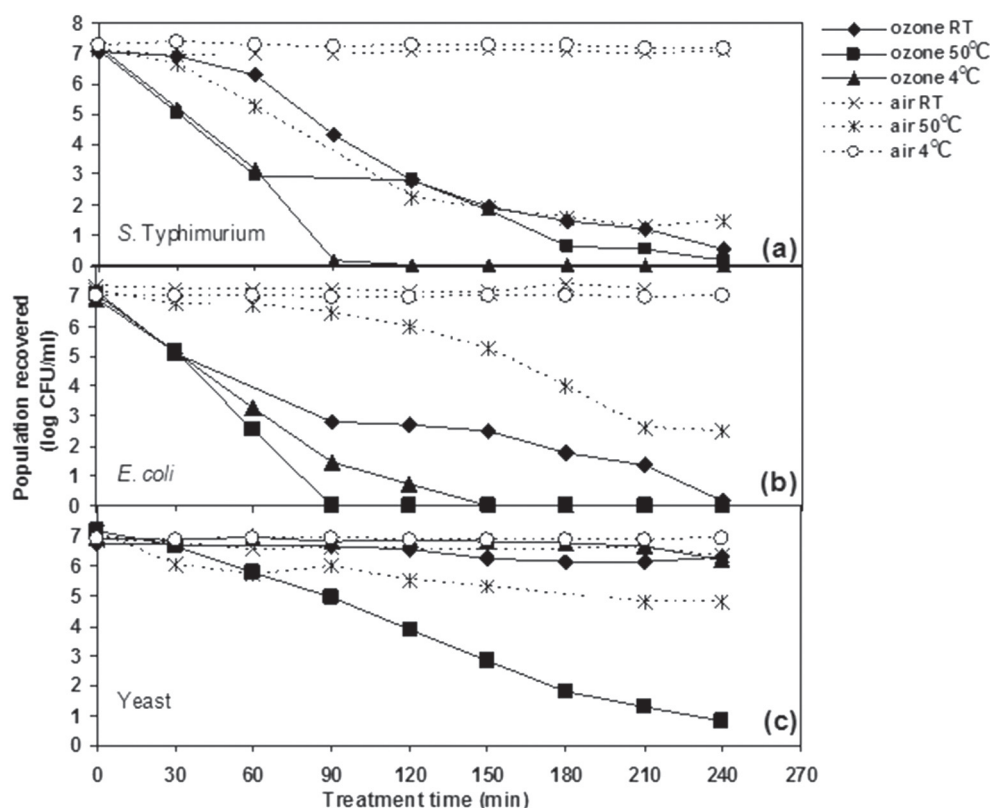
ผลการทดลองพ่นโอโซนเพื่อยับยั้งการเติบโตของ *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในเครื่องดื่มน้ำตาลไอ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่า โอโซนมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำตาลไอได้ผลดีกว่าน้ำตาลสด การลดลงของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium และ

Escherichia coli เมื่อพ่นโอโซนที่อุณหภูมิต่าง ๆ สามารถลดจำนวนเชื้อได้ประมาณ 7 log CFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จะลดจำนวนลง 7.17 log CFU ต่อ มิลลิลิตร เฉพาะชุดการทดลองพ่นโอโซนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเท่านั้น ในขณะที่การพ่นโอโซนที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส ลดจำนวน



เชื้อได้น้อยกว่า 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร สำหรับการฟ่นอากาศที่ทุกอุณหภูมิ มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการฟ่นโอโซน โดยสามารถลดจำนวนเชื้อทั้งสามชนิดได้เมื่อฟ่นอากาศที่อุณหภูมิ 50 องศา

เซลเซียส เพียงสภาวะเดียวเท่านั้น โดยลดจำนวนเชื้อได้เท่ากับ 5.62, 4.68 และ 2.31 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



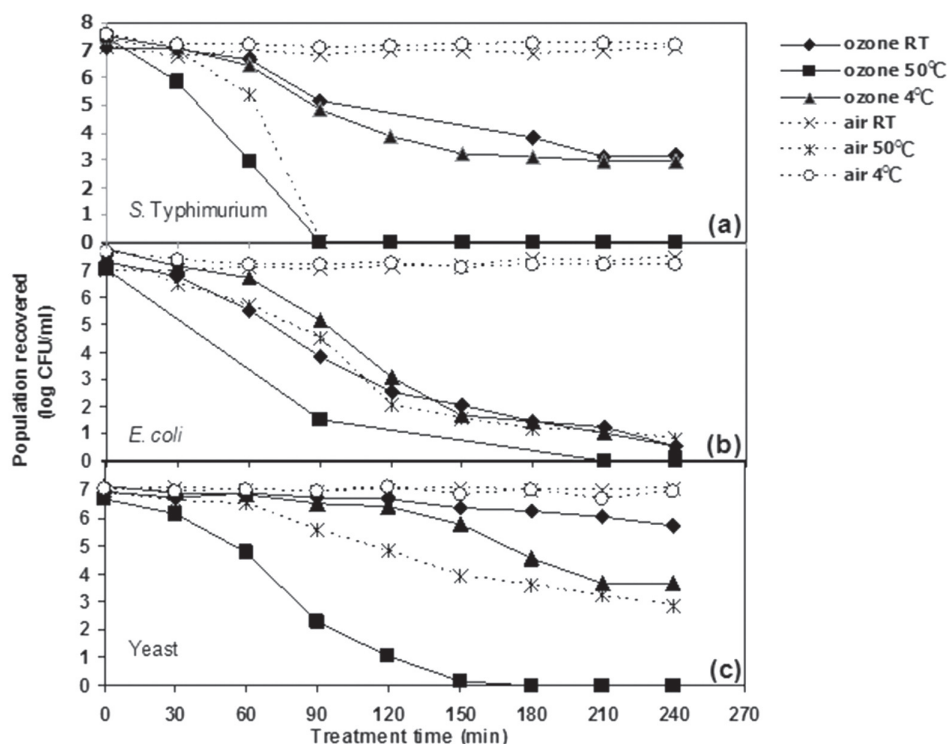
รูปที่ 2 ปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างน้ำลำไย หลังจากฟ่นโอโซนและฟ่นอากาศ เป็นระยะเวลา 240 นาที ที่อุณหภูมิ 3 ระดับได้แก่ อุณหภูมิห้อง 30, 4 และ 50 องศาเซลเซียส กับเชื้อ *Salmonella Typhimurium* (รูป a), *Escherichia coli* (รูป b) และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (รูป c)

ผลการทดลองฟ่นโอโซนเพื่อยับยั้งการเติบโตของ *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในน้ำมะพร้าว ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การฟ่นโอโซน หรืออากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ให้ผลการลดจำนวนเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้ดีที่สุด โดยผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน คือสามารถลดจำนวนเชื้อได้ประมาณ 7 log CFU ต่อมิลลิลิตร การฟ่นโอโซนที่ 4 องศาเซลเซียส ให้ผลการลดจำนวนเชื้อทั้งสามชนิดเท่ากับ 4.57, 7.28 และ 3.53 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการฟ่น

โอโซนที่อุณหภูมิห้อง สามารถลดจำนวนเชื้อได้น้อยกว่าที่ 50 และ 4 องศาเซลเซียส โดยมีค่าเท่ากับ 3.91, 6.68 และ 1.20 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ในขณะที่การพ่นอากาศที่

4 องศาเซลเซียส ลดจำนวนเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้น้อยกว่า 1 log CFU ต่อ มิลลิลิตร สำหรับที่อุณหภูมิห้อง การพ่นอากาศ (ชุดควบคุม) ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อได้



รูปที่ 3 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* มีชีวิตที่พบในตัวอย่างน้ำมะพร้าว หลังจากพ่นโอโซนและพ่นอากาศ เป็นระยะเวลา 240 นาที ที่อุณหภูมิ 3 ระดับได้แก่ อุณหภูมิห้อง 30, 4 และ 50 องศาเซลเซียส กับเชื้อ *Salmonella Typhimurium* (รูป a), *Escherichia coli* (รูป b) และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (รูป c)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การตรวจการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างเครื่องดื่มพื้นบ้านที่เก็บมาจากเขตอำเภอบางพลี พบว่า ตัวอย่างเครื่องดื่มส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในปริมาณสูง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์คุณภาพทาง

จุลชีววิทยาของอาหาร และภาชนะสัมผัสอาหาร สำหรับเครื่องดื่มที่ไม่บรรจุในภาชนะปิดสนิท เช่น เครื่องดื่มรดเย็น ตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2553 พบว่าเครื่องดื่มทั้ง 3 ชนิดมีคุณภาพไม่ตรงตามเกณฑ์ที่กำหนด เนื่องจากตรวจพบเชื้อ *Escherichia coli* ในทุก



ตัวอย่าง นอกจากนั้น ในน้ำลำไยและน้ำมะพร้าว พบเชื้อยีสต์จำนวนสูงกว่าเกณฑ์คุณภาพที่กำหนดไว้ แต่ตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในทุกตัวอย่าง เหตุผลสำคัญที่ทำให้เครื่องต้มพื้นบ้านพบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์สูงกว่าเกณฑ์คุณภาพ อาจเกิดจากกระบวนการผลิตที่ไม่ดี การใช้ความร้อนและเวลาในการฆ่าเชื้อไม่เพียงพอ ที่ผ่านมามีการพัฒนาวิธีการฆ่าเชื้อในน้ำผลไม้โดยไม่ใช้ความร้อนหลายวิธี เช่นการใช้รังสีแกมมา (Buchanan et al. November 1998 : 4533) การใช้คลื่นความถี่วิทยุสนามไฟฟ้า (Radio Frequency Electric Field) การใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (Ukuku and Geveke. March 2010:50) การใช้แรงดันน้ำสูง (hydrostatic high pressure) การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) (Abid et al. November 2014 : 70) การใช้โอโซนเป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีผู้ศึกษาวิจัยเพื่อนำมาใช้ในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลไม้บูดเสีย และปนเปื้อนเชื้อก่อโรค โดยโอโซนจะมีผลทำลายส่วนของไขมันไม่อิ่มตัวบริเวณชั้น lipopolysaccharide ของแบคทีเรียแกรมลบ รวมทั้งมีผลต่อเอนไซม์และสารพันธุกรรมภายในเซลล์จุลินทรีย์ด้วย (Kim, Yousef and Khadre. September 2003 : 167-218)

การศึกษาค้างนี้ เป็นการใช้โอโซนร่วมกับอุณหภูมิ เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ในเครื่องต้มพื้นบ้าน ผลการทดลองทำลายเชื้อ *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยโอโซนความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง อัตราการไหล 2.52 ลิตรต่อนาที โดยใช้การสร้างการปนเปื้อนให้

มีปริมาณจุลินทรีย์ 7 Log CFU ต่อมิลลิลิตร เนื่องจากวิธีมาตรฐานในการตรวจวัดประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์จะต้องมีผลในการลดปริมาณแบคทีเรียได้อย่างน้อย 5 Log units (U.S. Food and Drug Administration. January 2001 : 33829) พบว่า ในน้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว ความสามารถในการยับยั้งเชื้อด้วยโอโซนที่อุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส มากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส และมากกว่าอุณหภูมิห้อง ตามลำดับ สอดคล้องกับ Williams, Summer and Golden (November 2004 : 2381) ที่ทำการทดสอบประสิทธิภาพของโอโซนกับเชื้อ *Escherichia coli* O157:H7 และ *Salmonella* Typhimurium ในน้ำแอปเปิ้ลไซเดอร์และน้ำส้มให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 4 องศาเซลเซียส จะให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Sung et al. (February 2014 : 147) ที่ทำการทดสอบผลของการใช้โอโซนร่วมกับอุณหภูมิสูงกับน้ำแอปเปิล พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้มากกว่า 5 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นระดับที่ยอมรับได้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ ยกเว้นเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ลดลง 4.55 log CFU ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่า การใช้โอโซนร่วมกับอุณหภูมิสูงหรือต่ำ สามารถทำให้เกิดการเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในเครื่องต้มได้ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของเซลล์ และอุณหภูมียังมีผลต่อการละลายของโอโซนในน้ำอีกด้วย ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการพ่นโอโซนเพื่อยับยั้งการเติบโตของ



จุลินทรีย์ในน้ำตาลสดได้ผลไม่ดีเท่ากับการทดลองกับน้ำลำไยและน้ำมะพร้าว อาจเกิดจากการที่น้ำตาลสดมีสารอินทรีย์ละลายอยู่ในปริมาณมาก ซึ่งสารอินทรีย์จะมีผลต่อประสิทธิภาพของโอโซนในการยับยั้งเชื้อต่างจากการทดสอบการทำลายจุลินทรีย์ในน้ำบริสุทธิ์หรือสารละลายบัฟเฟอร์ เนื่องจากโอโซนบางส่วนจะทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ ทำให้ปริมาณโอโซนส่วนที่จะทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์มีน้อยลง (Broadwater, Hoehn and King. September 1973 : 393 ; Williams et al. November 2004 : 2385) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารอินทรีย์แต่ละชนิดจะทำปฏิกิริยากับโอโซนแตกต่างกันด้วย (Restaino et al. 1995 : 3474 ; Moore et al. August 2000 : 1105)

ผลการทดลองในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า เครื่องดื่มพื้นบ้าน ประกอบด้วยน้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว ที่จำหน่ายในท้องตลาดมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สูงกว่ามาตรฐาน เหตุผลสำคัญที่ทำให้เครื่องดื่มมีคุณภาพไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานทางจุลชีววิทยาส่วนใหญ่มาจากสุขลักษณะของผู้ประกอบการที่ไม่เหมาะสม จึงควรมีการอบรมให้ความรู้ถึงมาตรฐานในการผลิตอาหารที่ดีแก่ผู้ประกอบการเพื่อการผลิตเครื่องดื่มที่มีคุณภาพ และการพ่นโอโซนความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง ด้วยอัตราการไหล 2.52 ลิตร/นาที่ ในภาชนะขนาด 1 ลิตร รวมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90-120 นาที สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในเครื่องดื่มได้เป็นอย่างดี





เอกสารอ้างอิง

- ดาวิวรรณ เศรษฐีธรรม และเนตรนภา เจียรระแม. (กันยายน-ธันวาคม 2555) “สถานการณ์การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในน้ำดื่ม เครื่องดื่ม และภาชนะที่ให้บริการในโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพตำบล จังหวัดมหาสารคาม” **วารสารวิจัยสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**. 5 (3) หน้า 87-96.
- Abid, M. et al. (November 2014) “Synergistic impact of sonication and high hydrostatic pressure on microbial and enzymatic inactivation of apple juice” **LWT - Food Science and Technology**. 59 page 70-76.
- Broadwater, W. T., Hoehn, R. C. and King, P. H. (September 1973) “Sensitivity of three selected bacterial species to ozone” **Journal of Applied Microbiology**. 26 page 391-393.
- Buchanan, R. L. et al. (November 1998) “Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by irradiation” **Apply and Environmental Microbiology**. 64 page 4533-4535.
- Chavasit, V., Kunhawattana, S. and Jirarattanarangsri, W. (August 2006) “Production and contamination of pasteurized beverages packed in sealed plastic containers in Thailand and potential preventive measures” **Food Control**. 17 page 622-630.
- Choi, M. R. et al. (October 2012) “Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in apple juice with gaseous ozone” **Food Microbiology**. 32 page 191-195.
- Guzel-Seydim, Z. B., Greene, A. K. and Seydim, A. C. (June 2004) “Use of ozone in the food industry” **Lebensm.-wiss. u.-Technol.** 37 page 453-460.
- Kim, J., Yousef, A. E., and Khadre, M. A. (September 2003) “Ozone and its current and future application in the food industry” **Advances in Food and Nutrition Research**. 45 page 167-218.



- Moore, G., Griffith, C. and Peters, A. (August 2000) "Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant" **Journal of Food Protection**. 63 (8) page 100-1106.
- Patil, S. et al. (September 2010) "Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels" **Food Microbiology**. 27 page 835-840.
- Restaino, L. et al. (September 1995) "Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms" **Applied and Environmental Microbiology**. 61 (9) page 3471-3475.
- Sung, H. J. et al. (February 2014) "Combination effect of ozone and heat treatments for the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* in apple juice" **International Journal of Food Microbiology**. 171 page 147-153.
- Tiwari, B. K. et al. (April 2009) "Effect of ozone processing on anthocyanins and ascorbic acid degradation of strawberry juice" **Food chemistry**. 113 page 1119-1126.
- Torlak, E. (February 2014) "Efficacy of ozone against *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice" **International Journal of Food Microbiology**. 172 page 1-4.
- Ukuku, D. O. and Geveke, D. J. (March 2010) "A combined treatment of UV-light and radio frequency electric field for the inactivation of *Escherichia coli* K-12 in apple juice" **International Journal of Food Microbiology**. 138 page 50-55.
- U.S. Food and Drug Administration. (January 2001) "Hazard analysis and critical point (HACCP); procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice; final rule" **Federal Register**. 66 page 6138.
- U.S. Food and Drug Administration. (2000) **Bacteriological Analytical Manual (BAM) (8th ed.)**. [Online] Available : <http://www.fda.gov/BAM> (25 July 2009)
- Williams, R. C., Summer, S. S. and Golden, D. A. (November 2004) "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in apple cider and orange juice as affected by ozone and treatment temperature" **Journal of Food Protection**. 67 page 2381-2386.