หองสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของ Pyruvate และ Esculin ต่อการเจริญของเซลล์ *Listeria innocua* ที่บาดเจ็บจากความร้อนและการแช่แข็งบนอาหารแข็ง

(Effect of Pyruvate and Esculin on the growth of heat and freeze injury cells of *Listeria innocua* on agar medium)

จัดทำโดย

นางสาวชนม์นิภา โอมอภิญญาณ
นางสาววริศรา จิรพันธุ์ศักดิ์

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

....23../..03../..49.. อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ. ดร. อดิศร เศวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21095

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของ Pyruvate และ Esculin ต่อการเจริญของเซลล์ *Listeria innocua* ที่บาดเจ็บจากความร้อนและการแช่แข็งบนอาหารแข็ง

(Effect of Pyruvate and Esculin on the growth of heat and freeze injury cells of *Listeria innocua* on agar medium)

T096839

นางสาวชนม์นิภา โอมอภิญญาณ

นางสาววริศรา จิรพันธุ์ศักดิ์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2548

ปพ.
ต136ผ
ส548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน 96859

วัน,เดือน,ปี - 4 JUN 2009

ชนม์นิภา โอมอภิญญาณ และ วริศรา จิรพันธุ์ศักดิ์. 2548. : ผลของ Pyruvate และ Esculin ต่อการเจริญของเซลล์ *Listeria innocua* ที่บาดเจ็บจากความร้อนและการแช่แข็งบนอาหารแข็ง (Effect of Pyruvate and Esculin on the growth of heat and freeze injury cells of *Listeria innocua* on agar medium). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ , 52 หน้า

ในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร ไม่ว่าจะเป็นการให้ความร้อนหรือการแช่แข็งมักจะมีแบคทีเรียที่มีชีวิตเหลือรอดอยู่และอยู่ในสภาพที่มีความบกพร่องทางกายภาพ ซึ่งเรียกว่า เซลล์บาดเจ็บ (Injured cells) จากผลการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *Listeria innocua* โดยการแช่แข็ง 5 ชนิด คือ TSAYE , TSAYE + Esculin , TSAYE + Esculin + Pyruvate , Palcam และ Palcam + Pyruvate โดยมีค่า log cfu/ml คือ 7.89 , 7.82 , 7.89 , 7.51 และ 7.84 ตามลำดับ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam จะมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่น ๆ โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ส่วนการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *L. innocua* โดยการให้ความร้อน 5 ชนิด คือ TSAYE , TSAYE + Esculin , TSAYE + Esculin + Pyruvate , Palcam และ Palcam + Pyruvate โดยมีค่า log cfu/ml คือ 6.92 , 6.67 , 6.87 , 6.30 และ 6.77 ตามลำดับ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam จะมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 เช่นเดียวกัน จากผลการศึกษานี้พอสรุปได้ว่าไม่ว่า *L. innocua* จะบาดเจ็บในรูปแบบใด อาหารเลี้ยงเชื้อ Selective medium เช่น Palcam มีผลในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของ *L. innocua* ได้น้อยที่สุด การใช้ Pyruvate มีปริมาณ 10 กรัมในอาหาร Palcam สามารถช่วยฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของ *L. innocua* ให้เจริญเพิ่มมากขึ้นได้พอๆกับ TSAYE ที่ไม่มีสาร Selective agent นอกจากนี้ยังพบว่า Esculin ที่ใช้เป็นสาร Indicator ในอาหาร Selective medium อย่าง Palcam ไม่มีผลต่อการยับยั้งหรือทำลายเซลล์ *L. innocua* ที่บาดเจ็บ

ชนม์นิภา โอมอภิญญาณ

วริศรา จิรพันธุ์ศักดิ์

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

23 / 03 / 49

วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการปฏิบัติงาน ตลอดจนตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ที่ให้กำลังทรัพย์ทำงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่ช่วยค้นคว้าข้อมูล ให้คำแนะนำและให้กำลังใจโดยตลอด

ชนม์นิภา โอมอภิญญาณ
วริศรา จิรพันธุ์ศักดิ์
7 มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทัศน์	2
2.1 เชื้อ *Listeria innocua*	2
2.2 ผลของการแช่แข็งต่อจุลินทรีย์	3
2.3 ผลของความร้อนต่อจุลินทรีย์	9
2.4 ลักษณะของ เซลล์แบคทีเรียบาดเจ็บ	13
2.5 วิธีการตรวจสอบและการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บ	18
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	25
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจทางจุลชีววิทยา	25
3.2 สารเคมี	25
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	25
3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	26
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	31
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	42
ประวัติผู้เขียน	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะของเซลล์บาดเจ็บที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปอาหารโดยวิธีต่างๆ 16

2.2 ตำแหน่งที่ถูกทำลายในเซลล์บาดเจ็บเนื่องจากกระบวนการแปรรูป 17

2.3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูป และถนอมอาหาร 18

2.4 สารประกอบจำเพาะบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแข็งและเหลว 22

2.5 ผลของอาหารแข็งจำเพาะในการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียที่บาดเจ็บ 23

4.1 แสดงผลการนับเชื้อ *Listeria innocua* โดยการแช่แข็ง 31

4.2 แสดงผลการนับเชื้อ *Listeria innocua* โดยการให้ความร้อน 34

4.3 แสดง % Injured cells ของเชื้อ *Listeria innocua* จากการแช่แข็ง และให้ความร้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam เทียบกับ TSAYE และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam + Pyruvate เทียบกับ TSAYE 36

ผนวกที่ 1 46

ผนวกที่ 2 47

ผนวกที่ 3 48

ผนวกที่ 4 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ผลของการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ 8

2.2 ผลของ sublethal treatment ต่อเซลล์จุลินทรีย์ 20

3.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Listeria innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE 28

3.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Listeria innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam + Pyruvate 28

3.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Listeria innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam 29

3.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Listeria innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE + Esculin + Pyruvate 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

กระบวนการแปรรูปอาหารมีผลในการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ หรือทำให้จุลินทรีย์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป อยู่ในสภาพที่มีความบกพร่องทางกายภาพ ถ้าหากกระบวนการแปรรูปอาหารมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการทำลายจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่เหลือรอดก็จะอยู่ในสภาพบาดเจ็บได้ โดยกระบวนการแปรรูปอาหารมีผลทำลายเซลล์บางส่วน ส่งผลให้เซลล์บาดเจ็บหรือ ที่เรียกว่า Injured cells กระบวนการแปรรูปที่ทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ ได้แก่ การแช่แข็ง และ การให้ความร้อน

ในการตรวจสอบและการตรวจนับจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการเสื่อมเสียของอาหารหรือจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรคนั้นมักจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เรียกว่า selective medium ซึ่งมีสาร selective agent ที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านั้น แต่สารเหล่านี้กลับมีผลต่อการยับยั้งความสามารถในการรักษาตัวเองของแบคทีเรียที่ได้รับบาดเจ็บ ดังนั้นจึงต้องเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อพวก non selective medium ที่เหมาะสมต่อการรักษาตัวเองของเซลล์ที่บาดเจ็บเสียก่อนเพื่อลดขั้นตอนในการรักษาเซลล์บาดเจ็บในอาหาร non selective medium ก่อนทำการตรวจนับจุลินทรีย์ เราจึงศึกษาผลของ Pyruvate ในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam ซึ่งเป็น selective medium ของ *Listeria innocua* ว่า Pyruvate สามารถรักษาเซลล์บาดเจ็บบนอาหาร selective medium ได้หรือไม่ โดยมีวัตถุประสงค์การทดลองดังนี้

1. เพื่อศึกษาผลของการใช้ Pyruvate ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บ
2. เพื่อศึกษาผลของการใช้ Esculin ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บ
3. เพื่อศึกษาหาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของเชื้อ *Listeria innocua* โดยการแช่แข็งและการให้ความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เชื้อ *Listeria innocua*

2.1.1 ลักษณะของเชื้อ *Listeria innocua*

Listeria innocua มีขนาดเล็ก แกรมบวก รูปร่างท่อน เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-0.5 μm และยาว 0.5-2 μm เชื้อในกลุ่ม *Listeria* มีลักษณะเฉพาะตัวคือมี flagella และเคลื่อนที่โดยการกลิ้งหรือหมุนรอบตัวเอง อุณหภูมิจะสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่ อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะยับยั้งการเคลื่อนที่ แม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนมากมีอุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส จะแสดงให้เห็นการเคลื่อนที่ แต่จะเห็นการเคลื่อนที่ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และสามารถทดสอบการเคลื่อนที่ได้โดยการ stab ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม การเจริญจะเจริญตามรอย stab และจะกระจายไป 3-5 mm ใต้อาหาร

เชื้อในกลุ่ม *Listeria* จะเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อปกติในช่วง pH ระหว่าง 5.0-9.0 บนอาหารแข็ง เช่น Nutrient agar เชื้อ *Listeria* มีโคโลนีโปร่งแสง สีออกน้ำเงินเมื่อมองทำมุม 45 องศา จะยอมให้แสงผ่านเมื่อสังเกตผ่านกล้องจุลทรรศน์ หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โคโลนีจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.2-0.4 mm ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีคาร์โบไฮเดรตที่สามารถหมักย่อยได้ โคโลนีอาจมีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 2 mm บนอาหาร blood agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โคโลนีอาจมีขนาด 0.2-1.5 mm จากที่โปร่งแสงจะกลายเป็นสีเทา-ขาว ขุ่น ทึบแสง การ Hemolysis จะสังเกตได้บนอาหาร blood agar แต่โซนของ Hemolysis อาจมีเพียงเล็กน้อย เนื่องจากอาจตรวจไม่พบการเคลื่อนที่จากโคโลนีบนผิวหน้าอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ผลของการแช่แข็งต่อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์จำพวก *Listeria* เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (0.5 – 1 องศาเซลเซียส) ซึ่งนับว่าเป็นคุณลักษณะที่สำคัญและน่าศึกษา เนื่องจากอาหารหลายชนิดจำเป็นต้องเก็บที่อุณหภูมิต่ำเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้ จึงนับว่าเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ถ้าอาหารชนิดใด มีจุลินทรีย์ชนิดนี้หลงเหลืออยู่เพียงเล็กน้อย แล้วนำไปแช่เย็นก็จะเพิ่มจำนวนเป็นโทษต่อผู้บริโภคได้

จากการศึกษาของ Marth (1973) พบว่า ขั้นตอนของการแช่แข็งเซลล์บาดเจ็บประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ

1. ช่วงแช่เย็นเซลล์ของจุลินทรีย์จนอุณหภูมิลดถึง 0 องศาเซลเซียส
2. ช่วงแช่เย็นต่อไปจนเกิดการสร้างผลึกน้ำแข็งขึ้นภายนอกเซลล์ และอาจมีการสร้างผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ด้วย
3. การเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายที่มีอยู่ภายนอกและภายในเซลล์จุลินทรีย์
4. ช่วงของการเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์ในสภาพแช่แข็ง
5. ช่วงของการละลายของเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

ตามปกติแล้ว การแช่แข็งจะมีผลต่อการลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่อยู่ในอาหาร ทั้งนี้เนื่องมาจากผลของการทำลาย (lethal) และผลการทำลายบางส่วน (sublethal effect)

ในที่นี้จะกล่าวถึงผลของการแช่แข็งที่มีต่อจุลินทรีย์ โดยสามารถแบ่งออกเป็นผลของการเป็นน้ำแข็งและผลของการละลายน้ำแข็ง

2.2.1 ผลของอุณหภูมิที่ลดลงต่อจุลินทรีย์ในระหว่างการแช่แข็ง

การแช่แข็งไม่เพียงแต่ช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์เท่านั้น แต่มีผลทำให้จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตเกิดการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วอีกด้วย เนื่องจากการแข็งตัวของน้ำจะทำให้ค่า water activity (a_w) ของน้ำแข็งลดต่ำลงก่อนที่อาหารจะแข็งตัวพร้อมๆกับอุณหภูมิที่ลดลง น้ำที่แข็งตัวจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีค่า a_w เท่ากับ 0.823 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเท่ากับ 0.62 ที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส (Scott , 1962) ดังนั้นทั้งยีสต์และราจะสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารแช่แข็งที่มีค่า a_w และระดับอุณหภูมิต่ำกว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่

ในการแช่แข็งเซลล์แบคทีเรีย อาจมีผลทำให้แบคทีเรียบางพวกเกิดการบาดเจ็บอย่างถาวร นอกนั้นจะสามารถซ่อมแซมส่วนที่ถูกทำลายได้ เมื่อมีการนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ภายหลังจากการละลายแล้ว ส่วนแบคทีเรียบางพวกจะยังคงเป็นปกติ ในการแช่แข็งคาดว่าแบคทีเรียจะเกิดการตายและลดจำนวนลงสิบถึงหนึ่งร้อยเท่าของจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น นอกจากนี้เซลล์บาดเจ็บอย่างรุนแรงและไม่รุนแรง (lethally and nonlethally injured cells) ของแบคทีเรียแช่แข็งจะแสดงลักษณะบางอย่างที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนจากเซลล์ที่ยังไม่แช่แข็ง ข้อมูลต่อไปนี้จะใช้เป็นพื้นฐานในการแยกแยะเซลล์ที่ตายจากที่ยังรอดชีวิต และเซลล์ที่บาดเจ็บอย่างรุนแรงกับเซลล์บาดเจ็บไม่รุนแรง

2.2.1.1 สูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวน

การไม่ประสบความสำเร็จของเซลล์แบคทีเรียในการสร้างโคโลนีบนอาหารวุ้นนั้น จะใช้เป็นหลักในการวัดระดับของการบาดเจ็บ ไม่ว่าการล้มเหลวนั้นจะเกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบหน้าที่หรือโครงสร้างเดี่ยวที่สำคัญ หรือผลกระทบจากโครงสร้างหรือหน้าที่ต่าง ๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปก็ตาม ซึ่งใช้ในการตัดสิน และบางสมมุติฐานจะได้กล่าวถึงในภายหลัง

2.2.1.2 การรั่วของส่วนประกอบของเซลล์

หลังการแช่แข็งและการละลาย เซลล์แบคทีเรียจะสูญเสียส่วนประกอบโมเลกุลใหญ่เล็กอย่างเช่น โปรตีน กรดอะมิโน RNA DNA และเอนไซม์ในตัวกลางแขวนลอย การที่เซลล์จะตายหรืออยู่รอดนั้นเกี่ยวพันกับชนิดของสิ่งที่รั่วซึมมากกว่าปริมาณ

2.2.1.3 ความ (รู้สึก)ไว

มีการเพิ่มความไวต่อสาร surfactants และสารประกอบอื่นๆ เช่น เกลือน้ำดี ไลโซไซม์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.4 ความต้องการสารอาหาร

มีความต้องการสารอาหารเพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์ที่ถูกทำลายไม่สามารถสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ทั้งหมด

2.2.1.5 การขยายของ lag phase

แบคทีเรียที่รอดตายจากการแช่แข็งนั้น สามารถที่จะเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามเหล่านี้มักมีการขยายช่วง lag phase ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากความต้องการเวลาในการซ่อมแซมความเสียหาย

2.2.1.6 การฉายรังสี

แบคทีเรียจะมีความไวต่อการทำลายของรังสีอุลตร้าไวโอเลตเพิ่มขึ้น เมื่อมีการแผ่ฉายรังสีในสภาวะแช่แข็ง ในทางตรงกันข้าม ความไวของเซลล์แบคทีเรียต่อรังสีกำลังสูงสุดจะลดลงเมื่อเซลล์นั้นได้รับรังสีในสภาพแช่แข็ง

ธรรมชาติของการบาดเจ็บเนื่องจากการแช่แข็งนั้นยังไม่เป็นที่รู้จักแน่ชัด เมื่อพิจารณาหน้าที่ของเซลล์และความเสถียรของยีน จะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในโครงสร้างของเซลล์ส่วนที่หยาบและละเอียด (Ray and Speck , 1973) Mazur (1966) ได้กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และชีวเคมีที่เกิดขึ้นในเซลล์และสิ่งแวดล้อมระหว่างการแช่แข็งและการละลาย ในระหว่างการแช่แข็งอุณหภูมิของสารแขวนลอยแบคทีเรียจะลดต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ตัวกลางภายนอกจะเกิดการเย็นยิ่งยวด (supercooled) หลังจากนั้นจะเริ่มสร้างผลึกน้ำแข็ง น้ำในเซลล์จะยังคงเกิดซุปเปอร์คูลจนกระทั่งอุณหภูมิประมาณ -10 องศาเซลเซียส ถึง -15 องศาเซลเซียส แต่ถ้าระดับอุณหภูมิสูงกว่านี้การเป็นน้ำแข็งจะเกิดในสิ่งแวดล้อมเท่านั้น เพื่อที่จะรักษาสมดุลระหว่างภายในและภายนอกของความดันไอน้ำ น้ำจะเริ่มเคลื่อนออกจากเซลล์และแข็งตัวที่ภายนอกเซลล์ (การระเหยน้ำออกจากเซลล์) และน้ำภายในเซลล์จะแข็งตัวในที่สุด ถ้าอัตราของการแช่เย็นต่ำหรือความสามารถในการซึมผ่านของเซลล์นั้นสูง เซลล์จะแข็งตัวโดยการสร้างผลึกน้ำแข็งขึ้นที่ภายนอกเซลล์ การแช่แข็งอย่างรวดเร็วจะสร้างผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กภายในเซลล์ โดยผลึกน้ำแข็งเหล่านี้จะไม่เสถียรและมีแนวโน้มว่าจะขยายใหญ่เพิ่มขึ้น เมื่อได้เวลาของการตกผลึก เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียจะแข็งตัวโดยการสร้างน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ หรือโดยการระเหยน้ำออกจากเซลล์ การแช่แข็งจะเคลื่อนย้ายน้ำจากทั้งภายในและภายนอกสิ่งแวดล้อม ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายในและภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น ผลึกน้ำแข็งจะถูกสร้างขึ้นในระหว่างการแช่แข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตกผลึกอีกครั้ง สามารถที่จะทำลายเซลล์เมมเบรนได้ สารอิเล็กโทรไลต์ความเข้มข้นสูงจะถูกสร้างขึ้นโดยการแช่แข็ง และมีผลกระทบต่อชั้นไขมันของเซลล์เมมเบรนโดยจะทำให้เกิดการรั่วได้ การเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะมีผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์โมเลกุลใหญ่รวมทั้ง RNA DNA และ โปรตีน ทำให้เกิดการเสียสภาพ ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงบางอย่างนี้อาจไม่สามารถกลับคืนได้

ได้มีการค้นพบซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีปัจจัยทั้งเดี่ยวหรือหลาย ๆ ปัจจัยรวมกันซึ่งมีผลทำลายเซลล์แบคทีเรียแช่แข็ง ปัจจัยเหล่านี้ ได้แก่ อุณหภูมิที่ลดลง การสร้างผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ การสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์ และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ เป็นต้น และยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า การบาดเจ็บนั้นเกิดขึ้นจากปัจจัยเดี่ยวดั้งเดิมหรือการรวมกันของหลาย ๆ ปัจจัย (Mazur , 1966) แต่เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีหลักฐานจากการทดลองซึ่งชี้ให้เห็นว่า การบาดเจ็บจากการแช่แข็งมีสาเหตุใหญ่มาจากการสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ การเคลื่อนที่จากสารละลายความเข้มข้นต่ำไปยังสารละลายความเข้มข้นสูงกว่า (Ray and Speck , 1973)

มีการเสนอว่า การแช่แข็งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์เมมเบรน ซึ่งต่อมาจะเกิดการแยกกันของพันธะไรโบโซมในเซลล์เมมเบรน เซลล์แช่แข็งจะเกิดการสูญเสียเปปไทด์ที่มีความว่องไว (biologically active peptides) ซึ่งจะกลายเป็นสาเหตุของเมตาบอลิกและการบาดเจ็บอย่างรุนแรง (lethal injury) ได้ในที่สุด (Ray and Speck , 1973) ลักษณะเฉพาะของเซลล์แบคทีเรียและสภาวะแวดล้อมก่อนหน้า และระหว่างการแช่แข็งรวมทั้งความแตกต่างของสายพันธุ์และสปีชีส์อาจมีผลต่อการบาดเจ็บ แบคทีเรียแกรมบวกดูเหมือนว่าจะมีความต้านทานมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในขณะที่การแช่แข็งแทบจะไม่มีผลต่อสปอร์เลย ในการศึกษาเปรียบเทียบการเติบโตที่ระดับสเตชันนารีและเอ็กซ์โปเนนเชียล (stationary and exponential phase) พบว่าที่ระดับเอ็กซ์โปเนนเชียลแบคทีเรียจะมีความไวต่อผลการทำลายเนื่องจากการแช่แข็งมากกว่า (Jones and Fabian , 1952) นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในช่วง logarithmic จะถูกทำลายด้วยอุณหภูมิของการแช่แข็งได้ง่ายกว่าแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในช่วงอื่นของการเจริญเติบโต (วราวุฒิ , 2538) ความหลากหลายของสภาวะการเติบโตก่อนหน้าการแช่แข็ง อย่างเช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระดับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม สภาวะการใช้อากาศ (aerobiosis) จะมีผลกระทบต่อการตอบสนองของแบคทีเรียที่บาดเจ็บเนื่องจากการแช่แข็ง โดยปัจจัยหลักซึ่งมีผลกระทบต่อการบาดเจ็บ ได้แก่ การรวมอยู่ในตัวกลางแขวนลอยของโซเดียมคลอไรด์และเกลือชนิดอื่น ๆ ระดับพีเอชที่ต่ำ และจำนวนออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการแช่แข็ง เป็นต้น ทั้งนี้อุณหภูมิและอัตราการแช่แข็งจะเป็นตัวกำหนดว่าน้ำเซลล์จะแข็งตัวภายในหรือภายนอกเซลล์ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อระดับของการถูกทำลายจากการแช่แข็งได้ ทั้งอัตราการแช่แข็งที่เร็วและช้าล้วนแต่เป็นอันตรายต่อแบคทีเรียแต่ละสปีชีส์ได้ทั้งสิ้น โดย (วราวุฒิ , 2538) กล่าวว่า การแช่แข็งในอัตราที่เร็วจะมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในระดับที่ต่ำกว่าเมื่อใช้การแช่แข็งในอัตราที่ช้ากว่า ทั้งนี้เนื่องจากการแช่แข็งในอัตราที่เร็วจะทำให้จุลินทรีย์ผ่านช่วงอุณหภูมิวิกฤต ซึ่งมีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้น ถ้ามีการแช่แข็งในอัตราที่เหมาะสมก็จะทำให้จุลินทรีย์สามารถมีชีวิตรอดได้เป็นจำนวนมาก

อย่างไรก็ตาม Farrell and Rose (1967) ได้แสดงว่าอัตราการแช่แข็งที่เพิ่มขึ้นจะช่วยส่งเสริมความสามารถในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ด้วย (ภาพที่ 1 , a) โดยการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตนี้อาจมีสาเหตุมาจากช่วงเวลาที่จุลินทรีย์ซึ่งมีความบอบบางได้รับอันตรายจากตัวถูกละลายความเข้มข้นสูงในน้ำส่วนที่ยังไม่แข็งตัวลดน้อยลง และเมื่อการแช่แข็งมีความเร็วเพิ่มขึ้นต่อไป จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจะเริ่มลดลง ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากการสร้างผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ซึ่งมีผลการทำลายเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ (ภาพที่ 1 , b) และเมื่ออัตราการแช่แข็งเพิ่มมากสุด ตัวอย่างเช่น ในกรณีของการใช้ไนโตรเจนเหลว การสร้างผลึกน้ำแข็งจะลดน้อยลงและถูกแทนที่ด้วยก้อนน้ำแข็ง (vitrification) (ภาพที่ 1 , c) โดยปกติ เมื่ออาหารถูกแช่แข็งในทางการค้านั้นแบคทีเรียที่รอดชีวิตจะอยู่ในช่วงของเส้นโค้ง a อย่างไรก็ตาม มีสารบางชนิด อย่างเช่น กลูโคส milk solids ไขมัน และ โซเดียมกลูตาเมต ซึ่งเป็นที่รู้จักว่าสามารถช่วยป้องกันและพัฒนาความอยู่รอดของจุลินทรีย์ ซึ่งกลไกการป้องกันนั้นจะไม่กล่าวถึงในที่นี้

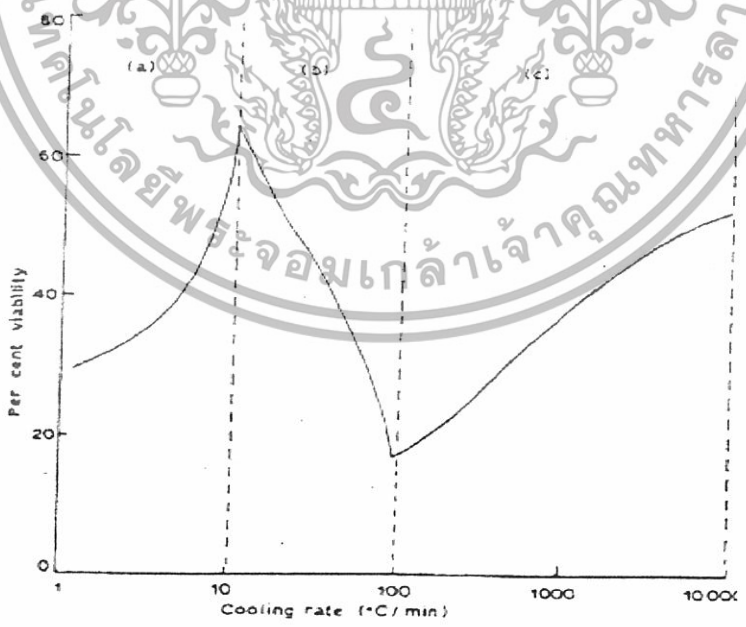
2.2.2 <u>ผลของการแช่แข็งต่อจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษา</u>

การตายของเซลล์แบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งนี้ น่าจะเป็นผลมาจากปัจจัย 2 ประการ ปัจจัยแรก ได้แก่ การตกผลึกใหม่ (recrystallization) ของผลึกน้ำแข็งภายในขนาดเล็กที่ไม่เสถียรซึ่งถูกสร้างขึ้นมาในระหว่างการแช่แข็งแบบเร็ว (rapid freezing) (เวลาแช่แข็งสั้น) อีกปัจจัยคือ การปล่อยไว้ในสารละลายความเข้มข้นสูงและในสารละลายของเซลล์ส่วนที่ยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่แข็งตัวเป็นระยะเวลานาน (Ray and Speck , 1973) พฤติกรรมของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะแช่แข็งจะแปรเปลี่ยนตามอายุของเซลล์ สารย่อยสลาย (menstruum) ของจุลินทรีย์ รวมถึงระยะเวลา และอุณหภูมิในการเก็บรักษา จุลินทรีย์จะมีการตายเพิ่มขึ้นอีกในระหว่างการเก็บรักษา แต่อัตราการตายนั้นจะช้ากว่าในระหว่างการแช่แข็งมาก นอกจากนี้พบว่าในระหว่างการเก็บรักษา ความชันของเส้นกราฟที่รอดชีวิตค่อนข้างจะราบเรียบ (Georgala and Hurst , 1963) การลดต่ำและขึ้นๆ ลงๆ (fluctulates) ของอุณหภูมิ จะเป็นผลดีสำหรับการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (Weiser ,1951 ; Georgala and Hurst ,1963 ; Woodbum and Strong, 1960 ; Haines , 1938)

ส่วนประกอบของอาหาร เช่น ไข่ขาว ซูโครส น้ำเชื่อมข้าวโพด ปลา กลีเซอรอล และเนื้อสกัด จะช่วยเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแบคทีเรียพวกที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ขณะที่มีรายงานว่าในสภาวะความเป็นกรดจะมีผลลดจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลง (Georgala and Hurst , 1963) และการเก็บรักษาในออกซิเจนจะมีผลทำลายจุลินทรีย์มากกว่าเก็บในไนโตรเจน



ภาพที่ 2.1 : ผลของการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์

ที่มา : Farrell and Rose (1967)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 <u>ผลของการละลายต่อจุลินทรีย์</u>

การละลายเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการแช่แข็งซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ การแช่แข็งและการละลายซ้ำจะมีผลในการทำลายแบคทีเรียได้ และเป็นที่รู้กันว่า การละลายอย่างรวดเร็วจะทำให้แบคทีเรียรอดชีวิตได้เป็นจำนวนมาก ยิ่งไปกว่านั้น การละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็วจะช่วยลดจำนวนเกล็ดน้ำแข็งที่ตกผลึกใหม่ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการละลายน้ำแข็งได้มาก อย่างไรก็ตาม ภายใต้สภาวะการทดลอง การละลายอย่างช้าๆ อาจมีส่วนสำคัญช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ได้ เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการเปิดเผยถึงผลการละลายต่อจำนวนจุลินทรีย์ในชิ้นเนื้อว่า ขณะที่อุณหภูมิศูนย์กลางของชิ้นเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ จนถึง -1 องศาเซลเซียสนั้นที่พื้นผิวส่วนนอกก่อน (Roberts , 1974) อย่างไรก็ตามการทำให้อุ่นอย่างรวดเร็วจะมีผลในการทำลายแบคทีเรียบางชนิด (วราวุฒิ , 2538)

2.3 ผลของความร้อนต่อจุลินทรีย์

การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อนเป็นวิธีหนึ่งที่ได้ผลดีมาก แต่มีผู้ตรวจพบว่านมพาสเจอไรซ์บางตัวอย่างมีเชื้อในกลุ่ม Listeria เหตุที่เป็นเช่นนี้นักวิทยาศาสตร์สรุปว่า Listeria บางส่วนอาจจะยังมีชีวิตอยู่ที่อุณหภูมิพาสเจอไรซ์ ชนิด high temperature short time หรือ HTST ถ้าในตัวอย่างนั้นมีเชื้อในกลุ่ม Listeria เริ่มต้นก่อนการพาสเจอไรซ์จำนวนมาก แต่โดยทั่วไปแล้วปริมาณเชื้อ Listeria เริ่มต้นของน้ำนมดิบที่ตรวจพบไม่สูง ดังนั้นอุณหภูมิพาสเจอไรซ์จึงน่าจะเพียงพอที่จะฆ่า Listeria ได้ทั้งหมด ถ้ากระบวนการผลิตถูกต้องทุกขั้นตอนและไม่มีการปนเปื้อนอีกภายหลังการผ่านความร้อน

ความร้อนสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยทำให้โปรตีนสลายตัว ทำให้เส้นคู่ของสาย DNA แตกออกเป็นสายเดี่ยว และทำให้ RNA บางส่วนถูกทำลาย ที่ระดับอุณหภูมิสูงตั้งแต่ 50-60 องศาเซลเซียส จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาด สิ่งต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิกจะไหลออกมา แต่ในกรณีที่อุณหภูมิสูงมาก จะมีผลให้เซลล์ตายทันที โดยที่เยื่อหุ้มเซลล์จะยังคงอยู่ในสภาพปกติ (ปรียา, 2528)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านทานความร้อนของแบคทีเรียในอาหารขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างซึ่งได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ – เวลา ภายใต้สภาพที่กำหนดเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น จะทำให้เวลาที่จำเป็นต้องใช้ลดลง

2.3.2 ความเข้มข้นของสปอร์หรือเซลล์เริ่มต้น ในสภาพที่มีสปอร์หรือเซลล์ในปริมาณมาก จำเป็นต้องใช้ความร้อนที่อุณหภูมิหนึ่งเป็นเวลานานขึ้นเพื่อที่จะสามารถทำลายสปอร์ หรือเซลล์ทั้งหมดได้

2.3.3 สภาพของเซลล์ปกติหรือสปอร์ก่อนการให้ความร้อน สภาพของเซลล์ในระหว่างการเจริญเติบโต หรือสภาพของสปอร์ในระหว่างการสร้างสปอร์จะ มีผลกระทบต่อการต้านต่อความร้อนของเซลล์หรือสปอร์นั้น ทั้งนี้จะแบ่งสภาพดังกล่าวเป็น

2.3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) อาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญอย่างมากต่อการต้านทานความร้อนของเซลล์หรือสปอร์ ตามปกติแล้วในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเซลล์หรือสปอร์ให้เจริญดี จะทำให้เซลล์หรือสปอร์นั้นมีความต้านทานความร้อนได้ดี ทั้งนี้ขึ้นกับผลของชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมถึงปริมาณของสารอาหารดังกล่าวเป็นสำคัญ ในที่นี้จะขอกล่าวถึงรายละเอียดของสารอาหารที่สำคัญต่อการความต้านทานความร้อนอย่างพอสังเขปดังนี้ ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมี growth factors ที่เพียงพอมักทำให้เกิดเซลล์หรือสปอร์ที่ต้านทานความร้อนได้ดี ในกรณีที่มีน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีในปริมาณที่ต่ำอาจช่วยเพิ่มความต้านทานต่อความร้อน แต่ในทางตรงกันข้ามถ้ามีในปริมาณที่สูงน้ำตาลกลูโคสอาจเปลี่ยนไปเป็นกรดซึ่งจะกลับไปลดความต้านทานต่อความร้อนลงมา นอกจากนี้แล้ว เกลือก็ยังมีผลต่อความต้านทานความร้อน กล่าวคือ ประจุของเกลือฟอสเฟตและเกลือแมกนีเซียม จะมีผลในการลดความต้านทานต่อความร้อนของสปอร์แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือทั้งสองชนิดเป็นส่วนประกอบ

2.3.3.2 อุณหภูมิของการบ่ม (Temperature of incubation) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ และสำหรับการสร้างสปอร์ จะมีผลต่อการต้านทานความร้อนของเซลล์และสปอร์ โดยทั่วไปแล้วความต้านทานความร้อนจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มถูกปรับให้สูงใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์นั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3.3 ช่วงของการเจริญเติบโตหรืออายุของเชื้อ (Phase of growth or age) ความต้านทานต่อความร้อนของเซลล์หรือสปอร์ ขึ้นกับช่วงของการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือช่วงของการสร้างสปอร์ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอายุของเซลล์และสปอร์ สำหรับกรณีของเซลล์แบคทีเรียจะมีความต้านทานต่อความร้อนสูงสุด เมื่อเจริญในช่วงปลายของระยะ lag phase แต่เกือบจะมีความต้านทานความร้อนได้สูงเมื่อเจริญอยู่ในช่วง stationary phase เช่นกัน อย่างไรก็ตาม ช่วงที่เซลล์มีความต้านทานต่อความร้อนต่ำสุดอยู่ในระหว่างการเจริญเติบโตในระยะ log phase นั่นเอง

2.3.3.4 สภาพแห้ง (Desiccation) สปอร์แห้ง(สปอร์ที่ถูกเก็บในสภาพแห้ง) ของแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถต้านทานความร้อนได้ดีกว่าสปอร์ที่ถูกเก็บไว้ในสภาพชื้น แต่ทั้งนี้ไม่ได้หมายถึงสปอร์ของแบคทีเรียทั้งหมด

2.3.4 <u>ส่วนประกอบของสับสเตรต</u> สับสเตรต ในที่นี้หมายถึง อาหารที่กำลังจะผ่านการให้ความร้อน จำแนกออกได้ดังนี้

2.3.4.1 ความชื้น (Moisture) ตามปกติแล้วความร้อนเปียก (moist heat) จะมีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ได้สูงกว่าความร้อนแห้ง (dry heat) ดังที่พบในห้องปฏิบัติการจะเห็นว่าเมื่อใช้ความร้อนเปียกโดยอาศัยหม้อนึ่งความดัน สามารถทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 ถึง 30 นาที ในขณะที่เมื่อใช้ความร้อนแห้งโดยอาศัยตู้อบ (hot air oven) ต้องใช้อุณหภูมิถึง 160 ถึง 180 องศาเซลเซียส นาน 3 -4 ชั่วโมง

2.3.4.2 ความเข้มข้นของประจุไฮโดรเจน (Hydrogen – ion concentration , pH) โดยทั่วไปทั้งเซลล์หรือสปอร์จะมีความต้านต่อทานความร้อนได้ดีในสับสเตรตที่มีพีเอชในช่วงเป็นกลาง แต่ถ้าพีเอชเปลี่ยนไปอยู่ในสภาพกรดหรือด่าง จะทำให้ความต้านต่อทานความร้อนของเซลล์หรือสปอร์ลดลง อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลของกรดกับด่างที่มีต่อความต้านทานความร้อนพบว่าเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพความเป็นกรดจะมีผลต่อความต้านทานความร้อนของเซลล์หรือสปอร์อย่างมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของสภาพความเป็นด่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.3 ส่วนประกอบอื่นๆของสับสเตรต (Other constituents of the substrate) ซึ่งพอที่จะแบ่งออกได้ดังนี้

- ไขมัน จุลินทรีย์ที่อยู่ในสับสเตรตอาหารที่มีน้ำมันหรือไขมันจะถูกทำลายได้ยากกว่าอาหารที่ไม่มีน้ำมันหรือไขมัน เนื่องจากไขมันมีความสามารถในการนำความร้อนต่ำ (heat conductivity) และมีความชื้นน้อย ดังนั้นจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารที่มีไขมันหรือน้ำมันจึงสัมผัสกับความร้อนต่ำกว่า จึงสามารถทนความร้อนได้ดีกว่าจุลินทรีย์ในอาหารที่ไม่มีน้ำมันหรือไขมัน Fain และคณะ(1991) รายงานว่า *L. monocytogenes* มีความสามารถในการต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณไขมันในอาหารเพิ่มขึ้น

- โปรตีน ชนิดของโปรตีนในสับสเตรตอาหารเลี้ยงเชื้อและผลิตภัณฑ์อาหาร ช่วยป้องกันเซลล์จากการทำลายด้วยความร้อน โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ และ อัลบูมิน ช่วยเพิ่มความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์บางชนิด

- Water activity หรือ a_w คือ ปริมาณน้ำอิสระในอาหาร ในสภาพปกติ ค่า a_w ภายในเซลล์แบคทีเรียต่ำกว่า a_w ของสภาพแวดล้อมภายนอกเพียงเล็กน้อย เมื่อ a_w ภายนอกลดต่ำลงจะทำให้เซลล์สูญเสียน้ำหรือเรียกว่าเกิด Plasmolysis กลไกการปรับตัวของเซลล์แบคทีเรียเมื่อค่า a_w ลดลง ได้แก่ เซลล์เลือกรับตัวถูกละลาย (solute) จากภายนอกได้ เซลล์สามารถสร้างตัวละลายชนิดใหม่ หรือรวบรวมตัวถูกละลายให้เข้มข้น เพื่อลด a_w ภายในให้เกิดความสมดุลของสารแบคทีเรียแกรมบวก จัดเป็นแบคทีเรียที่มีความต้านทานต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีว่าแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึงสามารถทนต่อ a_w ในระดับต่ำได้ดีกว่า การเติมเกลือในอาหารจะทำให้ a_w ลดลง แต่ความสามารถในการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีเกลือ ขึ้นกับชนิดของเกลือและความเข้มข้นของเกลือด้วย (ทนง , 2524)

สารประกอบกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาล ช่วยให้เซลล์ทนความร้อนได้ดี เนื่องจากน้ำตาลมีผลในการลดค่า a_w ในอาหาร ในทำนองเดียวกันกับโซเดียมคลอไรด์ Summer และคณะ (1991) นอกจากน้ำตาลมีผลในการป้องกันการถูกทำลายด้วยความร้อนให้กับเซลล์แล้ว คาร์โบไฮเดรต ชนิดอื่น ๆ เช่น แป้งและเพคติน มีคุณสมบัติในการเพิ่มความต้านทานความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อนให้เซลล์ได้เช่นเดียวกัน (ทนง, 2524) ความร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปสามารถทำลายแบคทีเรียส่วนใหญ่ในอาหาร แต่หากใช้ปริมาณความร้อนไม่เพียงพอหรือใช้กระบวนการแปรรูปที่ไม่เหมาะสม เซลล์บางส่วนอาจไม่ถูกทำลายแต่จะอยู่ในรูปของเซลล์บาดเจ็บ (Injured cells)

2.4 ลักษณะของ เซลล์แบคทีเรียบาดเจ็บ

กระบวนการแปรรูปต่าง ๆ ที่ทำให้เซลล์จุลินทรีย์อยู่ในสภาพบาดเจ็บนั้นมีสาเหตุมาจากการทำลายที่ส่วนต่าง ๆ ของเซลล์จุลินทรีย์ ดังนี้ คือ

2.4.1 <u>การทำลายที่ผนังเซลล์ หรือการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์</u>

พบว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) ที่พบในน้ำตา เม็ดเลือดขาว เมือก เป็นต้น และยังพบในแบคทีเรียอีกหลายชนิด เอนไซม์นี้จะไปย่อยสลายโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้เซลล์แตก

สารเคมีบางชนิดอาจไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโต มีผลทำให้เกิดเป็นโพรโทพลาสต์ (protoplast) ซึ่งถ้าไม่เลี้ยงไว้ในสภาพที่เหมาะสม เซลล์จะแตกได้ หรือการใช้ยาเพนิซิลลินก็มีผลยับยั้งการสร้างผนังเซลล์

2.4.2 <u>เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยอมให้สารผ่าน</u> (cell permeability)

เยื่อหุ้มเซลล์มีสมบัติที่ยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่เซลล์ ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์นี้ถูกทำลายจะมีผลทำให้ชะงักการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำให้เซลล์ตายได้ สารเคมีบางอย่าง เช่น ฟีนอล สารซักฟอก สบู่ มีความสามารถที่เปลี่ยนแปลงสมบัตินี้ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออกมา

2.4.3 <u>เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนและกรดนิวคลีอิก</u>

เซลล์ที่มีชีวิตจะต้องมีโปรตีนและกรดนิวคลีอิกอยู่ภายในเซลล์ในสภาพปกติหรือเป็นธรรมชาติ ถ้ามีสารเคมีหรือสภาพใด ๆ ที่มาทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไปจากสภาพธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(denature) ก็จะมีผลทำลายเซลล์ได้ เช่น อุณหภูมิสูง สารเคมีความเข้มข้นสูงจะทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกตกตะกอน จับตัวเป็นก้อนแข็ง ซึ่งจะไม่สามารถแปรสภาพให้กลับมาเหมือนเดิมได้อีก

2.4.4 <u>การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์</u>

เอนไซม์ต่าง ๆ จำเป็นในปฏิกิริยาเคมีของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ ดังนั้น ถ้ามีตัวยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) ก็จะมีผลต่อปฏิกิริยาของกระบวนการต่างๆ เช่น กระบวนการไกลโคลิซิส (glycolysis) วัฏจักรเครปส์ (Kreb' tricarboxylic acid cycle) และระบบไซโตโครม (cytochrome system) สารที่เป็นตัวยับยั้ง ได้แก่ ไซยาไนด์ ยับยั้งไซโตโครมออกซิเดสฟลูออไรด์ยับยั้งไกลโคลิซิส เป็นต้น

สารที่เป็นออกซิไดซิงเอเจนต์อย่างแรง เช่น ฮาโลเจน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจทำลายองค์ประกอบของเซลล์จนเซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ตามปกติต่อไปได้ เช่น รวมตัวกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl) ของเอนไซม์ในเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปเอนไซม์จึงไม่ทำงาน นอกจากนี้ยังมีไอออนของโลหะ เช่น เงิน ทองแดง และปรอท ซึ่งจะรวมตัวกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของเอนไซม์หรือโปรตีน มีผลทำให้เซลล์ถูกทำลายได้

2.4.5 <u>ป้องกันการสร้างเมแทบอไลต์</u> (antimetabolites)

เมแทบอไลต์เป็นสารที่จำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ เช่น ในการสังเคราะห์กรดโฟลิก จุลินทรีย์จำเป็นต้องใช้สารกรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (p-aminobenzoic acid) ซึ่งสารนี้มีโครงสร้างคล้ายกับซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) ดังนั้นการใช้ซัลฟานิลาไมด์เข้าแย่งทำปฏิกิริยาแทนที่กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก ทำให้การสังเคราะห์กรดโฟลิกหยุดชะงัก ดังนั้นการใช้สารที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสารเมแทบอไลต์เพื่อไปยับยั้งเมแทบอลิซึมของเซลล์ จึงช่วยทำลายจุลินทรีย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.6 <u>การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก</u>

สารบางอย่างมีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA โดยสารนั้นจะไปขัดขวางการสร้างหน่วยพื้นฐานของกรดนิวคลีอิก คือ พิวรีน และ ไพริมิดีน และไปขัดขวางการรวมตัวของนิวคลีโอไทด์เข้าเป็นกรดนิวคลีอิก ซึ่งจะมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติไป และทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ในที่สุด

ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียบาดเจ็บ

โดยทั่วไปเซลล์บาดเจ็บจะมีลักษณะต่าง ๆ ซึ่งแตกต่างไปจากเซลล์ปกติ (ตารางที่ 2.1) กล่าวคือ เซลล์บาดเจ็บจะสูญเสียคุณสมบัติในการต้านทาน และมีความว่องไวต่อสารเคมีต่าง ๆ มากขึ้น นอกจากนั้นยังสูญเสียส่วนประกอบของโมเลกุลเล็ก ๆ จำนวนมากให้แก่สิ่งแวดล้อม โดยการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้เชื่อว่าทำให้เซลล์เสียความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ไป และยิ่งไปกว่านั้นเซลล์เหล่านี้จะสูญเสียคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนด้วย อย่างไรก็ตามหลังจากได้รับการซ่อมแซมในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแล้วก็จะสามารถเพิ่มจำนวนได้อีกครั้งหนึ่ง โดยเซลล์บาดเจ็บจะมีช่วงระยะเวลาการพักตัว (lag period) ที่ยาวนาน เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะมีผลในการทำลายโครงสร้างและหน้าที่ต่าง ๆ ของส่วนประกอบของโมเลกุลใหญ่ (ตารางที่ 2.2)

ในระหว่างนี้จะเกิดการทำลายโครงสร้างส่วนผิวหน้า (lipopolysaccharides ; LPS : ในแบคทีเรียแกรมลบและกรดไทโอโคอิค ในแบคทีเรียแกรมบวก) ขึ้น และมีรายงานว่าได้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มไซโตพลาสมิค (cytoplasmic membrane) ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เป็นส่วนมาก เมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปที่ต่างกัน การทำลายโครงสร้างทั้ง 2 ส่วนนี้ ส่งผลให้จุลินทรีย์สูญเสียความสามารถในการซึมผ่านและมีความไวต่อสารประกอบต่าง ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดความล้มเหลวได้เมื่อต้องการตรวจหาเซลล์บาดเจ็บโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ลักษณะของเซลล์บาดเจ็บที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปอาหารโดยวิธีต่างๆ

Characteristics
1. Increased sensitivity to :
a. Surface - active compounds
b. Salt and toxic chemicals
c. Antibiotics
d. Dyes
e. Acid and low pH
2. Loss of cellular materials
3. Longer lag phase
4. Inability to multiply (until repair)
5. Ability to repair injury in suitable environment

ที่มา : (Ray , 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ตำแหน่งที่ถูกทำลายในเซลล์บาดเจ็บเนื่องจากกระบวนการแปรรูป

Site
1. Surface structure :
a. Outer membrane in gram - negative
b. Teiochoic acid in gran - positive
2. Cytoplasmic membrane
3. Ribosomes
4. DNA
5. Certain enzymes

ที่มา : (Ray , 1979)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96839

2.5 วิธีการตรวจสอบและการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บ

ระหว่างกระบวนการแปรรูป การเก็บรักษา การขนส่งและการจัดการนั้น อาหารจะต้องผ่านขั้นตอนการแปรรูปทางกายภาพและทางเคมีหลาย ๆ วิธีด้วยกัน (ตารางที่ 2.3) โดยวิธีเหล่านี้มีจุดมุ่งหมายหลักทางจุลชีววิทยา เพื่อเป็นการลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ปนเปื้อนอยู่ในส่วนประกอบต่าง ๆ และในผลิตภัณฑ์ ทั้งยังเป็นการช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์สำเร็จ (finished products) ที่ได้

ตารางที่ 2.3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูป และถนอมอาหาร

Physical
1. Low temperature : refrigeration , freezing
2. Heat (below sterilization) : pasteurization
3. Drying (low moisture) : air drying , freeze drying
4. High solids : sugar , salt
5. Radiation
Chemical
1. Acids : inorganic , organic
2. Preservatives
3. Sanitizers (equipment)

ที่มา : (Ray , 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

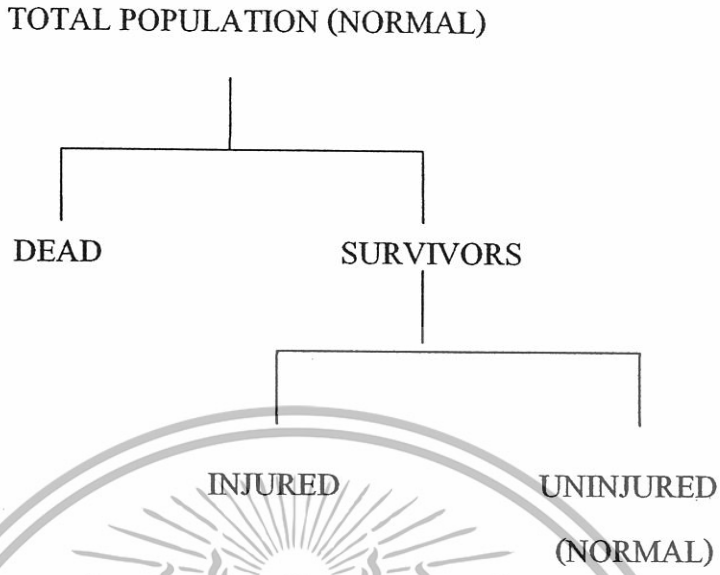
ในส่วนของเซลล์ที่พบหลงเหลืออยู่ภายหลังกระบวนการแปรรูปนั้น ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา จุลินทรีย์เหล่านี้จะคงอยู่ในสภาวะที่อ่อนเพลียหรือบาดเจ็บ จำนวนจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บจะมากน้อยเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการแปรรูป สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารและปัจจัยอื่นๆ โดยได้แก่ จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีสายพันธุ์ต่างๆ พวกที่ทำให้เกิดโรค พวกที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย รวมไปถึงยีสต์และราต่างๆ ซึ่งเป็นที่รู้จักว่าจะเกิดการบาดเจ็บจากกระบวนการที่รุนแรงได้ นอกไปจากนี้ เซลล์บาดเจ็บเหล่านี้ยังสามารถซ่อมแซมหรือฟื้นฟูตัวเองได้เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นเราจึงควรศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารรวมทั้งผลกระทบจากกระบวนการแปรรูปอาหารด้วย เพื่อที่จะสามารถเลือกใช้วิธีการตรวจหาจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป อย่างไรก็ตาม วิธีการทั่วไปที่ใช้สำหรับตรวจหาจำนวน และแยกกลุ่มหรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์จากอาหารนั้นไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบเซลล์บาดเจ็บได้ เนื่องจากวิธีเหล่านี้ได้ถูกออกแบบมาเพื่อใช้ตรวจสอบเซลล์ปกติ นั่นคือตรวจได้เฉพาะเซลล์ที่ไม่บาดเจ็บและยังอยู่รอดเท่านั้น ซึ่งไม่ได้หมายถึงเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด (ภาพที่ 2.2) ดังนั้น วิธีการเหล่านี้ยังไม่เพียงพอสำหรับการชี้ให้เห็นถึงคุณภาพทางด้านการสุขาภิบาลอาหารรวมไปถึงการรับแระกันความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค

เพื่อแก้ปัญหาเหล่านี้ สิ่งที่ควรตระหนักถึง ได้แก่

1.) เซลล์บาดเจ็บและเซลล์ปกติมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างไร และ 2.) ทำไมเซลล์บาดเจ็บจึงไม่ถูกตรวจพบโดยอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ

การเรียนรู้ในสิ่งเหล่านี้จะชักนำไปสู่การตัดสินลักษณะที่แตกต่างระหว่างเซลล์ปกติและเซลล์บาดเจ็บโดยไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงกระบวนการแปรรูปและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 ผลของ sublethal treatment ต่อเซลล์จุลินทรีย์
ที่มา : (Ray , 1979)

2.5.1 การรักษาและการตรวจหาเซลล์บาดเจ็บ

โดยทั่วไปสารจำเพาะที่ใช้เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อตรวจสอบและตรวจหาจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีหรือแยกจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารนั้น จะมีผลยับยั้งการซ่อมแซมหรือฟื้นฟูของแบคทีเรียที่บาดเจ็บ จากข้อมูลในตารางที่ 2.4 แสดงสารประกอบจำเพาะบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแข็งและเหลว ดังนั้นจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องรักษาเซลล์บาดเจ็บก่อนหน้าขั้นตอนของการนับจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะโดยวิธีการทั่วไป อย่างไรก็ตามวิธีการที่ช่วยส่งเสริมการรักษาเซลล์มากที่สุด มักจะมีผลยับยั้งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งน้อยมาก

ในกรณีที่ไม่พิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บเป็นสำคัญ หลักการของการตรวจหาจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บ สามารถกล่าวได้เป็นข้อๆ ดังนี้

ก. เซลล์ที่บาดเจ็บจะถูกรักษาให้หายได้อย่างรวดเร็ว ถ้านำเซลล์ที่บาดเจ็บนั้นไปบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการรักษา (Repair medium) ที่เหมาะสม ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม

ข. เมื่อกระบวนการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เซลล์ที่ได้รับการรักษาแล้วจะพร้อมที่จะเพิ่มจำนวนขึ้นได้ตามปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21095

ค. เซลล์ที่ได้รับการรักษาแล้วจะสามารถเจริญบน Selective medium ซึ่งใช้ในการตรวจนับเซลล์ในสภาพปกติได้

ง. สภาพที่ใช้ในการรักษาเซลล์บาดเจ็บนั้น จะต้องไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่ง (Competting organisms) ของเซลล์ที่บาดเจ็บ

นอกจากนี้แล้ว ระยะเวลาที่จำเป็นต่อการรักษาเซลล์ที่บาดเจ็บนี้ จะต้องขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ คือ ชนิดของผลิตภัณฑ์อาหาร จำนวนของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร และระดับหรือความรุนแรงของกระบวนการแปรรูปที่ใช้ที่มีผลต่อจุลินทรีย์นั้น เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม เซลล์บาดเจ็บยังสามารถซ่อมแซมและเพิ่มจำนวนได้ใน nonselective media ลักษณะเช่นนี้นั่นคือ เซลล์บาดเจ็บสามารถเพิ่มจำนวนได้ใน nonselective media แต่ไม่เพิ่มจำนวนใน selective media ซึ่งสิ่งนี้จะใช้เพื่อตัดสินเปอร์เซ็นต์ของเซลล์บาดเจ็บและเซลล์ปกติท่ามกลางเซลล์ที่รอดชีวิตภายหลังจากผ่านกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ การศึกษานี้จะชี้ให้เห็นถึงจำนวนของเซลล์บาดเจ็บซึ่งแปรเปลี่ยนไปตามกระบวนการแปรรูป รวมทั้งสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และ selective media ที่ใช้ จากข้อมูลในตารางที่ 2.5 ได้แสดงถึงประชากรที่รอดชีวิตประมาณ 56 – 95% ซึ่งเป็นเซลล์บาดเจ็บและไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อใช้วิธีการตรวจนับในอาหารวุ้นจำเพาะสำหรับสายพันธุ์ต่าง ๆ ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ได้กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตาม เซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมดจะสร้างโคโลนีบนอาหารวุ้นไม่จำเพาะ (nonselective agar) ได้ เพื่อเป็นการคาดคะเนจำนวนของเซลล์บาดเจ็บที่ไม่สามารถตรวจพบได้โดยอาหารเหลวจำเพาะต่าง ๆ ซึ่งมีการออกแบบการทดลองให้ต่างกันเล็กน้อยหลังจากผ่านกระบวนการแปรรูปแล้วเซลล์ที่รอดชีวิตจะถูกนับจำนวนโดยวิธีการนับเพลทบนอาหารวุ้นไม่จำเพาะสารละลายเซลล์จะถูกปล่อยทิ้งไว้ในอาหารเหลวจำเพาะเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากการเจือจางที่จำเป็นแล้ว เซลล์จะถูกนับอีกครั้งในอาหารไม่จำเพาะชนิดเดียวกันปริมาณที่นับได้ก่อนหน้า และภายหลังการปลดปล่อยทิ้งไว้ในอาหารเหลวจำเพาะจะแตกต่างกันและใช้เป็นตัวกำหนดจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ ผลที่ได้จะชี้ให้เห็นว่า หลังจากการปล่อยทิ้งไว้เพียง 5 นาทีในอาหารเหลวจำเพาะ เซลล์ที่รอดชีวิตจำนวน 25 ถึง 85 % จะไม่สามารถถูกตรวจพบได้ต่อมาในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะ (nonselective media) และยังมีข้อแนะนำว่าการปล่อยเซลล์ทิ้งไว้ในสิ่งแวดล้อมไม่จำเพาะ เซลล์บาดเจ็บจะสูญเสียความสามารถในการเพิ่มจำนวนไปในสิ่งแวดล้อมไม่จำเพาะ สิ่งนี้อาจเป็นสาเหตุสู่การตายของเซลล์

การบาดเจ็บเนื่องจาก sublethal treatment นั้นสามารถหายได้เมื่อได้รับการซ่อมแซมในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมอย่างเช่นในอาหารวุ้นหรืออาหารเหลวไม่จำเพาะ (nonselective agar or broth medium)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ตารางที่ 2.4 สารประกอบจำเพาะบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ชนิดแข็งและเหลว

Surface active compounds
Bile salts , deoxycholate , laury sulfate , teepol
Salts and toxic chemicals
NaCl , LiCl , bismuth , selenite , iodine , azide , rellurite
Antibiotics
Cycloserine , polymyxin
Dye
Brilliant green , eosine
Acid
Tartaric acid , acetic acid

ที่มา : (Ray , 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ผลของอาหารแข็งจำเพาะในการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียที่บาดเจ็บ

Organism	Treatment[a]	Selective media[b] (s)	% Undetected
Escherichai coli	Freezing	VRBA	90
	Heating	VRBA	56
	Acid treatment	VRBA	83
Salmonella sp.	Freezing	XLDA	90
	Freeze - drying	XLDA	95
Vibrio	Freezing	TCBS	80
parahaemolyticus	Refrigeration	TCBS	67
	Freezing	MSA	67
Staphylococcus	Heating	MSA	59
aureus	Freezing	KFA	88
	Heating	KFA	95
Streptococcus fecalis			

ที่มา : (Ray , 1979)

2.5.2 ข้อควรคำนึงในการตรวจหาเซลล์บาดเจ็บ

หลักสำคัญซึ่งควรพิจารณาเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบเซลล์บาดเจ็บ สามารถสรุปได้ดังนี้

ก. เซลล์บาดเจ็บจะกลายเป็นเซลล์ที่มีความไวต่อสารประกอบจำเพาะ (Selective compounds) ต่าง ๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วขณะหนึ่ง

ข. ความไวนี้จะมีการขยายออกไป อันเป็นผลเนื่องมาจากการทำลายเยื่อซึมผ่านในโครงสร้างส่วนผิวหน้า และ เยื่อหุ้มไซโตพลาสมิคของเซลล์

ค. การบาดเจ็บสามารถรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่จำเพาะที่มีการเติมสารอาหารเพิ่มเติม เมื่อเซลล์ได้รับการซ่อมแซมแล้วจะมีความต้านทานต่อสารจำเพาะ และสามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้

ง. เซลล์บาดเจ็บจะไม่มีการซ่อมแซมหรือเพิ่มจำนวนเมื่อเลี้ยงในสารประกอบจำเพาะเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนั้นมีความเข้มข้นสูงจนเกินไป หรือเซลล์นั้นถูกกระทบอย่างรุนแรงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของสารจำเพาะที่มีต่อแบคทีเรียที่บาดเจ็บโดยตรง

จ. สามารถตรวจนับจำนวนหรือแยกเซลล์บาดเจ็บได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ (Selective media) ถ้าทิ้งไว้ให้ได้รับการรักษาในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก่อนจะปล่อยทิ้งไว้ใน Selective environment

ฉ. ในส่วนของประชากรที่อยู่รอดซึ่งประกอบด้วยเซลล์ปกติและเซลล์บาดเจ็บนั้น เซลล์บาดเจ็บจะมีความแตกต่างในส่วนของตำแหน่งที่ถูกทำลายเท่า ๆ กับระดับของการทำลาย ณ ตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้น จึงต้องการเวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกันสำหรับการซ่อมแซม ภายใต้สภาวะเดียวกัน เซลล์ปกติอาจจะมีการเพิ่มจำนวนเป็นระยะเวลายาวนานก่อนหน้าเซลล์บาดเจ็บโดยสามารถเพิ่มจำนวนที่นับได้ ในสภาวะการซ่อมแซมนั้นควรจะมีการเพิ่มจำนวน (ที่นับได้) โดยวิธี Selective enumeration ซึ่งเป็นเพียงแค่การซ่อมแซมเซลล์เท่านั้นไม่ได้รวมถึงการเพิ่มจำนวน

ช. ในระหว่างการรักษาเซลล์บาดเจ็บ อาจเกิดปัญหาเนื่องจากการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมื่ออาหารที่ใช้ในการรักษาเป็นอาหารเหลว เพราะถ้าจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บนั้นสามารถเพิ่มจำนวนได้ในระหว่างการรักษา จะมีผลทำให้ปริมาณของจุลินทรีย์ดังกล่าวภายหลังจากการตรวจนับมีค่าสูงกว่าปกติได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ในการตรวจทางจุลชีววิทยา

1. เครื่อง Autoclave รุ่น Tomy SS-325 , Japan
2. เครื่อง Hot air oven รุ่น Heraeus
3. เครื่อง UV ESCO รุ่น KUL , Belgium
4. Vortex รุ่น Vortex mixer VM-300
5. Water bath รุ่น Memmert W 600
6. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส รุ่น Memmert
7. Microwave oven ยี่ห้อ HITACHI
8. ตู้เย็น ยี่ห้อ SANYO
9. Autopipette รุ่น Eppendorf , Germany
10. เครื่องแก้วที่ใช้วิเคราะห์ทางเคมี

3.2 สารเคมี

1. NaCl บริษัท Fisher Scientific
2. Ammonium ferric citrate , green บริษัท Fluka

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase(Tryptic) Soy Broth (TSB) บริษัท MERCK
2. Yeast Extract บริษัท Scharlau chemie S.A. Barcelona , Spain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Esculin บริษัท Sigma

4. Pyruvate บริษัท MERCK

5. Palcam บริษัท MERCK

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 การทำให้เซลล์จุลินทรีย์บาดเจ็บโดยการแช่แข็ง(Freeze injured) ของเชื้อ *Listeria innocua*

1. ใช้ลูป (loop) ลนไฟทิ้งไว้สักครู่ เขี่ยเชื้อ *Listeria innocua* จาก slant TSAYE (ภาคผนวก ก) ลงในหลอด TSBYE (ภาคผนวก ก)

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะได้เชื้อที่มีปริมาณ 10^8 cells / ml

3. ดูดเชื้อ 0.5 ml ลงในหลอดที่มี TSBYE (ภาคผนวก ก) 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

4. นำหลอดที่บ่มแล้วไปแช่แข็งที่อุณหภูมิของตู้เย็น (-4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 วัน

5. นำหลอดที่แช่แข็งมาละลายโดยแช่น้ำในบีกเกอร์

6. นำหลอดไป vortex แล้วใช้ Micropipette ดูดมา 1 ml ใส่ใน 0.85 % NaCl 9 ml จะได้ระดับความเจือจาง 10^{-1}

7. เจือจางต่อให้เป็น 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ด้วย0.85 % NaCl 9 ml

8. ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ใช้ Micropipette ดูดมา 0.1 ml ใส่ลงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด คือ TSAYE (ภาคผนวก ก) , TSAYE + Esculin (ภาคผนวก ก) , TSAYE + Esculin + Pyruvate (ภาคผนวก ก) , Palcam (ภาคผนวก ก) และ Palcam + Pyruvate (ภาคผนวก ก) แล้วทำการ Spread plate

9. ทำการ Spread plate เช่นเดียวกันที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6}

10. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

11. นับจำนวนโคโลนีและเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในแต่ละอาหารโดยใช้สถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1 การทำให้เซลล์จุลินทรีย์บาดเจ็บโดยการให้ความร้อน(Heat injured) ของเชื้อ *Listeria innocua*

1. ใช้ลูป (loop) ลนไฟทิ้งไว้สักครู่ เขี่ยเชื้อ *Listeria innocua* จาก slant TSAYE (ภาคผนวก ก) ลงในหลอด TSBYE (ภาคผนวก ก)

2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะได้เชื้อที่มีปริมาณ 10^8 cells / ml

3. ดูดเชื้อ 0.5 ml ลงในหลอดที่มี TSBYE (ภาคผนวก ก) 5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

4. นำหลอดที่บ่มแล้วไปให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

5. นำหลอดไปแช่ในน้ำผสมน้ำแข็งทันที และ vortex

6. ใช้ Micropipette ดูดมา 1 ml ใส่ใน 0.85 % NaCl 9 ml จะได้ระดับความเจือจาง 10^{-1}

7. เจือจางต่อให้เป็น 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ด้วย0.85 % NaCl 9 ml

8. ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ใช้ Micropipette ดูดมา 0.1 ml ใส่ลงบนเพลทอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด คือ TSAYE (ภาคผนวก ก), TSAYE + Esculin (ภาคผนวก ก), TSAYE + Esculin + Pyruvate (ภาคผนวก ก), Palcam (ภาคผนวก ก) และ Palcam + Pyruvate (ภาคผนวก ก) แล้วทำการ Spread plate

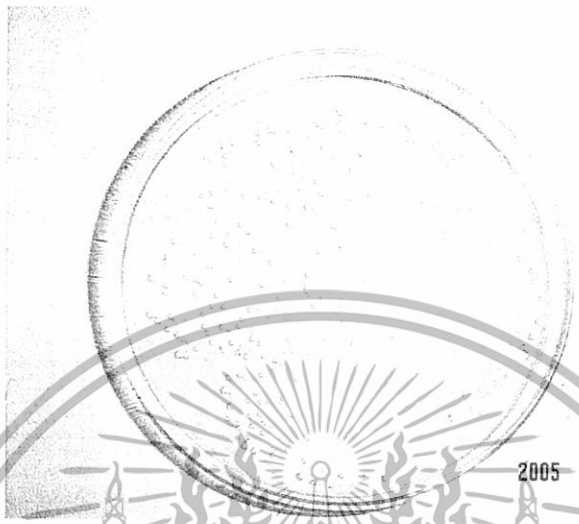
9. ทำการ Spread plate เช่นเดียวกันที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6}

10. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

11. นับจำนวนโคโลนีและเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในแต่ละอาหารโดยใช้สถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

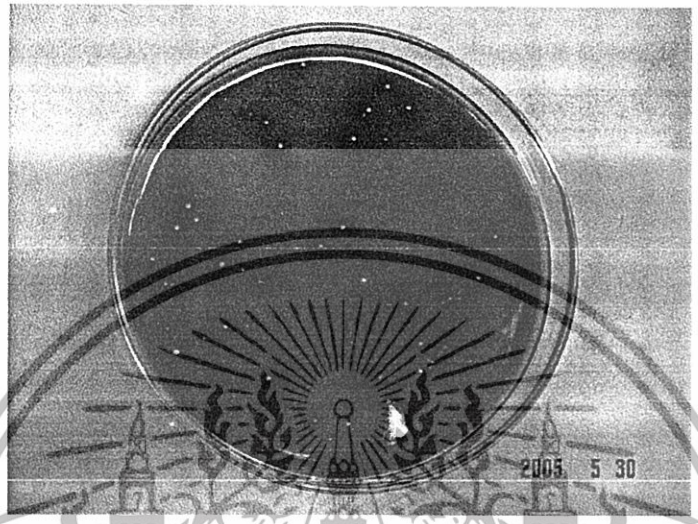
ภาพที่ 3.1 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Listeria innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE



ภาพที่ 3.2 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Listeria innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam + Pyruvate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3.3 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Listeria innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam



ภาพที่ 3.4 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Listeria innocua* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE + Esculin + Pyruvate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาทำการเปรียบเทียบระหว่างอาหารแต่ละชนิด แล้วทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS โดยวิเคราะห์การทดลองปัจจัยเดียวแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการนับเชื้อ *Listeria innocua* โดยการแช่แข็ง

จากการนำเชื้อ *Listeria innocua* ไปทำให้เซลล์บาดเจ็บโดยการนำเชื้อปริมาณ 10^8 cells/ml ไปทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิของตู้เย็น (-4 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 วัน แล้วทำการตรวจนับเชื้อได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการนับเชื้อ *Listeria innocua* โดยการแช่แข็ง

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนซ้ำ	ระดับการเจือจาง		ค่า log cfu / ml	ค่าเฉลี่ย
		10^{-5}	10^{-6}		
TSAYE	1	186 256	93 86	7.9518	7.89
	2	>300 >300	63 75	7.8388	
	3	>300 >300	72 78	7.8751	
TSAYE+Esculin	1	>300 >300	71 65	7.8325	7.82
	2	>300 >300	72 59	7.8162	
	3	>300 >300	68 61	7.8096	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการนับเชื้อ *Listeria innocua* โดยการแช่แข็ง (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนซ้ำ	ระดับการเจือจาง		ค่า log cfu / ml	ค่าเฉลี่ย
		10^{-5}	10^{-6}		
PALCAM+Pyruvate	1	>300 206	63 78	7.8482	7.84
	2	>300 >300	57 73	7.8129	
	3	>300 >300	64 76	7.8451	
PALCAM	1	>300 229	36 29	7.5119	7.51*
	2	>300 >300	39 32	7.5502	
	3	>300 >300	26 31	7.4548	
TSAYE+Esculin+ Pyruvate	1	>300 >300	78 95	7.9370	7.89
	2	>300 >300	71 68	7.8420	
	3	>300 >300	75 83	7.8976	

* มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บ โดยการแช่แข็งทั้ง 5 ชนิด คือ TSAYE , TSAYE + Esculin , TSAYE + Esculin + Pyruvate , Palcam และ Palcam + Pyruvate โดยมีค่า log cfu/ml คือ 7.89 , 7.82 , 7.89 , 7.51 และ 7.84 ตามลำดับ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปหาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ซึ่งวิเคราะห์การทดลองปัจจัยเดียวแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ดังตารางในภาคผนวก ข ผลปรากฏว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการนับเชื้อ *Listeria innocua* โดยการให้ความร้อน

จากการนำเชื้อ *Listeria innocua* ไปทำให้เซลล์บาดเจ็บโดยการนำเชื้อปริมาณ 10^8 cells/ml ไปทำการให้ความร้อนโดยแช่ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการตรวจนับเชื้อได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการนับเชื้อ *Listeria innocua* โดยการให้ความร้อน

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนซ้ำ	ระดับการเจือจาง			ค่า log	ค่าเฉลี่ย
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	cfu / ml	
TSAYE	1	229 245	76 34	33 17	6.7404	6.92
	2	>300 >300	98 70	10 10	6.9243	
	3	>300 >300	135 108	14 12	7.0864	
TSAYE+Esculin	1	271 291	40 54	6 2	6.6721	6.67
	2	293 >300	39 43	8 11	6.6128	
	3	>300 >300	57 48	15 14	6.7243	
PALCAM+Pyruvate	1	>300 >300	41 65	22 15	6.7243	6.77
	2	>300 >300	43 42	7 13	6.6335	
	3	>300 >300	117 60	19 15	6.9494	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการนับเชื้อ *Listeria innocua* โดยการให้ความร้อน (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนซ้ำ	ระดับการเจือจาง			ค่า log cfu / ml	ค่าเฉลี่ย
		10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}		
PALCAM	1	80 89	10 16	2 1	5.9294	6.30*
	2	>300 258	29 30	2 3	6.4698	
	3	>300 >300	32 31	17 15	6.4983	
TSAYE+Esculin+ Pyruvate	1	72 60	56 34	8 5	6.8195	6.87
	2	>300 >300	58 60	5 9	6.7709	
	3	>300 >300	103 104	8 10	7.0170	

* มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น

จากผลการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บ โดยการให้ความร้อนทั้ง 5 ชนิด คือ TSAYE , TSAYE + Esculin , TSAYE + Esculin + Pyruvate, Palcam และ Palcam + Pyruvate โดยมีค่า log cfu/ml คือ 6.92 , 6.67 , 6.87 , 6.30 และ 6.77 ตามลำดับ เมื่อนำผลการทดลองที่ได้ไปหาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS ซึ่งวิเคราะห์การทดลองปัจจัยเดียวแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ดังตารางในภาคผนวก ง ผลปรากฏว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 คือ มีปริมาณเซลล์ที่ตรวจนับได้น้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ เนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam เป็น Selective medium ของเซลล์ *Listeria innocua* มีสาร Selective agent ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์บาดเจ็บ ซึ่งจะให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการแช่แข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดง % Injured cells ของเชื้อ *Listeria innocua* จากการแช่แข็งและให้ความร้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam เทียบกับ TSAYE และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam + Pyruvate เทียบกับ TSAYE

จำนวนซ้ำ	% Injured cells			
	Freeze injured		Heat injured	
	Palcam เทียบกับ TSAYE	Palcam + Pyruvate เทียบกับ TSAYE	Palcam เทียบกับ TSAYE	Palcam + Pyruvate เทียบกับ TSAYE
1	63.69	21.23	76.36	3.64
2	48.55	5.80	64.88	49.40
3	62.00	6.67	74.07	27.16
เฉลี่ย	58.08	11.23	71.77	26.73

เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหา % Injured cells ของเชื้อ *Listeria innocua* จากการแช่แข็งและให้ความร้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam เทียบกับ TSAYE ที่ไม่มีสารยับยั้งอื่น ๆ พบว่าในระหว่างการแช่แข็งมี % Injured cells เท่ากับ 58.08 ซึ่งน้อยกว่า % Injured cells ของการให้ความร้อน เท่ากับ 71.77 เนื่องจากเซลล์ *L. innocua* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (0.5-1 องศาเซลเซียส) ทำให้เซลล์ทนต่ออุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง (-4 องศาเซลเซียส) ได้ดี และเมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหา % Injured cells ของ *L. innocua* จากการแช่แข็งและให้ความร้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam + Pyruvate เทียบกับ TSAYE พบว่าในระหว่างการแช่แข็งมี % Injured cells เท่ากับ 11.23 ส่วน % Injured cells ของการให้ความร้อน เท่ากับ 26.73 แต่อย่างไรก็ตามทั้งในกระบวนการแช่แข็งและการให้ความร้อนเซลล์บาดเจ็บจะสูญเสียคุณสมบัติในการต้านทาน และมีความว่องไวต่อสารเคมีต่าง ๆ มากขึ้น นอกจากนั้นยังสูญเสียส่วนประกอบของโมเลกุลเล็ก ๆ จำนวนมากให้แก่สิ่งแวดล้อม โดยการเปลี่ยนแปลงเช่นนี้เชื่อว่าทำให้เซลล์เสียความสามารถในการซึมผ่าน (permeability) ไป และยิ่งไปกว่านั้นเซลล์เหล่านี้จะสูญเสียคุณสมบัติในการเพิ่มจำนวนด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการคำนวณพบว่า % Injured cells ทั้งในระหว่างการแช่แข็งและให้ความร้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam เทียบกับ TSAYE มากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam + Pyruvate เทียบกับ TSAYE แสดงว่าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam ซึ่งเป็น Selective medium ที่มีการเติม Pyruvate จะสามารถฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของ *L. innocua* ให้เจริญเพิ่มมากขึ้นได้พอๆกับ TSAYE ที่ไม่มีสาร Selective agent

ดังเช่นในการตรวจ Direct Plate Count ของ *Staphylococcus aureus* ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar ที่มี Pyruvate รวมอยู่ในส่วนผสมด้วย ซึ่ง Pyruvate จะสามารถฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของ *S. aureus* จึงทำให้ผลการตรวจนับเชื้อมีค่าที่น่าเชื่อถือ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้ Pyruvate ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam ซึ่งเป็น Selective medium ของ *L. innocua* มีผลในการช่วยฟื้นฟูเซลล์ *L. innocua* ที่บาดเจ็บ จึงเหมาะในการนำมาตรวจ Direct Plate Count ทำให้ผลการตรวจนับเชื้อมีค่าที่น่าเชื่อถือ และแม้ว่าในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam จะมี Esculin ที่ใช้เป็นสาร Indicator แต่จากผลการทดลองพบว่า Esculin ไม่มีผลต่อการยับยั้งหรือทำลายเซลล์ *L. innocua* ที่บาดเจ็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า การตรวจนับเซลล์ *Listeria innocua* ที่บาดเจ็บจากการแช่แข็งบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด (TSAYE , TSAYE + Esculin , TSAYE + Esculin + Pyruvate , Palcam และ Palcam + Pyruvate) พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 และการตรวจนับเซลล์ *Listeria innocua* ที่บาดเจ็บจากการให้ความร้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด ให้ผลเช่นเดียวกันกับการแช่แข็ง โดย Pyruvate มีผลในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของ *Listeria innocua* ในอาหาร Palcam ที่เป็น Selective medium ได้ดีเทียบเท่ากับ medium ที่ไม่มี Selective agent คือ TSAYE ส่วน Esculin ซึ่งเป็น Indicator ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam ไม่มีผลในการฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บของ *Listeria innocua*

การตรวจหาเชื้อในกลุ่ม Listeria ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Selective medium ไม่เหมาะสมในการนำมาตรวจนับเซลล์บาดเจ็บ ถ้าจะทำการตรวจนับเซลล์บาดเจ็บต้องเลี้ยงเชื้อในอาหาร Non selective medium เพื่อฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บเสียก่อน แต่ถ้าทำการตรวจนับในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Selective medium ควรเติม Pyruvate ซึ่งสามารถช่วยฟื้นฟูเซลล์บาดเจ็บได้ดี ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีค่าน่าเชื่อถือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ทนง ภัครัชพันธุ์. 2524. การใช้ความร้อนในกระบวนการแปรรูป. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 160 น.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่4. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิศานาถ ตัณฑัยย์. 2543. ผลของความร้อนและโซเดียมคลอไรด์ต่อการอยู่รอดของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลพร้อมบริโภค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปทุมพร ฉิมอเนก. 2535. "สภาวะแวดล้อมกับการอยู่รอดของ *Listeria monocytogenes* ในอาหาร." อาหาร 22, 4: 8-14.

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. 2528. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหารเล่ม 1. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 247 น.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ศศิกานต์ อึ้งนิภากุล. 2546. การใช้สารผสมเปอร์ออกซีแอซีติกแอซิดในการลดปริมาณ *Listeria monocytogenes* ปนเปื้อนในกุ้งสดก่อนกระบวนการแช่เยือกแข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Doyle, M.P. (1989). Foodborne Bacterial Pathogens. Food Research: Institute University of Wisconsin-Madison Marcel Dekker, INC. Newyork and Basel.

Fain, A. Guerin, B. and Hart, BJ. 1991. Effects of Above - Optimum Growth Temperature and Cell Morphology on Thermotolerance of *Listeria Monocytogenes* Cells Suspended in Bovine Milk. Journal Appl Environ Microbiol, June. 2065-2071.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Farrell, J. and Rose, A. 1967. Temperature effects on microorganisms. Annual Rev. of Microb. 21, 101-120.

Foster, J. L. and Hall, H.K. 1991. Tolerance of Acid – Adapted and Non Adapted *Escherichai Coli* O157:H7 Cells To Reduced pH as Affected by type of Acidulant. Journal of Applied Microbiology 86, 203-210.

Georgala, D. L. and Hurst, A. 1963. Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure Intrenational. International Journal of Food microbiology 28, 197-219

Haines, R.B. 1938. Proc. R. Soc. London, Ser. B 124, 451.

Hill, B.L. and Britt L.D. 1995. pH Dependent Stationary- Phase Acid Resistance Response of Enterohemorrhagic *Escherichai Coli* in The Presence of Various Acidulants. Journal of Food Protection 62 , 211-218.

Jones, A.H., and Fabian. F.W. 1952. The protective effect of free and membrane-bound cryoprotectants during freezing and freeze-drying of liposomes. Journal of Controlled Release , 105-116

Marth, E.H. 1973. Behavior of food microorganism during freeze preservation. In Low-temperature preservation of foods and living matter. Ed. By O.R. Fennema, W.D. Powrie and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York.

Mazur, P. 1966. In "Cryobiology" (H.T. Merymen, ed.), p.214. Academic Press, New York.

Nakagawa, H.,Hara-Kudo, Y.,Kojima, T.,Ikedo, M.,Kodaka, H.,Konuma , H., and Kumagai S. 2000. Detection of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 Cells from foods by resuscitation prior to selective enrichment. International Journal of Food Microbiology 60, 107-110.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pinto, M., Burii, S., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2001. Comparison of Oxford Agar , PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from Foods and environmental samples. Food Control 12 , 511-514.

Ray, B., and Speck, M.L. 1973. Inactivation and injury of Listeria monocytogenes as affected by heating and freezing. Journal of Food Microbiology , 17-23

Ray, B. 1979. Methods to Detect Stressed Microorganisms. Journal of Food Protection 42, 340-345.

Roberts, T.A. 1974. Meat Freezing – Why and How? . Symp. Meat Res. Inst., Langford, U.K. 3 : 211-217.

Scott, W.J. 1962. Proc. Low Temp. Microbial. Symp. 89 , 1961.

Summers, P.M. and John H.L. 1991. The Role of Spray Oil in Alternative Agriculture. University of California Sustainable Agriculture Research and Education Program.

Weiser, H.H. 1951. Quick Frozen Foods. Biotechnology Annual Review 13 ,50.

Woodbum, M.J. and Strong, D.H. 1960. "Intrevention sensu wilson : The only valid approach to microbiological safety of food" International Journal of Food microbiology , 1-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Palcam

Peptone	23.0 g	Agar (Columbia Agar)	13.0 g
Yeast extract	3.0 g	D(-) - manitol	10.0 g
Starch	1.0 g	Ammonium iron (3) – citrate	0.5 g
Sodium chloride	5.0 g	Aesculin	0.8 g
Bextrose	0.5 g	Lithium chloride	15.0 g
Phenol red	0.08 g	pH 7.2 ± 0.2 at 25 °C	

ผสมองค์ประกอบของอาหารทั้งหมด นำไปต้มจนวุ้นละลาย(เดือด) แล้วต้มต่ออีกประมาณ 1 นาที ถ่ายใส่ขวดที่มีฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ หลังจากฆ่าเชื้อใน Autoclave นำขวดมาใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วใช้ Micropipette ดูดน้ำ Sterile มา 1 ml ใส่ใน Supplement ของ Palcam แล้ว vortex ใช้ Micropipette ดูด Supplement ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam 500 ml เขย่าให้เข้ากัน

Palcam + Pyruvate

Peptone	23.0 g	Agar (Columbia Agar)	13.0 g
Yeast extract	3.0 g	D(-) - manitol	10.0 g
Starch	1.0 g	Ammonium iron (3) – citrate	0.5 g
Sodium chloride	5.0 g	Aesculin	0.8 g
Bextrose	0.5 g	Lithium chloride	15.0 g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phenol red	0.08 g	pH	7.2 ± 0.2 at 25 °C
Pyruvate	10.0 g		

ผสมองค์ประกอบของอาหารทั้งหมด นำไปต้มจนวุ้นละลาย(เดือด) แล้วต้มต่ออีกประมาณ 1 นาที ถ่ายใส่ขวดที่มีฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

<u>หมายเหตุ</u> หลังจากฆ่าเชื้อใน Autoclave นำขวดมาใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วใช้ Micropipette ดูดน้ำ Sterile มา 1 ml ใส่ใน Supplement ของ Palcam แล้ว vortex ใช้ Micropipette ดูด Supplement ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam 500 ml เขย่าให้เข้ากัน

<u>Trypticase (Tryptic) Soy Broth (TSBYE)</u>

Trypticase peptone	17.0 g	Phytone peptone	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g	Dipotassium phosphate	2.5 g
Glucose	2.5 g	Distilled water	1.0 liter
Yeast extract	6.0 g	Final pH	7.3 ± 0.2

อุ่นสารละลายส่วนผสมทั้งหมด แล้วถ่ายอาหารปริมาตร 5 ml ลงในหลอดทดลองที่มีฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

<u>Trypticase (Tryptic) Soy Agar (TSAYE)</u>

Tryptone	17.0 g	Soytone	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g	Agar	15.0 g
Yeast extract	6.0 g		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมองค์ประกอบของอาหารทั้งหมด นำไปต้มจนวุ้นละลาย(เดือด) แล้วต้มต่ออีกประมาณ 1 นาที ถ่ายใส่ขวดที่มีฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

<u>การเตรียม slant TSAYE</u> ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายใส่หลอดทดลองที่มีฝาปิด หลอดละ 5 ml นำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำออกมาเอียงให้ผิวหน้าเอียงเป็นระนาบเดียวกัน

<u>Trypticase (Tryptic) Soy Agar (TSAYE) + Esculin</u>

Tryptone	17.0	g	Soytone	5.0	g
Sodium chloride	5.0	g	Agar	15.0	g
Yeast extract	6.0	g	Esculin	0.8	g
Ammonium iron (3) – citrate	0.5	g			

ผสมองค์ประกอบของอาหารทั้งหมด นำไปต้มจนวุ้นละลาย(เดือด) แล้วต้มต่ออีกประมาณ 1 นาที ถ่ายใส่ขวดที่มีฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

<u>Trypticase (Tryptic) Soy Agar (TSAYE) + Esculin + Pyruvate</u>

Tryptone	17.0	g	Soytone	5.0	g
Sodium chloride	5.0	g	Agar	15.0	g
Yeast extract	6.0	g	Esculin	0.8	g
Ammonium iron (3) – citrate	0.5	g	Pyruvate	10.0	g

ผสมองค์ประกอบของอาหารทั้งหมด นำไปต้มจนวุ้นละลาย(เดือด) แล้วต้มต่ออีกประมาณ 1 นาที ถ่ายใส่ขวดที่มีฝาปิด นำเข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ alpha = 0.05 โดยวิธี Duncan (Freeze injured)

ANOVA

MIC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.312	4	.078	46.223	.000
Within Groups	.017	10	.002		
Total	.329	14			

MIC

Duncan

TRT	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
PALCAM	3	7.505633	
TSAYE+Esculin	3		7.819433
PALCAM+Pyruvate	3		7.835400
TSAYE	3		7.888567
TSAYE+Esculin+Pyruvate	3		7.892200
Sig.		1.000	.070

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ alpha = 0.05 โดยวิธี LSD(Freeze injured)

Multiple Comparisons
Dependent Variable: MIC
LSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) TRT	(J) TRT				Lower Bound	Upper Bound
TSAYE	TSAYE+Esculin	.069133	.0335304	.066	-.005577	.143844
	PALCAM+Pyruvate	.053167	.0335304	.144	-.021544	.127877
	PALCAM	.382933 *	.0335304	.000	.308223	.457644
	TSAYE+Esculin+ Pyruvate	-.003633	.0335304	.916	-.078344	.071077
TSAYE+ Esculin	TSAYE	-.069133	.0335304	.066	-.143844	.005577
	PALCAM+Pyruvate	-.015967	.0335304	.644	-.090677	.058744
	PALCAM	.313800 *	.0335304	.000	.239090	.388510
	TSAYE+Esculin+ Pyruvate	-.072767	.0335304	.055	-.147477	.001944
PALCAM+ Pyruvate	TSAYE	-.053167	.0335304	.144	-.127877	.021544
	TSAYE+Esculin	.015967	.0335304	.644	-.058744	.090677
	PALCAM	.329767 *	.0335304	.000	.255056	.404477
	TSAYE+Esculin+ Pyruvate	-.056800	.0335304	.121	-.131510	.017910
PALCAM	TSAYE	-.382933 *	.0335304	.000	-.457644	-.308223
	TSAYE+Esculin	-.313800 *	.0335304	.000	-.388510	-.239090
	PALCAM+Pyruvate	-.329767 *	.0335304	.000	-.404477	-.255056
	TSAYE+Esculin+ Pyruvate	-.386567 *	.0335304	.000	-.461277	-.311856
TSAYE+ Esculin+ Pyruvate	TSAYE	.003633	.0335304	.916	-.071077	.078344
	TSAYE+Esculin	.072767	.0335304	.055	-.001944	.147477
	PALCAM+Pyruvate	.056800	.0335304	.121	-.017910	.131510
	PALCAM	.386567 *	.0335304	.000	.311856	.461277

* The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ alpha = 0.05 โดยวิธี Duncan (Heat injured)

ANOVA

MIC

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.726	4	.181	5.061	.017
Within Groups	.359	10	.036		
Total	1.084	14			

MIC

Duncan

TRT	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Palcam	3	6.299167	
TSAYE+Esculin	3		6.669733
Palcam+Pyruvate	3		6.769067
TSAYE+Esculin+Pyruvate	3		6.869133
TSAYE	3		6.917033
Sig.		1.000	.167

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ alpha = 0.05 โดยวิธี LSD (Heat injured)

Multiple Comparisons
Dependent Variable: MIC
LSD

		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) TRT	(J) TRT				Lower Bound	Upper Bound
TSAYE	TSAYE+Esculin	.247300	.1546047	.141	-.097181	.591781
	Palcam+Pyruvate	.147967	.1546047	.361	-.196514	.492447
	Palcam	.617867 *	.1546047	.003	.273386	.962347
	TSAYE+Esculin+ Pyruvate	.047900	.1546047	.763	-.296581	.392381
TSAYE+ Esculin	TSAYE	-.247300	.1546047	.141	-.591781	.097181
	Palcam+Pyruvate	-.099333	.1546047	.535	-.443814	.245147
	Palcam	.370567 *	.1546047	.038	.026086	.715047
	TSAYE+Esculin+ Pyruvate	-.199400	.1546047	.226	-.543881	.145081
Palcam+ Pyruvate	TSAYE	-.147967	.1546047	.361	-.492447	.196514
	TSAYE+Esculin	.099333	.1546047	.535	-.245147	.443814
	Palcam	.469900 *	.1546047	.012	.125419	.814381
	TSAYE+Esculin+ Pyruvate	-.100067	.1546047	.532	-.444547	.244414
Palcam	TSAYE	-.617867 *	.1546047	.003	-.962347	-.273386
	TSAYE+Esculin	-.370567 *	.1546047	.038	-.715047	-.026086
	Palcam+Pyruvate	-.469900 *	.1546047	.012	-.814381	-.125419
	TSAYE+Esculin+ Pyruvate	-.569967 *	.1546047	.004	-.914447	-.225486
TSAYE+ Esculin+ Pyruvate	TSAYE	-.047900	.1546047	.763	-.392381	.296581
	TSAYE+Esculin	.199400	.1546047	.226	-.145081	.543881
	Palcam+Pyruvate	.100067	.1546047	.532	-.244414	.444547
	Palcam	.569967 *	.1546047	.004	.225486	.914447

* The mean difference is significant at the .05 level.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

วิธีการคำนวณ % Injured cells ของเชื้อ *Listeria innocua* จากการแช่แข็งและให้ความร้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam เทียบกับ TSAYE

จากสูตร % Injured cells $= \dfrac{[\text{TSAYE} - \text{Palcam}]}{\text{TSAYE}} \times 100$

การคำนวณ % Injured cells (Freeze injured)

ครั้งที่ 1 % Injured cells $= \dfrac{[89.5 - 32.5]}{89.5} \times 100$

$= 63.69\ \%$

ครั้งที่ 2 % Injured cells $= \dfrac{[69.0 - 35.5]}{69.0} \times 100$

$= 48.55\ \%$

ครั้งที่ 3 % Injured cells $= \dfrac{[75.0 - 28.5]}{75.0} \times 100$

$= 62.00\ \%$

การคำนวณ % Injured cells (Heat injured)

ครั้งที่ 1 % Injured cells $= \dfrac{[55.0 - 13.0]}{55.0} \times 100$

$= 76.36\ \%$

ครั้งที่ 2 % Injured cells $= \dfrac{[84.0 - 29.5]}{84.0} \times 100$

$= 64.88\ \%$

ครั้งที่ 3 % Injured cells $= \dfrac{[121.5 - 31.5]}{121.5} \times 100$

$= 74.07\ \%$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

วิธีการคำนวณ % Injured cells ของเชื้อ *Listeria innocua* จากการแช่แข็งและให้ความร้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Palcam + Pyruvate เทียบกับ TSAYE

จากสูตร % Injured cells $= \dfrac{[\text{TSAYE} - (\text{Palcam} + \text{Pyruvate})]}{\text{TSAYE}} \times 100$

การคำนวณ % Injured cells (Freeze injured)

<u>ครั้งที่ 1</u> % Injured cells $= \dfrac{[89.5 - 70.5]}{89.5} \times 100$

$= 21.23\ \%$

<u>ครั้งที่ 2</u> % Injured cells $= \dfrac{[69.0 - 65.0]}{69.0} \times 100$

$= 5.80\ \%$

<u>ครั้งที่ 3</u> % Injured cells $= \dfrac{[75.0 - 70.0]}{75.0} \times 100$

$= 6.67\ \%$

การคำนวณ % Injured cells (Heat injured)

<u>ครั้งที่ 1</u> % Injured cells $= \dfrac{[55.0 - 53.0]}{55.0} \times 100$

$= 3.64\ \%$

<u>ครั้งที่ 2</u> % Injured cells $= \dfrac{[84.0 - 42.5]}{84.0} \times 100$

$= 49.40\ \%$

<u>ครั้งที่ 3</u> % Injured cells $= \dfrac{[121.5 - 88.5]}{121.5} \times 100$

$= 26.73\ \%$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวชนม์นิภา โอมอภิญญาณ เกิดวันที่ 4 พฤษภาคม 2527 จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) ในปี พ.ศ. 2548 โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนกัลยาณีศรีธรรมราช นครศรีธรรมราช ในปี 2544

นางสาววริศรา จิรพันธุ์ศักดิ์ เกิดวันที่ 15 พฤษภาคม 2528 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) ในปี พ.ศ. 2548 โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนสันติราษฎร์วิทยาลัย กรุงเทพมหานคร ในปี 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้