รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทในการยับยั้งเชื้อ *Clostridium perfringens* ในผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีด

Inhibitory concentration of sodium lactate for *Clostridium perfringens* occurring in sous-vide beef product

นางสาวโสรยา เกิดพิบูลย์

- ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทในการยับยั้งเชื้อ *Clostridium perfringens* ในผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีด

Inhibitory concentration of sodium lactate for *Clostridium perfringens* occurring in sous-vide beef product

นางสาวโสรยา เกิดพิบูลย์

RCH
ส991ค
2559
ทรัพย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
หมายเลขทะเบียน 145919
วันเดือนปี 11 เมษ. 2560
b 12840786
i

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัยในโครงการวิจัยเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

โสรยา เกิดพิบูลย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) ผลของโซเดียมแลคเตทต่อสปอร์ของเชื้อ *Clostridium perfringens* ในเนื้อซูวีด

แหล่งเงิน รายได้
ประจำปีงบประมาณ 2559
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ต.ค. 58 ถึง 30 ก.ย. 59

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ และผู้ร่วมโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด
นางสาวโสรยา เกิดพิบูลย์ (หัวหน้าโครงการ)
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของโซเดียมแลคเตทต่อสปอร์ของเชื้อ *Clostridium perfringens* ในเนื้อซูวีด ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนสูงและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในคน โดยศึกษาผลของระยะเวลาในการซูวีดต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ผ่านการให้ความร้อนโดยการจำลองสภาวะการซูวีดในหลอดทดลอง (SVM broth) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ Cooked meat medium และ Fluid Thioglycolate medium และใช้ความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้น 2 ระดับคือ 10^3 และ 10^5 spores/ml จากการศึกษาพบว่าการใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^5 spores/ml เมื่อผ่านกระบวนการซูวีดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีสปอร์ของเชื้อเหลือรอดอยู่ประมาณ 1 log cycle ในขณะที่ความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้น 10^3 spores/ml เมื่อซูวีดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ไม่พบสปอร์ของเชื้อในอาหาร SVM broth โดยการลดลงของสปอร์มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดและผลของอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสปอร์ของเชื้อต่างกันเพียงเล็กน้อย จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^5 spores/ml ในการทดลองขั้นต่อไป ผลของการใช้โซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหาร SVM broth ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทร้อยละ 0, 1.5, 3 และ 4.5 ผ่านกระบวนการซูวีดที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทร้อยละ 3 และ 4.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ได้ดีกว่าที่ระดับเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทร้อยละ 1.5 และ 0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการอยู่รอดของสปอร์เพียงเล็กน้อย โดยพบว่า Cooked meat medium มีประสิทธิภาพในการอยู่รอดของสปอร์ดีกว่า Fluid Thioglycolate medium แต่สามารถตรวจพบปริมาณเชื้อที่ระดับ log cycle เดียวกัน จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5 ในการทดลองถัดไป จากนั้นทำการศึกษาผลของโซเดียมแลคเตทที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีดและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษา ผลการทดลองพบว่าหลังจากการนำเนื้อวัวส่วนพื้นท้องและนำไปซูวีดที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานานกว่า 72 ชั่วโมงยังคงพบสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เหลืออยู่ 0.33 log spores/g แต่ไม่มีการเพิ่มขึ้นของสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* และในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่มีโซเดียมแลคเตทมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสปอร์ *C. perfringens* เล็กน้อยในระหว่างการเก็บรักษา ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคเนื้อซูวีดที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5 พบว่าผู้บริโภคทั้งหมด 40 คน ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างเสต็กเนื้อ ซูวีดที่มีและไม่มีสารละลายโซเดียมแลคเตท โดยผู้บริโภค 39 คน จาก 40 คน ให้การยอมรับในเนื้อ ซูวีดหลังจากการประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : ซูวีด, โซเดียมแลคเตท, เนื้อโคพื้นเมือง, เนื้อซูวีด, *Clostridium perfringens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Effect of sodium lactate on *Clostridium perfringens* spores in sous-vide beef
Faculty: Agro - Industry

ABSTRACT

The objectives of this research were to study effect of sodium lactate on *Clostridium perfringens* spores in sous-vide beef since it produced spores heat resistant and caused disease to humans. Effect of sous-vide cooking time on *C. perfringens* spores inhibition was studied sous-vide model broth (SVM) was used Cooked meat (CM) and Fluid Thioglycolate (FTG) as mediums and initial loads of *C. perfringens* spores of 10^3 and 10^5 spores/ml were observed. It was found that using initial load of 10^5 spores/ml to SVM and heated at 60 °C for 36 hours decreased *C. perfringens* spores to 1 log cycle, while using initial load of 10^3 spores/ml to SVM and heated at the same condition was not found the spores. Decreasing of spores after SVM was in the same trend for both mediums with slightly different. Initial load of *C. perfringens* spores of 10^5 spores/ml was applied for the next part of the study. Effect of sodium lactate (NaL) on inhibition of *C. perfringens* spores was studied NaL concentrations of 0, 1.5, 3 and 4.5 % (w/w) were applied to SVM broth and sous-vide cooked at 60 °C for 36 hours. It was found that using of 3 % and 4.5 % NaL had more effective to inhibit *C. perfringens* spores than those using of 0 and 1.5 % with significantly different ($p \leq 0.05$). Besides, results were found that types of medium slighty affected survival of spores. Using of CM had better effective to spore survival than that of FTG, while levels of spores survival were in the same log cycle. NaL concentration of 4.5% was applied for the next study. Moreover, effect of NaL on microorganisms inhibition in sous-vide beef and its shelflife was observed. It was found that after sous-vide cooking of flank beef treated by 4.5% NaL at 60 °C for 72 hours had *C. perfringens* spores survival for 0.33 log spores/g. However, *C. perfringens* spores of sample treated with NaL were not increased during storage at 4°C, while spores of sample untreated with NaL was found to slightly increased. Moreover, sensory evaluation and acceptance of sous-vide beef with NaL of 4.5% addition were found that 40 panels did not classify the different between sous-vide beef steak with and with out NaL addition. Besides, 39 from 40 panels accepted sous-vide beef steak.

Keywords : *Clostridium perfringens*, local Thai beef, sodium lactate, sous-vide, sous-vide beef

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ (ไทย)	ii
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	viii
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	3
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กระบวนการชูวีด	4
2.2 เนื้อโค	5
2.3 การปนเปื้อนและเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์	13
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์และการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน	18
2.5 วัตถุเจือปนอาหาร	20
2.6 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการวิเคราะห์	21
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง	25
3.1 วัตถุดิบ	25
3.2 อุปกรณ์	25
3.3 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์	26
3.4 สารเคมี	26
3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	31
4.1 ผลของระยะเวลาในการซูวีดที่มีต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ใน หลอดทดลอง	31
4.2 ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีผลต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ใน หลอดทดลอง	33
4.3 ผลของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีดและการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา	36
4.4 ตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคเนื้อซูวีด	40
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	43
บรรณานุกรม	44
ภาคผนวก	50
ก. การเตรียมสารละลายสปอร์บริสุทธิ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายเคมีเพื่อใช้ใน การทดลอง	51
ข. การเตรียมตัวอย่างและการตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์	55
ค. การเตรียมตัวอย่างเนื้อสำหรับใส่สารละลายโซเดียมแลคเตท	57
ง. การแช่เนื้อในสารละลายสปอร์บริสุทธิ์ของเชื้อ *C. perfringens*	58
จ. การเตรียมเสต็กเนื้อซูวีดสำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัส	59
การนำเสนอผลงาน	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 อุณหภูมิและระยะเวลาที่แนะนำเพื่อความปลอดภัยในการแช่เย็น	5
2.2 ข้อดีและข้อเสียของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการซูวีด	5
3.1 สภาวะในเนื้อซูวีดที่ศึกษา	28
4.1 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ระหว่างกระบวนการซูวีดที่ 60 องศาเซลเซียส	31
4.2 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหาร CM-SVM broth ที่มีสารละลายโซเดียมแลคเตทความเข้มข้นระดับต่างๆ ระหว่างกระบวนการซูวีดที่ 60 °C	33
4.3 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหาร FTM-SVM broth ที่มีสารละลายโซเดียมแลคเตทความเข้มข้นระดับต่างๆ ระหว่างกระบวนการซูวีดที่ 60 °C	34
4.4 ปริมาณเชื้อทั้งหมดในเนื้อซูวีดร่วมกับสารละลายโซเดียมแลคเตท 4.5 % ระหว่างกระบวนการซูวีดที่ 60 °C ที่ระยะเวลาต่างๆกัน	36
4.5 ปริมาณสปอร์ *C. perfringens* ที่เหลือรอดในเนื้อซูวีดที่มีการเติมสารละลายโซเดียมแลคเตท 4.5 % และซูวีดที่ 60 °C ที่ระยะเวลาต่างๆกัน	37
4.6 ปริมาณสปอร์ของ *C. perfringens* ที่เหลือรอดในเนื้อที่ซูวีดที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 36 ชั่วโมง ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	39
4.7 คะแนนเฉลี่ยความแตกต่างทางประสาทสัมผัสและค่า t ของเนื้อซูวีดที่เติมโซเดียมแลคเตทเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติมโซเดียมแลคเตท	41
4.8 ผลการทดสอบการยอมรับของผลิตภัณฑ์เสต็กเนื้อซูวีดราดน้ำเกรวี่	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โคพันธุ์พื้นเมือง ภาคกลาง (a) ภาคเหนือ (b) ภาคใต้ (c) และภาคอีสาน (d)	8
2.2	แผนภาพตำแหน่งของเนื้อสเต็ก ฟิเลต์มิยอง (a) ริบอาย (b) แฟลงก์ (c) สตริปลอยน์ (d) เซอร์ลอยน์ (e) และ ทีโบน (f)	14
ก.1.1	สารละลายสปอร์บริสุทธิ์ของเชื้อ *C.perfringens*	51
ก.1.2	อาหารสำหรับสร้างสปอร์ของเชื้อ *C.perfringens*	52
ก.1.3	อาหารเลี้ยงเชื้อ Cook meat medium	52
ก.1.4	อาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thioglycolate medium	53
ก.1.5	อาหาร SPS agar	53
ก.1.6	อาหาร CW (*Clostridium welchii*) agar	53
ก.2.1	สารละลายโซเดียมแลคเตทผสมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ	54
ข.3	โคโลนีสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหาร SPS agar	55
ข.4	ยืนยัน *C.perfringens* ในอาหาร CW Agar (a) ไม่ใช่ *C.perfringens* ; (b) *C.perfringens*	56
ค.1	การแบ่งชิ้นเนื้อสำหรับใส่สารละลายโซเดียมแลคเตท	57
ง.1	การฆ่าเชื้อเนื้อด้วยแสง UV ในตู้ปลอดเชื้อ	58
ง.2	การแช่เนื้อในสารละลายสปอร์บริสุทธิ์	58
จ.1	เนื้อวัวก่อนนำไปผ่านกระบวนการซูวีด	59
จ.2	เนื้อวัวที่ผ่านกระบวนการซูวีดในถุงสุญญากาศ	59
จ.3	เสต็กเนื้อซูวีดและน้ำเกรวี่ที่ใช้สำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบวนการซูวีด (sous-vide cooking) เป็นกระบวนการที่วัตถุดิบ หรืออาหารถูกบรรจุในถุงสุญญากาศที่ทนความร้อน และถูกแปรรูปภายใต้อุณหภูมิและระยะเวลาที่กำหนด (Schellekens, 1996) โดยวัตถุดิบดังกล่าวได้รับความร้อนที่อุณหภูมิระดับพาสเจอร์ไรเซชันเป็นระยะเวลานาน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็น (0-3 องศาเซลเซียส) (Church, 1998) กระบวนการซูวีดมีข้อดี คือวัตถุดิบอาหารถูกบรรจุอยู่ในถุงสุญญากาศก่อนนำไปให้ความร้อนในสภาวะที่ควบคุม ความร้อนเกิดการถ่ายเทผ่านถุงสุญญากาศไปที่วัตถุดิบอาหารได้อย่างเพียงพอ ป้องกันการเกิดการปนเปื้อนของอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษา สามารถป้องกันการเกิดกลิ่นรสเนื่องจากการเกิดออกซิเดชัน และยังช่วยเก็บรักษากลิ่นรสที่ดีของวัตถุดิบ รวมทั้งป้องกันการสูญเสียความชื้นที่มีอยู่ในอาหาร (Church and Parsons, 2000) นอกจากนี้กระบวนการซูวีดสามารถปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะความนุ่มและความฉ่ำของเนื้อสัตว์อีกด้วย (Church and Parsons, 2000; Schafheitle, 1990) กระบวนการซูวีดส่งผลให้วัตถุดิบมีการสูญเสียน้ำหนักเพียง 5-10% เมื่อเทียบวิธีการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์อาหารโดยตรงซึ่งมีการสูญเสียน้ำหนักสูงถึง 25-40% (Sheppard, 1987)

มีงานวิจัยที่นำเทคนิคการซูวีดไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของวัตถุดิบ โดยเฉพาะในเนื้อสัตว์หลายชนิด ได้แก่ การนำกระบวนการซูวีดไปปรับปรุงคุณภาพด้านกายภาพ ทั้งด้านสีและเนื้อสัมผัสของเนื้อไก่ (Komoltri, 2012) การปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัส โดยเฉพาะความนุ่มของเนื้อแกะ (Roldan et al., 2013) และการปรับปรุงสมบัติเชิงกายภาพและเคมีของเนื้อส่วนแก้มของหมู (Jose et al., 2012) เป็นต้น จากผลการวิจัยของ Kongpeam, Kerdpiboon และ Peuchkamut (2015) ที่มีการนำกระบวนการซูวีดมาใช้ในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อพื้นท้องของโคพันธุ์พื้นเมืองของไทยซึ่งมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่เหนียว แต่มีคุณค่าทางโภชนาการที่สูง และมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อโคขุนและเนื้อโคที่นำเข้ามาจากต่างประเทศประมาณ 2-3 เท่า ผลจากการทดลองพบว่ากระบวนการซูวีดสามารถปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อตำแหน่งพื้นท้อง ซึ่งเป็นส่วนที่เหนียวเป็นอันดับต้นของโคพันธุ์พื้นเมือง ทำให้มีลักษณะเนื้อสัมผัสโดยเฉพาะในด้านความนุ่ม และความชุ่มฉ่ำของเนื้อที่ไม่แตกต่างจากเนื้อโคขุนสายพันธุ์กำแพงแสนของไทยที่ตำแหน่งเดียวกัน

อย่างไรก็ตามในกระบวนการซูวีดมีการบรรจุเนื้อดิบในสภาวะสุญญากาศ ก่อนการนำเนื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ จึงอาจส่งผลให้เกิดการเจริญหรือการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่อาจปนเปื้อนอยู่ในเนื้อดิบ และรวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ เชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในเนื้อสัตว์ ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม Bacillus, Clostridium, Proteus, Pseudomonas, Salmonella และ *Escherichia coli* เป็นต้น (Skandamis and Gounadaki, 2009) เนื้อสัตว์ดิบเมื่อบรรจุในถุงสุญญากาศ หลังจากผ่านการซูวีดแล้วมีการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ กรณีที่เนื้อเกิดการปนเปื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อจุลินทรีย์ก่อนการบรรจุ เมื่อผ่านกระบวนการแปรรูปและเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ อาจทำให้มีการเจริญของเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะ เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Clostridium perfringens* ที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้ โดยเชื้อ *Cl. perfringens* จะสร้างสารพิษและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่ปริมาณเชื้อปนเปื้อนประมาณ 10^6 CFU/100 g แต่โดยทั่วไปจะพบในเนื้อวัวประมาณ 10^2 CFU/100 g (Miwa et al., 1998)

การใช้สารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Antimicrobial) สามารถชะลอการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลินทรีย์ จึงช่วยลดการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ รวมทั้งป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการบริโภคเชื้อจุลินทรีย์หรือสารพิษที่เชื้อจุลินทรีย์นั้นสร้างขึ้น มีงานวิจัยจำนวนมากที่นำสารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น การใช้โซเดียมฟอสเฟตและโซเดียมไฮเปอร์คลอไรต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Campylobacter และ Salmonella ในเนื้อไก่ (Sarjit and Dyles, 2015) การใช้เกลือแอซิติก และเกลือแลคเตทในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกพร้อมบริโภค (Ahmed et al., 2015) แต่ยังมีงานวิจัยจำนวนน้อยที่มีการศึกษาการใช้สารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการซูวีด ดังนั้นหากมีการนำสารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวในการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีด จึงเป็นแนวทางในการเพิ่มความมั่นใจในการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีดในระดับอุตสาหกรรม และโดยเฉพาะในธุรกิจการจัดและการบริการอาหาร

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ผ่านการแปรรูปโดยการซูวีด มีโอกาสในการเกิดการปนเปื้อนของเชื้อ *Cl. perfringens* โดยการใช้สารต่อต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มของเกลือ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวได้ (Juneja, 2006) ทั้งนี้ โซเดียมแลคเตท เป็นเกลือโซเดียมของกรดแลคติก เป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร โซเดียมแลคเตทเป็นสารที่ทาง USFDA – FSIS อนุญาตให้ใช้ในเนื้อสัตว์ โดยสามารถใช้ได้ 1.5 – 3.0 กรัมต่อ น้ำหนักเนื้อสัตว์ 100 กรัม หรือ ไม่เกินร้อยละ 4.8 ต่อน้ำหนักเนื้อสัตว์

เนื้อโคไทย เป็นเนื้อที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ค่อนข้างเหนียว เมื่อเทียบกับเนื้อโคขุนทั้งที่เลี้ยงในประเทศ และเนื้อนำเข้าจากต่างประเภท โดยมีงานวิจัยที่ยืนยันแล้วว่ากระบวนการซูวีด สามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพโดยเฉพาะลักษณะเนื้อสัมผัส (ความนุ่ม) ของเนื้อที่ตำแหน่งพื้นท้อง ซึ่งเป็นส่วนที่เหนียวที่สุดตำแหน่งหนึ่งเมื่อเทียบกับตำแหน่งชิ้นเนื้ออื่น (Kongpeam, Kerdpiboon and Peuchkamut, 2015) งานวิจัยนี้ศึกษาความปลอดภัยในการบริโภคเนื้อโคสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยที่ผ่านกระบวนการซูวี โดยการใช้โซเดียมแลคเตท เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Cl. perfringens* โดยการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตตที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Cl. perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำระดับความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในสภาวะที่ทำการทดลอง เพื่อทดสอบผลของโซเดียมแลคเตตที่มีต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีด รวมทั้งการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพ และการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีดที่มีการเติมโซเดียมแลคเตท

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Cl. perfringens* ในหลอดทดลอง

1.2.2 ศึกษาผลของโซเดียมแลคเตทที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อซูวีดข

1.2.3 การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อซูวีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ศึกษาผลของระยะเวลาในการซูวีดโดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0 – 36 ชั่วโมง ที่มีต่อความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง

1.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ใน sous-vide model (SVM) broth โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตท 3 ระดับร้อยละ 1.5, 3 และ 4.5 และนำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

1.3.3 ศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีดและการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน

1.3.4 ตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของเนื้อซูวีดโดยเปรียบเทียบผลของการเติมโซเดียมแลคเตทและไม่มีการเติมโซเดียมแลคเตทในผลิตภัณฑ์โดยใช้วิธี Different from control test เปรียบเทียบคุณลักษณะ 5 ด้านคือ ลักษณะปรากฏ สี รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม รวมทั้งทดสอบการยอมรับโดยราดร่วมกับน้ำเกรวี่และให้ผู้ทดสอบเลือกยอมรับผลิตภัณฑ์หรือไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบผลของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อการเจริญเติบโตของสปอร์ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง

1.4.2 ทราบผลของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อการเจริญเติบโตของสปอร์ *C. perfringens* ในเนื้อซูวีดและในระหว่างการเก็บรักษา

1.4.3 ทราบผลโซเดียมแลคเตทมีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสต่อเนื้อซูวีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระบวนการซูวีด

ซูวีด (Sous-vide) ในภาษาฝรั่งเศสแปลว่า "ภายใต้สุญญากาศ" โดย Benjamin Thomson เป็นผู้ค้นพบเทคนิค "ซูวีด" เป็นครั้งแรกในปีคริสศักราช 1799 ต่อมาวิศวกรชาวอเมริกันและฝรั่งเศสเป็นกลุ่มแรกที่มีการพัฒนาเทคนิคซูวีดในการปรุงอาหารในช่วงแรกโดยนำวัตถุดิบ ตับห่าน (Foie Gras) มาผ่านกระบวนการซูวีดและพบว่าตับห่านที่ผ่านการซูวีด มีลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ดีขึ้น (Myhrvold et al., 2011)

กระบวนการซูวีด (sous-vide cooking) เป็นกระบวนการที่วัตถุดิบ หรืออาหารถูกบรรจุในถุงสุญญากาศที่ทนความร้อน ก่อนการนำไปแปรรูปในระดับพาสเจอร์ไรเซชันภายในระยะเวลาที่กำหนด (Schellekens, 1996) หรือถูกปรุงในภาวะสุญญากาศและผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานาน (Low temp long time) (Vaudagna et al., 2002) และทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 0-3 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงก่อนนำไปเก็บรักษา (Church, 1998) กระบวนการซูวีดมีข้อดี คือการที่วัตถุดิบอาหารถูกบรรจุอยู่ในถุงสุญญากาศก่อนนำไปให้ความร้อนในภาวะที่ควบคุม ความร้อนเกิดการถ่ายเทผ่านถุงสุญญากาศไปที่วัตถุดิบอาหารได้โดยตรงทำให้สามารถป้องกันการเกิดการปนเปื้อนของอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษา และป้องกันการเกิดกลิ่นรสเนื่องจากการเกิดออกซิเดชัน อีกทั้งยังช่วยเก็บรักษากลิ่นรสที่ดีของวัตถุดิบ รวมทั้งป้องกันการสูญเสียน้ำที่มีอยู่ในวัตถุดิบอาหาร (Church and Parsons, 1993) โดยกระบวนการซูวีดสามารถปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์โดยเฉพาะความนุ่มและความฉ่ำของเนื้อสัตว์ (Church and Parsons, 2000; Schafheitle, 1990) ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการซูวีดแล้ว ควรนำมาลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์โดยน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 0-3 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง (Armstrong and Mcilveen, 2000) ก่อนนำมาเก็บแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็ง เพื่อลดโอกาสในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และอาจลดโอกาสในการเจริญเติบโตของสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด ทั้งนี้โอกาสในการพบเชื้อจุลินทรีย์หรือสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ ในผลิตภัณฑ์ซูวีดที่เก็บรักษาในภาวะแช่เย็นหรือแช่เยือกแข็งยังประกอบไปด้วยปัจจัยอื่นอีก เช่น ชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในวัตถุดิบ ภาวะที่ใช้ในการซูวีดและภาวะที่ใช้ในการเก็บรักษา เป็นต้น

ดังนั้นการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่ำหลายระดับส่งผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันโดย ACMSF (1992) ได้ให้คำแนะนำอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่บรรจุในภาวะสุญญากาศรวมไปถึงกระบวนการซูวีดโดยอ้างอิงกับการเจริญของเชื้อ non-proteolytic *Clostridium botulinum* เพราะเชื้อชนิดนี้เป็นเชื้อก่อโรคสามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ อีกทั้งสามารถเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 3.3 องศาเซลเซียส โดยการเก็บวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิน้อยกว่า 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้น้อยกว่า 31 วัน และหากเก็บที่อุณหภูมิสูงขึ้น ระยะเวลาการเก็บที่ปลอดภัยต่อการบริโภคจะลดน้อยลงตามลำดับ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 อุณหภูมิและระยะเวลาที่แนะนำเพื่อความปลอดภัยในการแช่เย็น

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา (วัน)
น้อยกว่า 3.0	น้อยกว่า 31
น้อยกว่า 5	น้อยกว่า 10
5 – 10	น้อยกว่า 5

ที่มา: ดัดแปลงจาก ACMSF (1992)

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ซูวีดที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์ซูวีดได้ยาวนานยิ่งขึ้นเพราะจะช่วยชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ผลของกระบวนการซูวีดที่มีต่ออาหารในด้านกระบวนการและความปลอดภัยอาหารแสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ข้อดีและข้อเสียของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการซูวีด

ข้อดี	ข้อเสีย
ปรับปรุงเนื้อสัมผัสให้ดียิ่งขึ้น	ใช้ระยะเวลานาน
อาหารสุกทั่วทั้งชิ้น	มีโอกาศที่จุลินทรีย์ไม่ใช้อากาศเจริญเติบโต
สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการน้อย	
ยืดอายุการเก็บรักษา	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Creed and Reeve, 1998; Schafheitle, 1990

โดยอันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากผลิตภัณฑ์อยู่ภายในภาชนะบรรจุปิดสนิทเนื่องจากมีออกซิเจนน้อยกว่าปกติ ซึ่งเป็นผลทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษา แต่ในขณะเดียวกันถ้ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ประเภทไม่ใช้อากาศในการดำรงค์ชีวิต เช่น *Clostridium botulinum* และ *Clostridium perfringens* ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและสามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้จะส่งผลทำให้ผู้บริโภคได้รับอันตรายจากการบริโภคได้ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2547)

2.2 เนื้อโค

ในกลุ่มของเนื้อที่มีสีแดง (red meat) เนื้อสัตว์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสัตว์เศรษฐกิจ ได้แก่ เนื้อโค เนื้อกระบือ เนื้อแพะ และเนื้อสุกร เป็นต้น โดยเนื้อโคที่มีอยู่ในประเทศไทยมีความแตกต่างกันเนื่องจากสายพันธุ์และระบบการผลิต ส่งผลให้คุณภาพเนื้อที่ได้มีความแตกต่างกัน ในการเลือกใช้ประโยชน์จากเนื้อโค ขึ้นกับความเหมาะสมของคุณภาพของเนื้อที่แตกต่างกันดังกล่าว และการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายตามความต้องการของผู้บริโภค

2.2.1 ประเภทของเนื้อโค

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (2552) ได้แบ่งเนื้อโคในประเทศไทย ตามระบบการผลิตออกเป็น 6 ประเภทดังนี้

1) เนื้อโคขุนคุณภาพสูง หมายถึงเนื้อโคที่มีความนุ่มมาก เป็นเนื้อที่มีไขมันแทรกในเนื้อ (marbling หรือ intramuscular fat) และผ่านขั้นตอนการบ่มเนื้อ (meat aging) ภายใต้อุณหภูมิการเก็บรักษาเนื้อในห้องเย็น 0 – 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 – 7 วัน ก่อนการจำหน่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อโคคุณภาพสูงได้มาจากการเลี้ยงโคลูกผสมเลือดโคยุโรป ที่นิยมมากคือ โคพันธุ์ชาโรเล่ส์ โดยโคลูกผสมมีเลือดโคยุโรปมากกว่าร้อยละ 50 โดยที่เป็นที่รู้จักคือ เนื้อโคขุนโพนยางคำ หรืออีกชื่อหนึ่งเรียกว่า Thai-French

2) เนื้อโคขุนคุณภาพปานกลาง หมายถึงเนื้อโคที่มีความนุ่มปานกลาง เป็นเนื้อที่มีไขมันแทรก ได้มาจากการขุนโคลูกผสมพันธุ์บราห์มัน โคจะถูกขุนด้วยอาหารข้นและหญ้าสด หรือฟาง เนื้อโคขุนกลุ่มนี้อาจจะผ่านขั้นตอนการบ่มหรือไม่ก็ได้ ขึ้นอยู่กับตลาดของเนื้อโค เนื้อโคขุนกลุ่มนี้จะมีความนุ่มด้อยกว่าเนื้อโคขุนคุณภาพสูง แม้จะมีการบ่มเนื้อนานถึง 21 วันก็ตาม ทั้งนี้เพราะเป็นโคขุนลูกผสมพันธุ์บราห์มันและพันธุ์พื้นเมืองที่อยู่ใน ตระกูลโคอินเดีย (Indicus) ที่มีเอนไซม์ calpastatins ที่เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpains ที่ทำให้เนื้อนุ่มน้อยกว่าโคในตระกูลโคยุโรป นอกจากนี้โคในตระกูลโคอินเดียยังมีปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ย่อยสลายยากอยู่สูงกว่า

3) เนื้อโคมัน หมายถึงเนื้อที่ได้มาจากโคอายุมาก ส่วนใหญ่เป็นโคลูกผสมพันธุ์บราห์มันและพันธุ์พื้นเมือง หรืออาจเป็นโคที่นำเข้ามาจากชายแดน โคเหล่านี้จะถูกนำมาขุนเป็นระยะเวลาสั้น ๆ เพียง 2 – 3 เดือนก่อนส่งโรงฆ่า เนื้อจะค่อนข้างเหนียวและมีกลิ่นแรง เส้นใยกล้ามเนื้อหยาบ มีไขมันหุ้มซากหนา เนื้อโคจะไม่ผ่านขั้นตอนการบ่มเนื้อ ส่วนใหญ่ถูกจำหน่ายในตลาดสด

4) เนื้อโคพื้นเมือง หมายถึง เนื้อโคที่ได้มาจากพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งถูกเลี้ยงปล่อยหากินหญ้าตามธรรมชาติ เนื้อโคจะมีคุณภาพไม่คงที่ ขึ้นอยู่กับอายุของโค ความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารธรรมชาติ เนื้อโคพื้นเมืองอายุ ประมาณ 2 ปี และมาจากแหล่งที่มีหญ้าธรรมชาติสมบูรณ์เกือบตลอดปี เนื้อที่ได้จะมีความนุ่มปานกลาง เส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด ไม่มีไขมันแทรก เนื้อมีสีออกแดงคล้ำ ผิวสัมผัสเป็นมันวาว เนื้อค่อนข้างแห้ง ไม่ฉ่ำน้ำเหมือนเนื้อโคขุนโดยทั่วไป เนื้อโคพื้นเมืองจะค่อนข้างเหนียว เนื้อโคพื้นเมืองส่วนใหญ่มีจำหน่ายตามตลาดสดในต่างจังหวัด ร้านขายเนื้อริมถนนหลวงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและตามตลาดนัด

5) เนื้อโคแก่ หมายถึงเนื้อที่ได้มาจากโคอายุมาก โคคัดทิ้ง โคนำเข้าจากชายแดน โคที่มีน้ำหนักน้อยเนื้อโคจะเหนียวมาก ไม่มีมันมีพังผืดมาก เนื้อมีกลิ่นแรง เนื้อโคกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ถูกส่งเข้าโรงงานทำลูกชิ้น อาจจะมีจำหน่ายอยู่บ้างตามตลาดสดชนบท ตลาดนัดเคลื่อนที่

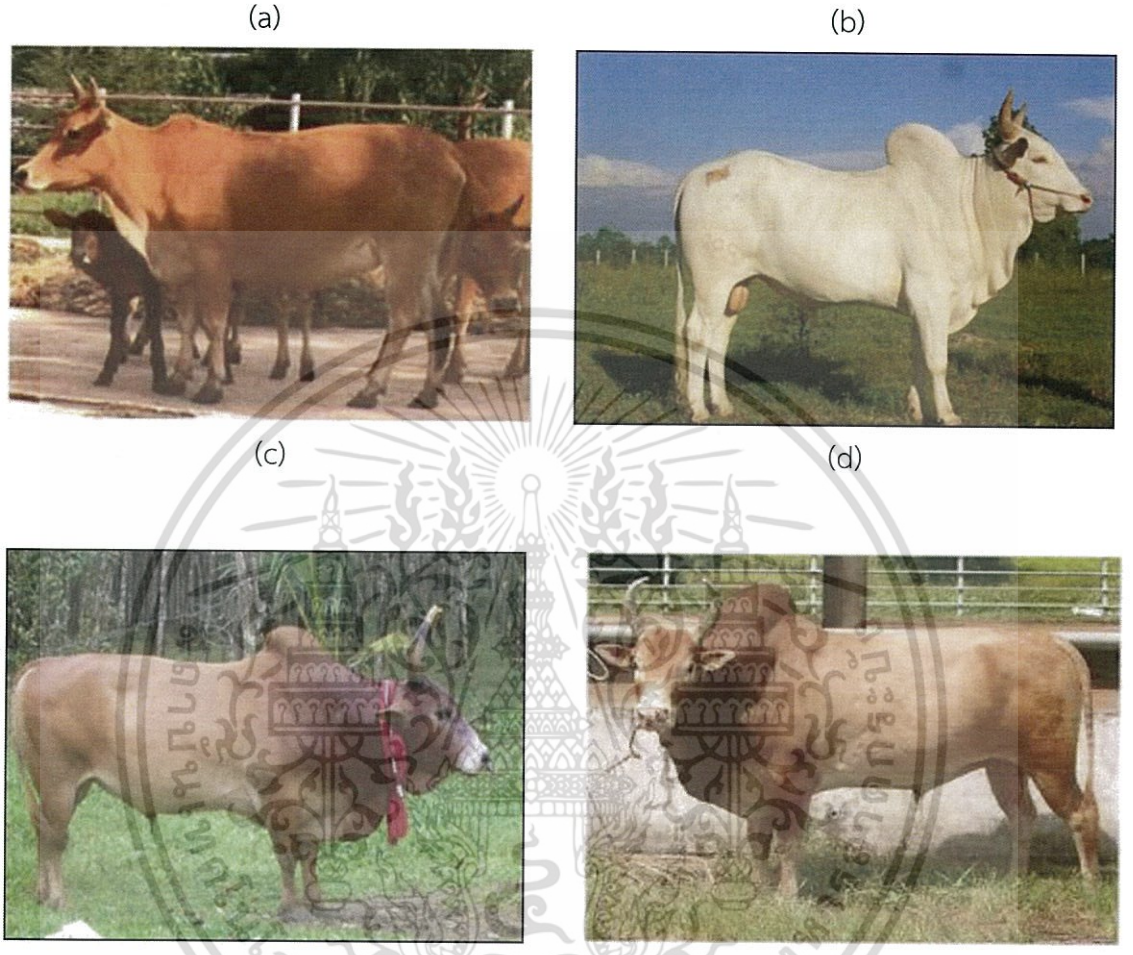
6) เนื้อโคนมขุน จัดอยู่ในกลุ่มเนื้อโคขุนคุณภาพสูง เนื้อมีความนุ่มมากและมีไขมันแทรก เนื่องจากเป็นเนื้อโคที่มีเลือดโคยุโรปสูง ในตลาดของไทยยังไม่มีการผลิตเนื้อโคประเภทนี้ แต่คาดว่าในอนาคตอันใกล้จะมีเนื้อโคนมขุนจากโคนมเพศผู้ (dairy beef) จำหน่าย

นอกจากสายพันธุ์และวิธีการเลี้ยงโคแล้ว ตำแหน่งชิ้นเนื้อ เป็นอีกปัจจัยที่สำคัญและส่งผลต่อความนุ่มของวัตถุดิบ เช่นเนื้อส่วนคอ (chunk) เป็นเนื้อที่มีไขมันแทรกในกล้ามเนื้อเกือบทุกส่วน นิยมแล่เป็นแผ่นบาง เหมาะสำหรับย่าง หรือลวก เนื้อส่วนเสือร้องไห้ เนื้อพื้นท้อง เนื้อริป เป็นส่วนทีมีไขมันที่หุ้มอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อ (intermuscular fat) เป็นเนื้อส่วนที่มีความเหนียวมาก จึงเหมาะสำหรับการย่าง หรือสไลด์เป็นแผ่นบางๆ ก่อนการย่าง สำหรับเนื้อส่วนสะโพก (round) เป็นส่วนที่มีปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับเนื้อส่วนอื่น เป็นเนื้อส่วนที่มีการแทรกของไขมัน (intramuscular fat) จึงเหมาะสำหรับแปรรูปสเต็ก สำหรับเนื้อน่อง มีส่วนเอ็นที่แทรกอยู่ในก้อนเนื้อ เหมาะสำหรับการตุ๋นและเนื้อส่วนคอ มีผังผืดปนและเนื้อมีความเหนียว จึงเหมาะไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ลดรูป (จุฑารัตน์และญานิน, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 เนื้อโคไทยพื้นเมือง

โคพื้นเมืองจะมีความแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย โดยโคพื้นเมืองแท้ๆ จะอยู่ในเขตภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ส่วนทางภาคเหนือและภาคใต้โคพื้นเมืองบางส่วนจะมีรูปต่างแตกต่างกันออกไปดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โคพันธุ์พื้นเมือง ภาคกลาง (a) ภาคเหนือ (b) ภาคใต้ (c) และภาคอีสาน (d)
ที่มา: จุฑารัตน์ (2552)

จุฑารัตน์ (2552) ได้ให้คำนิยามของเนื้อโคพื้นเมืองว่าเป็น เนื้อโคที่ได้มาจากโคพันธุ์พื้นเมือง เป็นโคขนาดเล็ก จัดอยู่ในเผ่าโค *Bos indicus* เป็นเผ่าเดียวกับโคอินเดีย หรือโคซีบู (Zebu cattle) โดยโคพื้นเมืองจะแบ่งประเภทตามภูมิภาคต่างๆ ได้แก่ โคพื้นเมืองสายภาคเหนือ (โคขาวลำพูน) โคพื้นเมืองสายภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (โคอีสาน) โคพื้นเมืองสายภาคใต้ (โคชน) โคพื้นเมืองสายภาคกลาง (โคลาน) เป็นต้น โคพื้นเมืองมักถูกเลี้ยงแบบปล่อยให้หากินหญ้าตามธรรมชาติ คุณภาพเนื้อโคไม่คงที่ขึ้นอยู่กับอายุโค และความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารตามธรรมชาติ โคพื้นเมืองที่อายุประมาณ 2 ปี จะมีน้ำหนักประมาณ 200 กิโลกรัม เนื้อที่ได้จะมีความนุ่มปานกลาง เส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด ไม่มีไขมันแทรก เนื้อมีสีออกแดงคล้ำ ผิวสัมผัสเป็นมันวาว เนื้อจะค่อนข้างแห้งไม่ฉ่ำน้ำเหมือนเนื้อโคขุนโดยทั่วไป เนื่องจากแหล่งหญ้าตามธรรมชาติไม่พอเพียงในฤดูแล้ง ต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงถึง 3 ปี จึงจะได้น้ำหนัก 200-250 กิโลกรัม นอกจากนี้ โคพื้นเมือง มีความทนสภาพอากาศร้อน เห็บ โรคและแมลงในเขตร้อนได้ดี โคพื้นเมืองไทยจึงเหมาะที่จะใช้เป็นพื้นฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมกับโคพันธุ์ต่างประเทศเพื่อปรับปรุงพันธุ์โคพื้นเมืองให้มีขนาดใหญ่ เนื้อโคพื้นเมืองส่วนใหญ่มีจำหน่ายตามตลาดสดในต่างจังหวัด ร้านขายเนื้อริมถนนหลวงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและตามตลาดนัดเคลื่อนที่

2.2.3 คุณลักษณะและปัจจัยต่อคุณภาพเนื้อโคไทย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (2552) ได้อธิบายถึงเนื้อโคไทยที่มีคุณภาพต้องให้คุณค่าทางโภชนาการและสารอาหารแก่ผู้บริโภค มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่นุ่ม รสชาติ สี กลิ่น ต้องมีคุณภาพดี มีการควบคุมกระบวนการผลิตที่มีความปลอดภัย (food safety) กล่าวคือ สะอาด ปลอดภัย ไม่มีสารตกค้าง มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในเนื้อเป็นปกติ มีการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก (cooking loss) ต่ำ เป็นต้น และจะต้องไม่ใช้ฮอร์โมน หรือการตอนเพื่อเร่งการเจริญเติบโตอีกทั้ง ควรเลี้ยงแบบปล่อยตามธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์ตลอดทั้งปี โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพของเนื้อโคที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดในข้างต้นประกอบด้วย

2.2.3.1 พันธุ์

โคยุโรป (*Bos taurus*) และโคอินเดีย (*Bos indicus*) มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อ กล่าวคือ เนื้อที่มาจากโคที่มีเลือดยุโรปสูงจะมีความนุ่มมากกว่าสายพันธุ์อื่น ดังนั้นโคพื้นเมือง โคพันธุ์บราห์มัน หรือโคที่มีเลือดพันธุ์บราห์มันระดับสูงจะมีความเหนียว (จุฑารัตน์ และญาณิน, 2548)

2.2.3.2 อายุ

โคที่มีอายุน้อยจะมีเนื้อที่นุ่มกว่าโคที่มีอายุมาก เนื่องจากโคอายุน้อยมีปริมาณและโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่ในระดับต่ำ ทำให้รู้สึกว่านุ่มกว่าโคที่มีอายุมาก ซึ่งโดยทั่วไปแล้วโคพื้นเมืองควรมีอายุไม่เกิน 2.5 ปี (บุญชู, 2548)

2.2.3.3 ระดับไขมันแทรก

เนื้อโคที่มีปริมาณไขมันแทรกสูงจะนุ่มกว่าเนื้อโคที่ไม่มีไขมันแทรกและโคเขตร้อนจะมีการสะสมไขมันแทรกได้น้อยกว่าโคเขตหนาว โดยระดับไขมันแทรกมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับพันธุ์กรรมของสัตว์ (Yamada and Nakanishi, 2012) ด้วยเช่นกัน

2.2.3.4 ขนาดและชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อ

ขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับความนุ่มของเนื้อ คือเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีขนาดเล็กจะมีความนุ่มมากกว่า ในขณะเดียวกันชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อได้แก่ red และ white fiber type ก็มีส่วนสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อเช่นเดียวกัน โดยพบว่ากล้ามเนื้อที่มีปริมาณของ red fiber ในสัดส่วนที่สูงกว่า white fiber เนื้อจะเหนียวเนื่องจากเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นชนิด Oxidative type ดังนั้นค่า pH ในกล้ามเนื้อลดลงช้า มีผลทำให้ปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) โดยเอนไซม์ในเนื้อเกิดขึ้นได้ช้า โคพื้นเมืองเป็นโคที่ยังไม่ถูกพัฒนาปรับปรุงด้านการสร้างกล้ามเนื้อ ดังนั้นจึงมีขนาดเส้นใยกล้ามเนื้อละเอียด ในขณะเดียวกันก็มีสัดส่วนของ red และ white fiber type สูงและยังเป็นโคในตระกูล *Bos indicus* อีกด้วย ดังนั้นเนื้อโคพื้นเมืองจึงเหนียวกว่าเนื้อโคที่ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์เป็นโคเนื้อ (Brooks and Savell, 2004)

2.2.3.5 ชนิดของกล้ามเนื้อแต่ละส่วน

ชิ้นส่วนต่างๆ ของร่างกายจะมีกล้ามเนื้อที่มีความนุ่ม ความเหนียวแตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของส่วนปริมาณส่วนประกอบของกล้ามเนื้อ เช่น เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมัน โดยเนื้อจากส่วนของร่างกายที่มีการเคลื่อนไหวมาก เช่น เนื้อน่อง เนื้อต้นคอ เนื้อสีข้าง เนื้อพื้นท้องจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีเอ็นและพังผืดอยู่มาก ส่วนเนื้อสันใน เนื้อสันนอก อยู่ในบริเวณของร่างกายที่เคลื่อนไหวน้อย ดังนั้นเนื้อจึงมีความนุ่มมากกว่าส่วนอื่นๆ (จุฑารัตน์ และญาณิน, 2548)

2.2.3.6 ระบบการเลี้ยงและการให้อาหาร

อาหารที่ใช้เลี้ยงโคมี 2 ชนิดคือ อาหารข้นซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามินและแร่ธาตุ เป็นหลักและ อาหารหยาบเช่น อาหารประเภทเยื่อใยสูง พวกหญ้าฟาง เป็นต้น จากรายงานของ Fukumoto et al. (1999) พบว่าเนื้อโคที่ได้รับการเลี้ยงขุนด้วยอาหารหญ้าจะนุ่มและรสชาติอร่อยกว่าการขุนเลี้ยงด้วยอาหารข้น

2.2.3.7 เพศและการตอน

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (2552) รายงานว่าเพศมีผลต่อคุณภาพของเนื้อ โดยโคตัวผู้ตอนและโคสาวจะให้เนื้อที่มีความนุ่มมากกว่า วัวตัวผู้ที่ยังไม่ถูกตอน งานวิจัยของ Zhang และคณะ (2010) และ Hanzelková และคณะ (2011) รายงานว่า โคตัวผู้ที่ถูกตอนจะมีอัตราการเจริญเติบโต ความดุร้ายลดน้อยลง การใช้พลังงานเพื่อการทำงานของร่างกายลดน้อยลงทำให้การสะสมไขมันในกล้ามเนื้อดีขึ้นจึงมีส่วนทำให้เนื้อนุ่มขึ้น

2.2.3.8 การใช้สารเคมีทำให้เนื้อนุ่ม

การใช้สารแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เพื่อเพิ่มความนุ่มของเนื้อ โดยจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ m-Calpain และ μ-Calpain โดยไปเร่งกระบวนการทำให้เนื้อนุ่ม (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2552) อีกทั้งจากการศึกษาของ Wheeler และคณะ (1992) พบว่าการฉีดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ 30 นาทีหลังฆ่าจะทำให้เนื้อมีความนุ่มมากที่สุด

2.2.3.9 การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาไกลโคไลซีสภายหลังสัตว์ตาย

ปฏิกิริยาไกลโคไลซีสภายหลังสัตว์ตายมีผลทำให้เกิดการใช้ไกลโคเจนในกล้ามเนื้อเพื่อสร้างพลังงานทำให้กล้ามเนื้อยังทำงานได้ภายหลังสัตว์ตาย จะมีผลทำให้เกิดกรดแลกติกซึ่งทำให้ค่า pH ในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายลดลง การเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยานี้ถ้าเป็นไปอย่างรวดเร็วจะทำให้อัตราการลดลงของค่า pH ในกล้ามเนื้อเป็นไปอย่างรวดเร็วมาก ซึ่งจะมีผลทำให้กล้ามเนื้อเข้าสู่ภาวะการเกร็งตัว (rigor mortis) อย่างถาวรและเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว มีผลทำให้ระยะเวลาที่จำเป็นจะต้องใช้ในการบ่มเนื้อสั้นลง เนื่องจากเอนไซม์ในเนื้อเข้าทำการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อได้เร็วขึ้นประมาณร้อยละ 15-30 (ชัยณรงค์, 2529)

2.2.3.10 ระยะเวลาในการบ่มเนื้อ

เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ เมทาบอลิซึมในเนื้อหลังจากการฆ่า เนื้อโคจะนุ่มได้ต้องอาศัยเอนไซม์ในเนื้อ ที่สำคัญคือ Calpain และ Cathepsins เข้าทำการย่อยโปรตีนในเนื้อบริเวณ Z-line การทำงานของเอนไซม์ต้องอาศัยระยะเวลาซึ่งจะใช้เวลามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องอีกมาก (ชัยณรงค์, 2529) นอกจากนี้ pH และ อุณหภูมิในเนื้อจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อวคามนุ่มของเนื้อด้วย (Dransfield, 1994)โดยทั่วไปแล้วเนื้อโคขุนเขตร้อน จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการบ่มนานกว่าเนื้อโคขุนยุโรป

2.2.3.11 ความเร็วในการลดอุณหภูมิเนื้อ

การลดอุณหภูมิในเนื้ออย่างรวดเร็วภายหลังกระบวนการฆ่าสิ้นสุดอาจมีผลทำให้เนื้อเหนียวมากขึ้น เนื่องจากเกิดภาวะการหดตัวเนื่องจากความเย็น (cold shortening) ปรากฏการณ์นี้อาจเกิดขึ้นได้ในกรณีที่นำซากโคเข้าห้องเย็นที่อุณหภูมิต่ำ ถ้าอุณหภูมิในเนื้อลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 ชั่วโมง ลดลงต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ประกอบกับค่า pH ในกล้ามเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงกว่า 6.0 โอกาสที่จะเกิดภาวะดังกล่าวมีสูงมาก (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2552) จากรายงานของ จุฑารัตน์ และญาณิน (2548) ซากโคที่น้ำหนักสูงและมีไขมันหุ้มซากหนา โอกาสจะเกิดขึ้นน้อยกว่าโคที่มีไขมันหุ้มซากน้อย เนื่องจากอุณหภูมิภายในเนื้อลดลงได้ช้ากว่า

2.2.3.12 วิธีการปรุงอาหาร

วิธีการปรุงอาหาร มีผลอย่างมากต่อความนุ่มหรือความเหนียวของเนื้อ ขึ้นอยู่กับว่ากล้ามเนื้อชิ้นมี เอ็น พังผืด และไขมันแทรกในเนื้อมากน้อยเพียงใดและใช้เวลาในการต้มเคี่ยวนานเท่าใด เนื้อสันนอก เป็นเนื้อที่มีความนุ่มมากรองจากเนื้อสันใน นิยมนำไปทำอาหารประเภทที่ใช้ความร้อนสูงและเวลาสั้นในการทำให้เนื้อสุก เนื่องจากความร้อนจะทำให้โปรตีนของเนื้อเสื่อมสภาพและจะทำให้เนื้อกระด้างแข็ง ดังนั้น ชิ้นเนื้อที่มีความนุ่มอยู่แล้วจึงไม่ควรปรุงให้สุกมาก (well done) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wheeler et al. (1999) ศึกษาการย่างเนื้อสเต็กด้วยอุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งผลมาจากการเสียสภาพของเส้นใยโปรตีนเมื่ออุณหภูมิมากขึ้น

2.2.4 การแปรรูปเสต็ก

อรอนงค์ (2553) ได้อธิบายความหมายของ สเต็ก (Steak) ว่าหมายถึง ชิ้นเนื้อสัตว์ (cut of meat) ที่นำมาปรุงให้สุก ซึ่งสเต็กทำได้จาก เนื้อสัตว์ ทุกประเภท เช่น เนื้อวัว (beef) เนื้อลูกวัว (veal) เนื้อหมู (pork) เนื้อไก่ (chicken) เนื้อปลา (fish) เนื้อแกะโตเต็มวัย (mutton) เนื้อลูกแกะ (lamb) และ เนื้อนกกระจอกเทศ (ostrich) เป็นต้น โดยจะใช้วิธีการย่าง หรือปิ้ง ส่วนใหญ่แล้วเนื้อที่จะทำการย่างจะเป็นเนื้อที่มีคุณภาพดีโดยเฉพาะเนื้อจำพวกสเต็กต่างๆ เช่น Filet mignon steak เป็นต้น การหมักเนื้อด้วยเครื่องปรุงต่างๆ ถ้าหมักนานเกินไปกลิ่นของเครื่องปรุงจะถูกดูดซับเข้าไปภายในทำให้รสชาติของเนื้อเปลี่ยนไปแต่ การหมักช่วยให้เนื้อนุ่มและลดความเหนียวลงได้ทำให้ช่วยปรับปรุงคุณภาพของเนื้อที่มีความเหนียว โดยส่วนต่างๆของเนื้อวัวที่มีความแตกต่างกันแสดงดังภาพที่ 2.2 ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกัน ดังนี้

a) ฟิเลต์มิยอง (Filet mignon) หรือ เทนเดอร์ลอยน์ (Tenderloin) เป็นเนื้อวัวส่วนสันในที่ละเอียดและอ่อนนุ่มมากที่สุด ไม่มีไขมัน นิยมอบย่างทั้งก้อน เป็นเนื้อส่วนที่ตัดจากกลางตัวเป็นส่วนที่อยู่สองข้างของแนวกระดูกสันหลัง ส่วนที่เรียกว่า Filet mignon คือเนื้อวัวส่วนสันในที่มีขนาดชิ้นเล็กที่สุด เป็นเนื้อส่วนที่มีความนุ่มมากเพราะเป็นส่วนกล้ามเนื้อของวัวที่ไม่ได้เคลื่อนไหว เส้นใยจึงไม่แข็งแรง ทำให้มีความนุ่ม มีไขมันแทรกอยู่น้อย เนื้อจึงมีรสชาติจืด ส่วนมากถ้านำมาใช้ทำสเต็กจะรับประทานคู่กับซอสเพื่อเพิ่มรสชาติ

b) ที-โบน (T-bone / Poterhouse) เป็นเนื้อส่วนสันนอกที่ติดกระดูกรูปตัว T เนื้อที่ติดทั้งสองด้านของกระดูกรูปตัว T ด้านหนึ่งจะเป็นเนื้อชิ้นเล็กซึ่งเป็น Tenderloin ส่วนอีกด้านหนึ่งจะเป็นเนื้อชิ้นใหญ่ คือ ส่วน Strip Loin ทีโบนสเต็ก เรียกว่าอีกอย่างหนึ่งว่าพอร์ตเตอร์เฮาส์ เพราะเนื้อสองชนิดนี้เป็นเนื้อส่วนเดียวกันแต่ต่างกันที่ขนาดโดยพอร์ตเตอร์เฮ้าส์จะมีส่วนที่เป็น Tenderloin มากกว่า Strip Loin

c) เซอร์ลอยน์ (Sirloin) เป็นเนื้อวัวส่วนสันสะโพก โดยตัดชิ้นเนื้อจากส่วนหลังของขาวัว เนื้อเหนียวเล็กน้อย เพราะเป็นส่วนที่มีการเคลื่อนไหวอยู่ตลอด จึงทำให้เนื้อส่วนนี้มีรสชาติดี มีไขมันแทรกอยู่น้อย นิยมนำมาแล่เป็นชิ้นบางๆ ก่อนนำมาทำสเต็ก จะช่วยทำให้เนื้อนุ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

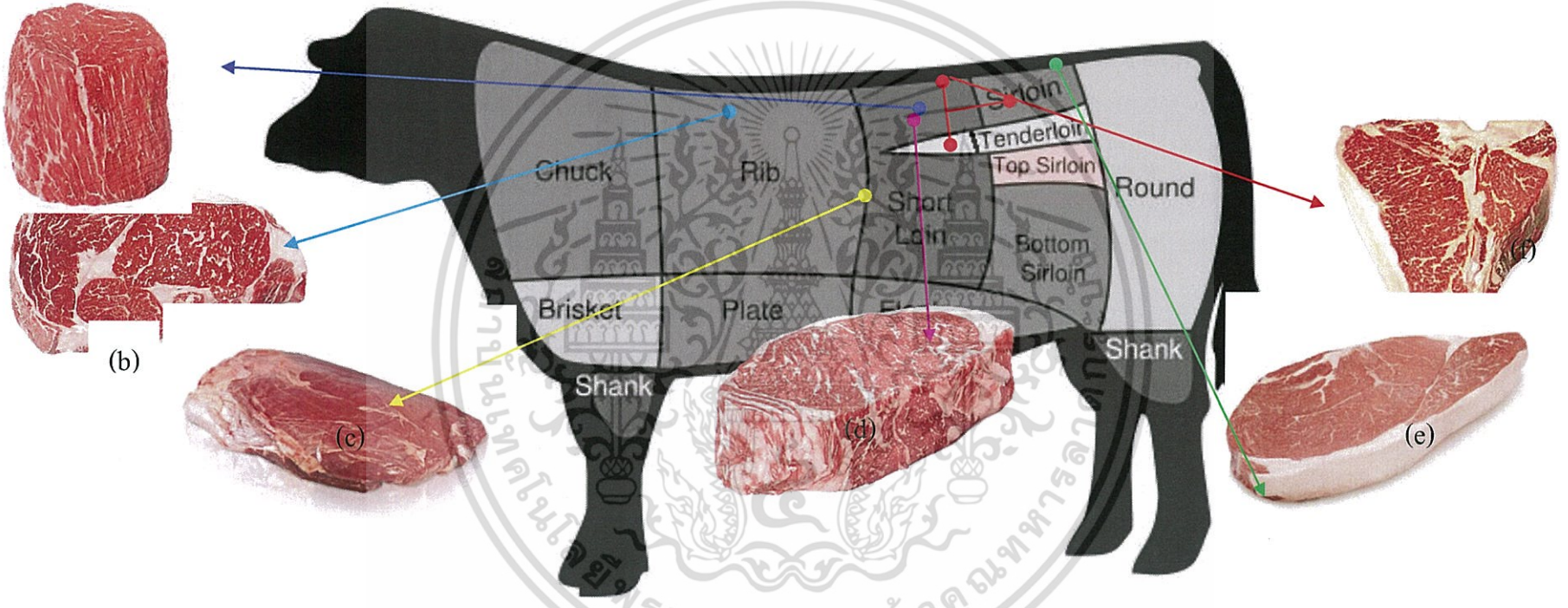
d) สตริปลอยน์ หรือนิวยอร์คสตริป (Strip Loin / New York Strip) เป็นเนื้อที่อยู่ระหว่างส่วนขาหลังกับขาหน้า ส่วนมากเนื้อส่วนนี้นิยมนำมาตัดแบ่งขายเป็นชิ้นสเต็กที่มีทั้งแบบติดหนังและไม่ติดหนัง มักเสิร์ฟในชื่อของ New York Strip Steak

e) ริบอาย (Rib eye) เป็นเนื้อวัวส่วนสันแหลมที่ติดอยู่กับซี่โครงชิ้นที่ 6-12 โดยตัดมาจากส่วนต้นของซี่โครง แต่เสิร์ฟโดยการตัดเอามาเฉพาะเนื้อ และเอาซี่โครงไปย่างเป็น Rib Steak ต่อ เนื้อริบอายมีลักษณะกลม แบน

f) แฟลงก์ (Flank) เป็นเนื้อวัวส่วนพื้นท้องหรือเนื้อใบบัว มีขนาดหนาไม่เกิน 1 นิ้ว ไม่มีกระดูก คนไทยนิยมนำมาต้มหรือตุ๋น แต่ถ้านำมาย่างจะต้องสไลด์เนื้อบางๆแล้วนำไปหมักเพื่อช่วยทำให้เนื้อเคี้ยวง่ายและนุ่มมากขึ้น ก่อนนำไปย่าง จะได้เนื้อที่มีรสชาติดีเพราะเนื้อมีไขมันแทรกมาก

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แผนภาพตำแหน่งของเนื้อสเต็ก ฟิเลต์มิยอง (a) ริบอาย (b) แฟลงก์ (c) สตริปลอยน์ (d) เซอร์ลอยน์ (e) และ ทีโบน (f)
ที่มา: ดัดแปลงจาก อรอนงค์ (2553)

2.3 การปนเปื้อนและเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

2.3.1 การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

ศิวาพร (2542) ได้กล่าวไว้ว่าจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เนื้อสัตว์เกิดการเสื่อมเสียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียมากกว่ายีสต์และรา ซึ่งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นมักปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนการฆ่า ตัดแต่ง และการเก็บรักษา ซึ่งสาเหตุของการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์มีหลายประภารดังนี้

2.3.1.1 การปนเปื้อนจากตัวสัตว์

แบคทีเรียกลุ่ม โคลิฟอร์มที่ อาศัยอยู่ในระบบทาง เดินอาหาร เช่น ลำไส้ กระเพาะ ของตัวสัตว์ เป็นต้น สามารถปนเปื้อนเข้าไปในซากได้ในขั้นตอนการฆ่าและการตัดแต่งซาก หากผู้ปฏิบัติงานไม่ระมัดระวังในการตัดแต่งส่วนที่มีจุลินทรีย์พวกนี้อาศัยอยู่ จะทำให้จุลินทรีย์มีโอกาสปนเปื้อนได้สูง ดังนั้นในโรงงานฆ่าสัตว์จึงต้องแยกเศษอุจจาระและสิ่งปนเปื้อนออกจากซากให้หมดก่อนที่จะล้างและจำหน่ายให้กับผู้บริโภค

2.3.1.2 การปนเปื้อนจากน้ำใช้

น้ำที่นำมาใช้ในขั้นตอนต่างๆ เช่น ใช้ล้างและลวกขนสุกรก่อนการขูดขนหรือใช้ในการล้างเครื่องมือจะมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ ดังนั้นการล้างแต่ละขั้นตอนจึงต้องมีคลอรีนเพื่อใช้ในการลดหรือป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งการใช้คลอรีนผสมในน้ำเย็นเพื่อทำลายจุลินทรีย์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในหลายประเทศ แต่ไม่อนุญาตให้ใช้ในสภาพยุโรป ซึ่งปริมาณคลอรีนที่อนุญาตให้ใช้ห้ามเกิน 50 ส่วนในล้านส่วน (ppm)

2.3.1.3 การปนเปื้อนจากเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการชำแหละและตัดแต่งซากรวมไปถึงเครื่องมืออื่นๆ เช่น เครื่องบด เครื่องสับ เครื่องบรรจุที่ใช้ใน เป็นต้น โดยในแต่ละขั้นตอนตั้งแต่วัตถุดิบจนไปถึงผลิตภัณฑ์สุดท้าย จะมีการสะสมของจุลินทรีย์อยู่ จึงควรทำความสะอาดทุกวัน มีการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อวัสดุและอุปกรณ์ที่สัมผัสกับเนื้อและผลิตภัณฑ์อย่างสม่ำเสมอ

2.3.1.4 การปนเปื้อนจากผู้ปฏิบัติงาน

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอาจมาจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อยู่บริเวณ ผิวหนัง มือ โพรงจมูก และ เครื่องแต่งกายของบุคคลที่สัมผัสอาหารซึ่งสาเหตุของการปนเปื้อน โดยเฉพาะมือของผู้ปฏิบัติงานจะเป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้เครื่องแต่งกายของผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสกับซากก็เป็นสาเหตุของการปนเปื้อนด้วยเช่นกัน ดังนั้นควรปฏิบัติตามหลักสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ดี เช่น จะต้องล้างมือและน้ำยาฆ่าเชื้อทุกครั้งก่อนและหลังปฏิบัติงาน เสื้อผ้าที่ใส่ในการปฏิบัติงานจะต้องมีการทำความสะอาดทุกวัน และมีการสุ่มตรวจทางจุลชีววิทยาอย่างสม่ำเสมอ

2.3.1.5 การปนเปื้อนจากอากาศ

การปนเปื้อนจากอากาศมักมาจากอากาศที่ไม่สะอาด เช่น รอบอาคาร ดังนั้นควรมีแผ่นกรองอากาศเพื่อป้องกันจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอากาศตามธรรมชาติ โรงงานจะต้องทำงานวางระบบหมุนเวียนอากาศจากส่วนที่สะอาดออกมาสู่ส่วนที่ไม่สะอาดเพื่อป้องกันจากปนเปื้อนข้ามไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูป และควรมีการทดสอบปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในอากาศด้วยวิธี Air test

2.3.1.6 การปนเปื้อนจากกระบวนการผลิต

การปนเปื้อนจากกระบวนการผลิตเกิดขึ้นได้ขณะแปรรูปหรือประกอบอาหาร เช่น การลดขนาดเนื้อให้มีขนาดเล็กลงซึ่งเป็นเพิ่มพื้นที่ผิวจุลินทรีย์ก็มีโอกาศปนเปื้อนได้ เนื้อที่ใช้สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมโดยเฉพาะเพื่อทำผลิตภัณฑ์ประเภทลดขนาดไม่ควรเสียหรือเป็นเมือกและควรมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ ปนเปื้อน ในปริมาณต่ำ นอกจากนี้ยังอาจป้องกันได้หลายวิธี เช่น การลดอุณหภูมิซากลงทันที เป็นต้น

ดังนั้นสาเหตุการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มีหลายปัจจัยซึ่งชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมีหลากหลายประเภทซึ่งก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์แตกต่างกันไปโดยสามารถแบ่งลักษณะการเสื่อมเสียได้ดังนี้

2.3.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

สุมณฑา (2545) ได้กล่าวไว้ว่าจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงและทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเนื้อสัตว์ เช่น การเหม็นหืนจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน เป็นต้น ซึ่งการเสื่อมเสียสามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะดังนี้

2.3.2.1 การเสื่อมเสียจากการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรส

การเสื่อมเสียจากการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสเกิดขึ้นได้จากหลายประการ เช่น การเหม็นหืน (rancidity) การเหม็นเน่า (putrefaction) การเกิดก๊าซและรสเปรี้ยว เป็นต้น

1) การเหม็นหืน เกิดจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยไขมันได้ เช่น เอนไซม์ไลเปส ทำให้เกิดเป็นสารประกอบต่างๆ เช่นกรดไขมัน อิสระ กลีเซอรอล คีโตน อัลดีไฮด์ เป็นต้น หรือเอนไซม์ออกซิเดสซึ่งทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดไขมันในเนื้อได้เป็นสารประกอบที่ทำให้อาหารมีกลิ่นรสผิดปกติ แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยไขมันได้ ได้แก่ สูโดโมแนส (*Pseudomonas* spp.) และอโครโมแบคเตอร์ (*Achromobactor* spp.)

2) การเหม็นเน่าเกิดจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ เช่น ครอสตริเดียม เปอร์ฟริงเจนส์ (*Clostridium perfringens*) สูโดโมแนส (*Pseudomonas* sp.) โปเตรียส (*Proteus* sp.) จะไปย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนหรือเพปไทด์หรือกรดอะมิโนอิสระซึ่งเป็นทำให้เกิดสารระเหยจำพวก แอมโมเนีย (ammonia) อินโดล (indoles) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide) เอมีน (amines) เป็นต้น ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ทำให้เกิดเป็นกลิ่นเหม็นเน่าขึ้นมา

3) การเกิดรสเปรี้ยวในเนื้อหมายถึงการมีกลิ่นและรสเปรี้ยวซึ่งอาจเกิดจากกรดที่สร้างจากแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ เช่น แบคทีเรียที่สามารถ ผลิตกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) ได้แก่ สเตรปโตคอกคัส ฟีเซียม (*Streptococcus faecium*) และ สเตรปโตคอกคัส ฟีคาไล (*Streptpcoccus faecali*)

2.3.2.2 การเสื่อมเสียเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ

การเสื่อมเสียทำให้ลักษณะปรากฏเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นได้หลายลักษณะ คือ การเกิดเมือก การเกิดสีเขียวและการเกิดเชื้อราที่ผิวหน้า เป็นต้น

1) การเกิดเมือกที่ผิวหน้าเป็นสารพวกโพลิแซคคาไรด์สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์สามารถมองด้วยตาเปล่าได้ อาจมีสีขาวหรือสีเหลืองเกิดขึ้นบน ผิวหน้าของชิ้นเนื้อและจะมีกลิ่นเหม็นสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียพวกสูโดโมแนส แอลคาลิจินีส (*Pseudomonas alcaligenes*) อโครโมแบคเตอร์ และลิวโคนอสตอก ถ้าเก็บเนื้อสัตว์ไว้ในห้องเย็นมีความชื้นต่ำจะพบพวกไมโครแบคทีเรียมหรือสเตรปโตคอกคัสที่บริเวณผิวหน้าโดยจะสีเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีลักษณะเป็นยางเมือก เมื่อทิ้งไว้นานจะสร้างเมือกขึ้นที่ผิวหน้า

2) การเกิดสีบนผิวหน้าของเนื้อเกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเม็ดสีขึ้นมาได้ เช่น จุดสีฟ้าจากสูโดโมแนส ซินไซนี (*Pseudomonas syncyanea*) จุดสีแดงจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซอราเตียมาร์เซส เซนส์ จุดสีน้ำเงินแกมเขียวหรือดำแกมน้ำตาลจากฟลาโวแบคทีเรียม (*Flavobacterium*) โครโมแบคทีเรียม ลิวิดัมและไมโครคอกคัส (*Micrococcus*)

3) การเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ได้แก่พวกแลกโตบา ซิลลัส วิริเดนเซนส์ (*Lactobacillus viridescens*) หรืออาจเป็นพวกที่ปนเปื้อนมาในส่วนผสมของเนื้อในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบทำให้เกิดเป็นสีเขียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

4) การเกิดเชื้อราที่ผิวหน้ามักพบที่ผิวหน้าของเนื้อที่ถูกตัดแบ่งส่วน ในขณะเก็บรักษาเพื่อการบ่มเนื้อให้นุ่มในห้องเย็น เมื่อขึ้นราส่วนที่ราขึ้นจะถูกตัดออกและนำส่วนที่เหลือไปทำผลิตภัณฑ์ต่อไป เชื้อราที่เกิดขึ้นจะก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของเนื้อแตกต่างกันไปแต่ละชนิด

การเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จากจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดลักษณะปรากฏ กลิ่น รส ที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แต่ยังมีจุลินทรีย์บางประเภทที่ปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และสามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เจริญเติบโตขึ้นและไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในผลิตภัณฑ์เช่น ลักษณะปรากฏ รสชาติ กลิ่น ทำให้ผู้บริโภคไม่สามารถรับรู้ถึงการเปลี่ยนแปลงได้ และทำให้ก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคอาจถึงขึ้นเสียชีวิตได้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในผลิตภัณฑ์มีดังนี้

2.3.3 จุลินทรีย์และพยาธิที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

สุมลฑา (2545) ได้กล่าวว่า จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมีหลากหลายชนิด โดยแต่ละชนิดก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่แตกต่างกันไปตามสายพันธ์ของเชื้อบางชนิดสามารถสร้างสปอร์ทนความร้อนสูง หรือสามารถอยู่ในภาวะที่ไม่มีอากาศ การปนเปื้อนจุลินทรีย์เหล่านี้มาได้หลายปัจจัยเช่น ฝุ่น ดิน อากาศ หรือแม้แต่วัตถุดิบ แต่จุลินทรีย์ก่อที่มักจะพบได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีดังนี้

2.3.3.1 *Staphylococcus aureus* ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ทั่วไปและพบในผิวหนังของมนุษย์ดังนั้นอาจจะปนเปื้อนลงผลิตภัณฑ์จากผู้ปฏิบัติงาน สร้างสารพิษภายในเซลล์ที่ทนความร้อนทำให้เกิดอาหารเป็นพิษซึ่งจากรายงานของ โสภณ (2524) สารพิษสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดได้นานถึง 60 นาที

2.3.3.2 *Salmonella* ทำให้เกิดโรคซัลโมเนลโลซีส (salmonelosis) แบคทีเรียชนิดนี้มักพบในสัตว์ประเภท เป็ด ไก่ หมู เป็นต้น อาศัยในระบบทางเดินอาหารและลำไส้ของสัตว์ และปนเปื้อนจากขั้นตอนการฆ่าหรือการชำแหละซากที่ไม่สะอาดหรือไม่ถูกสุขลักษณะ ซึ่งอาการของโรคจะมีอาการเวียนศีรษะอาเจียน และท้องเดิน ระยะการฟักตัวใช้เวลานานกว่า 6 ชั่วโมงตามรายงานของ Silva (2011) ถ้าเป็นในผู้ป่วยเด็กหรือผู้สูงอายุที่มีสุขภาพอ่อนแออาจทำให้เสียชีวิตได้

2.3.3.3 *Yersinia* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเยอซินิโอซีส (yersiniosis) มักพบในอาหารพวกเนื้อสัตว์ต่างๆ ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อแกะที่มีสุขาภิบาลสถานที่ฆ่าสัตว์ไม่ดีและผ่านการฆ่าเชื้อไม่เพียงพอและมีการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม อาการของผู้ป่วยเป็นไข้และปวดท้อง ผนังลำไส้และกระเพาะบวมพองท้องร่วงและอาเจียน ซึ่งจะมีอาการที่เด่นชัดกว่าโรคอาหารเป็นพิษชนิดอื่นๆ (Ryan, 2004)

2.3.3.4 *Listeria monocytogenes* ก่อให้เกิดโรคลิสเตอริโอซีส (listeriosis) มีอาการคลื่นไส้อาเจียน เชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 3 องศาเซลเซียส เป็นปัญหาอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารแช่เย็น ซึ่งมักพบในอาหารพวกนมดิบ เนื้อสัตว์ดิบ เช่น เนื้อไก่ และไส้กรอก เป็นต้น (Ramaswamy et al., 2007)

2.3.3.5 *Escherichia coli* ส่วนใหญ่มักพบอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ซึ่งกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคคือ (Enterohaemorrhagic *E.coli*, EHEC) มีสายพันธุ์ที่สำคัญได้แก่ เอสเชอริเชีย โคไล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0157:H7 (*Escherichia coli* 0157:H7) ซึ่งสามารถสร้างสารพิษได้ และเป็นสายพันธ์ที่ก่อให้เกิดอันตรายร้ายแรง แต่เชื้อชนิดนี้ไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส และไม่ทนต่อความร้อน อาการของโรคทำให้ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย อาเจียน ไม่ตัวร้อน และมักพบผลิตภัณฑ์จำพวกแฮมเบอร์เกอร์ที่ผลิตเพื่อรับประทานในบ้าน (Vogt, 2005)

2.3.3.6 *Trichinella spiralis* หรือพยาธิตัวกลมแหล่งที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในเนื้อหมูและอยู่ภายในซิสต์ (cyst) การเกิดโรคจากการบริโภคเนื้อที่ไม่สุกของผู้บริโภค โดยพยาธิ ชนิดนี้เข้าไป ตัวลาวาจะเข้าสู่อวัยวะระบบย่อยอาหารและแทรกตัวเข้าไปในผนังลำไส้ (Bruschi, 2002)

แต่กลุ่มที่เป็นปัญหาแก่ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยเฉพาะกับบรรจุภัณฑ์ในภาวะสุญญากาศมักจะพบเชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium* ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้ยังสามารถสร้างสปอร์ที่สามารถทนความร้อนได้ทำให้ยังคงมีหลงเหลือในผลิตภัณฑ์และอาจจะเจริญเติบโตและก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษแก่ผู้บริโภคได้ดังนี้

2.3.3.7 *Clostridium botilinum* เกิดขึ้นจากการบริโภคสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น อาหารกระป๋องที่ผลิตในครัวเรือนที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอในการทำลายสปอร์ของเชื้อนี้และไม่ผ่านการให้ความร้อนอีกครั้งก่อนรับประทาน เช่น ไส้กรอกต่างๆ ผลิตภัณฑ์เนื้ออื่นๆ ได้แก่ แฮม ลันเชียนมีท ไส้กรอกและซาลามิ ที่มีขั้นตอนการหมักที่ช้าจะเปิดโอกาส ให้แบคทีเรียชนิดนี้เจริญขึ้น ก่อนที่ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์จะลดต่ำลงในระดับที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้ แต่ไม่พบบ่อยในผลิตภัณฑ์เนื้อที่เติมไนเตรตมีงายวิจัยของ Peck (2009) พบว่าสารนี้จะยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อนี้ได้

2.3.3.8 *Clostridium perfringens* ส่วนใหญ่มักจะพบในเนื้อสัตว์หลายชนิด ได้แก่ เนื้อโค สุกร แกะและไก่ ทั้งในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์ เช่น แฮม เป็นต้นส่วนใหญ่จะพบในเนื้อที่ผ่านการทำให้สุกและทิ้งไว้ให้เย็น อย่างช้า ๆ หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและไม่ได้อุ่นซ้ำอีกครั้งก่อนรับประทาน ซึ่งโดยทั่วไปไม่พบ *C. perfringens* ในเนื้อสัตว์ การที่พบเชื้อเป็นเพราะมาจากการปนเปื้อนข้ามจากแหล่งอื่นๆ เช่นดิน หรืออุปกรณ์ที่ใช้ตัดแต่งซากที่ไม่ซะอาด สามารถบ่งบอกได้ถึงคุณภาพของเนื้ออาจจะด้อยเพราะมีการควบคุมกระบวนการเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้ามที่ไม่ดี ซึ่ง *C. perfringens* สามารถทำให้เนื้อเน่าเสีย มีกลิ่นเหม็นได้เพราะมีเอนไซม์ในการย่อยโปรตีน แต่เนื่องจากเป็นเชื้อที่เจริญได้ในภาวะไร้อากาศส่วนใหญ่วัตถุดิบที่เสียมักจะเสื่อมเสียจากเชื้อชนิดอื่นๆมากกว่า

ถ้าได้รับเชื้อเข้าไปโดยการกินอาหาร โดยมีเชื้อปนเปื้อนอยู่มากกว่า 10^6 โคโลนีของเซลล์ปกติต่อกรัม เป็นเวลา 8-22 ชั่วโมง จะเริ่มมีอาการปวดท้องและท้องเสียหรืออาจเกิด จากการรับประทานอาหารที่มีสปอร์อยู่แล้วและเกิดการงอกของสปอร์ในอวัยวะที่เกี่ยวกับการย่อยอาหาร

C. perfringens จัดอยู่ในกลุ่มของ food infection โดยเชื้อจุลินทรีย์นี้สร้างสารพิษ และส่งให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค โดยมีฤทธิ์ทางประสาท มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร สามารถพบการปนเปื้อนในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ผ่านการแปรรูป และมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน (Aberle et al., 2001) *C. perfringens* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีขนาดใหญ่ ยาว 4-6 mm กว้าง 1 mm เซลล์จัดเรียงตัวอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ มักมีแคปซูล ไม่เคลื่อนที่ สามารถสร้างสปอร์เมื่อเซลอยู่ในสภาพแวดล้อมหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ สปอร์อยู่กลางเซลล์ เชื้อนี้มี 5 types คือ A ถึง E แบ่งตาม toxin ที่เชื้อสร้างขึ้น โรคส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ type A ทำให้เกิดโรค gas gangrene หรือโรคเนื้อตายเน่า (myonecrosis) มีลักษณะของโรคเป็นโลหิตเป็นพิษ และมีก๊าซอยู่ในเนื้อเยื่อรอบๆบาดแผล toxin ของเชื้อจะย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดโลหิตจางเชื้อเจริญในสภาพไร้อากาศ (anaerobe) หรือมีอากาศเล็กน้อย (microaerobic) เจริญดีที่ 37 – 45 องศาเซลเซียส เจริญที่ pH มากกว่า 5.5 ถึง 8.0 เชื้อนี้ย่อยน้ำตาลได้และมีเอนไซม์หลายชนิดที่ย่อยเยื่อหุ้มเซลและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรวมทั้ง collagen ในเนื้อเยื่อสัตว์ เมื่อเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เชื้อในอาหารผสมเลือดม้าหลังจาก 24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีใหญ่ กลม เรียบ และ b-hemolysis (Bates and Bodnaruk, 2003)

C. perfringens มีหลายชนิดแต่มีเพียงแค่ 2 ชนิดที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้แก่ type A และ C ซึ่งก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (Clostridial Food Poisoning) โดยมักเกิดจากเชื้อ type A เชื้อจะสร้าง Exotoxin ขึ้นเมื่อสปอร์งอกเป็นเซลใหม่ๆ อาการต่างๆจะเกิดขึ้นหลังจากกินอาหารที่มีสปอร์เข้าไป 8-24 ชั่วโมง มีอาการการปวดท้องรุนแรง คลื่นไส้ และท้องร่วง แต่ไม่มีไข้และอาเจียน อาการจะลดลงภายใน 24 ชั่วโมง มีรายงานว่า *C. perfringens* สามารถก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้ โดยเชื้อ *C. perfringens* จะสร้างสารพิษและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่ปริมาณเชื้อปนเปื้อนประมาณ 10^6 CFU/ g ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อจำนวนมาก จะมีอาการตกเลือดในลำไส้ (hemorrhagic enteritis) และมีอัตราการตายสูง อาการป่วยนี้เรียกว่า enteritis necroticans มักเกิดจากเชื้อ *C. perfringens type* C ซึ่งจะสร้างเอนเทอโรทอกซินที่ไม่ต่างจาก type A และสร้าง alpha toxin และ beta toxin จำนวนมากที่มีสมบัติทำให้เซลตาย ผลจาก beta toxin จะทำให้เกิดอัมพาตของลำไส้ เกิดการอักเสบ เกิดการตกเลือดในลำไส้มาก และเกิดเนื้อเยื่อตาย (necrosis) โรคนี้มักเกิดขึ้นในเด็กเล็กเพราะมีภูมิคุ้มกันต่ำ อาการของโรคในคนไข้จะมีอาการปวดท้องทันทีทันใด ท้องร่วง ถ่ายเป็นเลือด และช็อก และมีอัตราการตายสูง (Brook et al., 1979) โดยปริมาณของเชื้อ *C. perfringens* ที่พบในโดยทั่วไปในเนื้อวัวพบประมาณ 10^2 CFU/100 g (Miwa et al., 1998)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมนำมาใช้จำแนก *C. perfringens* คือ Cooked meat medium เป็นอาหารที่ใช้จำแนกทั้งจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ อีกทั้งยังเหมาะในการเลี้ยงเชื้อกลุ่มของ Clostridia เพราะเชื้อกลุ่มนี้มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ (MacFaddin, 1985; Murray, 2003) อาหารชนิดนี้มีองค์ประกอบของสารสกัดจากเนื้อและโปรตีนรวมไปถึงกรดอะมิโนและสารอาหารอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีกลูต้าไธโอนซึ่งเป็นสารช่วยลดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น (obligate anaerobes) นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลเดกโทสช่วยในการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทไม่ใช้อากาศ (anaerobic bacteria) ในระยะเวลาสั้นๆเพื่อให้สามารถแยกเชื้อประเภทไม่ใช้อากาศได้รวดเร็ว สามารถสังเกตการเจริญได้จากมีการสร้างฟองอากาศและย่อยอาหาร cooked meat medium เป็นสีดำ เนื่องจากเอนไซม์ย่อยโปรตีน องค์กรอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกาแนะนำให้ใช้อาหารชนิดนี้ในการตรวจนับและจำแนกเชื้อ *C. perfringens* จากอาหาร (USFDA, 1984)

อาหารอีกชนิดที่นิยมใช้จำแนกประเภทจุลินทรีย์คือ Fluid Thioglycollate Medium (FTM) เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศและไม่ใช้อากาศ โดยอาหารชนิดนี้ช่วยสนับสนุนการเจริญของเชื้อหลายๆชนิดได้ดี รวมไปถึงจุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเท่านั้น โดยไม่จำเป็นต้องไปบ่มในภาวะที่ไม่มีอากาศ และยังสามารถจำแนกประเภทของจุลินทรีย์ได้เบื้องต้นโดยสังเกตุจากตำแหน่งการเจริญของจุลินทรีย์ในหลอดทดลอง องค์ประกอบในอาหาร Fluid Thioglycollate Medium มีสารอาหารที่ใช้ในการส่งเสริมเจริญของจุลินทรีย์รวมไปถึง Sodium thioglycollate และ L-cystine ช่วยป้องกันการสะสมของสาร peroxide ที่จะทำให้จุลินทรีย์ตายไปบางส่วน อีกทั้งยังมีตัวบ่งชี้คือ Resazurin ที่สามารถเปลี่ยนเป็นสีชมพูเมื่อมีออกซิเจนและจะกลับออกซิไดซ์กลับเป็นไม่มีสีเมื่อออกซิเจนหมดลง (MacFaddin, 1985)

แบคทีเรียที่พบในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีทั้งที่เป็นประโยชน์ และไม่เป็นประโยชน์ ซึ่งแบคทีเรียจะส่งผลต่อคุณภาพ อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งก่อให้เกิดโรคจากการบริโภคเชื้อแบคทีเรีย หรือสารพิษที่แบคทีเรียนั้นสร้างขึ้น ดังนั้นการใช้สารยับยั้งเช่น วัตถุเจือปนอาหาร (Food

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

145919

additive) ร่วมกับกระบวนการให้ความร้อนจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีขึ้นเราเรียกเทคโนโลยีนี้ว่า Hurdle technology

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์และการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2553) ได้กล่าวไว้ว่า จุลินทรีย์ในอาหารมีหลายชนิด ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีปัจจัยในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน มีปัจจัยต่างๆเป็นส่วนสำคัญต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์อย่างมาก โดยปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์มีดังนี้

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดเชื้อของจุลินทรีย์

2.4.1.1 ความชื้น (Moisture content)

ความชื้นหรือน้ำจำเป็นต่อการทำปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ บริเวณที่มีน้ำอยู่มากจุลินทรีย์จะเจริญได้ดีกว่าบริเวณที่มีน้ำอยู่น้อย ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการน้ำในปริมาณที่แตกต่างกัน แบคทีเรียส่วนใหญ่ต้องการน้ำในการเจริญมากกว่ายีสต์และยีสต์ก็ต้องการน้ำในการเจริญมากกว่ารา และน้ำยังเป็นกลางถ่ายเทความร้อนได้ดี

2.4.1.2 องค์ประกอบอาหาร

องค์ประกอบภายในอาหารมีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อจุลินทรีย์หลายชนิด ซึ่งองค์ประกอบบางชนิด เช่น ไขมัน ถ้าอาหารที่มีไขมันมากจะทำให้มีการถ่ายเทความร้อนได้ไม่ดี ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์อาจจะมีชีวิตรอดได้ เป็นต้น

2.4.1.3 ความต้องการออกซิเจน

วิลาวัณย์ (2539) ได้แบ่งประเภทของแบคทีเรียโดยความต้องการออกซิเจนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ โดยแบ่งได้ 4 ประเภทได้แก่

1) แบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีอากาศ (aerobic bacteria)

แบคทีเรียชนิดนี้ต้องใช้ออกซิเจนในการดำรงค์ชีวิต โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น ส่วนใหญ่จะพบบนพื้นผิวของวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์

2) แบคทีเรียที่เจริญได้ดีในที่มีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic bacteria)

แบคทีเรียชนิดนี้จะต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในการเจริญเติบโต โดยต้องการเพียงร้อยละ 3 – 5 ในการเจริญ

3) แบคทีเรียที่เจริญในทั้งที่มีและไม่มีอากาศ (facultative bacteria)

แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มี โดยภาวะที่มีออกซิเจนจะใช้การหายใจ ส่วนภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะใช้การหมัก

4) แบคทีเรียที่เจริญในที่ไม่มีอากาศ (anaerobic bacteria)

แบคทีเรียชนิดนี้จะสามารถเจริญได้ในภาวะที่ไร้อากาศหรือไม่มีออกซิเจนเท่านั้น โดยออกซิเจนจะเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่จะพบในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุในภาวะสุญญากาศซึ่งเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่เจริญได้ดีในที่ไม่มีอากาศได้แก่ *C.botulinum* และ *C.perfringens* เป็นต้น

2.4.1.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ภูเก็ต (2553) ได้กล่าวไว้ว่า เชื้อจุลิยทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการมีชีวิตรอดในอุณหภูมิแตกต่างกันซึ่งแบ่งเป็น 4 ชนิดคือ

1) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) คือ แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ประมาณ 45-80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) คือ แบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ประมาณ 12 – 15 องศาเซลเซียส และยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

3) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลางแต่ทนความเย็น (psychrotropic bacteria) คือ แบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ช่วง 20 - 30 องศาเซลเซียสแต่อยู่รอดได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส

4) แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) คือ แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ประมาณ 30 – 45 องศาเซลเซียส อีกทั้งเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และแบคทีเรียก่อโรคเกือบทุกชนิดจะอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งเชื้อ *C. perfringens* จัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย

ดังนั้นการที่จะลดหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทรีย์โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ *C. perfringens* ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่ศึกษาจะขึ้นปัจจัยต่างๆที่ส่งผลให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้และอาจจะส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภคดังนั้นกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนจึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์อย่างมาก

2.4.2 การแปรรูปด้วยความร้อน

ทิพาพร (2558) ได้กล่าวไว้ว่า กระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน (Thermal processing) เป็นวิธีการที่ใช้ถนอมอาหารอย่างนึงโดยเป็นการใช้ความร้อนเพื่อทำลายจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสีย (spoilage) โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (pathogens) สารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น และเป็นสาเหตุทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค โดยการใช้ความร้อนฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์จะถูกปิดสนิทเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ภายนอกแล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนซึ่งการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อแบ่งหลักๆเป็น 2 วิธี คือ

2.4.2.1 สเตอริไรซ์เซชัน (Sterilization)

สเตอริไรซ์เซชันเป็นการใช้ความร้อนอุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส วัตถุประสงค์เพื่อทำลายสปอร์ของแบคทีเรียซึ่งมีความทนทานต่อความร้อนสูง และมีจุดมุ่งหมายเพื่อไม่ให้จุลินทรีย์และสปอร์ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะการเก็บรักษา

2.4.2.2 พาสเจอร์ไรซ์เซชัน (Pasteurization)

พาสเจอร์ไรซ์เป็นการใช้ความร้อนในระดับที่ไม่สูงมาก อุณหภูมิที่ใช้ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส วัตถุประสงค์ของการพาสเจอร์ไรซ์จะแบ่ง ออกตามค่า pH ของอาหารที่นำมาผ่านการให้ความร้อนคือ อาหารที่มี pH > 4.6 และ อาหารที่มี pH < 4.6

1) อาหารที่มี pH > 4.6 วัตถุประสงค์เพื่อฆ่าเชื้อเพื่อฆ่าจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภคโดยที่จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียบางส่วนอาจเหลือรอด ดังนั้นต้องใช้การถนอมอาหารวิธีอื่นๆควบคู่ไปด้วยเช่น การใช้ความเย็น การเติมสารกันเสีย เป็นต้น

2) อาหารที่มี pH < 4.6 วัตถุประสงค์เพื่อฆ่าเซลล์ของจุลินทรีย์ทุกชนิดเพราะในภาวะนี้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะ *C. botulinum* และสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์

กระบวนการซูวีดที่เราศึกษาในผลิตภัณฑ์จัดอยู่ในกระบวนการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรซ์เซชัน ซึ่งเป็นระดับการให้ความร้อนที่ไม่สูงและแต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นการใช้การให้ความร้อนร่วมกับวิธีการอื่นๆ เช่น การเติมสารเติมแต่งเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 วัตถุเจือปนอาหาร

การใช้วัตถุเจือปนอาหาร (Food additive) ร่วมกับกระบวนการแปรรูปโดยการให้ความร้อนเป็นวิธีที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเนื่องจากการใช้กระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถยืดอายุของผลิตภัณฑ์ได้นานตามความต้องการ หรืออาจส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะทางประสาทสัมผัสไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นวัตถุเจือปนอาหารจึงช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานยิ่งขึ้น การใช้วัตถุเจือปนอาหารมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ถ้าใส่ปริมาณมากเกินไปอาจจะก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้ ดังนั้นวัตถุเจือปนอาหารจึงถูกควบคุมปริมาณที่กฎหมายกำหนดในระดับที่ผู้บริโภคได้รับโดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายหรือส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค

วัตถุเจือปนอาหาร คือ สารที่สามารถบริโภคเป็นอาหารได้แต่ไม่ได้ใช้เป็นส่วนประกอบหลัก (ingredients) โดยความตั้งใจจะเติมสารเคมีลงในอาหารเพื่อทำให้อาหารมีความคงตัว รักษาคุณภาพของอาหาร เป็นต้น อาจจะรวมไปถึงปรับปรุงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ซึ่งอาจจะมีผลโดยทางตรงหรือทางอ้อมกับผลิตภัณฑ์ และเป็นผลพลอยได้ของสารที่เติมลงไป หรือมีผลต่อคุณลักษณะของอาหาร ทั้งนี้ไม่รวมถึงสารปนเปื้อนหรือสารซึ่งเติมไปในอาหารเพื่อรักษาหรือปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการ (ข้อกำหนดในการใช้วัตถุเจือปนอาหาร, 2014) ซึ่งวัตถุเจือปนอาหารสามารถแบ่งได้หลายประเภท เช่น สารป้องกันการหืน สารที่ช่วยให้ข้นหรือช่วยให้คงตัว สารที่ทำให้เกิดเจล สารปรับความเป็นกรด ด่าง เป็นต้น ทั้งนี้หน้าที่ของวัตถุเจือปนอาหารสามารถแยกได้ดังนี้

2.4.1 เพื่อให้อาหารมีความคงตัว เช่นการใช้อิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ทำให้อาหารมีสภาพเป็นอิมัลชัน (emulsion) ลักษณะเนื้อสัมผัสคงตัวและป้องกันน้ำและน้ำมันไม่ให้เกิดการแยกชั้น (stabilizing agent) และ เพิ่มความหนืด (thickening agent) เป็นต้น

2.4.2 เพื่อรักษาคุณภาพโดยรวมของผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น การใช้วัตถุกันเสีย (preservative) เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารจากยีสต์รา แบคทีเรีย วัตถุกันหืน เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอาหารที่มีน้ำมันและไขมันเป็นส่วนประกอบ และการเปลี่ยนสีของผักและผลไม้สด เป็นต้น

2.4.3 เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหาร เช่น การเติมกรดลงไปในอาหาร เพื่อให้อาหารมีค่าพีเอชเป็นกรด จะช่วยลดอุณหภูมิและระยะเวลาในการฆ่าเชื้ออาหาร

ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนใหญ่จะใส่กลุ่มสารกันเสียเพื่อป้องกันการเสีย การบูดเน่าของอาหาร สารนี้จะไปควบคุมการเจริญเติบโต หรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมคุณภาพของอาหาร สารกันเสียที่ใช้แพร่หลาย ได้แก่ กรดและเกลือของกรดต่างๆ เช่น กรดน้ำส้ม (acetic acid), กรดเบนโซอิค (benzoic acid) หรือ สารประกอบไนไตรท์ (nitrite) จะเติมในเนื้อสัตว์ เพื่อให้เนื้อสัตว์มีสีชมพูหรือสีแดงและเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *C. botulinum* (Christiansen et al., 1973) อาหารที่ใส่สารประกอบชนิดนี้ เช่น ไส้กรอก หมูแฮม เบคอน และบางผลิตภัณฑ์อาจจะใส่โซเดียมเบนโซเอท (sodium benzoate) หรือโปแตสเซียมเบนโซเอท (potassium benzoate) โดยทั้งเบนโซเอทและซอร์เบตจะมีประสิทธิภาพดีในอาหารที่เป็นกรด (pH ต่ำ) จึงเหมาะกับการใช้ใน แยม เยลลี่ และอาหารหมักดอง เป็นต้น

กลไกการทำงานในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ของสารกันเสีย โดยจะทำให้สมบัติของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลง หรือส่งผลต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ และกลไกพันธุกรรมของจุลินทรีย์ เป็นต้น ซึ่งส่งผลให้การเจริญเติบโตหยุดชะงักและตายในที่สุด ซึ่งประสิทธิภาพของสารต่อต้านการเจริญของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปถ้ามีปริมาณมากจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น แต่ปกติแล้วจะใช้ในปริมาณที่เพียงพอต่อการแก่การยับยั้งการเจริญเติบโต ชนิด จำนวนและอายุของจุลินทรีย์เพราะจุลินทรีย์มีการตอบสนองต่อสารที่แตกต่างกันในแต่ละชนิด อีกทั้งสมบัติทางเคมีกายภาพของสารเคมีก็มีผลต่อการยับยั้ง เช่น antibiotic ใช้ทำลายจุลินทรีย์ที่อยู่ภายในร่างกาย เช่น sulphonamides หรือ fluoroquinolones เป็นต้น (จงกลม, 2532)

เกลือของโซเดียมที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำ เช่น เกลือของกรดแอซิติก กรดแลกติก กรด ซิตริก มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะเกิดแตกตัวของกรดหรือด่างให้ H+ คือ ไฮโดรเจนอิออน หรือ OH- คือไฮดรอกไซด์อิออน มีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ มีการแตกตัวของสารภายในเซลล์ของเชื้อ ส่งผลต่อค่า pH และทำให้โปรตีนเสียสภาพ ทำให้เซลล์ไม่สามารถที่จะดำรงชีวิตอยู่ได้ อีกทั้งโซเดียมแลคเตทยังมีสมบัติในการช่วยปรับปรุงลักษณะทางประสาทสัมผัส รวมถึงการยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหาร และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก และสัตว์น้ำ (Sallam, 2007; Williams and Phillips, 1998; Zhuang, Huang and Beuchat, 1996) โดยเกลือของกรดต่างๆ มีรายงานการศึกษาของ Lee et al. (2002) และ Qvist และคณะ (1994) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและทำให้อาหารเป็นพิษ หลายชนิด เช่น *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น

2.6 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการวิเคราะห์

ธงชัย (2549) ได้กล่าวว่าการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสคือวิธีการที่ใช้ในการวิเคราะห์ลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นปัจจัยคุณภาพที่ส่งผลต่อการยอมรับหรือไม่ยอมรับของผู้บริโภคซึ่งการทดสอบคุนภาพทางประสาทสัมผัสที่ใช้ในปัจจุบันมีมากมายหลายวิธี ซึ่งสามารถแบ่งลักษณะการทดสอบได้ 2 แบบคือ การวิเคราะห์ลักษณะทางประสาทสัมผัสและการทดสอบความชอบ อีกทั้งการประเมินทางประสาทสามารถแยกการทดสอบในการประเมินทางประสาทสัมผัสตามวัตถุประสงค์ของการนำมาใช้เป็น 3 วิธีคือ การทดสอบเพื่อวิเคราะห์หาลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณา (Descriptive analysis) การทดสอบเพื่อหาความชอบหรือการยอมรับในผลิตภัณฑ์ (Preference/Acceptance test) และ การทดสอบเพื่อหาความแตกต่างในผลิตภัณฑ์ (Difference test) ซึ่งวิธีการที่เราใช้ในการทดสอบผลิตภัณฑ์ชูวีดคือวิธีการทดสอบเพื่อหาความแตกต่างในผลิตภัณฑ์

2.6.1 การทดสอบเพื่อหาความแตกต่างในผลิตภัณฑ์ (Difference test) (ธงชัย, 2549)

การทดสอบเพื่อหาความแตกต่างในผลิตภัณฑ์มีวัตถุประสงค์เพื่ออธิบายตัวอย่างที่นำมาทดสอบมีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยรูปแบบการทดสอบความแตกต่างสามารถแบ่งเป็น 2 รูปแบบคือ การทดสอบเพื่อหาความแตกต่างลักษณะเฉพาะทางประสาทสัมผัส (Attribute diffence tests) ตัวอย่างวิธีการทดสอบได้แก่ Directional paired comparison, Ranking test และ Scoring test / Rating test เป็นต้น และการทดสอบเพื่อหาความแตกต่างโดยรวม (Overall difference tests)ตัวอย่างวิธีการทดสอบได้แก่ Triangle test, Duo-Trio test, R-index, Two out of five, Same/ Different test, A or not A test และ Difference from control test เป็นต้น

2.6.1.1 การทดสอบความแตกต่างจากตัวอย่างควบคุม (Difference from control test)

วิธีการทดสอบนี้จะนำตัวอย่างที่กำหนดให้เป็นตัวอย่างควบคุม หรือตัวอย่างอ้างอิงให้กับผู้ทดสอบก่อนเพื่อใช้เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบอีก 1 ตัวอย่างหรือมากกว่า โดยวิธีนี้ผู้ทดสอบจะอธิบายความแตกต่างของตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมออกมาเป็นระดับคะแนนความแตกต่างเทียบกับตัวอย่างควบคุมว่ามีความแตกต่างมากน้อยแค่ไหน ตัวอย่างระดับคะแนนความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างที่ใช้ เช่นใช้คะแนน 0 - 4 หรือ 0 - 10 โดยที่ 0 หมายถึง ไม่มีความแตกต่างไปจนถึง 10 หมายถึง แตกต่างมากที่สุดจากตัวอย่างควบคุมนำคะแนนที่ได้คำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยวิธี Difference from control test โดยจะนำผลรวมคะแนนที่ได้มาคำนวณหาค่า t ซึ่งคำนวณได้จากสมการที่ 1) จะได้ t คำนวณและนำไปเปรียบเทียบกับ t ตารางที่เปิดจากตารางแจกแจงค่า t (t distribution) โดยเปิดที่จำนวนผู้ทดสอบที่ทำการทดสอบ ในกรณีที่มีตัวอย่างมากกว่า 1 ตัวอย่างขึ้นไปจะเปรียบเทียบระหว่าง t คำนวณของแต่ละตัวอย่าง โดยถ้าค่า t คำนวณ > t ตาราง แสดงว่า ตัวอย่างที่ทดสอบไม่มีความแตกต่างจากตัวอย่างควบคุม

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{N_1 + N_2}}} \quad 1)$$

$$\bar{x} = \frac{\text{คะแนนรวม}}{\text{จำนวนผู้ชิม}} \quad 2)$$

$$S^2 = \frac{\sum X^2 - N\bar{X}^2}{N-1} \quad 3)$$

S^2 = ความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่าง

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยคะแนน

N = ประชากร

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Meng และ Genigeorgis (1994) ศึกษาผลของการใช้โซเดียมแลคเตทและอุณหภูมิการเก็บรักษาเพื่อยับยั้ง *C. botulinum* ในผลิตภัณฑ์ซูวีด โดยใช้อัตราส่วนของสารโซเดียมแลคเตท ร้อยละ 0, 2.4 และ 4.8 และเก็บที่อุณหภูมิ 4, 8, 12, และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 90 วัน ในผลิตภัณฑ์ตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด คือ เนื้อวัว อกไก่และปลาแซลมอน พบว่า เนื้อวัวและเนื้อไก่ที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 2.4 หรือ 4.8 และเก็บที่อุณหภูมิ 4 หรือ 8 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บได้มากกว่า 90 วัน ส่วนปลาแซลมอนจะมีอายุการเก็บที่สั้นกว่า โดยการเติมโซเดียมแลคเตทที่ปริมาณมากกว่าร้อยละ 2.4 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า จะช่วยยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ดีและยืดอายุการเก็บรักษาได้ดี

Miwa และคณะ (1998) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อ *C. perfringens* ชนิด enterotoxigenic ในเนื้อสัตว์ด้วยวิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยทำการสุ่มตรวจในเนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อไก่ โดยวิธี MPN และ วิธี Plate count agar พบว่าเมื่อตรวจตัวอย่างเนื้อ 50 ตัวอย่างโดยวิธี MPN ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเซลล์แบบ non - enterotoxigenic จากตัวอย่างทั้งหมดของ *Cl. perfringens* มีปริมาณจำนวนเซลล์ enterotoxigenic น้อยเมื่อเทียบกับปริมาณ non-enterogenic ในตัวอย่างเนื้อชนิดเดียวกัน

Araujo และคณะ (2004) ตรวจวิเคราห์ปริมาณสปอร์ของ *C. perfringens* ในตัวอย่างน้ำใต้ดิน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด ได้แก่ Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar, Tryptose Sulfite Cycloserine Fluorocult supplemented (TSCF) agar, Membrane *Clostridium Perfringens* (mCP) agar, Trypticase Sulfite Neomycin (TSN) agar, Sulphite Polymyxin Sulphadiazine (SPS) agar และ Wilson Blair agar พบว่าอาหาร mCP agar สามารถนับปริมาณสปอร์ได้น้อยที่สุดเมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทียบกับอาหาร TSC agar, TSN agar, SPS agar และ WB agar ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSCF agar เมื่อตรวจนับสปอร์ของเชื้อดังกล่าวพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่น

Juneja (2006) ศึกษาผลการยับยั้ง *C. perfringens* โดยใช้สารโซเดียมแลคเตทในการ ซูวีดผลิตภัณฑ์อกไก่หมัก โดยการเติมโซเดียมแลคเตท ร้อยละ 0, 1.5, 3.0 และ 4.8 ในผลิตภัณฑ์ไก่หมักและนำไปผ่านกระบวนการซูวีดที่อุณหภูมิ 71 องศาเซลเซียสหลังจากนั้นนำมาเก็บแช่เย็นที่ 4, 9 และ 25 องศาเซลเซียสตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า การเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 1.5 และเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสส่งผลให้ชะลดการเจริญของเชื้อได้ถึง 29 ชั่วโมง ส่วนการเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 3.0 หรือ 4.8 เก็บที่อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อและเก็บรักษาได้นานถึง 648 ชั่วโมง

Vaudagna และคณะ (2008) ศึกษาผลของการเติมสารละลายเกลือที่มีต่อเนื้อโคอาร์เจนตินาที่ปรุงสุกด้วยกระบวนการซูวีด โดยการเติมสารโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0 - 1.4 และโซเดียมไตรฟอสเฟต (STPP) ร้อยละ 0 - 0.5 ลงในเนื้อโค (Semitendinosus) จากนั้นนำเนื้อไปผ่านกระบวนการซูวีดที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (55-75 องศาเซลเซียส) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ pH ของเนื้อโค โดยผลการทดลองพบว่าการใช้ STPP ร้อยละ 0.25 ผสม เกลือร้อยละ 1.20และ STPP ร้อยละ 0.25 ผสมกับเกลือ 0.70 ภายใต้อุณหภูมิระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส มีการสูญเสียน้ำหนักน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ ค่า pH ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ STPP ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 และไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น

Jose และคณะ (2012) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการซูวีดเนื้อหมู โดยใช้แก้มหมูไปผ่านกระบวนการซูวีดที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่แตกต่างกันที่ 5 และ 12 ชั่วโมง และการบรรจุที่ภาวะสุญญากาศและไม่ใช้สุญญากาศ ผลพบว่ามีการสูญเสียน้ำหนักน้อยและมีค่าความชื้นสูงในแก้มหมูที่ผ่านระยะเวลาซูวีดและอุณหภูมิต่ำ สรุปว่าแก้มหมูที่ผ่านการซูวีดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง จะมีการสูญเสียน้ำหนักน้อยกว่าซูวีดที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Roldan และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาร่วมกันต่อสมบัติทางเคมีกายภาพ จุลินทรีย์ เนื้อสัมผัสและโครงสร้างเนื้อเยื่อของเนื้อสันในแกะด้วยการซูวีดที่ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าตัวอย่างที่ให้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส มีค่าความสว่างและค่าสีแดงสูงที่สุด เมื่ออุณหภูมิและระยะเวลาสูงขึ้นจะมีค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้น และค่าการสูญเสียน้ำหนักและความชื้นต่ำที่สุด ในขณะตัวอย่างที่ให้ความร้อนทุกอุณหภูมิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเนื้อสัมผัส ต่ำที่สุด รวมไปถึงค่าการสูญเสียน้ำหนักและความชื้นก็สูงที่สุดเช่นกัน อีกทั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบทั้งหมดไม่พบการเจริญ (not detect) หรือ น้อยกว่า 1 log cycle นั่นเอง

Bingol และคณะ (2014) ศึกษาผลของโซเดียมแลคเตทในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นเนื้อวัวตรุกี ต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสและคุณภาพทางจุลินทรีย์ โดยใช้โซเดียมแลคเตทระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 เก็บที่อุณหภูมิ 20 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าการใช้โซเดียมแลคเตทสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทเพิ่มขึ้น และคุณภาพทางประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับแก่ผู้บริโภค

Sarjit และ Dykes (2015) ศึกษาการใช้ไตรโซเดียมฟอสเฟต (TSP) และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (SH) เพื่อใช้ยับยั้ง *Campylobacter* และ *Salmonella* ในเนื้อเป็ดและเนื้อไก่ภายใต้การจำลองภาวะการแช่เย็นด้วยน้ำทางการค้า โดยเชื้อถูกใส่ที่ความเข้มข้น 10^4 และ 10^8 CFU/ml ลงบนผิวเป็ด ใช้ความเข้มข้น TSP 3 ระดับคือร้อยละ 8, 10, 12 และ SH เข้มข้น 40 50 และ 60 ppm ตามลำดับภายใต้อุณหภูมิ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที ผลการทดลองสรุปว่า TSP มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Campylobacter* และ *Salmonella* ในเนื้อเป็ดและเนื้อไก่ได้ดีกว่า SH และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งดียิ่งขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น

Kongpeam และคณะ (2015) ศึกษาการปรับปรุงคุณภาพเนื้อวัวส่วนพื้นท้องด้วยการซูวีด โดยใช้อุณหภูมิในการซูวีด 55-65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาตั้งแต่ 24-48 ชั่วโมง และเก็บที่อุณหภูมิแช่เย็น พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลามีผลต่อค่าลักษณะทางกายภาพ โดยอุณหภูมิไม่มีผลต่อค่าความสว่าง (Δ L) การซูวีด ส่งผลทำให้ค่าสีเขียวถึงแดง (Δ a) ลดลง การสูญเสียน้ำหนักและความสามารถในการอุ้มน้ำที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่าสูงที่สุดในทุกระยะเวลาการซูวีด และพบว่าตัวอย่างที่ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 36 ชั่วโมง มีค่าความเหนียวและค่าความแน่นเนื้อต่ำที่สุดแม้ค่าการสูญเสียน้ำหนักจะสูงขึ้นเมื่อเทียบกับภาวะอื่นๆก็ตาม

Bingol และ Kamil (2007) ศึกษาผลของโซเดียมแลคเตทต่อคุณภาพทางจุลชีววิทยาและอายุการเก็บรักษาของไส้กรอก โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่ร้อยละ 0 (ตัวอย่างควบคุม) 0.6 1.2 1.8 และใช้โซเดียมไนไตรท์ร้อยละ 0.125 ในแต่ละตัวอย่างนำไส้กรอกเก็บในภาวะสุญญากาศที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่าตัวอย่างที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุมโดยพบว่าที่การเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 0.6 และ 1.2 สามารถยืดอายุการเก็บได้ถึง 45 และ 60 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีอายุการเก็บเพียง 30 วัน อีกทั้งผลต่อเชื้อจุลินทรีย์โดนเฉพาะ anaerobic bacteria พบว่าตัวอย่างที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทจะช่วยลดปริมาณ anaerobic bacteria และที่การใช้โซเดียวแลคเตทร้อยละ 1.2 และ 1.8 ไม่พบการเจริญของเชื้อ anaerobic bacteria ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมยังพบอยู่ 1.21 log cfu/g ในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 เนื้อโคไทยส่วนพื้นท้อง (Flank) จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ

3.1.2 ผงน้ำเกรวี่สำเร็จรูป (McCormick, USA)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 เครื่องชั่ง (Balance) (Mettler Toledo, Germany)

3.2.2 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) (Heraeus, Germany)

3.2.3 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Heraeus, Germany)

3.2.4 เครื่องตีปั่น (Stomacher) (IUL instruments, Spain)

3.2.5 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) (BossTech, Thailand)

3.2.6 ไมโครเวฟ (Microwave) (Electrolux, China)

3.2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Memmert, Germany)

3.2.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) (Tommy, Japan)

3.2.9 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries, USA)

3.2.10 จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาด 15 มิลลิลิตร (Kartell, Italy)

3.2.11 ไมโครปิเปต (Micropipette) 200 - 1000 ไมโครลิตร(Gilson, France)

3.2.12 ช้อนสแตนเลส (Stainless spoon) (หัวม้าลาย, ประเทศไทย)

3.2.13 เจลความเย็น (Ice pack) (Coleman, China)

3.2.14 ทิป (Tips) ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson, France)

3.2.15 โถบ่มเชื้อสุญญากาศ (Anaerobic jar) (Merck, Germany)

3.2.16 ปิเปต (Pipettes) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.2.17 หลอดทดลองขนาด (Test tube) 16×150 มิลลิเมตร

3.2.18 หลอดทดลองขนาด (Test tube) 13×150 มิลลิเมตร

3.2.19 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50, 250,500 และ 1000 มิลลิลิตร

3.2.20 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50, 100, 500 และ1000 มิลลิลิตร

3.2.21 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Burner)

3.2.22 ห่วงและเข็มเขี่ยเชื้อ (Loop, needle)

3.2.23 แท่งแก้วรูปตัว L (Spreader)

3.2.24 แผ่นดูดอากาศ (AnaeroPack-Anaero) (MGC, Japan)

3.2.25 ถุงสุญญากาศ ชนิด LLDPE ขนาด 7x11 นิ้ว (กิจถาวร, ประเทศไทย)

3.2.26 ขวดดูแรน (Laboratory bottle) (Duran, Germany)
ขนาด 100, 200, 500 และ 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.3.1 เชื้อ *Clostridium perfringens* type c รหัส DSMT: 16637 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, กระทรวงสาธารณสุข)

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1.1 Cooked Meat Medium (CM)	(Difco, USA)
3.3.1.2 *Clostridium welchii* Agar	(Eiken chemical, Japan)
3.3.1.3 Fluid Thioglycollate Medium	(Difco, USA)
3.3.1.4 Peptone	(Rajasthan, India)
3.3.1.5 Plate Count Agar (PCA)	(Difco, USA)
3.3.1.6 Proteose peptone	(Merck, Germany)
3.3.1.7 Sulphite-Polymyxin-Sulphadiazine Agar (SPS Agar), Modified	(HiMedia, India)
3.3.1.8 Strach	(Merck, Germany)
3.3.1.9 Yeast extract	(Difco, USA)

3.4 สารเคมี

3.4.1 Malachite green oxalate	(Ajax Finechem Pty, Australia)
3.4.2 Sodium thioglycolate	(Merck, Germany)
3.4.3 Sodium-(S)-lactate-solution 50%	(Merck, Germany)
3.4.4 Iodine (I_2)	(Carlo Erba, Italy)
3.4.5 Safranin O	(Scharlau Chemie S.A., Spain)
3.4.6 Crystal violet	(Carlo Erba, Italy)
3.4.7 Ethyl Alcohol 95% commercial grade	(Vrbioscience co., Ltd, Thailand)
3.4.8 Sodium monohydrogen phosphate heptahydrate	(Panreac Quimica Sau, Spain) ($Na_2HPO_4.7H_2O$)

3.5 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การเตรียมสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium perfringens* ในหลอดทดลอง

นำเชื้อ *C. perfringens* type c รหัส DMST 16637 อ้างอิงจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ทำการต่อเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meat medium 1 ลูป บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้หัวเชื้อเข้มข้น (Stock culture) ของเชื้อ *C. perfringens* และทำการปิเปตจาก Stock ของเชื้อ 1 ml ลงใน อาหารสำหรับสร้างสปอร์ Proposed medium ปริมาตร 40 ml (ภาคผนวก ก.1.2) แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Duncan and Strong, 1968) และทำให้เป็นสารละลายสปอร์บริสุทธิ์ รายละเอียดตามภาคผนวก ก.1.1 โดยปริมาณสปอร์เริ่มต้นในสารละลายสปอร์บริสุทธิ์มีปริมาณ 10^6 spores/ml โดยตรวจปริมาณสปอร์ของเชื้อโดยใช้อาหาร SPS agar (Sulphite-Polymyxin-Sulphadiazine agar) ด้วยวิธี pour plate และบ่มในภาวะไม่มีอากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Duncan and Strong, 1968) ทำการนับโคโลนีที่เกิดขึ้นและเก็บตัวอย่างโคโลนีนำมายืนยันโดยใช้อาหาร CW agar (*Clostridium welchii* Agar)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยถ้าเป็น *C. perfringens* จะสร้าง clear zone เป็นสีเหลือง (ภาคผนวกที่ ข.4) (Komoriya et al., 2007)

3.5.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ sous-vide model broth (SVM)

3.5.2.1 เตรียมอาหาร CM-SVM broth โดยชั่ง Cooked meat medium 1.25 กรัม ต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียว และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานไม่เกิน 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้นำไปต้มน้ำเดือดเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 30 นาที

3.5.2.2 เตรียมอาหาร FTM-SVM broth โดยชั่ง Fluid thioglycolate medium 29.8 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 15 – 30 องศาเซลเซียส นานไม่เกิน 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้ นำไปต้มน้ำเดือดเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 30 นาที

3.5.3 การเตรียมวัตถุดิบเนื้อ

นำเนื้อโคพันธุ์ไทยพื้นเมืองส่วนพื้นท้อง (Flank) มาลอกผังผืดและไขมันออกและหั่นเนื้อให้มีขนาด 5×5×2.5 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 60-80 กรัม (Kongpeam et al., 2015; Podolak et al., 1996) และเก็บในถุงสุญญากาศปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.4 การศึกษาผลของระยะเวลาในการชูวีดต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง

นำสารละลายสปอร์บริสุทธิ์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 ใส่ลงในอาหาร sous-vide model broth (SVM) ทั้ง 2 ชนิดคือ CM-SVM broth ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2.1 และ FTM-SVM broth ที่เตรียมจากข้อ 3.5.2.2 โดยคำนวนความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 2 ระดับคือ 10^3 และ 10^5 spores/ml และปิดฝาหลอดทดลองด้วยพาราฟิน แล้วจึงนำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง (Kongpeam et al., 2015) สุ่มตัวอย่างหลอดทดลองที่ผ่านการ ชูวีดนาน 0, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ตรวจปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* โดยใช้อาหาร SPS agar (Sulphite-Polymyxin-Sulphadiazine agar) ด้วยวิธี pour plate และบ่มในภาวะไม่มีอากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและนับโคโลนีที่เกิดขึ้น ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณสปอร์ที่เปลี่ยนแปลงในอาหารทั้ง 2 ชนิดด้วยวิธี t-test

3.5.5 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีผลต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง

3.5.5.1 เตรียมสารละลายโซเดียมแลคเตทความเข้มข้นร้อยละ 1.5, 3.0 และ 4.5 น้ำหนัก/น้ำหนัก วิธีการเตรียมแสดงดังภาคผนวกที่ ก.2.1 (Juneja, 2006) ลงใน sous-vide model broth (SVM) ทั้ง 2 ชนิดคือ CM-SVM broth และ FTM-SVM broth และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.5.2 นำสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 เตรียมที่ความเข้มข้นสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เริ่มต้นที่เลือกได้จากการทดลองในข้อ 3.5.4 ใส่ลงในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแลคเตท 4 ระดับคือร้อยละ 0, 1.5, 3, 4.5 จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง และตรวจนับปริมาณเชื้อโดยวิธีในข้อ 3.5.8.3 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณสปอร์ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละภาวะด้วยวิธี t-test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีผลต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในเนื้อซูวีดและการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษา

3.5.6.1 การศึกษาผลของโซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งสปอร์ *C. perfringens* ในเนื้อซูวีด

เตรียมตัวอย่างเนื้อตามวิธีในข้อ 3.5.3 และนำเนื้อมาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet, UV) ในตู้ปลอดเชื้อบนตะแกรงปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (กลับด้านด้านละ 30 นาที) เพื่อฆ่าเชื้อในเนื้อเบื้องต้น รายละเอียดตามภาคผนวกที่ ง.1 โดยแบ่งภาวะการทดลองในเนื้อซูวีดเป็น 4 ภาวะ ประกอบไปด้วย ภาวะที่ 1 คือ เนื้อใส่น้ำกลั่น (ตัวอย่างควบคุม) ภาวะที่ 2 คือ เนื้อที่ใส่สารละลายโซเดียมแลคเตท ภาวะที่ 3 คือ เนื้อที่ใส่สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* และภาวะที่ 4 คือ เนื้อที่ใส่สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* และสารละลายโซเดียมแลคเตท โดยภาวะในเนื้อซูวีดแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 3.1 สภาวะในเนื้อซูวีดที่ศึกษา

ภาวะที่	เนื้อ	น้ำกลั่น	โซเดียมแลคเตท	สปอร์ของเชื้อ
1 (control)	☑	☑	-	-
2	☑	-	☑	-
3	☑	-	-	☑
4	☑	-	☑	☑

การใส่สารละลายสปอร์บริสุทธิ์เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 มีความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^6 spores/ml โดยความเข้มข้นของสปอร์ *C. perfringens* ในการทดลองนี้เลือกได้จากข้อ 3.5.5 โดยวิธีการใส่สปอร์ของเชื้อลงบนเนื้อตามวิธีในภาคผนวก ง.2

สำหรับตัวอย่างที่มีการเติมสารละลายโซเดียมแลคความเข้มข้นที่เลือกได้จากข้อ 3.5.5 โดยเติมเพียงร้อยละ 10 ของน้ำหนักเนื้อ (Bruce and Denis, 2001) วิธีการเติมสารละลายโซเดียมแลคเตทตามวิธีในภาคผนวก ค.2 และนำเนื้อผึ่งบนตะแกรงปลอดเชื้อให้สารละลายโซเดียมแลคเตทซึมเข้าเนื้อเป็นระยะเวลา 5 นาที ทำเช่นเดียวกันทั้งสองด้าน

นำตัวอย่างที่เตรียมได้จากภาวะที่แสดงในตารางที่ 3.1 ใส่ถุงสุญญากาศชนิด LLDPE และบรรจุในสภาพสุญญากาศแล้วจึงนำซูวีดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง (Kongpeam et al., 2015) ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่ง 72 ชั่วโมงโดยตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ตามรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 3.5.8 จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติของปริมาณสปอร์เหลือรอดด้วยวิธี t-test

3.5.6.2 การเปลี่ยนแปลงทางด้านจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษา

นำเนื้อที่ผ่านการซูวีดทั้ง 4 ภาวะจากข้อ 3.5.6.1 มาทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่เหลือรอด ทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ตามข้อ 3.5.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.7 การตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคเนื้อซูวีด

3.5.7.1 ทดสอบความแตกต่างของเสต็กเนื้อซูวีดที่มีการเติมและไม่เติมสารละลายโซเดียมแลคเตทด้วยวิธี Difference from control test

นำเนื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.3 โดยทดสอบเนื้อที่ไม่เติมและเติมสารละลายโซเดียมแลคเตท ซึ่งในเนื้อที่เติมสารละลายโซเดียมเลคแตทใช้ความเข้มข้นที่เลือกได้ในข้อ 3.5.5 โดยเติมเพียงร้อยละ 10 ของน้ำหนักเนื้อ (Bruce and Denis, 2001) วิธีการใส่สารละลายอ้างอิงตาม ภาคผนวก ค.2 หลังจากนั้นนำเนื้อทั้งหมดบรรจุในถุงสุญญากาศและนำไปเข้ากระบวนการซูวีดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสระยะเวลา 36 ชั่วโมง (Kongpeam et al., 2015) และนำเนื้อซูวีดไปย่างบนกระทะไฟปานกลางโดยให้ความร้อนเป็น 15 วินาที ทั้ง 2 ด้าน รายละเอียดตามภาคผนวก จ.3 และนำไปให้ให้ผู้บริโภคทดสอบชิมโดยให้คะแนนตั้งแต่ 0 ถึง 4 (0 = ไม่แตกต่าง 1 = แตกต่างเล็กน้อย 2 = แตกต่างปานกลาง 3 = แตกต่างมาก และ 4 = แตกต่างมากที่สุด) เพื่อวัดความแตกต่างในแต่ละคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี (บริเวณด้านในของเนื้อ) รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม จากนั้นนำคะแนนที่ได้คำนวณตามสูตรที่แสดงตาม (ในตรวจเอกสาร) เพื่อหาค่า t ในแต่ละคุณลักษณะเพื่อเปรียบเทียบกับค่า t ตารางที่เปิดจากตารางแจกแจงค่า t

3.5.7.2 ทดสอบการยอมรับของเสต็กเนื้อซูวีด

นำน้ำเกรวี่สำเร็จรูป 1 ซอง ซึ่งประกอบไปด้วยผงเกรวี่สำเร็จรูป ปริมาณ 24 กรัม ต่อปริมาตร 250 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันในหม้อและนำไปให้ความร้อนด้วยไฟอ่อน ทำการคนตลอดเวลาเพื่อให้ผงน้ำเกรวี่สำเร็จรูปละลาย เมื่อละลายหมดแล้ว นำขึ้นมาทิ้งไว้ให้เย็นและเสริฟพร้อมเนื้อเสต็กที่ผ่านการให้ความร้อนตามรายละเอียดในข้อ 3.5.7.1 โดยให้ผู้บริโภคทดสอบการยอมรับของผลิตภัณฑ์โดยให้ราดน้ำเกรวี่ลงบนเสต็กเนื้อซูวีดก่อนทดสอบชิมและให้ทำเครื่องหมายลงในช่องยอมรับและไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์

นำคะแนนการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้ทดสอบจำนวน 40 คน มาวิเคราะห์ทางสถิติ เพื่อหาความแตกต่างระหว่างเนื้อที่เติมและไม่เติมสารละลายโซเดียมแลคเตทและการยอมรับผลิตภัณฑ์หลังจากราดน้ำเกรวี่ลงบนเสต็ก

3.5.8 การตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์

3.5.8.1 การเตรียมตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างเนื้อที่ผ่านการซูวีดที่ระยะเวลาต่างๆ มาตีปั่นทั้งชิ้นโดยใช้อัตราส่วนระหว่างชิ้นเนื้อและ peptone water 1:10 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีปั่นอาหาร (stomacher) เป็นเวลา 2 นาที ทำการเจือจางที่ระดับความเจือจางที่ 1:10, 1:100 และ 1:1,000 และนำตัวอย่างที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens*

3.5.8.2 วิธีการตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ทั้งหมด

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) โดยวิธี Aerobic Plate Count ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Plate count agar (PCA) เพื่อทำการ pour plate เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาค่าในหน่วย cfu/g ของตัวอย่าง (FDA-BAM, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.8.3 วิธีการตรวจปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens*

การวิเคราะห์ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* โดยปิเปตตัวอย่างเชื้อที่ระดับความเจือจางที่ 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ลงบนอาหาร SPS Agar บ่มในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Duncan and Strong, 1968) ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีสีดำ เก็บตัวอย่างโคโลนีสีดำโลนีมายืนยันโดยใช้อาหาร CW agar (*Clostridium welchii* Agar) โดยถ้าเป็น *C. perfringens* จะสร้าง clear zone เป็นสีเหลือง (Komoriya et al., 2007) และส่งตรวจเพื่อยืนยันเชื้อ *C. perfringens* โดยวิธีการ biochemical test ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลของระยะเวลาในการซูวีดที่มีต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง

ระยะเวลาการซูวีดที่มีผลต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลองที่ผ่านกระบวนการซูวีดหรือ Sous-vide model broth (SVM) โดยใช้อาหารทั้ง 2 ชนิดคือ CM-SVM broth และ FTM-SVM broth รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ระหว่างกระบวนการซูวีดที่ 60 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	CM-SVM broth (log spores/ml)		FTM-SVM broth (log spores/ml)	
	10^3	10^5	10^3	10^5
0	3.05±0.01	5.42^{a}±0.02	3.09±0.02	5.41^{a}±0.01
12	nd	1.49^{b}±0.03	nd	1.37^{b}±0.02
24	nd	1.23^{c}±0.01	nd	1.08^{c}±0.03
36	nd	1.03^{d}±0.02	nd	0.68^{d}±0.02

หมายเหตุ

$^{a\,b\,c}$ หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

nd = not detect (ตรวจไม่พบ)

ในการศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการซูวีดที่มีต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ได้การใช้ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ระดับความเข้มข้น 10^3 และ 10^5 spores/ml ทั้งนี้เพราะที่ระดับ 10^3 cfu/g จะเป็นระดับที่ตรวจพบเชื้อ *C. perfringens* ได้ในกรณีที่เนื้อสัตว์เกิดการปนเปื้อนข้ามและปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค *C. perfringens* อยู่ที่ปริมาณ $10^5 - 10^6$ cfu/g

โดยการผลการใส่สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ระดับความเข้มข้น 10^3 spores/ml ในหลอดทดลองที่มีอาหารทั้ง 2 ชนิดและนำ SVM broth ไปซูวีดที่ระยะเวลา 0 – 36 ชั่วโมง ในกรณีของอาหาร CM-SVM broth พบว่า ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ระยะเวลาการซูวีที่ 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.05 log spores/ml และเมื่อเวลาการซูวีดผ่านไป 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ไม่พบสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *C. perfringens* เป็นเชื้อประเภท Mesophile bacteria ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 37 – 45 องศาเซลเซียส (ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ภูเก็ต, 2553) ซึ่งไม่สามารถมีชีวิตรอดที่อุณภูมิ 60 องศาเซลเซียส แต่สปอร์ของเชื้อสามารถทนความร้อนสูงได้ โดยต้องใช้อุณหภูมิถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 – 124 นาทีจึงจะสามารถทำลายสปอร์ได้ (Sarker et al., 2000) แต่เนื่องจากปริมาณสปอร์ที่ระดับ 10^3 spores/ml มีการกระจายตัวของปริมาณสปอร์อย่างไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนาแน่น อาจจะส่งผลต่อการถ่ายเทความร้อนทำให้สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อได้ทั้งหมดในระยะเวลาการซูวีดเพียง 12 ชั่วโมง (Payne et al., 2007)

ในส่วนของการใส่สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่มีความเข้มข้น 10^5 spores/ml จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อเริ่มต้นใน CM-SVM broth มีค่าเท่ากับ 5.42 log spores/ml และเมื่อระยะเวลาการซูวีดเพิ่มขึ้นเป็น 12, 24 และ 36 ชั่วโมง มีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เท่ากับ 1.49, 1.23 และ 1.03 log spores/ml ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ยังมีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* หลงเหลืออยู่เพราะอุณหภูมิและระยะเวลาในการซูวีดอาจจะไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ 10^5 spores/ml เนื่องจากปริมาณสปอร์ของเชื้อยิ่งมากจะส่งผลให้เชื้ออยู่รอดเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเหตุผลอาจมาจากการกระจายตัวของสปอร์ของเชื้อเช่นเดียวกับที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ซึ่งปริมาณสปอร์ที่ระดับ 10^5 spores/ml อาจจะมีการกระจายตัวของสปอร์ที่หนาแน่นทำให้การกระจายความร้อนไม่ทั่วถึงส่งผลให้ยังมีสปอร์เหลือรอดอยู่แม้จะผ่านระยะเวลาการซูวีดถึง 36 ชั่วโมงแล้วก็ตาม (Payne et al., 2007)

ในกรณีของอาหาร FTM-SVM broth พบว่าผลการใส่สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ระดับความเข้มข้น 10^3 spores/ml เมื่อนำ SVM broth ไปซูวีดที่ระยะเวลา 0 – 36 ชั่วโมง พบปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ระยะเวลาการซูวีดที่ 0 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.09 log spores/ml และเมื่อเวลาการซูวีดผ่านไป 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ไม่พบสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง ผลการทดลองแนวโน้มเดียวกันกับกรณีที่มีการใช้อาหาร Cooked meat medium

ในส่วนของการใส่สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่มีความเข้มข้น 10^5 spores/ml พบปริมาณเชื้อเริ่มต้นใน FTM-SVM broth มีค่าเท่ากับ 5.41 log spores/ml และเมื่อระยะเวลาการซูวีดผ่านไป 12, 24 และ 36 ชั่วโมง พบปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เท่ากับ 1.37, 1.08 และ 0.68 log spores/ml ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ยังพบปริมาณสปอร์ของ *C. perfringens* หลงเหลืออยู่เพราะอุณหภูมิและระยะเวลาในการซูวีดไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ของเชื้อที่ 10^5 spores/ml ซึ่งเหตุผลสอดคล้องกับในกรณีของการใช้อาหาร CM-SVM broth

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหาร FTM-SVM broth กับ อาหาร CM-SVM broth พบว่าปริมาณสปอร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสาเหตุที่ปริมาณสปอร์ในอาหาร FTM-SVM broth ที่เหลือน้อยกว่าปริมาณสปอร์ที่พบในอาหาร CM-SVM broth อาจเนื่องมาจากอาหาร CM-SVM broth มีลักษณะเป็นเม็ดทำให้มีพื้นที่มาก สปอร์ของเชื้อที่เข้าไปเกาะการถ่ายเทความร้อนอาจจะไม่เพียงพอ ทำให้เชื้อบางส่วนสามารถยังคงอยู่รอด ในขณะที่อาหาร FTM-SVM broth มีลักษณะเป็นสารละลายเหลวที่สามารถได้รับความร้อนได้ทั่วถึง (MacFaddin, 1985; Murray et al., 2003)

อีกทั้งอาหาร CM-SVM broth มีองค์ประกอบใกล้เคียงกับเนื้อสัตว์ มากกว่าอาหาร FTM-SVM broth และข้อจำกัดของอาหาร FTM-SVM broth คือไม่ใช่อาหารที่เลี้ยงเชื้อ *C. perfringens* โดยเฉพาะภาวะในการเจริญเติบโตอาจจะด้อยกว่าอาหาร CM-SVM broth (MacFaddin, 1985)

จะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพต่างกันในกรณีของ CM-SVM broth มีประสิทธิภาพในแง่ของความใกล้เคียงกับเนื้อสัตว์ด้านองค์ประกอบของอาหารมากกว่าจึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถอยู่รอดได้มากกว่าอีกทั้งยังเป็นอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อกลุ่ม *C. perfringens* โดยเฉพาะ (Selective medium) ส่วนอาหาร FTM-SVM broth มีประสิทธิภาพในด้านการถ่ายเทความร้อนเนื่องจากไม่ได้เป็นอาหารที่ใช้เฉพาะกับเชื้อจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวแต่สามารถใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายชนิด อีกทั้งลักษณะของอาหารเป็นของเหลวมีการถ่ายเทความร้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ปริมาณสปอร์ของเชื้อจึงมีปริมาณเหลือรอดน้อยกว่าอาหาร CM-SVM broth (Payne et al., 2007)

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น กล่าวได้ว่าปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ 10^3 spores/ml เมื่อนำไปใส่ในหลอดทดลองและจำลองภาวะการซูวีดใน SVM broth ภาวะการ ซูวีดที่ 12 ชั่วโมง สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* โดยปริมาณสปอร์ของเชื้อดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 10^3 spores/ml เป็นระดับที่สามารถตรวจพบได้ในกรณีที่เนื้อสัตว์เกิดการปนเปื้อน อย่างไรก็ตาม ปริมาณเชื้อจุลินทรีเริ่มต้นมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์ (Payne et al., 2007) และส่งผลต่อเนื่องถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเช่นกัน ดังนั้นในการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของโซเดียมแลคเตท ในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ภาวะซูวีดนี้จึงเลือกใช้สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 spores/ml ในขั้นตอนถัดไป

4.2 ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีผลต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง

4.2.1 ผลของความเข้มข้นโซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหารชนิด CM-SVM broth

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง (SVM broth) โดยใช้ CM-SVM broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหาร CM-SVM broth ที่มีสารละลายโซเดียมแลคเตทความเข้มข้นระดับต่างๆ ระหว่างกระบวนการซูวีดที่ 60 °C

เวลา (ชั่วโมง)	สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* (log spores/ml) ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแลคเตท (%)			
	0	1.5	3	4.5
0	5.43^{a} ±0.03	5.42^{a} ±0.02	5.43^{a} ±0.02	5.43^{a} ±0.02
12	1.49^{b} ±0.01	1.39^{b} ±0.05	1.11^{b} ±0.03	0.74^{b} ±0.04
24	1.24^{c} ±0.04	1.08^{c} ±0.05	0.72^{c} ±0.08	0.42^{c} ±0.10
36	1.04^{d} ±0.02	0.46^{d} ±0.15	nd	nd

หมายเหตุ ^{abc} หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)
nd = not detect (ตรวจไม่พบ)

จากการทดลองที่มีการใส่ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ 10^5 spores/ml ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าที่ระยะเวลาการซูวีด 0 ชั่วโมง มีปริมาณสปอร์ของเชื้ออยู่ระหว่าง 5.42 – 5.43 log spores/ml ในทุกๆความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทในอาหาร CM-SVM broth ทั้งนี้เมื่อระยะเวลาการซูวีดนานขึ้นส่งผลให้ปริมาณสปอร์ *C. perfringens* ในหลอดทดลองมีปริมาณที่ลดลงในทุกภาวะการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลาการซูวีดส่งผลให้ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ลดลงคือการซูวีดนาน 12, 24 และ 36 ชั่วโมง มีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ลดลงจาก 5.43 เป็น 1.49, 1.24 และ 1.04 log spores/ml ตามลำดับ โดยสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการซูวีด 12 ชั่วโมงแรก โดยลดลงประมาณ 4 log cycle ในทุกๆภาวะของการทดลอง และจะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเวลาซูวีด 24 – 36 ชั่วโมง การที่ยังพบปริมาณสปอร์ของ *C. perfringens* หลงเหลืออยู่เป็นอาจเป็นเพราะเมื่อมีการให้ความร้อนในอุณภูมิที่ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้ทั้งหมดเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้สปอร์ของเชื้อที่เหลือรอดมีการทนความร้อนได้สูงขึ้นจึงไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อได้ทั้งหมด (Smith et al., 1981)

จากตารางที่ 4.2 ยังพบว่าการเติมโซเดียมแลคเตทมีผลต่อการลดลงของสปอร์เชื้อ *C. perfringens* โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่สูงขึ้นส่งผลให้สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* มีปริมาณลดลง กล่าวคือที่ระยะเวลาการซูวีด 12 ชั่วโมงหลอดทดลองที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 1.5, 3 และ 4.5 มีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เท่ากับ 1.39, 1.11 และ 0.74 log spores/ml โดยเมื่อซูวีดนาน 36 ชั่วโมง มีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เท่ากับ 1.04 และ 0.46 log spores/ml และไม่พบสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 3 และ 4.5 ตามลำดับ การที่ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลองที่เติมสารละลายแลคเตทร้อยละ 1.5 3 และ 4.5 หลงเหลือน้อยกว่าหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมแลคเตทร้อยละ 0 อาจเป็นเพราะปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาส่งผลให้โซเดียมแลคเตทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อมากขึ้น โดยกลไกการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อเกิดจากโมเลกุลของกรดจะเข้าไปสอดแทรกกระบวนชีวเคมีของเซลล์ รบกวนการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์และสปอร์จะถูกยับยั้งหลังจากเซลล์งอกออกจากเปลือกหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์เจริญไม่เต็มที่ (Velugoti et al., 2007)

4.2.2 ผลของความเข้มข้นโซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหารชนิด FTM-SVM broth

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในหลอดทดลอง (SVM broth) โดยใช้ FTM-SVM broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหาร FTM-SVM broth ที่มีสารละลายโซเดียมแลคเตทความเข้มข้นระดับต่างๆ ระหว่างกระบวนการซูวีดที่ 60 °C

เวลา (ชั่วโมง)	สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* (log spores/ml) ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแลคเตท (%)			
	0	1.5	3	4.5
0	5.42^{a}±0.01	5.41^{a}±0.03	5.41^{a}±0.04	5.43^{a}±0.01
12	1.38^{b}±0.03	1.31^{b}±0.05	1.13^{b}±0.06	0.68^{b}±0.09
24	1.09^{c}±0.06	1.06^{c}±0.05	0.57^{c}±0.12	0.18^{c}±0.08
36	0.68^{d}±0.03	0.40^{d}±0.12	nd	nd

หมายเหตุ ^{abc} หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nd = not detect (ตรวจไม่พบ)

จากตารางที่ 4.3 พบว่าปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ระยะเวลาการซูวีด 0 ชั่วโมง มีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 5.41 – 5.43 log spores/ml ในทุกความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตท (ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์บริสุทธิ์ที่เติมคือ 10^6 spores/ml) ในอาหาร FTM-SVM broth และเมื่อผ่านการซูวีดระยะเวลานานขึ้นส่งผลให้ปริมาณสปอร์ *C. perfringens* ในหลอดทดลองมีปริมาณที่ลดลง โดยที่ระยะเวลาการซูวีดนาน 12, 24 และ 36 ชั่วโมง มีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ลดลงจาก 5.42 เป็น 1.38, 1.09 และ 0.68 log spores/ml ตามลำดับ โดยสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงการซูวีด 12 ชั่วโมงโดยลดลงประมาณ 4 log cycle จากนั้นจะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเวลาซูวีดนาน 24 – 36 ชั่วโมง ซึ่งแม้ซูวีดผ่านไปถึง 36 ชั่วโมงแต่ก็ยังพบสปอร์ของ *C. perfringens* หลงเหลืออยู่ซึ่งเป็นแนวโน้มกรณีเดียวกันกับอาหาร CM-SVM broth

อีกทั้งยังพบว่าประสิทธิภาพของโซเดียมแลคเตทมีผลต่อการลดลงของสปอร์เชื้อ *C. perfringens* ดียิ่งขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทสูงขึ้นส่งผลทำให้สปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* มีปริมาณลดลง โดยที่ระยะเวลาการซูวีด 12 ชั่วโมงหลอดทดลองที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 1.5, 3 และ 4.5 มีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เท่ากับ 1.31, 1.13 และ 0.68 log spores/ml และเมื่อผ่านการซูวีดเป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เท่ากับ 0.68 และ 0.40 log spores/ml และไม่พบสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 3 และ 4.5 ตามลำดับ เหตุผลเป็นเช่นเดียวกับในข้อ 4.2.1

จากการศึกษาหลอดทดลอง (SVM broth) ที่มีการใส่โซเดียมแลคเตทลงไปและผ่านกระบวนการซูวีดปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ลดลง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด คืออาหาร CM-SVM broth และ อาหาร FTM-SVM broth พบว่าปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ตรวจพบในอาหาร FTM-SVM broth น้อยกว่าอาหาร CM-SVM broth เล็กน้อยอาจเป็นเพราะอาหาร FTM-SVM broth มีลักษณะของอาหารที่เป็นของเหลว การถ่ายเทความร้อนไปสู่เชื้อจุลินทรีย์ได้ดี (MacFaddin, 1985) ส่งผลให้สปอร์ของเชื้อที่เหลือรอดในอาหาร FTM-SVM broth มีปริมาณน้อยกว่า จึงทำให้ CM-SVM broth มีประสิทธิภาพในการเลี้ยงเชื้อ *C. perfringens* ได้ดีกว่าอาหาร FTM-SVM broth

ผลการทดลองพบว่าการเติมสารละลายโซเดียมแลคเตทร้อยละ 3 และ 4.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* แตกต่างกันเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดยที่ความเข้มข้นสารละลายโซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อมากกว่าความเข้มข้นที่ร้อยละ 3 เล็กน้อย โดยการศึกษาในขั้นตอนถัดไป มีการเลือกความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแลคเตทที่ร้อยละ 4.5 เนื่องจากเชื้อ *C. perfringens* เป็นเชื้อก่อโรคที่อันตรายจึงคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลักเพื่อต้องการให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงที่อาจจะได้รับอันตรายลดน้อยลงมากที่สุด เพราะที่ระดับความเข้มข้น 10^5-10^6 cfu/g สามารถก่อให้เกิดโรคได้(Miwa et al., 1998) โดยในจะศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในวัตถุดิบเนื้อซูวีด จึงทำการทดลองในขั้นตอนถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีดและการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา

4.3.1 ผลของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อซูวีด

4.3.1.1 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

จากการศึกษาผลโซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อ ซูวีด โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเชื้อทั้งหมดในเนื้อซูวีดร่วมกับสารละลายโซเดียมแลคเตท 4.5 % ระหว่างกระบวนการซูวีดที่ 60 °C ที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา	ปริมาณเชื้อทั้งหมด (log cfu/g)			
(ชั่วโมง)	*ตัวอย่างที่ 1 (ควบคุม)	*ตัวอย่างที่ 2	*ตัวอย่างที่ 3	*ตัวอย่างที่ 4
0	7.63±0.53	7.38±0.29	7.38±0.20	7.59±0.33
12	nd	nd	nd	nd
24	nd	nd	nd	nd
36	nd	nd	nd	nd
48	nd	nd	nd	nd
60	nd	nd	nd	nd
72	nd	nd	nd	nd

หมายเหตุ * ตัวอย่างที่ 1 (ควบคุม) = เนื้อซูวีด+น้ำกลั่น
* ตัวอย่างที่ 2 = เนื้อซูวีด+โซเดียมแลคเตท
* ตัวอย่างที่ 3 = เนื้อซูวีด+สปอร์ *C. perfringens*
* ตัวอย่างที่ 4 = เนื้อซูวีด+สปอร์ *C. perfringens*+โซเดียมแลคเตท
nd = not detect (ตรวจไม่พบ)

จากข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าวัตถุดิบเนื้อที่นำมาใช้ในการทดลองมีการปนเปื้อนปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเริ่มต้นในตัวอย่างควบคุม (1), ตัวอย่างที่ 2, ตัวอย่างที่ 3 และ ตัวอย่างที่ 4 โดยมีปริมาณระหว่าง 7.38 ถึง 7.63 log โคโลนี/กรัม ตามลำดับ

เมื่อซูวีดนาน 12 ชั่วโมง ไม่พบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในทุกตัวอย่าง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Roldan และคณะ (2013) ที่ศึกษาผลร่วมระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาต่อในเนื้อแกะซูวีดส่วนสะโพก พบว่าที่อุณหภูมิซูวีด 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตั้งแต่ 6-24 ชั่วโมงพบปริมาณเชื้อทั้งหมดน้อยกว่า log 1 โคโลนี/กรัม หรือก็คือตรวจไม่พบ ซึ่งสาเหตุที่ไม่พบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด อาจเนื่องมาจากระดับความร้อนที่ใช้ในกระบวนการซูวีดสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปที่ไม่ทนความร้อน อีกทั้งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่ใช้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *C. perfringens* จึงไม่พบการเจริญของเชื้อ *C. perfringens* ซึ่งการตรวจด้วยวิธีนี้เป็นการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้อากาศในการเจริญเติบโตเป็นส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.1.2 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในเนื้อซูวีด

จากการศึกษาผลโซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในเนื้อซูวีดโดยเปรียบเทียบตัวอย่างทั้ง 4 ภาวะ รายละเอียดตามตารางที่ 3.1 โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณสปอร์ *C. perfringens* ที่เหลือรอดในเนื้อซูวีดที่มีการเติมสารละลายโซเดียมแลคเตท 4.5 % และซูวีดที่ 60 °C ที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา	ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* (log spores/g) เหลือรอด			
(ชั่วโมง)	*ตัวอย่างที่ 1 (ควบคุม)	*ตัวอย่างที่ 2	*ตัวอย่างที่ 3	*ตัวอย่าง 4
0	nd	nd	5.30 ± 0.04^{a}	5.45 ± 0.05^{a}
12	nd	nd	2.70 ± 0.02^{b}	2.65 ± 0.04^{b}
24	nd	nd	2.56 ± 0.06^{b}	2.36 ± 0.03^{b}
36	nd	nd	2.33 ± 0.03^{b}	2.13 ± 0.08^{b}
48	nd	nd	1.36 ± 0.10^{c}	1.20 ± 0.17^{c}
60	nd	nd	1.33 ± 0.58^{d}	0.67 ± 0.58^{d}
72	nd	nd	0.33 ± 0.58^{e}	0.33 ± 0.58^{e}

หมายเหตุ ^{abc} หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

* ตัวอย่างที่ 1 (ควบคุม) = เนื้อซูวีด+น้ำกลั่น
* ตัวอย่างที่ 2 = เนื้อซูวีด+โซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5
* ตัวอย่างที่ 3 = เนื้อซูวีด+สปอร์ *C. perfringens* (10^5 spores/g)
* ตัวอย่างที่ 4 = เนื้อซูวีด+สปอร์ *C. perfringens* (10^5 spores/g) +โซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5

nd = not detect (ตรวจไม่พบ)

ข้อมูลจากตารางที่ 4.5 พบว่าวัตถุดิบเนื้อที่นำมาใช้ในการทดลองไม่มีการปนเปื้อนของสปอร์เชื้อ *C. perfringens* และกำหนดความเข้มข้นของสปอร์ของเชื้อเริ่มต้นที่ 10^5 สปอร์/กรัมโดยความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ของเชื้อบริสุทธิ์ที่เติมลงไปเท่ากับ 10^6 สปอร์/กรัม ทำให้ตัวอย่างเนื้อมีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่ 5.3-5.45 log สปอร์/กรัม โดยมีสุ่มตัวอย่างโคโลนีเพื่อยืนยันเชื้อ *C. perfringens* โดยวิธีการ biochemical test ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (ตารางผนวก ช.1)

ในตัวอย่างเนื้อซูวีดที่ใส่สปอร์เชื้อ *C. perfringens* เพียงอย่างเดียว (ตัวอย่างที่ 3) เมื่อผ่านกระบวนการซูวีด 12 ชั่วโมงพบการลดลงของปริมาณสปอร์ *C. perfringens* จาก 5.30 เหลือเพียง 2.70 log cycle ลดลง 2.6 log cycle และแนวโน้มลดลงคงที่ในชั่วโมงที่ 24-72 โดยลดลงอยู่ในช่วง 0.03-1 log cycle ที่ระยะเวลาการซูวีดชั่วโมงที่ 72 ยังคงพบว่ามีสปอร์ *C. perfringens* เหลือรอด 0.33 log สปอร์/กรัม

ในส่วนของเนื้อซูวีดที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทและสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* (ตัวอย่างที่ 4) มีแนวโน้มเดียวกันกับตัวอย่างที่ 3 โดยพบว่า เมื่อซูวีดผ่านไป 12 ชั่วโมง ปริมาณสปอร์ของ *C. perfringens* ลดลงจาก 5.45 เหลือเพียง 2.65 log cycle ซึ่งลดลง 2.8 log cycle และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่ 24-72 โดยลดลงอยู่ในช่วง 0.23-0.93 log cycle แต่พบว่าเมื่อระยะเวลาผ่านไปจนถึง 72 ชั่วโมง ยังคงพบว่ามีสปอร์ *C. perfringens* เหลือรอดประมาณ 0.33 log สปอร์/กรัม

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างเนื้อซูวีดที่ 3 และ 4 พบว่าที่ระยะเวลาการซูวีดจนกระทั่ง 72 ชั่วโมง ยังคงพบสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* โดยตัวอย่างเนื้อที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทพบปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* น้อยกว่าเนื้อซูวีดที่มีการเติมสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* โดยไม่มีการเติมโซเดียมแลคเตทเพียงเล็กน้อยแต่ยังอยู่ในช่วง log สปอร์เดียวกันในทุกช่วงเวลาการซูวีด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโครงสร้างของเนื้อสัตว์ที่มีลักษณะเป็นรูพรุน มีเส้นใยส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถแทรกไปเกาะตามช่องว่างระหว่างเนื้อ ทำให้สารละลายโซเดียมแลคเตทไม่สามารถแทรกเข้าไปได้อย่างทั่วถึง ซึ่งเหตุผลขัดแย้งกับการศึกษาในหลอดทดลองที่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อได้ทั้งหมดที่ 36 ชั่วโมง ซึ่งมีงานวิจัยของ Dhir และ Dodd (1995) กล่าวว่าพบว่าเซลล์ของ *S.enteritidis* ที่เกาะอยู่บนผิววัสดุหรือวัตถุดิบมีการต้านทานความร้อนมากกว่าเซลล์อิสระถึง 2 เท่า รวมไปถึงอาจจะมีไขมันบางส่วนเป็นตัวกลางป้องกันการถ่ายเทความร้อนทำให้ไม่สามารถทำลายสปอร์เชื้อได้ อีกทั้งงานวิจัยของ Smith และคณะ (1981) ได้กล่าวไว้ว่าเมื่อมีการให้ความร้อนในอุณภูมิที่ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้ทั้งหมดเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้สปอร์ของเชื้อที่เหลือรอดมีการทนความร้อนได้สูงขึ้นจึงไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อได้ทั้งหมด ซึ่งปริมาณสปอร์ของเชื้อที่หลงเหลือ อยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค (Birkhead et al., 1988) แต่การซูวีดจนถึง 72 ชั่วโมง ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อซูวีดในด้านความนุ่มและความเหนียว (Kongpeam et al., 2015)

อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายโซเดียมแลคเตทมีผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อ *C. perfringens* ในระหว่างการเก็บรักษาโดยมีงานวิจัยของ Juneja (2006) ที่ได้ใช้โซเดียมแลคเตทใน ซูวีดผลิตภัณฑ์อกไก่หมัก โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตทที่ร้อยละ 4.8 จะสามารถยับยั้งการงอกสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ได้โดยโซเดียมแลคเตทเป็นเกลือของกรดแลคติก มีฤทธิ์เป็นสารยังยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์ (De wit and Rombouts, 1990) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อโดยโมเลกุลของกรดจะเข้าไปสอดแทรกกระบวนชีวเคมีของเซลล์ รบกวนการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์และสปอร์จะถูกยับยั้งหลังจากเซลล์งอกออกจากเปลือกหุ้มเซลล์ โดยเซลล์จะเจริญไม่เต็มที่ (Velugoti et al., 2007) และมีงานวิจัยของ Bingol and Kamil (2007) ที่ศึกษาการใช้โวเดียมแลคเตทในไส้กรอกพบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อกลุ่ม anaerobic bacteria ได้โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมเลคเตทร้อยละ 1.2 และ 1.8 ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่ม anaerobic bacteria ตั้งแต่วันที่ 5 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับ comtrol ซึ่งไม่พบเชื้อในกลุ่ม anaerobic bacteria ตั้งแต่วันที่ 20 เป็นต้นไป แสดงให้เห็นว่าโซเดียมแลคเตทมีส่วนช่วยในการลดปริมาณเชื้อในกลุ่ม anaerobic bacteria ที่จะส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาในระยะเวลานานได้ แต่ข้อจำกัดของการใส่โซเดียมแลคเตทในผลิตภัณฑ์ ถ้าใช้ปริมาณที่มากเกินไปอาจจะส่งผลต่อรสชาติที่ผู้บริโภคได้รับ เช่นอาจจะมีรสเปรี้ยวทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แต่ยังมีกฎหมายในการควบคุมปริมาณการใส่โซเดียมแลคเตท ไม่เกินร้อยละ 4.8 ต่อน้ำหนักเนื้อสัตว์ (United States of America Food and Drug Administration, 1984) เนื่องจากความปลอดภัยของผู้บริโภคถ้าได้รับปริมาณมากเกินไปอาจจะมีในระบบหายใจ ความดันเลือดสูงขึ้น เป็นต้น แต่กฎหมายประเทศไทยไม่ได้กำหนดปริมาณการใช้สามารถใช้ได้ตามความเหมาะสม (ภาคผนวก ช.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองในเนื้อซูวีดสรุปว่าการใช้โซเดียมแลคเตทร่วมกับกระบวนการซูวีดไม่สามารถทำลายสปอร์ของ *C. perfringens* ได้ทั้งหมด แม้จะซูวีดจนกระทั่ง 72 ชั่วโมงแล้วก็ตามแต่โซเดียมแลคเตทมีผลต่อการยับยั้งสปอร์โดยทำการศึกษาผลของโซเดียมแลคเตทในระหว่างการเก็บรักษาในขั้นถัดไป

4.3.2 ผลของโซเดียมแลคเตทที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อซูวีดระหว่างการเก็บรักษา

4.3.2.1 ปริมาณสปอร์ *C. perfringens* ที่เหลือรอดในการเก็บรักษา

จากผลการทดลองการเก็บรักษาเนื้อที่ผ่านกระบวนการซูวีดที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงและนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสปอร์ของ *C. perfringens* ที่เหลือรอดในเนื้อที่ซูวีดที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 36 ชั่วโมง ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

เวลา	ปริมาณสปอร์ *C. perfringens* (log spores/g) ที่เหลือรอด			
(สัปดาห์)	*ตัวอย่างที่ 1 (ควบคุม)	*ตัวอย่างที่ 2	*ตัวอย่างที่ 3	*ตัวอย่างที่ 4
0	nd	nd	2.33 ± 0.03^{a}	2.13 ± 0.08^{a}
1	nd	nd	1.51 ± 0.05^{d}	1.45 ± 0.13^{b}
2	nd	nd	1.61 ± 0.02^{cd}	1.22 ± 0.09^{c}
3	nd	nd	1.70 ± 0.03^{bc}	1.19 ± 0.06^{c}
4	nd	nd	1.79 ± 0.03^{b}	1.15 ± 0.14^{c}

หมายเหตุ $^{a\,b\,c}$ หมายถึง ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

อุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการซูวีดคือ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

* ตัวอย่างที่ 1 (ควบคุม) = เนื้อซูวีด+น้ำกลั่น
* ตัวอย่างที่ 2 = เนื้อซูวีด+โซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5
* ตัวอย่างที่ 3 = เนื้อซูวีด+สปอร์ *C. perfringens* (10^5 spores/g)
* ตัวอย่างที่ 4 = เนื้อซูวีด+สปอร์ *C. perfringens* (10^5 spores/g) +โซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5

nd = not detect (ตรวจไม่พบ)

ข้อมูลจากตารางที่ 4.6 พบว่าเนื้อที่ผ่านการซูวีดและนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์โดยตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ 1 ไม่พบสปอร์ของ *C. perfringens* ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 – 4 เนื่องจากวัตถุดิบเนื้อที่นำมาใช้ในการทดลองไม่มีการปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* จึงไม่พบในระหว่างการเก็บรักษา และการเติมสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 10^5 สปอร์/กรัม และเมื่อผ่านการซูวีดที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโม พบว่ามีปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในตัวอย่างที่ 3 และ 4 ระหว่าง 2.13 – 2.33 ตามลำดับ

จากตางรางที่ 4.6 ตัวอย่างที่ 3 คือ เนื้อซูวีดที่ใส่สปอร์ *C. perfringens* เพียงอย่างเดียว พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการซูวีดมีปริมาณสปอร์ 2.33 log เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะ 1 สัปดาห์มีการลดลงของสปอร์ *C. perfringens* เหลือเพียง 1.51 log แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นกลับมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของสปอร์ *C. perfringens* โดยสัปดาห์ที่ 2 มีปริมาณสปอร์เพิ่มขึ้นเป็น 1.61 log และเพิ่มขึ้นเป็น 1.70 และ 1.79 log ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของตัวอย่างที่ 2 คือ เนื้อซูวีดที่ใส่โซเดียมแลคเตทและสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* พบว่าหลังจากผ่านกระบวนการซูวีดมีปริมาณสปอร์ 2.13 log เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะ 1 สัปดาห์มีการลดลงของสปอร์ *C. perfringens* เหลือเพียง 1.45 log และมีแนวโน้มคงที่ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-4

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ระหว่าง ตัวอย่างที่ 3 และตัวอย่างที่ 4 พบว่าเมื่อเก็บรักษาครบ 4 สัปดาห์ ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมโซเดียมแลคเตทมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณสปอร์ของเชื้อแต่ในตัวอย่างที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทไม่พบการเพิ่มปริมาณและมีแนวโน้มคงที่ แสดงให้เห็นว่าโซเดียมแลคเตทมีผลในการยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ซึ่งกลไกการยับยั้งดังที่กล่าวไปในข้างต้น จากผลการทดลองพบว่าเป็นเช่นเดียวกันกับ งานวิจัยของ Juneja (2006) ที่ศึกษาผลของโซเดียมแลคเตทในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ซูวีดที่ใช้โซเดียมแลคเตทร้อย 4.8 สามารถเก็บผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ซูวีดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นานมากกว่า 648 ชั่วโมง อีกทั้งผลของอุณหภูมิต่ำจะยับยั้งการเจริญของสปอร์ *C. perfringens* อุณหภูมิต่ำจะชะลอการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระยะพักตัวของสปอร์ (dormant enzyme) ให้ช้าลง (Labadie et al., 1984)

ในส่วนของปริมาณเชื้อทั้งหมดที่ตรวจพบในระหว่างการเก็บรักษา จากผลการทดลองพบว่าตรวจไม่พบเชื้อทั้งหมดในระหว่างการเก็บรักษาในทุกตัวอย่าง (ไม่แสดงผลการทดลอง) ซึ่งผลเป็นเช่นเดียวกันกับการหาปริมาณเชื้อทั้งหมดในข้อ 4.3.1.2

4.4 ตรวจสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคเนื้อซูวีด

4.4.1 ทดสอบเพื่อหาความแตกต่างของเสต็กเนื้อซูวีดด้วยวิธี Different from control test

นำเนื้อซูวีดทั้ง 2 ชนิดคือเสต็กเนื้อซูวีดที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทและไม่เติมโซเดียมแลคเตท มาทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี Different from control test โดยบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างควบคุม (เนื้อที่ไม่เติมโซเดียมแลคเตท) กับ เนื้อที่เติมสารละลายโซเดียมแลคเตท (ร้อยละ 4.5) โดยให้บอกความแตกต่าง 5 ระดับ (0-4) คือ 0 = ไม่มีความแตกต่าง, 1 = แตกต่างเล็กน้อย, 2 = แตกต่างปานกลาง, 3 = แตกต่างปานกลาง และ 4 = แตกต่างมากที่สุด โดยให้คะแนนความชอบของผลิตภัณฑ์เนื้อซูวีดที่ผ่านการปรุงสุกแล้วโดยประเมินความชอบใน 5 คุณลักษณะได้แก่ ลักษณะปรากฏ, สี(บริเวณด้านในของเนื้อ), รสชาติ, เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ผลคะแนนความแตกต่างของผู้ทดสอบจำนวน 40 คน นำคะแนนที่ได้ทั้งหมดในแต่คุณลักษณะมาคำนวณหาค่า t เพื่อหาความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.7 ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 คะแนนเฉลี่ยความแตกต่างทางประสาทสัมผัสและค่า t ของเนื้อซูวีดที่เติมโซเดียมแลคเตทเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่เติมโซเดียมแลคเตท

ตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	สี (บริเวณด้านในของเนื้อ)	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม
A	1.425±0.87	1.300±0.91	1.350±1.02	1.800±1.11	1.700 ±0.91
ค่า t คำนวน	1.0323^{ns}	1.0337^{ns}	1.0331^{ns}	1.0298^{ns}	1.0303^{ns}
ค่า t ตาราง ที่ N = 40			2.021^{ns}		

หมายเหตุ ^{ns} = not significant (ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ)

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 4.7 โดยให้ผู้ทดสอบเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างเนื้อซูวีดที่เติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5 (ตัวอย่าง A) และไม่เติมโซเดียมแลคเตท (ตัวอย่างควบคุม) โดยพบว่าคะแนนเฉลี่ยความแตกต่างทางประสาทสัมผัสด้านต่างๆของตัวอย่าง A อยู่ในช่วง 1.300 - 1.800 ซึ่งเป็นคะแนนเฉลี่ยที่ต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโซเดียมแลคเตทอาจจะส่งผลเล็กน้อยหรือไม่ส่งผลต่อคุณลักษณะทั้ง 5 ด้านที่ใช้ทดสอบเสต็กเนื้อซูวีด แนวโน้มเดียวกับงานวิจัยของ Crist และคณะ (2014) พบว่าในการทดสอบความชอบของไส้กรอกหมูอิตาลีที่เติมโซเดียมแลคเตทร้อยละ 2.5 พบว่าคะแนนความชอบด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น เนื้อสัมผัส กลิ่นรส และ ความชอบโดยรวม เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ดังนั้นการคำนวนทางสถิติเพื่อหาความแตกต่างระหว่างเสต็กเนื้อซูวีดที่เติมโซเดียมแลคเตทและไม่เติมโซเดียมแลคเตท โดยคำนวนหาค่า t ของตัวอย่าง A โดยสูตรการคำนวณอ้างอิงในภาคผนวก ฉ.2 ซึ่งค่า t ที่คำนวนของแต่ละคุณลักษณะคือ ลักษณะปรากฏ สี(บริเวณด้านในของเนื้อ) รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม เท่ากับ 1.0323, 1.0337, 1.0331, 1.0298 และ 1.0303 ตามลำดับเนื่องจากตัวอย่างเรามีเพียงแค่ตัวอย่างเดียว จึงต้องทำการเปิดตารางค่า t ตารางเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบโดยเปิดค่า t ที่ Two tail = 0.05 จำนวนประชากร (N) = 40 พบว่าค่า t ตารางคือ 2.021 (ภาคผนวก ฉ.4) ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่า t คำนวนของทั้ง 5 คุณลักษณะมีค่าน้อยกว่าค่า t ที่เปิดได้จากตาราง สรุปได้ว่าตัวอย่างเสต็กเนื้อซูวีดที่เติมโซเดียมแลคเตทเปรียบเทียบกับตัวอย่างเสต็กเนื้อ ซูวีดที่ไม่เติมโซเดียมแลคเตทไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.4.2 ทดสอบเพื่อหาการยอมรับผลิตภัณฑ์เสต็กเนื้อซูวีด

หลังจากทำการทดสอบในข้อ 4.4.1 แล้ว นำน้ำเกรวี่ราดลงบนเสต็กเนื้อซูวีดทั้ง 2 ชนิดและทดสอบการยอมรับของผลิตภัณฑ์โดย เลือกในช่องยอมรับหรือไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.8 ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบการยอมรับของผลิตภัณฑ์เสต็กเนื้อซูวีดราดน้ำเกรวี่

ตัวอย่าง	จำนวณผู้ทดสอบ N = 40	
	ยอมรับ	ไม่ยอมรับ
A	39	1

จากตารางที่ 4.8 จะเห็นว่าเสต็กเนื้อซูวีดที่เติมโซเดียมแลคเตทหลังจากราดน้ำเกรวี่ ผู้บริโภคยอมรับผลิตภัณฑ์ 39 คน ไม่ยอมรับ 1 คน แสดงให้เห็นว่าน้ำเกรวี่มีผลต่อการยอมรับทางประสาทสัมผัส และผู้ทดสอบไม่สามารถสัมผัสความแตกต่างหลังจากราดน้ำเกรวี่อาจเป็นเพราะปริมาณโซเดียมแลคเตทที่ใส่ลงในเสต็กเนื้อซูวีด มีปริมาณไม่มากพอจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่นรสชาติเปรี้ยวหรือเนื้อสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไปในผู้ทดสอบบางคนที่สามารถรู้สึกถึงความเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ได้ แต่หลังจากราดน้ำเกรวี่แล้วไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างได้ เนื่องจากรสชาติเฉพาะของน้ำเกรวี่ที่ราดลงบนเนื้อซูวีดมีรสชาติเฉพาะทำให้ผู้บริโภคไม่สามารถรับรู้ถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการเติมโซเดียมแลคเตทได้ โดยจากงานวิจัยของ Bingol และคณะ (2014) ที่มีการใช้โซเดียมแลคเตทสูงสุดถึงร้อยละ 4 ในมีทบอลตุรกีแต่ผู้บริโภคยังให้การยอมรับผลิตภัณฑ์มีทบอลดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เริ่มต้นมีผลต่อการอยู่รอดของสปอร์เชื้อใน SVM broth โดยพบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสปอร์ที่ 10^5 spores/ml เมื่อผ่านกระบวนการซูวีดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 36 ชั่วโมงพบสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เหลือรอดประมาณ 0.68 – 1.03 log spores/ml ในขณะที่ความเข้มข้นสปอร์ของเชื้อที่ 10^3 spores/ml กระบวนการซูวีดที่ 60 องศาเซลเซียสนาน 12 ชั่วโมง ไม่พบสปอร์ของเชื้อในอาหาร SVM broth ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CM-SVM และ FTM-SVM โดยพบว่าประสิทธิภาพของอาหาร FTM-SVM มีมากกว่า CM-SVM ในแง่การทำลายสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในทางกลับกันอาหาร CM-SVM มีประสิทธิภาพในแง่ขององค์ประกอบใกล้เคียงกับเนื้อสัตว์ทำให้มีสปอร์หลงเหลือมากกว่า อาหาร FTM-SVM

5.1.2 ผลของโซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในระหว่างกระบวนการซูวีดพบว่าที่ความเข้มข้นโซเดียมแลคเตทร้อยละ 4.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ได้ดีที่สุด โดยคำนึงถึงประสิทธิภาพในแง่ของความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นสำคัญ และชนิดของอาหารมีผลต่อการอยู่รอดของสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เพียงเล็กน้อย

5.1.3 ผลของโซเดียมแลคเตทต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในเนื้อซูวีด โดยสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* เริ่มต้นที่ 10^5 spores/ml พบว่าตัวอย่างเนื้อที่มีไม่เติมโซเดียมแลคเตทและเติมร้อยละ 4.5 ยังคงพบสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในปริมาณเดียวกันที่ 0.33 log cycle โดยผลศึกษาการเก็บรักษาพบว่าตัวอย่างเนื้อซูวีดที่มีการเติมโซเดียมแลคเตทมีการลดลงของสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* จาก 2.13 - 1.22 log cycle ในสัปดาห์ที่ 0 - 2 และคงที่ ในสัปดาห์ที่ 2-4 ในขณะที่ตัวอย่างเนื้อที่ไม่มีการเติมโซเดียมแลคเตทมีการลดลงของสปอร์ จาก 2.33 - 1.51 log cycle ในสัปดาห์ที่ 0 - 1 และเพิ่มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็น 1.61 - 1.79 log cycle

5.1.4 เสต็กเนื้อที่เติมโซเดียมแลคเตทไม่มีความแตกต่างทางประสาทสัมผัสเมื่อเทียบกับเสต็กเนื้อที่ไม่เติมโซเดียมแลคเตท ผู้บริโภคให้การยอมรับผลิตภัณฑ์เสต็กเนื้อซูวีดที่เติมโซเดียมแลคเตท

5.2 ข้อเสนอแนะ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาใช้มีประสิทธิภาพแตกต่างกัน นั่นคือ Cooked meat medium มีประสิทธิภาพในแง่ของการอยู่รอดของเชื้อจุลินทรีย์มากเนื่องจากมีความใกล้เคียงกับวัตถุดิบและมีสภาวะในการเอื้ออำนวยต่อการเจริญของเชื้อมาก แต่ใน Fluid thioglycolate medium เป็นอาหารที่สามารถถ่ายเทความร้อนได้ดีกว่าประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์จึงดีกว่า ดังนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลองเพื่อให้ผลการทดลองมีความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหารตามมาตรฐานทั่วไปสำหรับสัตถุเจือปนอาหารของโคเด็กซ์ (General Standard for Food Additives: GSFA). 2014. สำนักอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, กระทรวงสาธารณสุข.

จงกล เที่ยงดาห์. 2532. เภสัชวิทยา เล่ม 2. อักษรบัณฑิต กรุงเทพฯ.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2552. คุณค่าเนื้อโคไทย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ. 2548. คุณภาพของเนื้อโคภายใต้ระบบการผลิตและการตลาดของ ประเทศไทย. สุพีเรียพริ้นติ้งเฮาส์ กรุงเทพฯ.

ชัยณรงค์ คันธพานิต. 2529. วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ไทยวัฒนาพานิช กรุงเทพฯ.

ทิพาพร อยู่วิทยา. 2558. การใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้ออาหาร.ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลยัเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ธงชัย สุวรรณสิชณน์. 2549. เทคนิคการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสและการวิเคราะห์. วารสาร 30 ปี สมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารแห่งประเทศไทย การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารในทศวรรษหน้า. ด่านสุทธาการพิมพ์ กรุงเทพฯ หน้า 152-165.

บุญชู โสมไธสง. 2548. วัวขุน. มิวนิคซัพพลายพริ้นติ้ง เชียงใหม่ หน้า 23-25.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. แหล่งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนสู่อาหาร. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ หน้า 4-7.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2542. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ภูเก็ต. 2553. จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและน้ำ. [ออนไลน์] [อ้างถึง 13 พฤศจิกายน 2559] : เข้าถึงได้จาก httpc//www.dmsc.moph.go.th/webroot/puket/download/km8350.doc

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). 2547. ข้อจำกัดสุญญากาศ. จดหมายข่าว Business Development Services Network (BDSN) 3(4): 1-9.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร.โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ กรุงเทพฯ.

โสภณ คงสำราญ. 2524. แบคทีเรียทางการแพทย์ พิมพ์ครั้งที่ 1 โรงพิมพ์พิฆเณศ กรุงเทพฯ.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 2552. คุณค่าเนื้อโคไทย. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิช กรุงเทพฯ.

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2553. แบคทีเรียในอาหาร (Bacteria in food). กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

อรอนงค์ ทองมี. 2553. ความรู้เกี่ยวกับเนื้อสัตว์ สัตว์ปีก สัตว์น้ำ และการปรุง. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต กรุงเทพฯ.

ACMSF. 1992. Report onVacuum Packaging and Associated processes. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. HMSO, London.

Aberle, E.D., Forrest, J.C., Gerrard, D.E. and Mills, E.W. 2001. Principles of Meat Science. 4 th Ed. Kendall Hunt Publishing Company. Iowa, USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Angelotti, R., Hall, H.E., Foter, M.J. and Lewis, K.M. 1962. Quantitation of *Clostridium perfringens* in Foods. Applied Microbiology. 10: 193-199.

Araujo, M., Sueiro R.A., Gomez M.J. and Garrido M.J. 2004. Enumeration of *Clostridium perfringens* spore in ground water samples: comparison of six culture media. Journal of Microbiological Methods. 57(2): 175-180

Armstrong, G.A.and Mcllveen, H. 2000. Effect of prolonged storage on the sensory quality and consumer acceptance of sous-vide meat-based recipe dishes. Food Quality and Preference. 11(3): 75-85.

BAM. 2001. Bacteriological Analytical Manual online, Chapter 3 Aerobic plate count. USFDA.[Online]. Available:http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm

Bingol, B.E. and Kamil, B. 2007. Effect of sodium lactate on microbiology quality life of sausage. Turkish Journal of Veterinary and Animal sciences. 31(5): 333-339.

Bingol, B.E., Colak, H., Omer, C. and Hampikyan, H. 2014. Effects of Sodium Lactate on the Shelf Life and Sensory Characteristics of Cig Kofte – A Turkish Traditional Raw Meatball. Journal of Food Processing and Preservation. 38(3): 1024-1036.

Birkhead, G., Richard, L.V., Elizabeth, M.H., James, T.S. and Bruce, A.M. 1988. Characterization of an outbreak of *Clostridium perfringens* food poisoning by quantitative fecal culture and fecal enterotoxin measurement. Journal of Clinical Microbiology. 26(3): 471-474.

Bates, J.R. and Bodnaruk, P.W. 2003. *Clostridium perfringens* In: Foodborne Microorganisms of Public Health Significance. Australian Institute of Food Science and Technology Inc., Food Microbiology Group, Waterloo NSW. pp: 505-542.

Brooks, J.C. and Savell, J.W. 2004. Perimysium thickness an indicator of beef tenderness. Meat Science. 67: 329-334.

Brook, I., Schwartz, R.H. and Controni, G. 1979. *Clostridium ramosum* and beta hemolytic streptococci isolated from a child presenting with acute otitis media. Journal of Clinical Pediatrics. 18: 699-700.

Bruce, A. and Denis, K. 2001. The complete Meat Cookbook. Kindle Edition .Entreé Press LLC. Cleveland. USA.

Bruschi, F. and Murrell, K.D. 2002. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. Postgraduate Medical Journal. 78: 15-22.

Christiansen L.N., Johnston R.W., Kautter D.A., Howard J.W. and Aunan W.J. 1973. Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *Clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned comminuted cured meat. Applied Microbiology. 25(3): 357-362.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Church, I.J. 1998. The sensory quality, microbiological safety and shelf life of packaged foods. In: Sous vide and cook-chill processing for the food industry. Aspen Publishers. Maryland. USA.

Church, I.J. and Parsons, A.L. 1993. Review: Sous vide cook-chill technology. International Journal of Food Science and Technology. 28: 575-586.

Church, I.J., and Parsons, A.L. 2000. The sensory quality of chicken and potato products prepared using cook-chill and sous-vide methods. International Journal of Food Science and Technology. 35: 155-162.

Creed, P.G., and Reeve, W. 1998. Principles and applications of sous-vide processed foods. Sous-vide and cook-chill processing for the food Industry, Aspen Publishers. Maryland. USA.

Crist, C.A., Williams, J.B., Schilling, M.W., Hood, A.F., Smith, B.S. and Campano, S.G. 2014. Impact of sodium lactate and vinegar derivatives on the quality of fresh Italian pork sausage links. Meat Science. 96(4): 1509-1516.

De Wit, J.C. and Rombouts, F.M. 1990. Antimicrobial effect of sodium lactate. Food Microbiology. 7: 113-120.

Dhir, V.K., and Dodd, C.E. 1995. Susceptibility of suspended and surface-attached Salmonella enteritidis to biocides and elevated temperatures. Applied Environmental Microbiology. 61(5): 1731-1738.

Dransfield, E. 1994. Optimisation of tenderisation, ageing and tenderness. Meat Science. 36: 105-121.

Duncan, C.L. and Strong, D.H. 1968.Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. Applied Microbiology. 16(1): 82-89.

Fukumoto, G.F., Kim, Y.S., Kim, K.H. and Ako, H. 1999. Carcass and meat quality characteristics of forage based beef. In: Food for Health in the Pacific Rim. 3rd International Conference of Food Science and Technology (Ed.), pp: 12-21.

Hanzelková, S., Simeonovová, J., Hampel, D., Dufek, A. and Šubrt, J. 2011. The effect of breed, sex and aging time on tenderness of beef meat. Journal of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno. 80: 191-196.

José, S.P., Antonio, G. and Jorge, R.C. 2012. Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature and cooking time. Meat Science. 90(3):828-835.

Juneja, V.K. 2006. Delayed *Clostridium perfringens* growth from a spore inocula by sodium lactate in sous-vide chicken product. Food Microbiology. 23: 105-111.

Komoriya, T., Hashimoto, A., Shinozaki, A., Inoue, M. and Kohno, H. 2007. Study on partial purification of α-toxin produced from obligate anaerobe *Clostridium perfringens*. Report of the Research Institute of Industrial Technology, Nihon University. Number 88.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kongpeam, I. Kerdpiboon, S. and Peuchkamut, Y. 2015. Flank steak of local thai beef preparation of sous-vide process. Oral presentation In Asean Food Conference 25-28 June, Philippines.

Labadie, J. Boucheteil, M. and Laroche, M. 1984. Influence of heating beef at 55°C on the growth of *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus*. Zentr Bakt Mikro Hygi. 178 (5/6): 542-550.

Lee, Y.L., Cesario, T., Owens, J., Shanbrom, E. and Thrupp, L.D. 2002. Antibacterial activity of citrate and acetate. Food Control. 18(5): 566-575

MacFaddin, J.F. 1985. Media for Isolation - Cultivation - Identification - Maintenance of Medical bacteria volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore.

Meng, J. and Genigeorgis, C.A. 1994. Delaying toxigenesis of *Clostridium botulinum* by sodium lactate in sous vide products in lelt. Applied Microbiology. 19: 20-23.

Ministry of Health by ESR. 2001. Microbial Pathogens Data Sheets: *Clostridium perfringens*. Prepared for the Ministry of Health by ESR Ltd., Wellington, New Zealand.

Miwa, N., Tokuhiro, N., Shuichiro, K., Mikio, A., and Hiroyasu, H. 1998. Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. International Journal of Food Microbiology. 42: 195–200.

Murray, P.R., Baron, J.H., Pfaller, M.A., Jorgensen, J.H. and Yolken, R.H. 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8th Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Myhrvold, N., Young, C. and Bilet, M. 2011. Modernist Cuisine: The Art and Science of Cooking. The Cooking Lab Book.

Payne J.B., Osborne, J.A., Jenkins, P.K. and Sheldon, B.W. 2007. Modeling the growth and death kinetics of *Salmonella* in poultry litter as a function of pH and water activity. Poultry Science. 86(1): 191-201.

Peck, M.W. 2009.Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. Advances in Microbial Physiology. 55: 183-265.

Podolak, R.K., Zayas J.F., Kastner C.L. and Fung D.YC. 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on Beef by Application of Organic acids. Journal of Food Science. 59(4): 370-373.

Qvist, S., Sehested, K. and Zeuthen, P. 1994. Growth suspension of *Listeria monocytogenes* in a meat product. International Journal of Food Microbiology. 24: 283-293.

Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P. and Vijila, H.M. 2007. Listeria – review of epidemiology and pathogenesis. Journal of Microbiology Immunology and Infection. 40(1): 4-13.

Roldan, M., Antequera, T., Martín, A., Mayoral, A.I. and Ruiz, J. 2013. Effect of different temperature-time combinations on physicochemical, microbiological, textural and structural features of sous-vide cooked lamb loins. Meat Science. 93(3): 572-578.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ryan, K.J. and Ray, C.G. 2004. Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp: 368-370.

Sallam, K.I. 2007. Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. Food Control. 18: 566-575.

Sarjit, A. and Dykes, G.A. 2015. Trisodium phosphate and sodium hypochlorite are more effective as antimicrobials against Campylobacter and Salmonella on duck as compared to chicken meat. International Journal of Food Microbiology. 203(16): 63-69.

Sarker, M.R, Shivers, R.P., Sparks, S.G., Juneja, V.K. and McClane, B.A. 2000. Comparative experiments to examine the effects of heating on vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* isolates carrying plasmid genes versus chromosomal enterotoxin genes. Applied and Environmental Microbiology. 66: 3234-3240.

Schafheitle, J.M. 1990. The sous-vide system for preparing chilled meals. British Food Journal. 92(5): 23-27.

Schellekens, M. 1996. New research issues in sous-vide cooking. Trends in Food Science and Technology. 7: 256-262.

Sheppard, J. 1987. The big chill-a report on the implications of cook-chill catering for the public services-report. London Food Commission. pp: 107-109.

Silva, F.V.M. and Gibbs, P.A. 2011. Thermal pasteurization requirement for the inactivation of Salmonella in food. Food Research International. 45(2): 695-699.

Skandamis, P.N. and Gounadaki, A.S. 2009. Dried meats poultry and related products. In microbiology handbook of meat products. Leatherhead Food International. Cambridge, UK. pp: 83-99.

Smith, A.M., Evans, D.A. and Buck, E.M. 1981. Growth and survival of *Clostridium perfringens* in rare beef prepared in a water bath. Journal of Food Protection. 44: 9-14.

USFDA. 1984. Bacteriological Analytical Manual, 6th (Eds.), United States of America Food and Drug Administration. AOAC, Arlington, Va.

Vaudagna, S.R., Pazos, A.A., Guidi, S.M., Sanchez, G., Carp, D.J. and Gonzalez, C.B. 2008. Effect of salt addition on sous vide cooked whole beef muscles from Argentina. Meat Science. 79(3): 470-482.

Vaudagna, S.R., Sanchez, G., Neira, M.S., Insani, E.M., Picallo, A.B. and Gallinger, M.M. 2002. Sous vide cooked beef muscles: Effects of low temperature-long time treatments on their quality characteristics and storage stability. International Journal of Food Science and Technology. 37(4): 425-441.

Velugoti, R.P., Lalit K.B., Vijay, K.J. and Harshavardhan, T. 2007. Inhibition of germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores by lactic acid salts during cooling of injected turkey. Journal of Food Protection. 70(4): 923-929.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vogt, R.L. and Dippold, L. 2005. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef. Public Health Reports. 120(2): 174-178.

Wheeler, T.L., Crouse, J.D. and Koohmaraie, M. 1992. The effect of postmortem time of injection and freezing on the effectiveness of calcium chloride for improving beef tenderness. Journal of Animal Science. 70: 3451-3457.

Wheeler, T.L., Shackelford, S.D. and Koohamaraie, M. 1999. Tenderness classification of beef: III. Effect of the interaction between end point temperature and tenderness on Warner Bratzler shear force of beef longissimus. Journal of Animal Science. 77: 400-407.

Williams, S.K. and Phillips, K. 1998. Sodium lactate affects sensory and objective characteristics of tray-packed broiler chicken breast meat. Poultry Science. 77: 765-769.

Yamada, T. and Nakanishi, N. 2012. Effects of the roughage concentrate ratio on the expression of angiogenic growth factors in adipose tissue of fattening wagyu steers. Meat Science. 90: 807-813.

Zhang, Y.Y., Zan, L.S., Wang, H.B., Xin, Y.P., Adoligbe, C.M. and Ujan. J.A. 2010. Effect of sex on meat quality characteristics of Qinchuan cattle. African Journal of Biotechnology. 9: 4504-4509.

Zhuang, R.Y., Huang, Y.W. and Beuchat, L.R. 1996. Quality changes during refrigerated storage of packaged shrimp and catfish fillets treated with sodium acetate, sodium lactate or propyl gallate, Journal of Food Science. 61: 241-244.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารละลายสปอร์บริสุทธิ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายเคมีเพื่อใช้ในการทดลอง

ก.1 การเตรียมตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1.1 การเตรียมตัวอย่างสปอร์ของเชื้อ *C.perfringens* ดัดแปลงตามวิธีการของ Duncan and Strong (1968)

นำเชื้อ *C. perfringens* DSMT 16637 ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มาเลี้ยงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่มีอาหาร Cook meat medium และบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการปิเปตจากอาหาร Cook meat medium ปริมาณ 1 ml ลงใน อาหารสำหรับสร้างสปอร์ Proposed medium ปริมาตร 40 ml (ภาคผนวก ก.1.2) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 rpm เป็นเวลา 15 ที่ 4 องศาเซลเซียส และทำการล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ได้ปริมาตร 5 ml จะได้สารละลายสปอร์บริสุทธิ์

ภาพที่ ก.1.1 สารละลายสปอร์บริสุทธิ์ของเชื้อ *C.perfringens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1.2 การเตรียมอาหาร Propoesd medium สำหรับสร้างสปอร์ของเชื้อ *C.perfringens* ตามวิธีของ Duncan and Strong (1968)

ชั่ง Yeast extract 0.4 กรัม, Proteose peptone 1.5 กรัม, Starch 0.4 กรัม, Sodium Thioglycolate 0.1 กรัม, $Na_2HPO_4.7H_2O$ 1 กรัม ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฝาเกลียวโดยให้ปริมาตรเท่ากับ 40 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและจึงนำไปใช้

ภาพที่ ก.1.2 อาหารสำหรับสร้างสปอร์ของเชื้อ *C.perfringens*

ก.1.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Cook meat medium

ชั่ง Cooked meat medium 1.25 กรัม ต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียว และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้นำไปต้มน้ำเดือดเพื่อไล่อากาศเป็นเวลา 30 นาที

ภาพที่ ก.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Cook meat medium

ก.1.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thioglycolate medium

Fluid thioglycolate medium 29.8 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 15 – 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ก.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Fluid thioglycolate medium

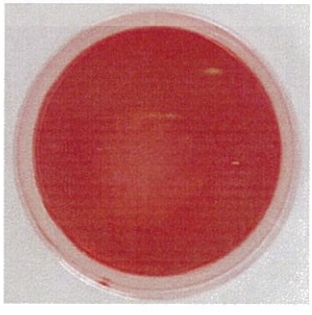
ก.1.5 การเตรียมอาหาร SPS agar (Sulphite-Polymyxin-Sulphadiazine agar) ตามวิธีการของ Angelotti และคณะ (1962)

ชั่งอาหาร SPS agar 41.28 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาพที่ ก.1.5 อาหาร SPS agar

ก.1.6 การเตรียมอาหาร CW (*Clostridium welchii* agar) ตามวิธีของ Komoriya และคณะ (2007)

ชั่งอาหารอาหาร CW (*Clostridium welchii* agar) 55 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ ก.1.6 อาหาร CW (*Clostridium welchii*) agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ก.2.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมแลคเตทเข้มข้นร้อยละ 1.5, 3 และ 4.5 w/w ตามวิธีการของ Juneja (2006)

ชั่งโซเดียมแลคเตท 1.5, 3 และ 4.5 กรัม และเติมน้ำกลั่นปริมาณ 98.5, 97 และ 95.5 กรัม ลงในขวดดูแรนขนาด 125 มิลลิลิตร ตามลำดับ และนำไปทำฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาพที่ ก.2.1 สารละลายโซเดียมแลคเตทผสมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
การเตรียมตัวอย่างและการตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

ข.1 การเตรียมตัวอย่าง โดยวิธีของ BAM (2001)

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อทั้งชิ้นบรรจุใส่ในถุงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้วเติมสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักชิ้นเนื้อต่อสารละลายเปปโตน 1:10 นำเข้าเครื่องตีป่นอาหาร (stomacher) ปั่นผสมชิ้นเนื้อเป็นเวลา 2 นาที และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อต่อ

ข.2 ตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธีของ BAM (2001)

ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม และปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อตรวจหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีการ Pour plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate cout agar บ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดและคำนวณหาค่าในหน่วย cfu/g ของตัวอย่าง

ข.3 การตรวจปริมาณสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* โดยวิธีของ Duncan และ Strong (1968)

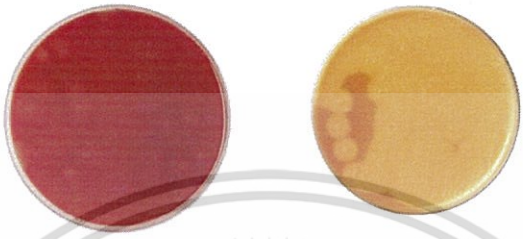
ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม ตรวจหาจำนวนสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* วิธีการ Pour plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SPS agar (Sulphite-Polymyxin-Sulphadiazine agar) บ่มในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับเฉพาะโคโลนีของเชื้อที่ให้ลักษณะโคโลนีสีดำ

ภาพที่ ข.3 โคโลนีสปอร์ของเชื้อ *C. perfringens* ในอาหาร SPS agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.4 การยืนยันเชื้อ *C. perfringens* โดยวิธีของ Duncan และ Strong (1968)

เก็บตัวอย่างโคโลนีสีดำโลนีจากอาหาร SPS Agar มายืนยันว่าใช่ *C. perfringens* โดยใช้อาหาร CW agar โดยจะสร้าง clear zone เป็นสีเหลือง และส่งตรวจเพื่อยืนยันเชื้อ *C. perfringens* โดยวิธีการ biochemical test ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข



(a) (b)

ภาพที่ ข.4 ยืนยัน *C.perfringens* ในอาหาร CW Agar (a) ไม่ใช่ *C.perfringens* ; (b) *C.perfringens*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

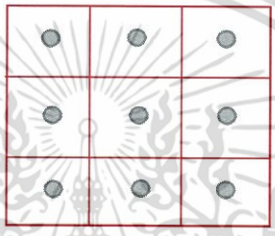
ภาคผนวก ค.
การเตรียมตัวอย่างเนื้อสำหรับใส่สารละลายโซเดียมแลคเตท

ค.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำเนื้อโคพันธุ์ไทยพื้นเมืองส่วนพื้นท้อง (Flank steak) มาลอกผังผืดและไขมันออกและหั่นเนื้อให้มีขนาด 5×5×2.5 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 60-80 กรัม (Kongpeam et al., 2015; Podolak et al., 1996)

ค.2 การใส่สารละลายโซเดียมแลคเตทลงบนเนื้อ

นำเนื้อที่ได้จากการเตรียมวัตถุดิบในภาคผนวกข้อ ค.1 มาแบ่งพื้นที่ของเนื้อเป็น 9 ส่วนดังภาพที่ ค.1



ภาพที่ค.1 การแบ่งชิ้นเนื้อสำหรับใส่สารละลายโซเดียมแลคเตท

และนำสารละลายโซเดียมแลคเตทร้อยละ 10 ของน้ำหนักชิ้นเนื้อ แบ่งสารละลายเป็น 2 ส่วนให้เท่ากันหยดลงบนเนื้อในปริมาณเท่ากันทั้งสองด้านตามจุดในภาพที่ ค.1 ผึ่งให้สารละลายโซเดียมแลคเตทซึมเข้าในเนื้อเป็นระยะเวลา 5 นาทีบนตะแกรงปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.
การแช่เนื้อในสารละลายสปอร์บริสุทธิ์ของเชื้อ *C. perfringens*

ง.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำเนื้อโคพันธุ์ไทยพื้นเมืองส่วนพื้นท้อง (Flank steak) มาลอกผังผืดและไขมันออกและหั่นเนื้อให้มีขนาด 5x5x2.5 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 60-80 กรัม (Kongpeam et al., 2015; Podolak et al., 1996) นำเนื้อมาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสง UV ในตู้ปลอดเชื้อบนตะแกรงปลอดเชื้อเป็นเวลา 60 นาที โดยกลับด้านทุกๆ 30 นาที (ดัดแปลงจาก Podolak et al., 1996)

ภาพที่ ง.1 การฆ่าเชื้อเนื้อด้วยแสง UV ในตู้ปลอดเชื้อ

ง.2 การแช่เนื้อในสารละลายเชื้อบริสุทธิ์

นำเนื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วแช่สารละลายที่มีสปอร์บริสุทธิ์ของเชื้อ *C. perfringens* ที่มีความเข้มข้นของปริมารสปอร์เริ่มต้น 10^6 spores/ml เตรียมจากภาคผนวก ก.1.1 โดยแช่จนท่วมเป็นระยะเวลา 5 นาทีและนำไปผึ่งบนตะแกรงปลอดเชื้อให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที เช่นเดียวกับภาคผนวก ง.1 (Podolak et al., 1996) และนำไปบรรจุใส่ถุงสุญญากาศปลอดเชื้อ และนำไปทำขั้นตอนถัดไป

ภาพที่ ง.2 การแช่เนื้อในสารละลายสปอร์บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.
การเตรียมเสต็กเนื้อซูวีดสำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัส

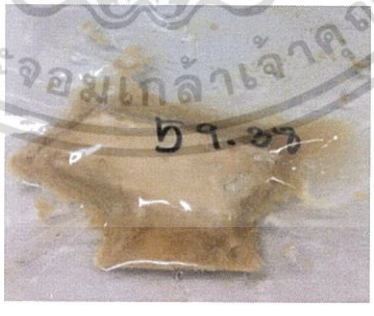
จ.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำเนื้อโคพันธุ์ไทยพื้นเมืองส่วนพื้นท้อง (Flank steak) มาลอกผังผืดและไขมันออกและหั่นเนื้อให้มีขนาด 5x5x2.5 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 60-80 กรัม (Kongpeam et al., 2015; Podolak et al., 1996) ในตัวอย่างที่เติมโซเดียมแลคเตททำตามรายละเอียดในภาคผนวกที่ ค.2 และนำในบรรจุในถุงสุญญากาศ

ภาพที่ จ.1 เนื้อวัวก่อนนำไปผ่านกระบวนการซูวีด

จ.2 การซูวีดเนื้อ

นำวัตถุดิบได้จากการเตรียมในภาคผนวกที่ ฉ.1 ไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง (Kongpeam et al., 2015)



ภาพที่ จ.2 เนื้อวัวที่ผ่านกระบวนการซูวีดในถุงสุญญากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.3 การทำเสต็กเนื้อซูวีด

นำเนื้อที่ซูวีดเสร็จแล้วมาให้ความร้อนบนกระทะ โดยใส่น้ำมันมะกอกเล็กน้อย ใช้ไฟปานกลางนำเนื้อซูวีดลงไปให้ความร้อนด้านละ 15 วินาที นำขึ้นมาพักไว้บนตะแกรงให้เย็น และหั่นเป็นชิ้นสำหรับเสริฟให้ผู้ทดสอบ

ภาพที่ จ.3 เสต็กเนื้อซูวีดและน้ำเกรวี่ที่ใช้สำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of sodium lactate on inhibition of *Clostridium perfringens* spores in sous-vide model (SVM) broth

Thanakorn Laorojpinyo[1], Adisorn Swetwiwathana[1], Aphacha Jindaprasert[1], Wiramsri Sriphochanart[1], Soraya Kerdpiboon[1]* and Sompob Vattanamanee[2]

[1]*Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Chalongkrung Road, Ladkrabang, Bangkok, Thailand 10520*
**Corresponding author: soraya.ke@kmitl.ac.th*

[2]*Bureau of quality and safety of food, Department of Medical Science. Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand 11000*

ABSTRACT: Sous-vide process was successful to improve tenderness of Thai local beef. However, beef was packed in vacuum before sous-vide under controlling temperature of 60 °C for 36 hrs. This might cause anaerobic bacteria and facultative bacteria growth and induce spoilage to foods. *Clostridium perfringens* are anaerobic rod-shaped, gram-positive bacteria, spore-forming, contaminated in meat and meat products such as rolled meat and stews. In addition, *C. perfringens* can multiply in vacuum condition and cause poisoning to foods. This research studied effect of sodium lactate (NaL) on inhibition of *C. perfringens* spores in sous-vide model (SVM) broth. Different initial loads of *C. perfringens* spores were inoculated to SVM broth. Then samples were sous-vide at 60 °C for 0 – 36 hrs. It was found that 10^3 cfu/ml initial load of *C. perfringens* spores were not detected after sous-vide process for 12 hrs, while 10^5 cfu/ml initial load of *C. perfringens* spores were decreased for 4 log cycle after sous-vide for 12 hrs. Then *C. perfringens* spores were found approximately 1 log cycle after sous-vide for 36 hrs. Initial load cell of 10^5 cfu/ml was desired. Three levels of NaL (1.5, 3, and 4.5%) were then applied in SVM broth with initial load cell of 10^5 cfu/ml. The results implied that adding of 1.5% NaL and sous-vide for 24 hrs induced *C. perfringens* spores remaining for 1 log cycle, while using of 3% and 4.5% NaL affected decreasing of *C. perfringens* spores in SVM broth at the sous-vide period for 4 and 5 log cycle, respectively. In addition, the application of 3% and 4.5% NaL could diminish 10^5 cfu/ml loads of *C. perfringens* spores in SVM broth.

Keyword: *Clostridium perfringens* spores, Sodium lactate, Sous-vide, Sous-vide model broth

INTRODUCTION

Sous-vide process has been widely used to improve qualities of materials. Foods were packaged in vacuum and cooked under controlled conditions including of temperature and time (Schellekens, 1996). This was called pasteurization since temperature used was less than 100 °C. Foods were then cooled to 0-3 °C (Church, 1998). Sous-vide process can prevent moisture loss and keep flavor of foods (Church and Parsons, 2000). In addition, sous-vide process was found to improve tenderness and juiciness of meat (Schafheitle, 1990).

However, sous-vide process under controlled heating temperature and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

vacuum condition caused pathogens growing and increasing themselves. Most of bacteria, found in meat including *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* and *Escherichia* (Skandamis and Gounadaki, 2009), especially for *Clostridium perfringens*, produced toxin and caused disease to consumers.

C. perfringens was anaerobic rod-shaped, gram-positive bacteria and spores forming, optimum growth of 43-47°C and optimum temperature for enterotoxin production of 35-40°C. Enterotoxin was inactivated at 60°C for 5 min. D-values of vegetative cells and spores were 60°C for 5.4-14.5 min and 100°C for 0.31 min to >38 min depending varying of strains, respectively. *C. perfringens* was widely distributed in soil, dust and vegetables and can be found at levels of 10^3 to 10^4 cfu/g in soil. (Czeczulin et al., 1993; Ministry of Health by ESR, 2001). During cooking, vegetative cells of *C. perfringens* was damaged but their spores were able to survive in unfavorable conditions. After thermal process, the spores germinated into vegetative cells and then multiply to high numbers of cells if foods were in the optimal condition for microbial and its spore growth.

Since sous-vide process was done in vacuumed and pasteurized (temperature less than 100 °C), meat with *C. perfringens* contamination might caused toxic to consumer after eating meat products. Total *C. perfringens* might be found in beef about $1 \times 10^2 - 4.3 \times 10^2$ MPN/100g sample, in general (Miwa et al., 1998). Using of NaL to inhibit germinate of *C. perfringens* spore could prevent this enterotoxin to meat products.

Contamination of *C. perfringens* to foods caused large amount of toxin to consumers. Although *C. perfringens* cell could not grow, but cell was broken and release spore from microbial and hence produce toxin (McClane, 2007). Large numbers of cells have to be ingested to cause food poisoning at least 10^6 cfu/g of food (Ministry of Health by ESR, 2001). Data from epidemiological was found that *C. perfringens* might implicate in food items as high up to 10^5 cfu/g. In addition, *C. perfringens* in fecal of ill persons were recorded at higher than 10^6 cfu/g (American Public Health Association, 1985; Hauschild, 1975; Shandera, 1983).

Using of antimicrobial to kill or inhibit bacteria growth could reduce food spoilage caused by microorganisms and also prevent hazards of toxin produced by microorganisms. It is reported that antimicrobials such as Cacium lactate (CaL) and Sodium lactate (NaL) at three different concentrations (0, 1.5 and 3% w/w) and at different temperatures (15, 20 and 25°C) were found to inhibit growth from spores of *Bacillus cereus* and *C. perfringens* in a sous-vide beef under temperature abuse (Necla, 2001), Results from Juneja (2006) was found that sodium lactate (NaL) delayed °C growth in sous-vide chicken product. Different concentrations of NaL (w/w) (0%, 1.5%, 3%, or 4.8%) were applied to chicken before sous-vide cooking at temperature of 71.1°C at 24 hrs and stored at 4, 19, and 25°C. Increased concentration of NaL affected delaying growth of *C. perfringens* in each storage temperature. Besides, samples with 3% or 4.8% NaL and stored at 4 °C was not observed *C. perfringens* growth, while *C. perfringens* from spores was dramatically restriced with little or no growth in 648 hr at 19 °C.

Sous-vide model (SVM) broth used in this study was cooked meat medium since it was developed for the cultivation of certain anaerobes isolated from wounds which supports the growth of many spore forming and non-spore forming strict anaerobes (Murray, 2003). Cooked meat medium contained beef heart, the muscle protein, which provided amino acids and other nutrients. In addition, it had dextrose allows rapid and heavy growth of anaerobic bacteria in a short time and led more rapid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

identification of important anaerobes (Collins, 1985). FDA had recommended this medium for enumeration and identification of *C. perfringens* from foods (U.S. Food and Drug Administration, 1984).

Production of sous-vide Thai local beef to support tender beef for consumer using 60 °C for 36 hrs (Kongpeam, Kerdpiboon and Peuchkamut, 2015) and maintain safety from beef consumption were therefore our purpose. Sodium lactate (NaL) was applied to inhibit *C. perfringens* spores in SVM broth. The optimum concentration of NaL to reduce *C. perfringens* spores was presented in this research.

MATERIAL AND METHODS

2.1 *C. perfringens* spores production

Stock cultures were maintained in cooked meat medium, incubated at 37 °C 18-24 hrs. Then 1 ml of incubated stock cultures was inoculated into 40 ml of sporulation medium (Duncan and Strong, 1968), which was incubated for 24 hrs at 37 °C. Sporulation medium was then centrifuged at 8000 rpm, 15 min and spore was washed with sterile distilled water to final volumetric of 5 ml. Spore suspensions were prepared by heating at 75 °C for 20 min and cooling at 3-4 °C (Akhtar et al., 2008). A spore concentration of approximately 10^6 cfu/ml was obtained.

2.2 Preparation of initial loads *C. perfringens* spores in SVM broth

Initial load cells of *C. perfringens* spore concentration of 10^3 and 10^5 cfu/ml were prepared. SVM broth was prepared by adding of 1.25 g cooked meat medium (Difco, USA) into 10 ml distilled water in 16x120 mm screw cap tubes. Two levels of initial load cell concentration were added into SVM broth and sous-vide in water bath at 60 °C for 0, 12, 24 and 36 hrs (Kongpeam, Kerdpiboon and Peuchkamut, 2015). The amount of *C. perfringens* spores after sous-vide in different time was determined. The experiment was done in 3 replicated. In each replicated, 2 replicated were recorded.

2.3 Preparation of sodium lactate in SVM broth

Sodium lactate (NaL) concentration of 1.5%, 3% and 4.5% w/w were prepared according to Necla (2001). Weights of NaL: distilled water were 1.5:98.5, 3:97 and 4.5:95.5, respectively. 1.25 g of cook meat medium was then added into 10 ml NaL solution. SVM broth with NaL was sterilized at 121 °C 15 min. Then all samples were inoculated *C. perfringens* spores at the concentration achieved from 2.2. SVM broth with *C. perfringens* spores and different concentration of NaL were heating at 60 °C for 0, 12, 24 and 36 hrs (Kongpeam, Kerdpiboon and Peuchkamut, 2015).

2.4 Bacterial enumeration procedure

Determination numbers of surviving bacteria, sterile distilled water of 10 ml was prepared and used to dilute decimal serial. This was done in duplicate. Then solution was pour plated into SPS (BBL, USA) and incubated at 37 °C (Angelotti et al., 1962) under anaerobic condition (Anaerobic jar 2.5 L and Gas pack; Merck, Germany) and viable counts were made after 48 hrs. Each experiment was performed in triplicate and experiments were performed in duplicate. Black colony of *C. perfringens* from SPS agar was confirmed on CW agar (Eiken chemical, Japan) and clear zone of colony will changed into yellow (Komoriya et al., 2007) and take the isolated *C. perfringens* to confirm at Bureau of quality and safety of food, Department of Medical Science. Ministry of Public Health.

RESULT AND DISCUSSION

3.1 Survival of *C. perfringens* spores in SVM broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of sous-vide conditions on *C. perfringens* spores reduction in SVM broth was shown in Table 1. In this study, the initial load of *C. perfringens* spores of 10^3 and 10^5 cfu/ml were inoculated in SVM and heated at for 0-36 hrs. It was found that SVM broth with initial load of 10^3 cfu/ml could not be detected *C. perfringens* spores after heating for 12 hrs, while SVM broth with initial load of 10^5 cfu/ml was found *C. perfringens* spores approximately 1.49 log cfu/ml after heating for 12 hrs.

Table 1 *C. perfringens* spores in SVM broth during sous-vide cooking at 60 °C

Time	*C. perfringens* spores (log CFU/ml)	
(hrs)	Initial loads	
	10^3	10^5
0	3.15±0.01	5.43^{a}±0.03
12	ND	1.49^{b}±0.01
24	ND	1.24^{c}±0.04
36	ND	1.04^{d}±0.01

Different superscript letter within the same column means significantly different ($P \leq 0.05$)
*ND = not detect

Amount of initial load of microorganisms affected their survival after processing. This can be implied that sous-vide process at 60 °C for 12 hrs could destroy *C. perfringens* spores with initial load cell of 10^3 cfu/ml. However, sous-vide using 60 °C for 0-36 hrs could not destroy *C. perfringens* spores with initial load cell of 10^5 cfu/ml. Sous-vide using 60 °C for 36 hrs decreased *C. perfringens* spores in SVM broth to approximately 4 log cycle. Initial load cell of *C. perfringens* spores with initial load cell of 10^5 cfu/ml was then use to next study.

3.2 Effect of NaL solution on survival of *C. perfringens* spores in SVM broth

Effects of cooking times and concentrations of NaL on survival of *C. perfringens* spores in SVM broth were shown in Table 2. The initial load of 10^5 cfu/ml was inoculated in SVM broth with three levels of NaL (1.5, 3, 4.5% w/w) comparing to control (0% NaL) and sous-vide for 0-36 hrs. The result displayed that SVM broth with 1.5% NaL and sous-vide for 12 hrs decreased *C. perfringens* spores from 5.41 to 1.39 (approximately for 4 log cycle). This was in the same trend as in the case of control (0% NaL) SVM broth. *C. perfringens* spores in 1.5% SVM broth were remained less than 1 log cycle (Table 2).

Table 2 *C. perfringens* spores in SVM broth with NaL during sous-vide cooking at 60 °C

Time	*C. perfringens* spores (log CFU/ml)			
(hrs)	%NaL			
	0	1.5	3	4.5
0	5.43^{a}±0.03	5.42^{a}±0.02	5.43^{a}±0.02	5.43^{a}±0.02
12	1.49^{b}±0.01	1.39^{c}±0.05	1.11^{e}±0.03	0.74^{f}±0.04
24	1.24^{d}±0.04	1.08^{e}±0.05	0.72^{f}±0.08	0.42^{g}±0.10
36	1.04^{e}±0.02	0.46^{g}±0.15	ND	ND

Different superscript letter within the same roll and column means significantly different ($P \leq 0.05$)
*ND = not detect

However, SVM broth with 3% and 4% NaL represented *C. perfringens* spores less than 1 log cycle after sous-vide for 24 hrs and 12 hrs, respectively. Be sided, SVM broth with 3% and 4.5% NaL were not detected *C. perfringens* spores after sous-vide for 36 hr.

CONCLUSIONS

It was found that 10^3 cfu/ml initial load of *C. perfringens* spores were not detected after sous-vide process for 12 hrs, while 10^5 cfu/ml initial load of *C. perfringens* spores were decreased for 4 log cycle after sous-vide for 12 hrs. Then *C. perfringens* spores were found approximately 1 log cycle after sous-vide for 36 hrs. Initial load cell of 10^5 cfu/ml was desired. Three levels of NaL (1.5, 3, and 4.5% w/w) were then applied in SVM broth with initial load cell of 10^5 cfu/ml. The results implied that adding of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5% NaL and sous-vide for 24 hrs induced *C. perfringens* spores remaining for 1 log cycle, while using of 3% and 4.5% NaL affected decreasing of *C. perfringens* spores in SVM broth at the sous-vide period for 4 and 5 log cycle, respectively. In addition, the application of 3% and 4.5% NaL could diminish 10^5 cfu/ml load of *C. perfringens* spores in SVM broth.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their sincere appreciation to the Faculty of Agro-industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Thailand for supporting the study financially.

REFERENCES

Akhtar, S., Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R. (2008). Inhibitory effect of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporution and spore outgrowth. Food Microbiology; 25: 802-808.

American Public Health Association. (1985). *Clostridium perfringens* food poisoning, p. 148-149. In A. S. Benenson (ed.), Control of communicable diseases in man. American Public Health Association, Washington, D.C.

Angelotti, R., H. E. Hall, M. J. Foter, and K. H. Lewis. (1962). Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. Applied Microbiology. 10:193-199.

Church, I. (1998). The sensory quality, microbiological safety and shelf life of packaged foods. In: Ghazala, S. (Ed.), Sous vide and cook-chill processing for the food industry. Aspen Publishers, Gaithersburg, Maryland, pp. 190-205.

Church, I.J., and Parsons, A.L. (2000). The sensory quality of chicken and potato products prepared using cook-chill and sous-vide methods. International Journal of Food science and Technology 35: 155-162.

Collins C. H., Lyne P. M., Grange J. M., (1985). 7th Ed., Microbiological Methods.
Czezulin JR, Hanna PC, McClanr BA. (1993). Cloning, nucleotide sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. Infection and Immunity; 61: 3429-3439.

Duncan C.L., Strong D.H., (1968). Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. Applied Microbiology. 16, 82-89.

Hauschild, A. H. W. (1975). Criteria and procedures for implicating *Clostridium perfringens* in foodborne outbreaks. The Canadian Journal of Public Health, 66:388-392.

Juneja, V.K. 2006. Delayed Clostridium perfringens growth from a spore inocula by sodium lactate in sous-vide chicken product. Food Microbiology 23: 105-111.

Komoriya T., Hashimoto A., Shinozaki A., Inoue M., and Kohno H. (2007). Study on Partial Purification of α-Toxin Produced from Obligate Anaerobe *Clostridium perfringens*. Report of the Research Institute of Industrial Technology, Nihon University. Number 88.

Kongpeam, I., Kerdpiboon, S. and Peuchkamut, Y. (2015). Flank steak of local Thai beef preparation using sous-vide process. Oral Presentation In Proceedings of The 14th Asian Food Conference 2015, SMX Convention Center, Mall of Asia, Pasay City, Philippines. 24-26 June 2015.

McClane BA. (2007). *Clostridium perfringens* In Food Microbiology: fundamentals and frontiers, 3rd edition. Eds: MP Doyle, LR Beuchat. ASM Press, Washington, D.C. p: 305-326.

Ministry of Health by ESR Ltd. (2001). Microbial Pathogens Data Sheets: *Clostridium perfringens*. Prepared for the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ministry of Health by ESR Ltd., Wellington, New Zealand.

Miwa N., Tokuhiro N., Shuichiro Kubo., Mikio A., and Hiroyasu H. (1998). Amount of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat detected by nested PCR. International Journal of Food Microbiology 42:195–200.

Murray P. R., Baron J. H., Pfaller M. A., Jorgensen J. H. and Yolken R. H., (Ed.). (2003). Manual of Clinical Microbiology, 8th (Eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Necla Aran. (2001). The effect of calcium and sodium lactates on growth from spores of Bacillus cereus and *Clostridium perfringens* in a 'sous-vide' beef goulash under temperature abuse. International Journal of Food Microbiology. 63: 117–123.

Schafheitle, J.M. (1990). The sous-vide system for preparing chilled meals. Food Journal 92(5): 23-27.

Schellekens, M. (1996). New research issues in sous-vide cooking. Trends in Food Science and Technology 7: 256-262.

Shandera, W. X., C. O. Tacket, and P. A. Blake. (1983). Food poisoning due to *Clostridium perfringens* in the United States. The Journal of Infectious Diseases. 147:167-170.

Skandamis, P.N. and Gounadaki, A.S. (2009). Dried Meats, Poultry and Related Products. In Fernandes, R. Microbiology Handbook of Meat Products. Leatherhead Food International Ltd. Cambridge, UK. 83-99.

United States of America Food and Drug Administration, (1984). Bacteriological Analytical Manual, 6th (Eds.), AOAC, Arlington, Va.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้