การฆ่าเชื้อ Listeria monocytogenes ด้วยความร้อนในการทวนสอบความถูกต้องของกระบวนการให้ความร้อนไก่หมักปรุงรส

THERMAL INNOTIVATION OF Listeria monocytogenes TO VALIDATE MARINATED COOKED CHICKEN PROCESS.

ศศิวิมล อาษณีย์

SASIWIMOL ARNMANEE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2838-8

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenes* ด้วยความร้อน ในการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการให้ความร้อนไก่มาริเนต

THERMAL INACTIVATION OF *Listeria monocytogenes* TO VALIDATE MARINATED COOKED CHICKEN PROCESS.

ศศิวิมล อานมณี

SASIWIMOL ARNMANEE

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67426
วัน,เดือน,ปี 15 S.A. 2549

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2549

ISBN.974-15-2838-8

THERMAL INACTIVATION OF *Listeria monocytogenes* TO VALIDATE MARINATED COOKED CHICKEN PROCESS.

SASIWIMOL ARNMANEE

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2006

ISBN. 974-15-2838-8

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenes* ด้วยความร้อน ในการตรวจสอบความถูกต้องของกระบวนการให้ความร้อนไก่มาริเนต
นักศึกษา	นางสาวศศิวิมล อานมณี
รหัสนักศึกษา	46067902
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร.วริพัสย์ อารีกุล

บทคัดย่อ

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างสปอร์ที่ทนร้อนได้ดีที่สุด จากการศึกษาผลของความร้อนต่อการทำลายเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 โดยทดลองหาค่าความต้านทานความร้อน ด้วยสภาวะการให้ความร้อนแบบนึ่งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ในตัวกลางน้ำไก่มาริเนตที่มีส่วนผสมของเกลือและน้ำตาลโดยร้อยละเกลือเท่ากับ 11.6 และปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำร้อยละ 13.6 ทดลองในหลอดทดลองขนาดเล็กปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โดยผลที่ได้นำมาประมวลค่าทางทฤษฎีเพื่อศึกษาค่า D z และ ค่า F พบว่าค่า D ที่อุณหภูมิ 60 65 และ 70 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 15.9 5.9 และ 1.2 นาที ตามลำดับ ค่า z เท่ากับ 8.85 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาค่าความต้านทานความร้อนของเชื้อดังกล่าวในสภาวะการให้ความร้อนแบบนึ่งและย่างไก่มาริเนตที่อุณหภูมิเดียวกัน มีค่า D เท่ากับ 6.6 2.9 และ 0.6 นาที ตามลำดับ และมีค่า z เท่ากับ 9.30 องศาเซลเซียส

ผลที่ได้จากการทดลองนำมายืนยันกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 65 70 และ 100 องศาเซลเซียส โดยเครื่องมือให้ความร้อนใกล้เคียงกับที่ใช้ในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรม จากการศึกษาผลการทำลายเชื้อดังกล่าวด้วยความร้อนโดยกำหนดการลดลงของปริมาณเชื้อเท่ากับ 7 log cycle จะต้องใช้เวลาในการให้ความร้อนเท่ากับ 46.5 20.4 4.0 นาที และ 0.1 วินาทีตามลำดับ ซึ่งผลการยืนยันกระบวนการให้ความร้อนเป็นที่น่าพอใจ โดยการให้ความร้อนด้วยการนึ่งและย่างให้ผลการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ดีกว่าวิธีการนึ่งเพียงอย่างเดียว

Thesis Title	Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* to validate marinated cooked chicken process.
Student	Ms. Sasiwimol Arnmanee
Student ID.	46067902
Degree	Master of Science
Program	Food sanitation
Year	2006
Thesis Advisor	Dr.Varipat Areekul

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is the thermotolerance of the highest among nonsporeformers. The study effects of heat and the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 was determined in marinated chicken broth which contains sodium chloride and sugar were 11.6% and soluble solution (°Brix) was 13.6 % by testing in the 2.5 ml test tube method. The theoretical process as determine D values at 60 , 65 and 70 °C were 15.9 , 5.9 and 1.2 minutes respectively and z value obtained in water bath was 8.85 °C. In marinated cooked chicken using the combination between steaming and roasting method , the D values were 6.6, 2.9 and 0.6 minutes respectively and z value was 9.30 °C .

The confirmation of validation by using the combination between steaming and roasting at 60, 65, 70 and 100 °C to control the condition as same as processing line's cooker. This challenging validation by obtain *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 7 log inactivation, controlling time at F_0 values evaluated 46.5, 20.4, 4.0 minutes and 0.1 seconds. The theoretical calculation to predict the inactivation, was successfully. The result indicated that the combination between both heating method increased the inactivation effect compared to steaming alone.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยความช่วยเหลืออย่างดีจากผู้มีพระคุณหลายท่าน ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ ดร.วริพัสย์ อารีกุล ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รวมทั้งกรุณาสละเวลาอันมีค่าให้ความรู้ คำแนะนำ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณคุณเพ็ญศรี รอดมา ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ และ ผศ.ดร.อดิสร เสวตวิวิฒน์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย รวมทั้งชี้แนวทางแก้ไขปัญหาส่งผลให้รายงานฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคุณวรรณทนีย์ ชำนาญเศรษฐการณ์ รองกรรมการผู้จัดการบริษัท ซีพีเอฟ ผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ที่ให้โอกาสในการศึกษาและวิจัย และคุณศรรัก พงษ์สุวรรณ ผู้จัดการฝ่ายห้องปฏิบัติการ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ที่ทำงานและเพื่อนร่วมสถาบัน อาทิเช่น คุณฤทัยพันธน์ คุณทรงสิทธิ์ คุณดวงกมล คุณพสุดา คุณอร คุณแฮ๋ว คุณตาล ที่ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจที่ดี

ขอขอบคุณคุณสวนัฏ สุรินทร์ และคุณอภิชาติ เอกภาพไพบูลย์ ที่ช่วยเหลือให้งานสำเร็จลุล่วง ขอบคุณสำหรับความหวังดีที่มีให้เสมอมาและความหมายของคำว่ามิตรแท้

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและพี่สาวที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนด้วยดีตลอดมา

ข้าพเจ้าหวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจ และผู้ที่ต้องการหาหัวข้อเพื่อทำงานวิจัยต่อจากนี้ คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ครอบครัว และคณาจารย์ที่อบรมสั่งสอนและให้วิชาความรู้ แต่หากมีข้อบกพร่องประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้เพียงผู้เดียว และขออภัยไว้ ณ โอกาสนี้

ศศิวิมล อานมณี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง..... VII

สารบัญภาพ VIII

บทที่ 1. บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 2

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย 2

1.4 ขอบเขตของการวิจัย 2

บทที่ 2. แนวคิดทางทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 กระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อน..... 3

2.2 ผลของกระบวนการให้ความร้อนต่อเชื้อจุลินทรีย์..... 6

2.3 หลักการใช้ความร้อนในการถนอมอาหาร 8

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์..... 10

2.4.1 ชนิดอาหาร 10

2.4.2 ชนิดของจุลินทรีย์..... 13

2.4.3 ระดับความร้อน 13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5 แบคทีเรีย *L. monocytogenes* 14

2.5.1 ประวัติของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* และการระบาดของโรค Listeriosis 15

2.5.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา..... 16

2.5.3 การเกิดโรคและพยาธิสภาพ..... 16

2.5.4 แหล่งที่พบ 17

2.5.5 การเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในอาหาร... 17

2.5.6 การต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* 19

2.6 การทดสอบความมั่นใจได้ด้วยวิธีปฏิบัติ (confirmation by challenging process validation) 20

บทที่ 3. วิธีการดำเนินการทดลอง 22

บทที่ 4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 28

บทที่ 5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 41

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม..... 43

ภาคผนวก 50

ภาคผนวก ก. วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายเซลล์ *L.monocytogenes* และผลการทดสอบความบริสุทธิ์แบคทีเรีย *L. monocytogenes* 50

ภาคผนวก ข. วิธีการคำนวณและผลการคำนวณ 55

ภาคผนวก ค. ผลการทดลอง 62

ภาคผนวก ง. ภาพการทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... . 67

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ความทนทานต่อความร้อนของแบคทีเรียในกลุ่มอาหารที่มีสภาพพีเอช ต่างๆ..... 12

2.2 ตารางแสดงการแพร่ระบาดของโรค Listeriosis ที่พบในอาหารต่างๆ 15

2.3 ตารางแสดงจำนวนครั้งที่พบแบคทีเรีย *L. monocytogenes* จากการสุ่มเก็บตัวอย่าง ในพื้นที่การผลิตในโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ 18

2.4 ตารางแสดงค่าความต้านทานความร้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์..... 19

4.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ Testkit Microbact 12L 28

4.2 ตารางแสดงค่า D ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในน้ำไก่มาริเนต สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และไก่มาริเนต 34

4.3 แสดงระยะเวลาในการให้ความร้อนนานถึงอุณหภูมิที่ต้องการและค่า F ที่อุณหภูมิต่างๆ 38

4.4 ผลวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของไก่มาริเนตที่ผ่านความร้อนในสภาวะนึ่งและย่าง ที่ อุณหภูมิ 60 65 70 และ 100 องศาเซลเซียส 39

ข.1 ความชันที่ได้จากเส้นแนวโน้มของกราฟแสดงปริมาณของเซลล์ *L. monocytogenes* เซลล์ปกติที่รอดชีวิตในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 57

ข.2 ความชันซึ่งได้จากเส้นแนวโน้มของกราฟลอการิทึมของค่า D และอุณหภูมิในช่วง 60-70 องศาเซลเซียส 59

ค.1 ค่าพีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายในสารละลาย และร้อยละเกลือในน้ำไก่มาริเนต 62

ค.2 แสดงจำนวนเซลล์ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส 63

ค.3 แสดงจำนวนเซลล์ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 65 องศาเซลเซียส 64

ค.4 แสดงจำนวนเซลล์ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 70 องศาเซลเซียส 65

ค.5 แสดงจำนวนเซลล์ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 100 องศาเซลเซียส 66

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 การถ่ายเทความร้อนของโมเลกุลในแท่งทองแดง..... 3

2.2 การพาความร้อน 4

2.3 การแผ่รังสีความร้อน 5

2.4 กราฟ D แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตและเวลาที่ให้ความร้อน... 8

2.5 กราฟ TDT แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Dและอุณหภูมิที่ให้ความร้อน 9

2.6 ภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงลักษณะเซลล์
ของเชื้อ*L. monocytogenes* 16

2.7.เส้นทางการแพร่กระจายของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในสิ่งแวดล้อม 17

3.1 ตัวอย่างน้ำไก่มาริเนตที่เตรียมได้จากการทดลอง..... 24

4.1 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในตัวกลางน้ำไก่มาริเนตและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้
ทดสอบการต้านทานความร้อน ณ อุณหภูมิต่างๆ..... 29

4.2 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในไก่มาริเนตที่ใช้ทดสอบการต้านทานความร้อน ณ อุณหภูมิ
ควบคุมต่างๆ 30

4.3 การรอดชีวิตของ *L. monocytogenes* ในน้ำไก่มาริเนต และฟอสเฟตบัฟเฟอร์
ที่อุณหภูมิต่างๆ 32

4.4 การรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในไก่มาริเนต ที่อุณหภูมิ
60 65 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ 33

4.5 ความสัมพันธ์ค่า z ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ไก่มาริเนตระหว่างการให้ความร้อน
ในสภาวะนิ่งและย่างในตู้อบ และการให้ความร้อนด้วยไอน้ำในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ..... 37

ก.1 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ทางชีวเคมี..... 53

ก.2 กราฟ OD มาตรฐานที่ 600 นาโนเมตรต่อปริมาณเซลล์ *L monocytogenes* 54

ข.1 กราฟการรอดชีวิตแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ
60 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 1 55

ข.2 กราฟการรอดชีวิตแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ
60 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 2 56

ข.3 กราฟการรอดชีวิตแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ
60 องศาเซลเซียส ครั้งที่ 3 56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ข.4 กราฟ Thermal death time แบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนต ครั้งที่ 1 58
ข.5 กราฟ Thermal death time แบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนต ครั้งที่ 2 58
ข.6 กราฟ Thermal death time แบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนต ครั้งที่ 3 59
ง.1 ภาพแสดงลักษณะของชิ้นส่วนเนื้ออกไก่ไม่มีหนังหุ้ม 67
ง.2 ภาพอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Julabo MD , Germany) 67
ง.3 ภาพตู้อบ combination oven (Rational model CM 6, Germany) 68
ง.4 ภาพชิ้นไก่มาริเนต spread แบคทีเรีย *L. monocytogenes* 68

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

อุตสาหกรรมไก่แปรรูปแช่แข็งของประเทศไทย เป็นอุตสาหกรรมส่งออกที่ใหญ่และสามารถทำรายได้สูงให้แก่ประเทศไทย การเปิดตลาดการค้าเสรีระหว่างประเทศทำให้ประเทศไทยสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์ไปขายยังต่างประเทศได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญได้แก่คุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ ประเทศในกลุ่มสมาชิกยุโรปมีมาตรการห้ามนำเข้าผลิตภัณฑ์ปนเปื้อนจากสารเคมีตกค้างในเนื้อไก่ และอันตรายทางชีวภาพโดยห้ามพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ เช่น แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* (EU regulation, 2005)

ในโรงงานอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักพบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในวัตถุดิบ การออกแบบกระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม และการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์หลังกระบวนการผลิต เป็นต้น จากการศึกษาและรวบรวมข้อมูลของโรงงานแปรรูปแห่งหนึ่งพบว่าเบื้องต้นยังคงพบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคหลงเหลือภายหลังกระบวนการให้ความร้อนเช่นแบคทีเรีย *L. monocytogenes* (Metaxopoulos, 1999) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างสปอร์และทนร้อนได้ดีที่สุด หากบริโภคอาหารที่มีเชื้อชนิดนี้ปนเปื้อนอยู่จะทำให้เกิดโรค Listeriosis (Pagen และคณะ, 1997)

จากข้อมูลเบื้องต้นของ ICMSF (1996) มีการระบุความสามารถในการต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ต่างๆเช่น ในเนื้อย่าง เนื้อบดหมัก ไส้กรอกหมัก เป็นต้น แต่จากการค้นคว้าไม่พบข้อมูลการต้านทานความร้อนในไก่มาริเนต เหตุผลเนื่องจากสูตรส่วนผสม และเวลาที่ใช้ในการผลิตที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ ดังนั้นการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในกระบวนการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์และการยืนยันความปลอดภัยในกระบวนการผลิตเป็นสิ่งสำคัญ ความร้อนที่ใช้ในการผลิตสามารถทำลายแบคทีเรียส่วนใหญ่ในอาหารแต่เซลล์บางส่วนอาจไม่ถูกทำลาย จากการศึกษาของ Linton และคณะ (1992) พบว่าเซลล์แบคทีเรียที่ผ่านสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญหรือสภาวะเครียด (stress) ต่างๆ เช่น ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูง อาหารที่ผ่านการให้ความร้อน การแช่เย็นหรือการใช้สารฆ่าเชื้อในกระบวนการผลิต สภาวะต่างๆเหล่านี้จะกระตุ้นความสามารถในการต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้น และเซลล์ที่บาดเจ็บ (injured cell) จากกระบวนการผลิตอาจฟื้นตัวและเพิ่มจำนวนในขณะเก็บรักษา

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการให้ความร้อนแก่ไก่มาริเนต โดยการหาค่า D z และ F และการยืนยันความปลอดภัยในกระบวนการผลิต (validation) เพื่อกำหนด

อุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนที่เหมาะสมแก่ไก่มาริเนตและป้องกันการเหลือรอดของแบคทีเรีย *L monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการต้านทานความร้อน (heat resistance) ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* และกรรมวิธีการฆ่าเชื้อทางทฤษฎี (theoretical thermal inactivation) ของไก่มาริเนต

1.2.2 เพื่อยืนยันผลด้วยวิธีปฏิบัติโดยการตรวจสอบความถูกต้อง (confirmation by challenging validation) ของกระบวนการให้ความร้อนไก่มาริเนต

1.3 สมมุติฐานของการวิจัย

การศึกษาอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนที่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปเพื่อทำลายแบคทีเรีย *L. monocytogen*โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานจากการทดลองเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากหากการออกแบบกระบวนการผลิตที่ไม่เหมาะสม อาจก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และการทดลองนี้ได้หาค่าความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์คือค่า D, z และ F และทดสอบความมั่นใจโดยการยืนยันผลด้วยวิธีปฏิบัติซึ่งข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองยังเป็นประโยชน์แก่ผลิตภัณฑ์อื่นๆที่มีขั้นตอนการผลิตที่ใกล้เคียงกัน

การกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนที่เหมาะสมจะสามารถลดปัญหาการสูญเสียกรณีตรวจพบแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ ทำให้ลดการ reprocess หากพบว่าผลเชื้อจุลินทรีย์ของสินค้าไม่อยู่ในเกณฑ์ ซึ่งช่วยประหยัดพลังงาน และต้นทุนคุณภาพ

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการตรวจสอบหาค่า D z และ F ในกระบวนการให้ความร้อนไก่มาริเนต เพื่อกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการทำลายแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ ATCC 7644 แล้วนำผลที่ได้จากการทดลองดังกล่าวมายืนยันในกระบวนการให้ความร้อนไก่มาริเนต ซึ่งสภาวะการให้ความร้อนใกล้เคียงกับกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรม โดยทำการทดลอง ณ ห้องปฏิบัติการโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์แช่แข็งแห่งหนึ่ง เขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพฯ

บทที่ 2
แนวคิดทางทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

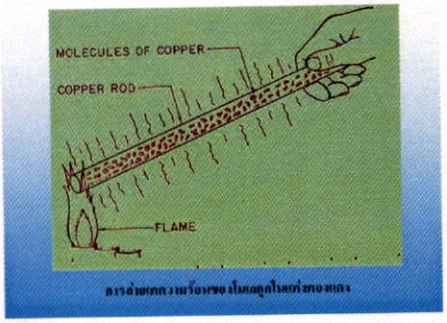
2.1 กระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อน

กระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อนเป็นวิธีที่สำคัญในการถนอมอาหาร มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อยับยั้งการเน่าเสียของอาหารและการสร้างสารพิษจากจุลินทรีย์ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงในระยะเวลานานจะสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์และเอนไซม์ได้มีประสิทธิภาพกว่าการใช้อุณหภูมิต่ำและเวลาสั้น อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงในช่วงเวลาสั้นๆจะสามารถยืดอายุของผลิตภัณฑ์ได้เท่ากับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำในระยะเวลานานและยังสามารถรักษากลิ่นรสและคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์นั้นไว้ได้ (วิไล, 2543)

หลักการถ่ายเทความร้อน แบ่งเป็น 3 แบบ คือ การนำความร้อน (Conduction) การพาความร้อน (Convention) และการแผ่รังสีความร้อน (Radiation) จะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีความแตกต่างของอุณหภูมิเกิดขึ้น (ธนาคม, 2547)

2.1.1 การนำความร้อน

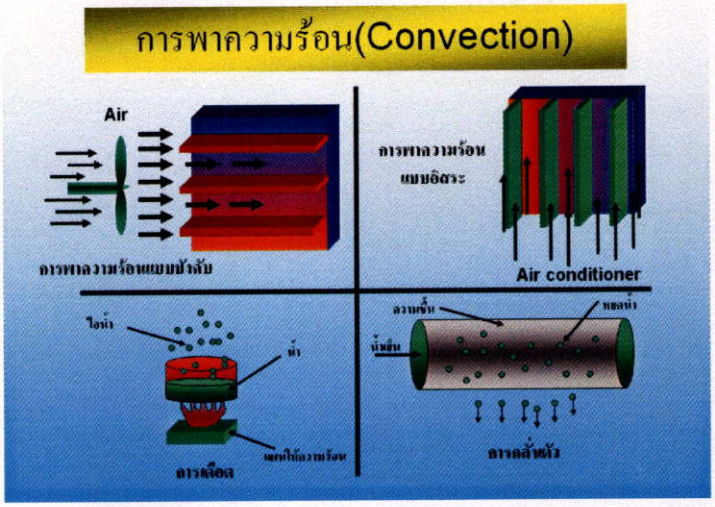
เป็นการถ่ายเทความร้อนจากบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงไปสู่บริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำภายในตัวกลางเดียวกัน หรือเป็นการเคลื่อนที่ของความร้อนระหว่างตัวกลางที่อยู่ติดกันแต่มีอุณหภูมิต่างกัน โดยความร้อนจะเคลื่อนที่ผ่านโมเลกุลที่ไม่เคลื่อนที่หรืออยู่นิ่ง ดังภาพที่ 2.1 แสดงการถ่ายเทความร้อนแบบการนำความร้อนของแท่งทองแดง การนำความร้อนจะเกิดขึ้นได้ดีมากในตัวกลางที่เป็นของแข็ง และนำความร้อนได้ไม่ดีในตัวกลางที่เป็นของเหลวและก๊าซ ความร้อนเกิดการเคลื่อนที่ของอิเลคตรอนจากจุดที่มีอุณหภูมิสูงไปสู่จุดที่มีอุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ความร้อนยังเคลื่อนที่ไปได้โดยการสั่นสะเทือนของโมเลกุลภายในของแข็งในลักษณะพลังงานของความสั่นสะเทือน (ธนาคม, 2547)



ภาพที่ 2.1 ภาพการถ่ายเทความร้อนของโมเลกุลในแท่งทองแดง
ที่มา: ทวีวัฒน์ (2539)

2.1.2 การพาความร้อน

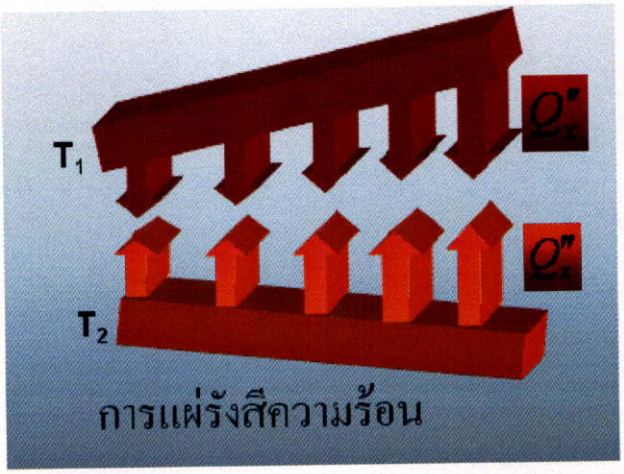
เป็นการเคลื่อนที่ของความร้อนระหว่างผิวของแข็งและของไหล ดังแสดงในภาพที่ 2.2 โดยที่ของไหลจะเป็นพาหะในการพาความร้อนเข้าหรือออกจากผิวของแข็ง ซึ่งการเคลื่อนที่ของความร้อนโดยการพา เกิดจากการอนุรักษ์พลังงานความร้อนที่บริเวณผิวความร้อนระหว่างของแข็งและของไหล โดยพิจารณาจากการเก็บสะสมพลังงานความร้อนและการเคลื่อนที่ของของไหล (ธนาคม, 2547)



ภาพที่ 2.2 ภาพการพาความร้อน
ที่มา : ทวีวัฒน์ (2539)

2.1.3 การแผ่รังสีความร้อน

เป็นการเคลื่อนที่ของความร้อน โดยไม่ต้องอาศัยตัวกลาง เช่น การนำความร้อน และการพาความร้อน โดยเป็นการเคลื่อนที่จากผิวตัวกลางที่มีอุณหภูมิสูงไปสู่ผิวตัวกลางที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า พลังงานความร้อนจากการแผ่รังสีความร้อนจะเคลื่อนที่ในรูปของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหรือในรูปของโปรตอน โดยความร้อนสามารถเคลื่อนที่ได้ดีในสุญญากาศ ดังภาพที่ 2.3 แสดงการแผ่รังสีความร้อนจากผิวตัวกลางที่มีอุณหภูมิต่างกัน(ธนาคม, 2547)



ภาพที่ 2.3 ภาพการแผ่รังสีความร้อน

ที่มา: ทวีวัฒน์ (2539)

การแบ่งชนิดของอาหารตามลักษณะการถ่ายเทความร้อนและการบรรจุของอาหารกระป๋องสามารถแบ่งได้ดังนี้ (บุษกร, 2547)

2.1.1 ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบการพาอย่างรวดเร็วตลอดระยะเวลาการให้ความร้อน เช่น น้ำผัก น้ำผลไม้ นม ผลไม้บรรจุในน้ำเชื่อม ผักบรรจุในน้ำเกลือ เนื้อสัตว์บรรจุในน้ำเกลือ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ ถ้ามีชิ้นใหญ่จะมีการพาความร้อนช้าลง

2.1.2 ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบการพา แต่ช้ากว่าแบบแรก เช่น ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ หรือเนื้อสัตว์ที่บรรจุแน่นขึ้น ทำให้มีน้ำซึ่งเป็นตัวพาความร้อนลดลง

2.1.3 ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนเปลี่ยนจากการพาความร้อน เป็นการนำความร้อนในระหว่างการฆ่าเชื้อ เช่น น้ำมะเขือเทศ ซุปบางชนิด หรืออาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบอยู่มาก

2.1.4 ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบการนำตลอดกระบวนการ เช่น ครีมซุป ผลิตภัณฑ์ในซอสข้น แยม คอร์นบีฟ และแซนวิชสเปรด เป็นต้น

2.1.5 ผลิตภัณฑ์ที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบการนำ แล้วเป็นการพาความร้อนในช่วงหลังของการให้ความร้อน พบได้ในอาหารที่มีการสลายของเจล เช่น พุดดิ้ง และน้ำมะเขือเทศบางชนิด

กระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อนมีหลายวิธีขึ้นกับวัตถุประสงค์การกำหนดคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์นั้นๆ โดยแบ่งตามวิธีการให้ความร้อน มี 2 วิธีคือการให้ความร้อนแบบแห้ง (dry heat) คือการให้ความร้อนโดยไม่อาศัยน้ำเป็นตัวกลางในการพาความร้อน แต่จะอาศัยการ

ถ่ายเทความร้อนแบบอื่น เช่นการนำความร้อน หรือการแผ่รังสีความร้อน และการให้ความร้อนแบบเปียก (moist heat) คือการให้ความร้อนโดยอาศัยน้ำเป็นตัวกลางพาความร้อนสู่ชิ้นอาหาร

ตัวอย่างการให้ความร้อนแบบแห้ง เช่น การเผาไหม้ การย่าง การอบ เป็นต้น และการให้ความร้อนแบบเปียกเช่น การต้ม การพลาสเจอร์ไรส์ และการสเตอริไรซ์ เป็นต้น

การเผาไหม้ (flaming) หรือการย่างคือ การให้ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส การให้ความร้อนด้วยวิธีนี้เน้นการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเรื่องคุณภาพการบริโภคมากกว่าการถนอมรักษา

การใช้ตู้อบลมร้อน (hot air oven) เช่น การอบ เป็นต้น เป็นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส โมเลกุลของน้ำในอาหารจะลดลง และสารประกอบในอาหารเช่น แป้ง ไขมัน เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพไป มีผลต่อค่า a_w และสามารถทำลายเซลล์จุลินทรีย์ (vegetative cell) ได้

การต้ม (boiling) คือการให้ความร้อนแก่น้ำจนมีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส สามารถทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อ thermophilic spoilage bacteria เช่น *Bacillus sp.*และ *Clostridium sp.*

การพลาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) เป็นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที เป็นความร้อนแบบไม่รุนแรง เช่นเดียวกับการต้ม ซึ่งสามารถทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ แต่สปอร์ของแบคทีเรียบางชนิดสามารถทนต่อการให้ความร้อนดังกล่าวได้

การสเตอริไรซ์ (sterilization) เป็นการให้ความร้อนที่รุนแรง เช่นการใช้หม้อฆ่าเชื้อ (retort) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีที่ความดัน 15 ปอนด์ สามารถทำลายเซลล์และสปอร์ของจุลินทรีย์ ซึ่งอาหารที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยวิธีการนี้จะสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานโดยไม่เน่าเสีย (บุษกร, 2547)

2.2 ผลของกระบวนการให้ความร้อนต่อเชื้อจุลินทรีย์

Gould (1989) ได้สรุปผลของความร้อนต่อการทำลายและการบาดเจ็บของจุลินทรีย์โดยอุณหภูมิในระดับที่ทำลายจุลินทรีย์ (lethal temperature) ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลาย ในขณะที่อุณหภูมิที่ระดับต่ำกว่า (sub-lethal temperature) จะทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บ นอกจากนี้ยังสรุปว่าการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อนแบบแห้ง (dry heat) เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation)ของสารประกอบภายในเซลล์ ส่วนความร้อนแบบเปียก (moist heat) จะเกิดการตกตะกอนและสูญเสียกิจกรรมของโปรตีนซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญต่อการอยู่รอด

และโครงสร้างโปรตีนในเซลล์ (สุมาลี , 2539) โดยสรุปผลของความร้อนแบบแห้งและแบบเปียกมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์แบ่งเป็น 4 ข้อดังนี้

2.2.1 ดีเอ็นเอ (DNA)

จากการศึกษาของ Allwood และ Russell (1967) พบว่าความร้อนทำให้เส้นคู่ของดีเอ็นเอแตกออกเป็นเส้นเดี่ยว และสามารถทำลายคู่เบสพิวรีน (purine) และ พีริมิดีน (pyrimidine) ที่เป็นองค์ประกอบในดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ ทำให้ดีเอ็นเอสูญเสียสภาพทางด้านโครงสร้างและตายในที่สุด

2.2.2 อาร์เอ็นเอ (RNA)

ความร้อนทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดเป็นผลให้อาร์เอ็นเอที่อยู่ในเซลล์เกิดการแตกตัว โดยความร้อนแบบไม่รุนแรง (mild heat) จะเร่งการแตกตัวของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้ไรโบโซมอล โปรตีน ต่างๆมาเกาะกันเกิดเป็นรูปร่างของโรโบโซม (มาลินี, 2541) เมื่อให้ความร้อนแบบต่อเนื่องอาร์เอ็นเอก็จะสูญเสียสภาพ และทำให้เซลล์ตาย

2.2.3 เยื่อหุ้มเซลล์และไซโตรพลาสซึม (cell membrane and cytoplasm)

ความร้อนที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาด สิ่งต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น กรดนิวคลีอิค กรดอะมิโน จะไหลออกมาทำให้เซลล์สูญเสียสภาพไป แต่ในกรณีที่อุณหภูมิสูงมากจะมีผลทำให้เซลล์ตายทันที โดยที่เยื่อหุ้มเซลล์ยังคงอยู่ในสภาพปกติ (ปรียา, 2528)

2.2.4 เอนไซม์ที่จำเพาะ

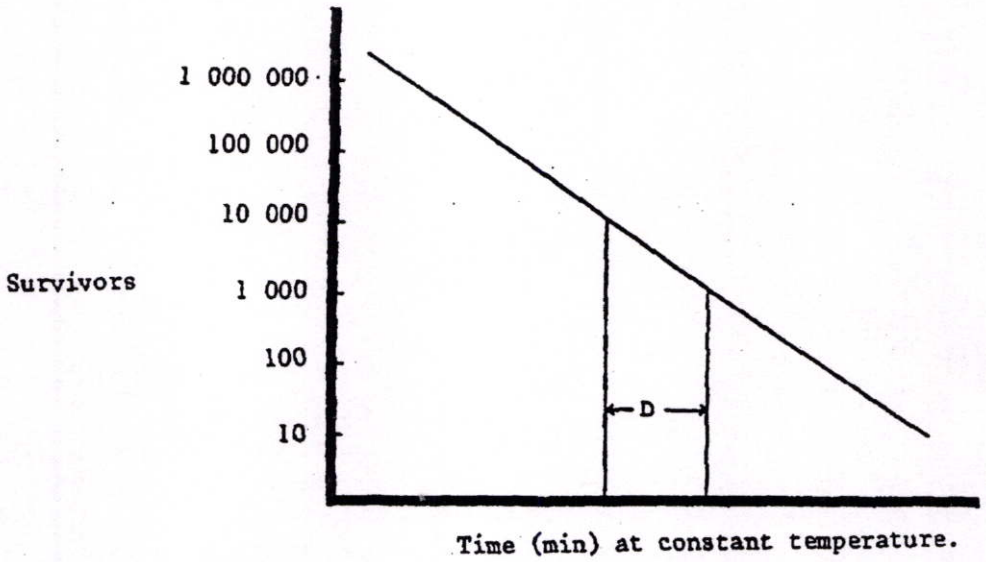
ความร้อนมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้จุลินทรีย์ตายหรือทำให้เซลล์บาดเจ็บ ความร้อนแบบไม่รุนแรงมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แคตตาเลส (catalase) และเอนไซม์ซุปเปอร์ดิสมิวเตส (super dismutase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และอนุพันธ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น นอกจากนี้ความร้อนยังขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เอ็นโดจีเนสนิวคลีเอส (endogenous nuclease) ที่ช่วยย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้ามาสู่เซลล์แบคทีเรีย

ดังนั้นการใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารต้องพิจารณาระดับอุณหภูมิและปริมาณความร้อนที่ใช้ ซึ่งจะต้องศึกษาถึงความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ (heat resistance) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่นอัตราการแทรกผ่านความร้อน (heat penetration)ไปยังจุดที่ร้อนช้าที่สุด เวลาในการให้ความร้อน การกระจายความร้อน (heat distribution) และการถ่ายเทความร้อน (heat transfer) (Tucker และ Philip, 2001)

2.3 หลักการใช้ความร้อนในการถนอมอาหาร

การใช้ความร้อนในการถนอมอาหาร เป็นการทำลายจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตได้ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารแต่ละชนิดมีสมบัติและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันที่จะเอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์บางชนิดเท่านั้นสามารถเติบโตได้ เมื่อนำผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านั้นไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อน พบว่าอาจมีจุลินทรีย์บางชนิดเหลือรอด เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านทานความร้อนแตกต่างกัน การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์นี้สามารถแสดงในรูปของค่า D ค่า z และค่า F (วิไล, 2543)

2.3.1 ค่า D หมายถึง ระยะเวลาในการทำลายจุลินทรีย์ให้ลดลงร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle ณ อุณหภูมิที่กำหนด การคำนวณหาค่า D ทำได้โดยเขียนกราฟ semilog ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต (CFU/ มิลลิลิตร) และเวลาที่ให้ความร้อน ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 กราฟ D แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตและเวลาที่ให้ความร้อน
ที่มา : www.fao.org/DOCREP/003/R6918E/R6918E02.HTM

จากกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถคำนวณหาค่า D จากสมการที่ 2.1

$$D = U/\log_{10} a - \log_{10} b = -1/\text{slope} \qquad \text{---------- (2.1)}$$

U = เวลาของการให้ความร้อน

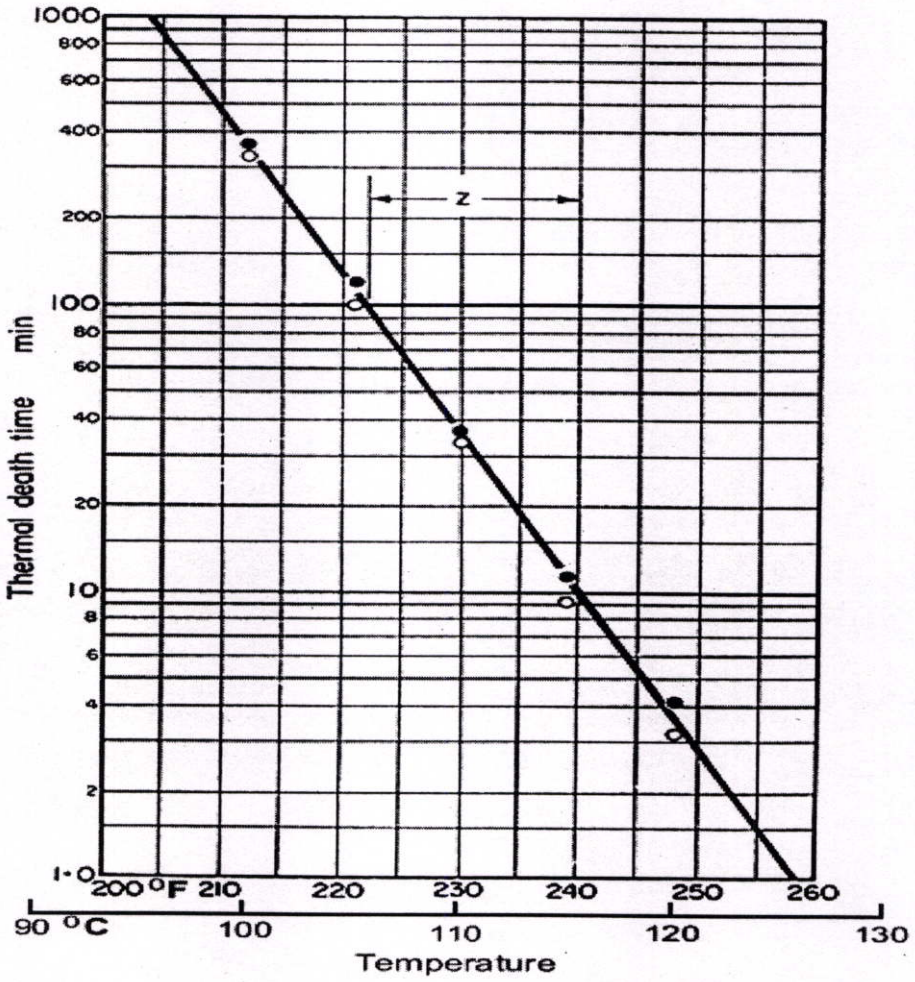
a = ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น

b = ปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต เมื่อเวลา U นาที

เมื่อนำค่า D มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอุณหภูมิจะได้ระยะเวลาที่ใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์หรือเรียกว่า TDT

2.3.2 TDT หรือ thermal death time หมายถึง ระยะเวลาที่ใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์จำนวนหนึ่ง ในอุณหภูมิที่กำหนด

ค่า z หมายถึง ช่วงอุณหภูมิหน่วยองศาเซลเซียสที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์โดยทำให้ค่า TDT ลดลง หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle สามารถคำนวณค่า z โดยการเขียนกราฟ semilog ระหว่างค่า D และอุณหภูมิบนแกน x และ y ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 5 และคำนวณค่า z ได้จากสมการข้างล่างนี้



ภาพที่ 2.5 กราฟ TDT แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Dและอุณหภูมิที่ให้ความร้อน

ที่มา : www.nzifst.org.nz/unitoperations/httrapps2.htm

จากกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถคำนวณค่า z ได้จากสมการที่ 2.2

$$z = \frac{(T_1 - T_2)}{\text{Log}_{10} D_1 - \text{Log}_{10} D_2} \quad \text{------- (2.2)}$$

T_1 T_2 = อุณหภูมิที่ให้ความร้อน

D_1 D_2 = ค่า D ที่อุณหภูมิ T_1และT_2

2.3.3 ค่า F หมายถึง ระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ทราบจำนวนในอาหารภายใต้สภาวะที่กำหนด ณ อุณหภูมิหนึ่ง สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 2.3

$$F = D(\text{Log } N_0 - \text{Log } N) \quad \text{-------- (2.3)}$$

โดยที่ N_0 = จำนวนเซลล์หรือสปอร์เริ่มต้น

N = จำนวนเซลล์หรือสปอร์สุดท้ายที่เหลืออยู่

D = ค่า D ของจุลินทรีย์ที่ศึกษา

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์

ความร้อนมีผลอย่างยิ่งต่อการเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในอาหาร โดยการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ขึ้นกับหลายปัจจัย (บุษกร, 2547) ดังนี้

2.4.1 ชนิดของอาหาร

อาหารมีองค์ประกอบต่างๆได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ตัวถูกละลาย สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เป็นต้น และคุณสมบัติในตัวอาหารที่แตกต่างกัน เช่นค่า a_w ค่าพีเอช องค์ประกอบต่างๆมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ๆดังนี้ (วิไล, 2539)

2.4.1.1 น้ำตาล

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะต้านทานความร้อนได้ดีขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสภาวะของจุลินทรีย์ น้ำตาลทำให้ปริมาณน้ำในโพรโทพลาสซึม (protoplasm) ของเซลล์ลดลงจึงช่วยป้องกันโปรตีนไม่ให้เสียสภาพเนื่องจากความร้อน

2.4.1.2 เกลือ

ความสามารถในการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในสภาวะที่มีเกลือขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือ (ทนง, 2524) Mackey และคณะ (1990) พบว่าแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในเนื้อวัวบดที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3.5 จะมีความต้านทานความร้อนหรือมีค่า D เพิ่มขึ้น 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการต้านทานคามร้อนของจุลินทรีย์ชนิดนี้ในเนื้อวัวบดที่มีเกลือต่ำกว่าร้อยละ 3 นอกจากนี้ชนิดของเกลือมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ ถ้าเนื้อวัวบดมีเกลือร้อยละ 3.5 และมีไนเตรตและไนไตรต์เป็นส่วนผสม จะให้ค่า D สูงกว่าตัวอย่างที่มีเกลือร้อยละเท่ากัน แต่ไม่มีไนเตรตและไนไตรต์เป็นส่วนผสม

การเพิ่มความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในองค์ประกอบของน้ำตาลและเกลือสืบเนื่องจากการลดลงของค่า a_w หรือปริมาณน้ำอิสระในอาหาร (บุษกร, 2547) ที่ทำให้เซลล์สูญเสียน้ำหรือเรียกว่าเกิด plasmolysis จุลินทรีย์จะสร้างกลไกการปรับตัวโดยเซลล์จะเลือกรับตัวถูกละลาย (solute)จากภายนอกและจะพยายามสร้างตัวทำละลายชนิดใหม่หรือรวบรวมตัวถูกละลายให้เข้มข้นขึ้นเพื่อให้เกิดความสมดุลย์ (ทนง, 2524) และการลดลงของค่า a_w จะช่วยป้องกันโปรตีนไม่ให้เสียสภาพได้ (นิศานาถ , 2543)

2.4.1.3 ไขมัน

ในอาหารที่มีไขมันสูงจะทำให้อาหารนั้นๆมีความสามารถในการนำความร้อนต่ำค่าความจุความร้อนต่ำและมีความชื้นน้อยทำให้ไขมันทำหน้าที่ในการป้องกันจุลินทรีย์จากความร้อน จุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารที่มีไขมันจะทนความร้อนได้มากกว่าเมื่ออยู่ในน้ำ Fain และคณะ (1991) รายงานว่าแบคทีเรีย *L. monocytogenes* มีความสามารถในการต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณไขมันในอาหารเพิ่มขึ้น การใช้ความร้อนทำลายจุลินทรีย์ในน้ำมันมีความคล้ายคลึงกับการทำสเตอริไรส์แบบความร้อนแห้ง (dry heat sterilization) ซึ่งต้องใช้ความร้อนสูงกว่าการใช้ความร้อนเปียก (moist heat sterilization)(บุษกร, 2547)

นอกจากนี้ขนาดของชิ้นอาหาร น้ำหนักบรรจุ การเรียงตัวของอาหารมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ หากชิ้นอาหารขนาดใหญ่ จะใช้เวลาในการฆ่าเชื้อนานกว่าชิ้นขนาดเล็ก และถ้าน้ำหนักบรรจุมากเกินไป ทำให้อัตราการแทรกผ่านความร้อนลดลง จึงต้องให้ความร้อนที่นานขึ้นจึงสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ และลักษณะของอาหารที่จะให้ความร้อนมีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ หากอาหารที่มีซอกมุมหรือพื้นผิวไม่เรียบ อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของไอน้ำที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์เนื่องจากจุลินทรีย์อาจซ่อนอยู่ที่ผิวของอาหาร(วิไล, 2539)

2.4.1.4 ค่าพีเอชในอาหาร

ปกติจุลินทรีย์จะทนความร้อนได้ดีที่สุดในอาหารที่มีช่วงค่าพีเอชเป็นกลาง ถ้า

อาหารมีความเป็นกรดหรือด่างเพิ่มขึ้นจุลินทรีย์จะทนความร้อนได้น้อยลง (Farber และ Pagotto, 1992) ดังตารางที่ 2.1 แสดงความทนทานต่อความร้อนของแบคทีเรียในรูปค่า D และ z ในอาหารที่มีค่าพีเอชต่างๆ

ตารางที่ 2.1: ความทนทานต่อความร้อนของแบคทีเรียในกลุ่มอาหารที่มีสภาพพีเอชต่างๆ

ชนิดอาหารและแบคทีเรีย	ความต้านทานความร้อน	
Low acid medium acid (พีเอช >4.5)	D_{121}	z ($^{\circ}$ซ)
Thermophile (35-55°ซ สร้างสปอร์ได้)	(นาที)	
Flat sour (*B. stearothermophilus*)	4.0-5.0	-10 ถึง -5
Gaseous-spoilage(*C. thermosaccharolyticum*)	3.0-4.0	-8.8 ถึง -5
Sulfide stinkers (*C. nigrificans*)	2.0-3.0	-8.8 ถึง -5
Mesophiles (spores)		
C. botulimum (typeA&B)	0.1-0.2	-10 ถึง -7.7
C. sporogenes (PA3679)	1.0-1.5	-10 ถึง -7.7
Acid foods (พีเอช 4.0-4.5)		
Thermophile(35-55°ซ สร้างสปอร์ได้)		
B. coagulans	0.01-0.07	-10 ถึง -7.7
Mesophiles (spores)	D_{100}	
B. polymyxa, B. macerans	0.1-0.5	-11 ถึง -8.8
C. pasterianum	0.1-0.5	-11 ถึง -8.8
High-Acid foods (พีเอช <4.0)	$D_{65.5}$	
Mesophiles non spore forming	(นาที)	
Lactobacillus spp., Leuconostoc spp.		
ยีสต์และรา	0.5-1.0	-13 ถึง -12.2

ที่มา : ดัดแปลงจาก Stumbo (1973)

นอกจากนี้ในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง สามารถใช้เชื้อจุลินทรีย์อื่น เช่นยีสต์ หรือเอนไซม์ที่ทนความร้อนเป็นตัวกำหนดเวลาในการให้ความร้อน โดยวัตถุประสงค์การให้ความร้อนในอาหารที่เป็นกรดสูง (ค่าพีเอชน้อยกว่า 3.7) คือ เป็นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเงื่อนไขการให้ความร้อนจะรุนแรงน้อยกว่าอาหารที่มีค่าพีเอชเป็นกลาง

2.4.2 ชนิดของจุลินทรีย์

สปอร์ของแบคทีเรียสามารถทนความร้อนได้ดีที่สุด รองลงมาคือเซลล์แบคทีเรีย(vegetative cell) ราและยีสต์ตามลำดับ (บุษกร, 2547) และแบคทีเรียรูปกลมทนความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียรูปท่อน แบคทีเรียที่เลี้ยงในที่อุณหภูมิสูงจะทนความร้อนได้สูง และแบคทีเรียที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรือที่สร้างแคปซูลจะทนความร้อนได้สูงกว่าแบคทีเรียที่อยู่เดี่ยวๆหรือแบคทีเรียที่ไม่สร้างแคปซูล (ปรียา, 2548) Heid และ Joslyn (1967) พบว่าระยะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมีผลต่อการต้านทานความร้อนโดยจุลินทรีย์จะต้านทานความร้อนได้ดีที่สุดในระยะสเตชันนารีเฟส (stationary phase) รองลงมาคือช่วงแลกเฟส (lag phase) ซึ่งเป็นช่วงพักตัวก่อนเริ่มการเจริญเติบโต และจุลินทรีย์จะไวต่อความร้อนมากที่สุดในช่วงลอการิทึมเฟส (logarithmic phase)

2.4.3 ระดับความร้อน

ความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับระดับความร้อนที่ให้แก่อาหาร โดยกระบวนการให้ความร้อนมี 3 ระดับดังนี้ (สุมาลี , 2539)

2.4.3.1 การให้ความร้อนอุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส หรือเรียกว่าพลาสเจอร์ไรส์ การให้ความร้อนดังกล่าวจะทำลายจุลินทรีย์กลุ่มที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิต่ำ และจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้งแบคทีเรียพวกที่ไม่สร้างสปอร์ ดังนั้นจึงยังคงมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆซึ่งส่วนใหญ่เป็นเซลล์หรือสปอร์ที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียสหลงเหลืออยู่และสามารถเจริญเติบโตได้ ดังนั้นอาหารที่ผ่านการพลาสเจอร์ไรส์จะต้องแช่เย็นเพื่อควบคุมการเติบโตของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต หรืออาจยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธีต่างๆ เช่นการใช้บรรยากาศดัดแปลงในการบรรจุหรือเก็บอาหาร หรือการใช้สารถนอมอาหาร การลดค่า a_w Frazier (1988) พบว่าการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลาน้อยกว่า 30 นาทีจะไม่สามารถทำลายเอนไซม์และสารพิษที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนได้

2.4.3.2 การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิน้ำเดือดจะเพียงพอในการทำลายจุลินทรีย์กลุ่มไม่สร้างสปอร์ แต่ไม่เพียงพอในการทำลายสปอร์ของแบคทีเรียบางชนิด (วราวุฒิ, 2539) การใช้ความร้อนระดับนี้พบในการฆ่าเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกผักผลไม้กระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ เนื่องจากการใช้ความร้อนที่สูงเกินไปจะทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป

2.4.3.3 การใช้ความร้อนอุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส หรือเรียกว่าการสเตอริไรส์เป็นการถนอมอาหารโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าการพาสเจอร์ไรส์ซึ่งความร้อนระดับนี้สามารถทำลายจุลินทรีย์ทุกชนิด

2.5 แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes*

2.5.1 ประวัติของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* และการระบาดของโรค Listeriosis

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในธรรมชาติทั้งในพืช สัตว์ สิ่งแวดล้อม และที่ทำให้เกิดโรคมีจำนวน 25 สายพันธุ์ สามารถแบ่งเป็น 13 ซีโรไทป์ (serotype) และ ซีโรไทปที่ทำให้เกิดโรค Listeriosis ในมนุษย์หรือทำให้เกิด haemolysis คือเกิดการย่อยเม็ดเลือดแดงได้แก่สายพันธุ์ 1/2 a 1/2 b 1/2 c และ 4 b (Fagerและ Peterkin , 1991) แบคทีเรีย *L. monocytogenes* พบครั้งแรกในปี คศ.1926 โดย Murray และคณะได้แยกเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้จากสัตว์ที่เป็นโรค และตั้งชื่อว่า *Bacteria monocytogenes* เนื่องจากมีสมบัติทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว ต่อมาในปี คศ.1966 Gray และ Killinger พบการระบาดของโรค Listeriosis ในสัตว์หลายชนิด ได้แก่ ลูกวัว นก หนู หรือแม้แต่ปลา และตรวจพบแบคทีเรียนี้ในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ที่เตรียมจากวัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ อาการของโรคในสัตว์คล้ายกับอาการของโรคในคน แต่อย่างไรก็ตามโรค Listeriosis ยังไม่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย จนกระทั่งในช่วงปี คศ.1941-1951 เกิดการระบาดของโรค Listeriosis ครั้งใหญ่ในเยอรมัน เนื่องจากการบริโภคนมที่ไม่ได้ผ่านความร้อน ในปี คศ.1980-1983 พบการระบาดของโรคนี้ในรัฐ Massachusettes ประเทศอเมริกา มีผู้เสียชีวิตถึง 14 คน (Fleming และคณะ ,1985) ในช่วงปี คศ.1980 พบการระบาดของโรค Listeriosis ในประเทศแถบยุโรป การระบาดในครั้งนี้ทำให้มีผู้เสียชีวิตสูงถึง 31 คน (Bille, 1990) นับแต่นั้นมาจึงได้มีการตื่นตัวเพื่อที่จะกำจัดแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำนม และพบว่าการพลาสเจอร์ไรส์น้ำนมสามารถป้องกันโรค Listeriosis ได้ (Linan และคณะ, 1988) ประวัติการพบแบคทีเรียและการแพร่ระบาดในอาหารดังแสดงในตารางที่ 2.2

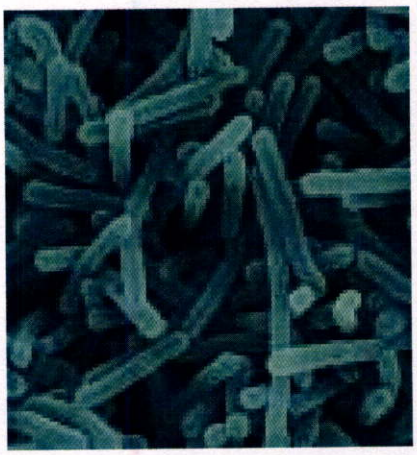
ตารางที่ 2.2 แสดงการแพร่ระบาดของโรค Listeriosis ที่พบในอาหารชนิดต่างๆ

ปี พ.ศ.	อาหารที่พบการปนเปื้อน	จำนวนครั้งที่พบ/ประวัติการเสียชีวิต	ประเทศ
1953	นมดิบ	2/1	เยอรมัน
1953	เนื้อสัตว์ปีกดิบ	4/2	สวีเดน
1966	นมและผลิตภัณฑ์นม	279/109	เยอรมัน
1980	หอย	22/6	นิวซีแลนด์
1983	นมพลาสเจอร์ไรซ์	49/14	อเมริกา
1985	เนยแข็ง	142/48	อเมริกา
1986-87	ผัก	36/16	อเมริกา
1987	เนยสด	1	อังกฤษ
1988	แอลฟัลฟา	1	แคนาดา
1989	ไส้กรอกหมู	1	อิตาลี
1989	เห็ดในน้ำเกลือ	1	ฟินแลนด์
1989	กุ้ง	9/1	อเมริกา
1990	ไส้กรอกหมู	1	อิตาลี
1992	เนื้อรมควัน	4/2	นิวซีแลนด์
1994	นมชอคโกแลต	52/0	อเมริกา
1995	เนย	17/0	ฝรั่งเศส

ที่มา : ดัดแปลงจากสุวิมล (2548)

2.5.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ปลายมน ดังแสดงในภาพที่ 2.6 ในเชื้อที่มีอายุมากเซลล์อาจมีลักษณะต่อกันเป็นเส้น (filamentous cell) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วย Peritrichous flagella และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส (ศิวาพร, 2542) นอกจากนี้ยังสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีช่วงพีเอชในช่วง 4.4-8.0



ภาพที่ 2.6 ภาพขยายจากกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอนแสดงลักษณะเซลล์ของเชื้อ *L. monocytogenes*

ที่มา : http://biology.kenyon.edu/microbial_biorealm/bacteria/gram-positive/listeria,2005

2.5.3 การเกิดโรคและพยาธิสภาพ

โรค Listeriosis เป็นโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย *L .monocytogenes* โดยเมื่อเข้าสู่คนทำให้คนมีอาการทางระบบประสาททำให้ประสาทอักเสบ (meningtis) โรคติดเชื้อในเลือด (septicemia) และในมารดาที่ตั้งครรภ์จะทำให้ลูกเสียชีวิตแรกคลอด (still birth) หรือแท้ง (miscarriage) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (encephalitis) โดยระยะแรกจะมีอาการปวดศรีษะ ปวดหลัง อาเจียนและปวดตามข้อ เป็นระยะเวลานานประมาณ 10 วัน ต่อมามีไข้สูง การทำงานของประสาทส่วนกลางผิดปกติ ถ้าหากผู้ป่วยไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมจะตายภายใน 2-3 วัน โรค Listeriosis พบในประชากรอย่างน้อย 1/100,000 ในแต่ละปี โดยพบว่าร้อยละ 20-30 ที่ติดเชื้อจากจุลินทรีย์ชนิดนี้เสียชีวิต และร้อยละ 90 ที่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล (Tompkin, 2005)

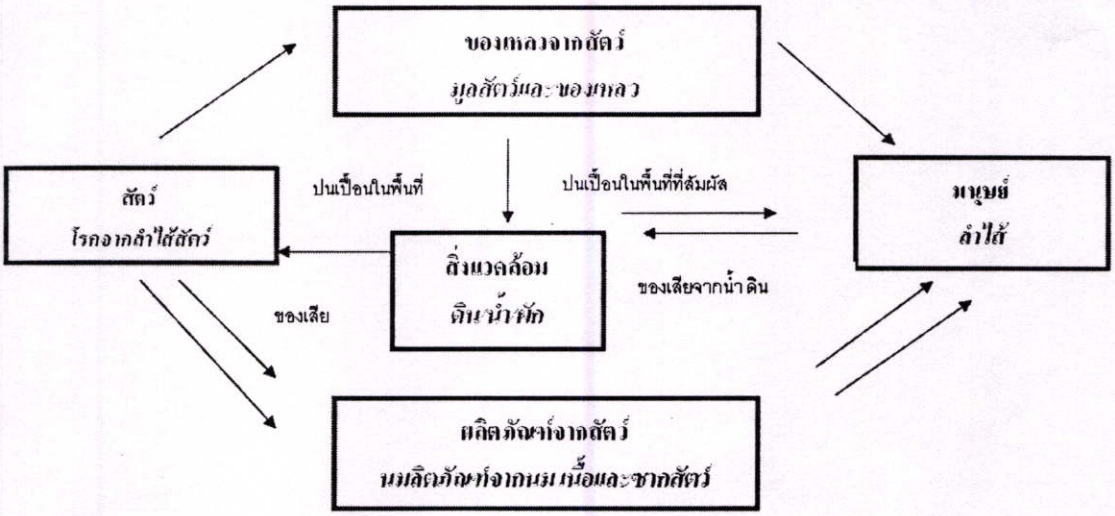
L. monocytogenes มีความสามารถในการผลิต Listeriolysis O ซึ่งเป็นโพลีเปปไตด์สายเดี่ยวที่มีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 58-60 กิโลดาลตัน และมีคุณสมบัติทำลายเม็ดเลือด (นันทนา , 2537) ความรุนแรงจากของโรคคาดว่าเกิดจาก พลาสมิด (plasmid) อย่างน้อย 4 ชนิดในแบคทีเรีย *L. monocytogenes* เมื่อเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ด้วยการบริโภค แบคทีเรียชนิดนี้จะแสดงสมบัติเป็น invasive intracellular pathogen โดยการแทรกเข้าสู่ร่างกายผ่านทางลำไส้เล็ก ถึงตับและม้ามจะทำหน้าที่กำจัดแบคทีเรียนี้โดยเซลล์ภูมิคุ้มกันร่างกายกลุ่ม phagocytic cell ได้แก่ macrophages และ monocytes ภายในเวลาเพียง 10 นาที โดย phagocytic cells จะสร้าง superoxide anion (O_2^-) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เพื่อทำลายแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถสร้างเอนไซม์ superoxide dimutase และ catalase เอนไซม์ดังกล่าวนี้จะกลับไปทำลาย (O_2^-) และ H_2O_2 (Bille, 1990) หลังจากนั้น แบคทีเรียที่อยู่รอดได้ในเซลล์ host จะเริ่มแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และมีจำนวนมากที่สุดภายใน 2-3 วัน ถ้าร่างกายสามารถสร้างภูมิต้านทานยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไว้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ได้ ร่างกายก็จะกลับสู่สภาพปกติในวันที่ 3-4 หลังการติดเชื้อ ในคนปกติที่มีสุขภาพดี อาจมีเพียงอาการปวดหัว เป็นไข้ และอาเจียน ยังไม่เคยพบว่ามีการเสียชีวิตของคนกลุ่มนี้ (นิศานาถ, 2543)

2.5.4 แหล่งที่พบ

แบคทีเรีย *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบในสิ่งแวดล้อม หรือเรียกว่า environmental pathogen เนื่องจากพบใน ดิน โคลน อุจจาระ น้ำโสโครก ผักต่างๆ สามารถมีชีวิตรอดในดินได้ถึง 295 วัน เชื้อสามารถติดต่อทางเดินอาหารได้และแพร่เข้าสู่ร่างกายโดยการบริโภคอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิต เส้นทางการแพร่กระจายของเชื้อในสิ่งแวดล้อม สัตว์ อาหาร และมนุษย์ ดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 เส้นทางการแพร่กระจายของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในสิ่งแวดล้อม
ที่มา : ดัดแปลงจาก Jay (1992)

2.5.5 การเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในอาหาร

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียประเภท Psychrotroph (Seeligeer และJones, 1986) สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 1-45 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำเจริญได้ช้ามากแม้ว่าจะเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพที่มีสารอาหารเหมาะสม หรือแม้แต่มีค่าความเป็นกรดด่างพอเหมาะ Walker และ Bank (1990) พบว่าที่อุณหภูมิต่ำ ระยะ log phase ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* อาจชลอการเจริญได้ตั้งแต่ 3-18 วัน ความสามารถเจริญในอาหารประเภทต่างๆ ขึ้นกับชนิดของอาหาร และปริมาณเซลล์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นๆ โดยองค์กรอนามัยโลกได้แบ่งอาหารออกเป็น 4 กลุ่มตามความเสี่ยงจากแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ดังนี้

67426

2.5.5.1 อาหารดิบ ได้แก่เนื้อสด ผักสด เป็นต้น

2.5.5.2 ผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สลัดผัก ไส้กรอกหมัก นมดิบ เนยแข็งเป็นต้น

2.5.5.3 ผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบวนการทำลายแบคทีเรีย *L. monocytogenes* แต่มีโอกาสปนเปื้อนในภายหลัง เช่น หมูหั่นสไลด์ เนยแข็งบางชนิด เป็นต้น

2.5.5.4 ผลิตภัณฑ์อาหารที่บรรจุในวัสดุหีบห่อก่อนผ่านกระบวนการให้ความร้อนหรือบรรจุในสภาวะปลอดเชื้อทันทีหลังทำลายแบคทีเรีย *L.monocytogenes* ได้แก่ แฮมปรุงสุก

สาเหตุของการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในอาหาร (สุวิมล, 2548)ได้แก่ การจัดการด้านสุขาภิบาลสถานที่ผลิตไม่เหมาะสม การปนเปื้อนข้ามและการปนเปื้อนภายหลัง การทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่เหมาะสม และพฤติกรรมการบริโภคที่ไม่เหมาะสมนอกจากนี้หากกระบวนการผลิตไม่มีการควบคุมเรื่องสุขลักษณะที่ดี เช่นการกำหนดความถี่ในการล้างอุปกรณ์ที่ไม่เหมาะสม มีผลต่อการปนเปื้อนของแบคทีเรีย โดย Salmelis และ Metaxopoulos (1999) ได้ทดลองเก็บตัวอย่างด้วยวิธี swab test เพื่อวิเคราะห์ผลทางจุลชีววิทยาในโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์ พบแบคทีเรีย *L. monocytogenes* จำนวนมากในขั้นตอนการนวด เนื่องจากกระบวนการผลิตเป็นแบบต่อเนื่องและไม่มีการกำหนดความถี่ในการล้างทำความสะอาดอย่างเหมาะสม แบคทีเรียดังกล่าวสามารถสะสมในสภาพแวดล้อมของการผลิตโดยจากการเก็บข้อมูลของโรงงานแปรรูปสัตว์ปีกของ ดร.สุวิมล (2548) พบแบคทีเรีย ในสภาพพื้นที่ต่างๆดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงจำนวนครั้งที่พบแบคทีเรีย *L. monocytogenes* จากการสุ่มเก็บตัวอย่างในพื้นที่การผลิตในโรงงานแปรรูปเนื้อสัตว์

พื้นที่	จำนวนครั้งที่พบแบคทีเรีย *L. monocytogenes* (คิดเป็นร้อยละ)
พื้น	37
ท่อระบายน้ำ	37
อุปกรณ์ทำความสะอาด	24
ห้องทำความสะอาด	24
น้ำหยด(condensate)	7
ผนังและเพดาน	5
เครื่องทำความเย็น	4

ที่มา : ดัดแปลงจากสุวิมล(2548)

ดังนั้นการควบคุมสภาวะแวดล้อมในการผลิตให้อยู่ในสุขลักษณะที่ดี สามารถป้องกันการปนเปื้อนและการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Tompkin , 2005)

2.5.6 การต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

จากที่กล่าวข้างต้นว่าความร้อนมีผลต่อจุลินทรีย์คือทำให้ DNA RNA เอนไซม์ที่จำเพาะและเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย หรือสูญเสียสภาพ Mackey และคณะ (1990) ได้ทดลองหาค่า D ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* 27 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย *L .innocua* อีก 2 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส พบค่า D 29 สายพันธุ์อยู่ในช่วงตั้งแต่ 6.5-26 นาที ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเป็น 16.3 นาที ต่อมา Schoeni และคณะ (1991) ได้ทดลองหาค่า D ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ผสมรวมกัน 5 สายพันธุ์ในเนื้อวัวบด ที่อุณหภูมิ 54.4 57.2 60.0 และ 62.8 องศาเซลเซียส ให้ค่า D เป็น 22.4 15.7 4.47 และ 2.56 นาที ตามลำดับ ในแต่ละสายพันธุ์พบว่าค่า D ที่อุณหภูมิเดียวกันของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์เดี่ยวที่ปนเปื้อนในเนื้อบดจะให้ค่า D น้อยกว่า 2-4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า D ที่ได้จากแบคทีเรีย *L. monocytogenes* 5 สายพันธุ์รวมกัน

หน่วยงาน ICMSF (1996) ได้รวบรวมค่าความต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ค่าความต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *L.monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์	ค่า D ที่ 60 °ซ (นาที)	ค่า D ที่ 70 °ซ (นาที)
เนื้อบด (Ground meat)	3.12	-
เนื้อบดหมัก (Ground meat, cured)	16.7	-
ไส้กรอกหมัก (Fermented sausage)	9.2-11	-
เนื้อวัวย่าง (Roast beef)	3.5-4.5	
เนื้อวัว (Beef)	3.8	0.14
เนื้อวัวบดผสม (Beef homogenate)	6.27-8.32	0.14-2.0
เนื้อไก่บดผสม(Chicken homogenate)	-	0.16-2.0
ขาไก่ (Chicken leg)	5.6	0.11
ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)	-	0.5
ช่วง (RANGE)	1.6-6.7	

ที่มา : ดัดแปลงจาก ICMSF (1996)

Pagen และคณะ (1997) ได้ศึกษาการให้ความร้อนแก่แบคทีเรียกลุ่มไม่สร้างสปอร์และพบว่าแบคทีเรีย *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ทนร้อนได้ดีที่สุด (thermo- tolerant) และจากการศึกษาของ Linton และคณะ (1990) สรุปว่าการให้ความร้อนที่ heat shock แก่แบคทีเรียคือ การนำเซลล์แบคทีเรียมาผ่านความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ภายในระยะเวลาช่วงสั้นๆคือที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เวลาในการให้ความร้อนเท่ากับ 30 นาที

มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนชนิดพิเศษ คือ heat shock protein (Farber และBrown, 1990) ถ้าให้ความร้อนสูงขึ้นแก่แบคทีเรียในระดับที่ไม่ทำให้เซลล์ตาย (non lethal temperature) คือที่อุณหภูมิน้อยกว่า 60 องศาเซลเซียส (Jay, 1992) จะทำให้อัตราการสังเคราะห์ heat shock protein เพิ่มขึ้นและจุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการต้านทานความร้อนมากขึ้น

2.6 การทดสอบความมั่นใจได้ด้วยวิธีปฏิบัติ (confirmation by challenging process validation)

กระบวนการตรวจสอบความถูกต้อง(process validation) เป็นการตรวจสอบเพื่อประกันว่ากระบวนการผลิตนั้นๆ สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ให้ได้มาตรฐานตามข้อกำหนด (Codex ,2002) และมีคุณสมบัติตามคุณภาพที่กำหนดไว้โดยมีข้อแนะนำในการทำ process validation และความถี่ในการทำ validation ดังนี้

2.6.1 เมื่อผลิตสินค้าใหม่หรือมีการปรับเปลี่ยนกระบวนการผลิตใดๆที่มีผลต่อความปลอดภัยของอาหาร

2.6.2 เมื่อพบว่าระดับของอันตราย เช่นเกณฑ์ทางจุลินทรีย์สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานหรือเกินกว่าระดับที่เคยศึกษาไว้

2.6.3 เมื่อมีการศึกษาใหม่ๆหรือข้อมูลเพิ่มเติมใดๆที่มีผลต่อความปลอดภัยของอาหาร

2.6.4 เมื่อพบว่าวิธีการตรวจติดตามและทวนสอบ (monitor and verification) ล้มเหลว

วิธีการตรวจสอบความถูกต้อง (validation) ทำได้โดยการกำหนดเกณฑ์ทางการปฏิบัติ (performance criteria) ตามมาตรฐาน Codex (2002) ซึ่งให้กำหนดปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 5 log reduction ในผลิตภัณฑ์และการออกแบบการทดลอง validation ในกระบวนการให้ความร้อนจะต้องมีการทดลองหาจุดที่คาดว่าจะเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ (worst case) เช่นถ้ากระบวนการให้ความร้อนทำในหม้อ retort ก็จะต้องศึกษาการกระจายความร้อนของหม้อดังกล่าวเพื่อศึกษาตำแหน่งร้อนช้าที่สุด โดยการศึกษากลไกการให้ความร้อนและการกระจายความร้อน (heat distribution) จากผลการทดลองจะทำให้ทราบตำแหน่งร้อนช้าที่สุด จากนั้นจึงศึกษาการแทรกผ่านความร้อน (heat penetration) ของผลิตภัณฑ์ ณ ตำแหน่งดังกล่าวและศึกษาค่าความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ทางทฤษฎี ได้แก่ค่า D, z และค่า F และกำหนดเวลาในการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการลดจำนวนหรือทำลายจุลินทรีย์ลง 5 log reduction หรือขึ้นอยู่กับความเหมาะสมจากความเสี่ยงของผลิตภัณฑ์และประวัติการพบเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ ถ้ากระบวนการให้ความร้อนหรือเครื่องจักรให้ความร้อนเป็นแบบต่อเนื่องเช่นเตาทอดที่มีสายพานเป็นตัวขับเคลื่อนสินค้าภายในเครื่องทอด การศึกษาการให้ความร้อนจะต้องศึกษาหาจุดร้อนช้าที่สุดของ

ผลิตภัณฑ์ (heat penetration) ก่อนที่จะออกแบบเป็นค่าทางการปฏิบัติหรือค่าทาง process criteria (Tucker และ Philip , 2001)

ในบางกรณีมีการตรวจสอบความถูกต้องและการตั้งข้อกำหนดของกระบวนการให้ความร้อนอาจไม่ได้ทำการทดลองในสภาวะจริง แต่อาศัยแหล่งข้อมูลจากแหล่งที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับเช่นการตรวจสอบความถูกต้องสินค้าไส้กรอกหมักในประเทศแคนาดาโดยศึกษาการลดลงของเชื้อ *Escherichia coli 0157:H7* จากตารางความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนที่จุดร้อนช้า ซึ่งค่าควบคุมอาจไม่ใช่ค่าที่แท้จริง เนื่องจากสภาวะในการให้ความร้อนและกระบวนการผลิตมีความแตกต่างกัน (Piette, 2002) อย่างไรก็ตามการแสดงค่า D, z และ F สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการลดเชื้อจุลินทรีย์ให้อยู่ระดับที่ต้องการได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 วัตถุดิบไก่

เนื้ออกไก่ลอกหนัง (Skinless Boneless Breast) ปลอดสารเคมี เช่นยาปฏิชีวนะ หรือยาฆ่าแมลง ตกค้างในเนื้อสัตว์ จากบริษัทที่มีการตรวจสอบคุณภาพสารเคมีตกค้างจากโรงชำแหละแห่งหนึ่ง เขตหนองจอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร

3.1.2 น้ำหมักไก่

ประกอบด้วย	น้ำตาลกลูโคส	8.8	เปอร์เซนต์
	เกลือโซเดียมคลอไรด์	8.8	เปอร์เซนต์
	น้ำตาลทราย	0.3	เปอร์เซนต์
	น้ำ	82.1	เปอร์เซนต์

3.2 เชื้อจุลินทรีย์]

Listeria monocytogenes สายพันธุ์ ATCC 7644 จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Listeria selective agar base Palcam	(Merck , Germany)
3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB)	(Difco, France)
3.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar	(Difco, France)
3.3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA)	(Difco, France)
3.3.5 ชุดทดสอบทางชีวเคมี Test kit Microbact 12 L	(Microgen bioproduct, UK)
3.3.6 สารเคมีทดสอบ Listeria selective supplement	(Oxoid, UK)
3.3.7 Yeast extract agar	(Merck, Germany)
3.3.8 Dilution fluid	(Difco, France)
3.3.9 ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.2)	(Oxoid, UK)

3.4 เครื่องมือและอุปกรณ์การทดลอง

3.4.1 เครื่องบันทึกอุณหภูมิอัตโนมัติ	(ANRIZU HFT-80, Japan)
3.4.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	(Julabo MD, Germany)
3.4.3 สเปกโตโฟโตมิเตอร์	(SHIMADZU UV-1201, Japan)
3.4.4 เครื่องเหวี่ยง	(Hettich Centrifudge Mikro-Rapid , Germany)
3.4.5 เครื่องวัดค่าของแข็งในสารละลาย	(BSD-35 digital , UK)
3.4.6 ตู้อบ	(Ration Model CM 6 ,Germany)
3.4.7 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	(Suntex , Japan)
3.4.8 เครื่องตีป่นไฟฟ้า	(Seward 400 circulator, UK)
3.4.9 เครื่องปั่น	(National , Japan)
3.4.10 ตู้บ่มเพาะเชื้อ	(MMM Incucell 222, Germany)
3.4.11 หม้อนึ่งความดัน	(Tomy , Germany)
3.4.12 ตู้เขี่ยเชื้อ	(ESCO-KUL , Belgium)
3.4.13 เครื่องชั่ง	(Memmert , Germany)
3.4.14 เครื่องเขย่าผสม	(Votex , Germany)

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 และทดสอบความบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์

ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ลงในหลอด lyophilized culture *L. monocytogenes* ATCC 7644 เขย่าเบาๆ ปิเปตสารละลายเซลล์แบคทีเรียมาเพาะเชื้อในอาหาร TSB-YE บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ทดสอบความบริสุทธิ์โดยการเขี่ยเชื้อลงบนอาหาร Palcam agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาศึกษาสมบัติทางสัณฐานวิทยา และทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ Test kit Microbact 12 L เมื่อทดสอบได้ว่าเชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อมาเพาะบน TSAYE slant แล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อเป็น stock culture ใช้ในการศึกษาครั้งต่อไป

3.5.2 การเตรียมเซลล์ *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

เขี่ยเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.5.1 ลงใน TSB-YE ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงหลอดเซนติฟิวส์แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจำนวน 2 ครั้งด้วย dilution fluid ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรแล้วจึงเตรียมสารละลายเซลล์

นำสารละลายเซลล์มาทดสอบหาค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและนับจำนวนเซลล์ในอาหาร TSAYE โดย pour plate ที่ระดับเจือจางที่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ในสารละลาย dilution fluid อ่านค่าและบันทึกผลการทดลอง โดยนำผลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานความขุ่นที่ระดับเจือจางต่างๆ หลังจากนั้นเตรียมเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เทียบค่าความขุ่นเท่ากับ 0.4-0.6

3.5.3 การเตรียมน้ำมาริเนต

นำชิ้นส่วนอกไก่ไม่มีหนังติด น้ำหนัก 2 กิโลกรัมมาต้มในน้ำปริมาตร 1 ลิตรจนเดือด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปตีละเอียดด้วยเครื่องปั่นผสม เป็นน้ำไก่ (chicken broth) นำมาผสมกับน้ำหมักไก่ ในอัตราส่วนน้ำไก่ : น้ำหมักไก่ = 8:1 ส่วนผสมที่ได้จะเรียกว่าน้ำไก่มาริเนตดังแสดงในภาพที่ 3.1 ซึ่งจะถูกนำไปวัดค่าพีเอช ร้อยละเกลือและของแข็งที่ละลาย ($^{\circ}$Brix)

ภาพที่ 3.1 ตัวอย่างน้ำไก่มาริเนตที่เตรียมได้จากการทดลอง

3.5.4 ศึกษาการต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 7644ในน้ำไก่มาริเนตด้วยวิธีให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

นำน้ำไก่มาริเนตปริมาตร 990 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตสารละลายผสม 2.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อขนาด 13 × 100 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองวางลงในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่กำหนด บันทึกอุณหภูมิและเวลาเริ่มต้นจนอุณหภูมิในหลอดทดลองได้ตามที่กำหนด นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาเพื่อศึกษา coming up time

เมื่อความร้อนถึงระดับอุณหภูมิที่กำหนด จะเริ่มทำการเก็บตัวอย่างโดยเริ่มนับเวลาใหม่เป็นเวลาเริ่มต้นของการวิเคราะห์หาค่าการต้านทานความร้อน คือเท่ากับ 0 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสทันที จากนั้นจึงเริ่มทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ การเก็บตัวอย่างจะเก็บตัวอย่างละ 3 หลอดทดลอง (triplicate test)

นำตัวอย่างมานับจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดด้วยวิธี pour plate เพาะในอาหาร TSYEA บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24± 2 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองโดยทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส

3.5.5 ศึกษาการต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ด้วยวิธีให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

เตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 99 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตสารละลายผสม 2.5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อขนาด 13 × 100 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองวางลงในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่กำหนด ทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความต้านทานความร้อนในน้ำไก่มาริเนตด้วยวิธีให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ข้อ 3.5.4

3.5.6 ศึกษาการต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ในไก่มาริเนตด้วยวิธีนึ่งและย่างในตู้อบ

เตรียมสารละลายเซลล์ *L. monocytogenes* ความเข้มข้น 10^9 CFU/มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนชิ้นไก่ขนาด 1 ตารางนิ้ว ซึ่งมีน้ำหนักประมาณ 10 กรัม และทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำชิ้นไก่ใส่ในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิที่กำหนด บันทึกอุณหภูมิและเวลาเริ่มต้นจนได้อุณหภูมิตามที่กำหนด นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาเพื่อศึกษา coming up time

การวิเคราะห์หาความต้านทานความร้อนในไก่มาริเนตทำการทดลองเช่นเดียวกับในน้ำไก่มาริเนต ข้อ 3.5.4 แต่เปลี่ยนวิธีให้ความร้อนจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นการให้ความร้อนโดยใส่

ในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิ 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส โดยตัวอย่างชิ้นไก่จากการเก็บตัวอย่างต้องนำไปแช่ในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส และนับจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดด้วยวิธี pour plate โดยเพาะในอาหาร TSAYE บ่มเชื้อที่เวลาและอุณหภูมิตามการทดลองข้างต้น

3.5.7 การวิเคราะห์หาค่า D และ z

การคำนวณหาค่า D ทำได้โดยนำผลการทดลองจากข้อ 3.5.4 - 3.5.6 มาเขียนกราฟ semilog ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต (CFU/ มิลลิลิตร) และเวลาที่ให้ความร้อน วิธีการคำนวณแสดงในภาคภาคผนวก 1 และ 2 ข ที่อุณหภูมิ 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส โดยคำนวณค่า D จากสมการ

ค่า D = -1/slope

การคำนวณหาค่า z ทำได้โดยนำค่า D มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับอุณหภูมิจะได้ระยะเวลาที่ใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์ โดยคำนวณค่า z จากสมการ

ค่า z = -1/slope

3.5.8 การคำนวณจากสมการหาค่า D ที่ 100 องศาเซลเซียส และค่า F

นำค่า D และ z ที่ได้จากการทดลองในตู้อบ (ข้อ3.5.6) มาคำนวณหาค่า D ที่ 100 องศาเซลเซียสแสดงการคำนวณจากสมการที่ 3.1 ข (ภาคผนวก 3 ข) ดังนี้

$$\text{Log}\frac{D}{D_0} = \frac{T_0 - T}{z}$$

โดยที่ D = ค่า D value ที่ต้องการ ณ อุณหภูมิหนึ่ง

D_0 = ค่า D value ณ อุณหภูมิเริ่มต้น

T_0 = อุณหภูมิเริ่มต้น

T = อุณหภูมิที่ต้องการหาค่า D value

Z = อุณหภูมิที่ทำให้ค่า D เปลี่ยนไป 10 เท่า

และคำนวณค่า F ที่ 60 65 70และ 100 องศาเซลเซียส แสดงการคำนวณจากสมการที่ 2.3 (ภาคผนวก 4 ข) ดังนี้

$$F = D(\log N_0 - \text{Log}N)$$

โดยที่ N_0 = จำนวนเซลล์หรือสปอร์เริ่มต้น

N = จำนวนเซลล์หรือสปอร์สุดท้ายที่เหลืออยู่

D = ค่า D ของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษา

3.5.9 การทดลองยืนยันกระบวนการให้ความร้อนของไก่มาริเนตด้วยสภาวะนึ่งและย่าง

นำอกไก่ลอกหนังที่ผ่านการหมักด้วยน้ำหมักไก่ผสมเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร โดยหมักไก่นาน 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ ≤ 4 องศาเซลเซียสนำมาผ่านความร้อนในตู้อบในสภาวะนึ่งและย่าง จับเวลาในการให้ความร้อนโดยเก็บตัวอย่างตามเวลาที่คำนวณได้จากข้อ 3.5.8 ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

นำตัวอย่างมานับจำนวนเซลล์ในอาหาร TSBYE เริ่มต้นทำ pre enrichment ก่อนโดยบ่มเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37$\pm$ 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24$\pm$ 2 ชั่วโมง หากอาหาร TSAYE มีลักษณะขุ่นให้ปิเปตมาทำ pour plate บนอาหาร Palcam แล้วบ่มเชื้อในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37$\pm$ 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24$\pm$ 2 ชั่วโมง บันทึกและสรุปผลการทดลอง

3.5.10 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูล D และ z ที่ได้จากการพลอทกราฟเส้นตรง linear regression นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical package for the social science (SPSS) โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ ATCC 7644

การทดสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* พบว่าเมื่อทำการทดสอบทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมแบคทีเรียจะติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเล็ต แสดงว่าเป็นแกรมบวก และเมื่อตรวจสอบรูปร่างพบว่าเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ การทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ Test kit Microbact 12 L พบว่าแบคทีเรียมีคุณสมบัติในการใช้น้ำตาล แอลกอฮอล์ (sugar alcohol) และอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถย่อยเม็ดเลือดทำให้เกิด hemolysis ได้ ซึ่งคุณลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สามารถสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่นำมาวิเคราะห์เป็นแบคทีเรีย *L. monocytogenes* บริสุทธิ์ ดังตารางที่ 4.1 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ Test kit Microbact 12 L

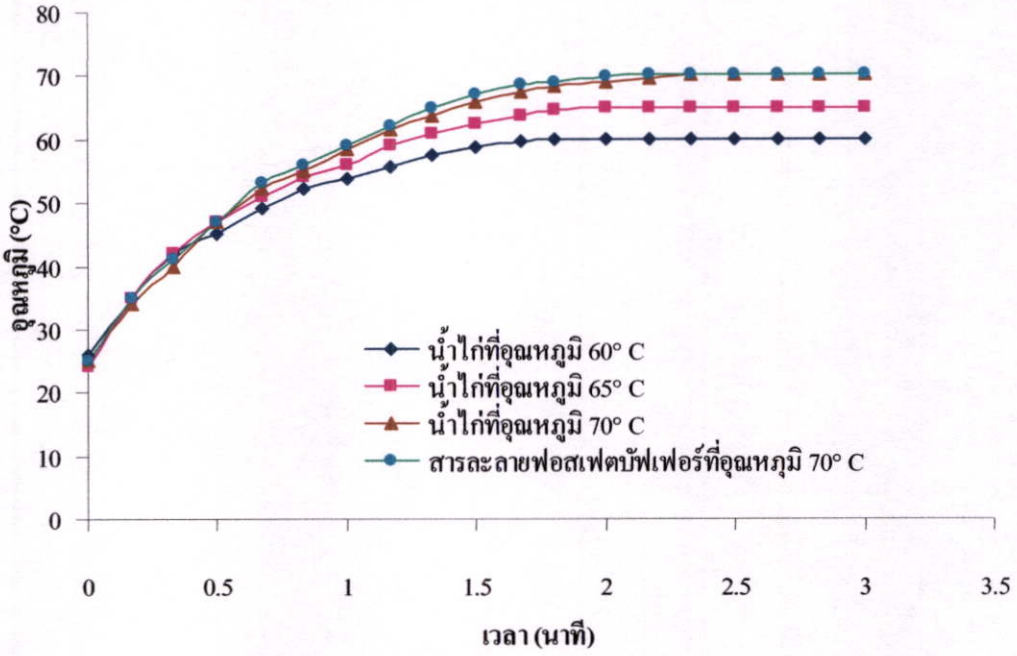
ตารางที่ 4.1 ผลการทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ

Biochemical test	Result
Asculin	+
Manitol	-
Xylose	-
Arabitol	+
Ribose	-
Rhaminose	+
Trehalose	+
Tagatose	-
Gluc-1-plus	+
M-D-Glucose	+
M-D-manose	+
Hemolysis	+

4.2 การศึกษาระยะเวลาในการให้ความร้อน (coming up time)

4.2.1 ระยะเวลาในการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่น้ำไก่มาริเนตปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรในหลอดทดลองขนาด 13× 100 มิลลิลิตร จนถึงอุณหภูมิที่กำหนดได้แก่ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส มีระยะเวลาในการให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่กำหนดเท่ากับ 1.8, 2.0 และ 2.3 นาทีตามลำดับและในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าเท่ากับ 2.2 นาที ดังแสดงในภาพที่ 4.1



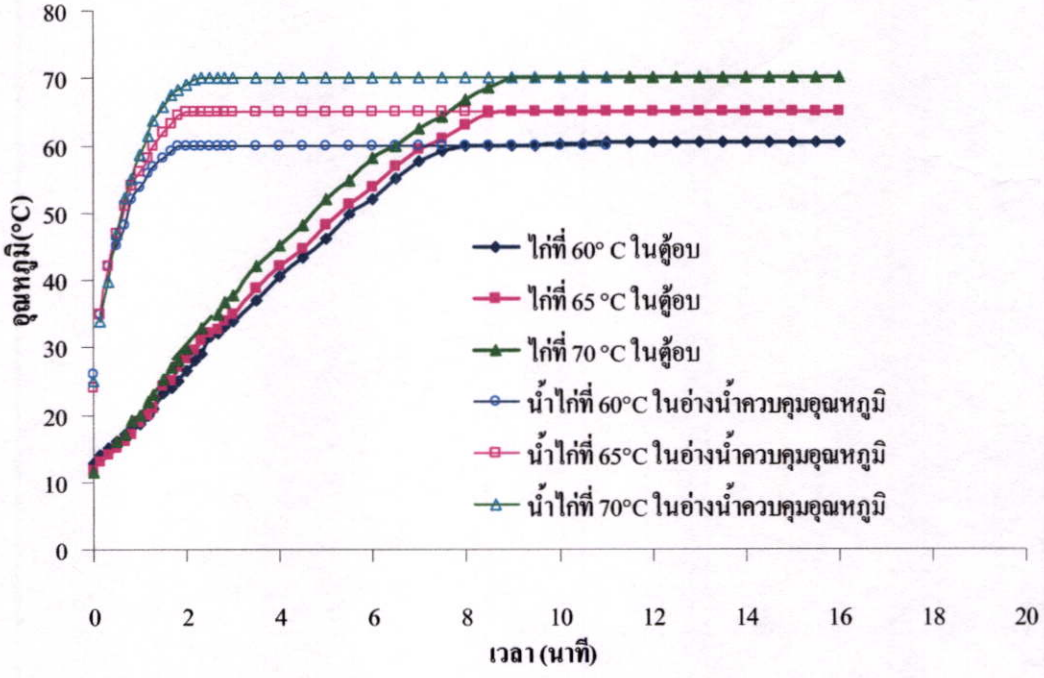
ภาพที่ 4.1 : Coming up time ของอุณหภูมิในตัวกลางที่ใช้ทดสอบการต้านทานความร้อน

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่กำหนดให้สูงขึ้น ระยะเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการจะนานขึ้น จึงส่งผลให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลง เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 28 องศาเซลเซียส เป็น 60 องศาเซลเซียส จำนวนเชื้อเริ่มต้นจะลดลงจาก 5.8 เป็น 5.6 log CFU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้นจะเท่ากับ 5.3 log CFU ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการตาย (lethal temperature) ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* เท่ากับ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Jay, 1992) ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิของตัวกลางให้ความร้อนสูงกว่าอุณหภูมิดังกล่าว จุลินทรีย์จะเริ่มสูญเสียกิจกรรมภายในเซลล์และตายลง การที่จุลินทรีย์ลดจำนวนลง 0.7 log CFU ภายในเวลา 2.3 นาที อาจเนื่องจากจุลินทรีย์บางตัวมีความอ่อนแอ ทำให้ถูกทำลายได้ง่าย

การเปลี่ยนองค์ประกอบของสารละลายจากน้ำไก่มาริเนตเป็นสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่พีเอชเท่ากับ 7.2 พบว่าระยะเวลาในการเพิ่มอุณหภูมิจาก 27 องศาเซลเซียส เป็น 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 2.2 นาที ซึ่งมีค่าน้อยกว่าการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำไก่มาริเนตเป็นเวลา 1 วินาที แสดงว่าตัวกลางหรือองค์ประกอบของสารละลายตัวอย่างที่แตกต่างกันส่งผลต่ออัตราการถ่ายเทความร้อนแตกต่างกัน (รุ่งนภา, 2535) โดยอัตราการถ่ายเทความร้อนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นแบบการพาความร้อน ซึ่งการกระจายความร้อนดีกว่าในน้ำไก่มาริเนต ดังนั้นเวลาในการให้ความร้อนจึงน้อยกว่า

4.2.2 ระยะเวลาในการให้ความร้อนด้วยตู้อบในสภาวะนิ่งและย่าง

จากผลการทดลองพบว่าระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่ไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส เท่ากับ 7.5-12 นาที แสดงดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 : การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในไก่มาริเนตที่ใช้ทดสอบการต้านทานความร้อน ณ อุณหภูมิควบคุมต่างๆ

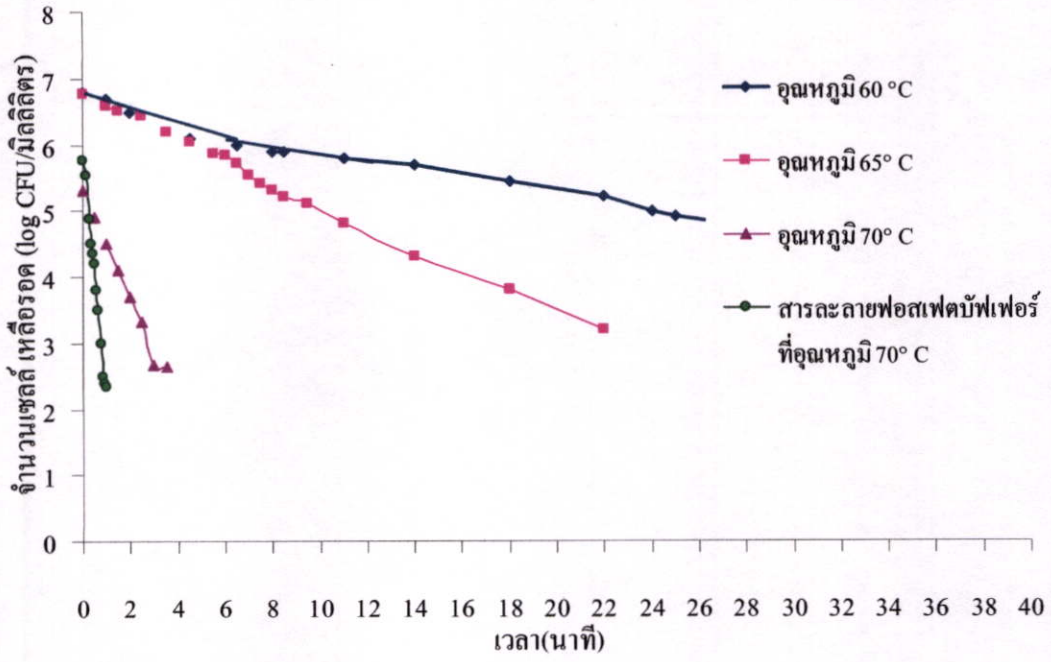
ระยะเวลาในการให้ความร้อนแก่ไก่มาริเนตในตู้อบจะให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ กล่าวคือเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่กำหนดให้สูงขึ้น ระยะเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการจะสูงขึ้นและส่งผลให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลง เมื่ออุณหภูมิเนื้อไก่เพิ่มจาก 15 องศาเซลเซียส เป็น 60 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลงจาก 9.6 เป็น 8.7 log CFU ต่อกรัม และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อลดลงเป็น 7.6 log CFU ต่อกรัม แสดงว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการตาย จุลินทรีย์จะเริ่มสูญเสียกิจกรรมภายในเซลล์และตายลง

การให้ความร้อนในตู้อบจะใช้ระยะเวลานานกว่าการให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิถึง 4 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากวิธีการให้ความร้อนแตกต่างกันมีผลต่อปริมาณความร้อนที่เกิดขึ้น การให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นการให้ความร้อนแบบเปียก (wet heat) ปริมาณความร้อนที่ได้รับจากการถ่ายเทความร้อนของน้ำจะค่ามากกว่าปริมาณความร้อนที่ได้รับจากการถ่ายเทความร้อนของอากาศภายในตู้อบ ซึ่งมีลักษณะเป็นความร้อนแบบกึ่งแห้ง (dry heat) ดังนั้นวิธีการให้ความร้อนที่แตกต่างกันจึงมีผลต่อระยะเวลาในการให้ความร้อนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ และส่งผลให้ค่าความร้อนจำเพาะของตัวอย่างหรือผลิตภัณฑ์ที่ทดลองแตกต่างกัน เนื่องจากค่าความร้อนจำเพาะจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้น (รุ่งนภา, 2535) นอกจากนี้การถ่ายเทความร้อนในการทดลองทั้ง 2 มีความแตกต่างกันโดยการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นแบบพาความร้อนซึ่งเป็นการถ่ายเทความร้อนที่รวดเร็ว แต่ในตู้อบเป็นการให้ความร้อนแบบกึ่งพาและนำความร้อน โดยไอน้ำจากตู้อบส่วนหนึ่งเป็นตัวกลางในการพาความร้อนสู่ผิวของอาหารซึ่งเป็นของแข็งและถ่ายเทความร้อนแบบนำความร้อนทำให้ประสิทธิภาพการกระจายความร้อนน้อยกว่าการให้ความร้อนจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (ทวีวัฒน์, 2539)

4.3 ความสามารถในการต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

4.3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอดในน้ำไก่มาริเนต โดยวิธีการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

เมื่อนำแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ ATCC 7644 ในน้ำไก่มาริเนต มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส และในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 : การรอดชีวิตของ *L. monocytogenes* ในน้ำไก่มาริเนต และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากผลการทดลองพบว่าในอาหารชนิดเดียวกันการให้ความร้อนที่อุณหภูมิแตกต่างกันมีผลต่อค่าความต้านทานความร้อนที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 11) โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถต้านทานความร้อนได้มากที่สุด โดยเส้นกราฟจะลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเทียบกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 และ 70 องศาเซลเซียส เนื่องจากความร้อนทำให้เซลล์จุลินทรีย์บาดเจ็บ และจากการศึกษาของ Gould (1989) สรุปว่าความร้อนมีผลต่อการทำลายดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ เยื่อหุ้มเซลล์ และการทำงานของเอนไซม์จำเพาะในเซลล์

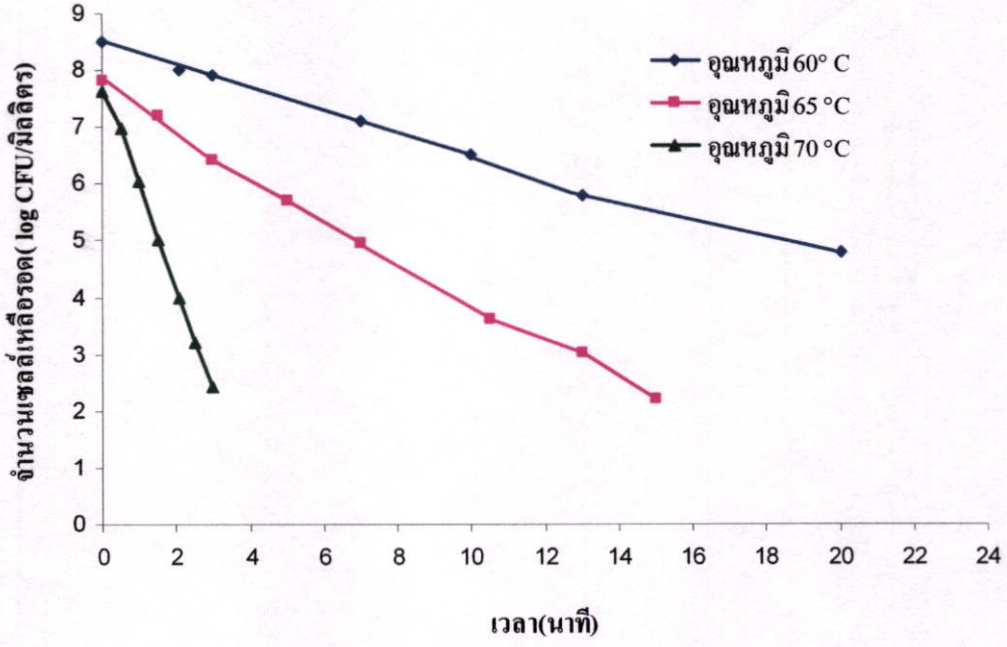
จำนวนเซลล์เริ่มต้น ณ อุณหภูมิ 60 และ 65 องศาเซลเซียส มีค่ามากกว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 70 องศาเซลเซียส อยู่ประมาณ 1 log cycle เนื่องจากระยะเวลาในการให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการมีค่าแตกต่างกัน หากใช้เวลาในการให้ความร้อนนานทำให้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นลดลง ซึ่งปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการต้านทานความร้อน (Jay, 1992) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นไม่เท่ากัน โดยปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่สูงกว่าไม่มีผลต่อความสามารถในการต้านทานความร้อนของเซลล์ *L. monocytogenes* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Colins-Thompson และ Bunning (1992) ได้ทดลองให้ความร้อนแก่แบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE โดยการให้ความร้อนแบบเปียก (wet heat) แล้วสรุปว่าอัตราการตายของแบคทีเรียในการให้ความร้อนแบบเปียกจะไม่ขึ้นกับปริมาณเซลล์เริ่มต้น แต่จะขึ้นกับการกระตุ้นเซลล์ด้วย

ความร้อนซึ่งทำให้เกิดกลไกบางอย่างขึ้นภายในเซลล์เพื่อป้องกันเซลล์จากการถูกทำลายด้วยความร้อนและมีผลต่อการต้านทานความร้อนมากกว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของเซลล์แบคทีเรีย ณ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในตัวกลางทั้งสอง พบว่าปริมาณเซลล์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะลดลงอย่างรวดเร็วกว่าในน้ำไก่มาริเนต ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำไก่มาริเนตมีส่วนผสมของชิ้นเนื้อไก่ที่ถูกปั่นผสมจนเป็นคอลลอยด์ ซึ่งประกอบด้วยไขมันและโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการปกป้องจุลินทรีย์จากความร้อน นอกจากนี้ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีปริมาณความร้อนมากกว่า เมื่อให้ความร้อนจึงทำให้จำนวนเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับในน้ำไก่มาริเนต

4.3.2 การเหลือรอดของเชื้อในไก่มาริเนต โดยวิธีการให้ความร้อนในตู้อบด้วยวิธีนึ่งและย่าง

การศึกษาการต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในตู้อบ โดยผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.4 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของการต้านทานความร้อนในสภาวะนึ่งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และเพื่อให้วิธีการให้ความร้อนใกล้เคียงกับในโรงงานอุตสาหกรรม



ภาพที่ 4.4 การรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในไก่มาริเนต ที่อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของเชื้อที่อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียสของทั้งสองวิธี พบว่าอัตราการเหลือรอดของเชื้อมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเมื่อให้ความร้อนในสภาวะนึ่งและย่างอัตราการตายของเซลล์แบคทีเรียจะสูงกว่าการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในการให้ความร้อนในตู้อบจนถึงอุณหภูมิที่กำหนดนานกว่า ทำให้เชื้อจุลินทรีย์บริเวณผิวของชิ้นไก่ได้รับความร้อนเป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้เซลล์อยู่ในสภาพบาดเจ็บ (cell injury) สูญเสียกิจกรรมและและตายลงในที่สุด เนื่องจากความร้อนจะทำลาย DNA endogenous nuclease หรือเอนไซม์จำเพาะในเซลล์ ทำลาย DNA และRNA (Gould, 1989) และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียสภาพ (ปรียา, 2528)

4.4 ค่า D ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

4.4.1 ค่า D ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในตัวกลางในสภาวะต่างๆ

ค่า D ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในตัวกลาง อันได้แก่ น้ำไก่มาริเนต ไก่มาริเนตและสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ตารางแสดงค่า D ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในน้ำไก่มาริเนต สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และไก่มาริเนต

ตัวอย่างอาหาร	อุณหภูมิ (°ซ)	ค่า D (นาที)			ค่า D เฉลี่ย (นาที)	ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95	
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่2	ครั้งที่3		ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด
น้ำไก่มาริเนต	60	15.0	16.1	16.5	15.9±0.78[a]	13.94	17.80
	65	5.3	6.4	6.0	5.9±0.55[b]	4.52	7.28
	70	1.2	1.1	1.2	1.2±0.33[c]	1.02	1.31
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	70	0.3	0.2	0.3	0.3±0.06	-	-
ไก่มาริเนต	60	7.7	5.98	6.24	6.6±0.93[a]	4.33	8.94
	65	2.90	2.91	2.92	2.9±0.01[b]	2.88	2.93
	70	0.60	0.55	0.56	0.6±0.26[c]	0.50	0.64

a b c ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.2 แสดงว่าค่า D ที่อุณหภูมิทั้ง 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสของไก่มาริเนตมีค่าเบี่ยงเบนมากที่สุดคือ $\pm$0.93 และมีค่าไม่แน่นอน (uncertainty) (ISO 19036, 2006) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มากที่สุดโดยที่ค่าต่ำสุดเท่ากับ 4.33 นาที และค่าสูงสุดเท่ากับ 8.94 นาที เมื่อเทียบกับค่าเฉลี่ย D ที่ได้จากการทดลองเท่ากับ 6.6 นาที แสดงว่ามีความเป็นไปได้ว่าค่า D ของเชื้อ *L. monocytogenes* อาจอยู่ในช่วงตั้งแต่ 4.33 -8.94 นาทีซึ่งมีความแตกต่างกันถึง 4.61 นาที อย่างไรก็ตามในการคำนวณหาเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อนเพื่อทำลายเชื้อในขั้นตอนการทดลองต่อไปได้พิจารณาใช้ค่าเฉลี่ย D จากการทดลองเท่ากับ 6.6 นาที ทั้งนี้เนื่องจากหากการทดลองใช้ค่าต่ำสุดของระดับความเชื่อมั่นอาจมีผลทำให้เกิดภาวะ under cooking และหากใช้ค่าสูงสุดของระดับความเชื่อมั่นอาจมีผลทำให้เกิดภาวะ over cooking ในผลิตภัณฑ์ได้ อีกทั้งการกำหนดเวลาในการให้ความร้อนที่เหมาะสมที่อุณหภูมิต่างๆจะกำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 7 log cycle ซึ่งได้พิจารณาจากปัจจัยความปลอดภัย (safety factor) จากเดิมที่มีการทดลองการยืนยันกระบวนการให้ความร้อนโดยกำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 5 log cycle (Codex, 2002)

ค่าเฉลี่ย D ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.3 นาที ซึ่งต่ำกว่าค่า D ที่อุณหภูมิเดียวกันในน้ำไก่มาริเนตซึ่งค่าเท่ากับ 1.2 นาที และในไก่มาริเนตมีค่าเท่ากับ 0.6 นาที ที่อุณหภูมิเดียวกันทั้งนี้เนื่องจากในน้ำมาริเนตมีส่วนผสมคือน้ำตาลและเกลือ โดยมีปริมาณของแข็งที่สามารถละลายน้ำ ($^{\circ}$Brix) เท่ากับ 13.6 เปอร์เซ็นต์ และ เกลือ 11.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10 ภาคผนวก ค) ปริมาณเกลือและน้ำตาลมีผลต่อการต้านทานความร้อนของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากทำให้น้ำอิสระในอาหารน้อยลง ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะเครียด ทำให้เซลล์จุลินทรีย์สามารถสร้างโปรตีนเพื่อต้านทานความร้อนได้ดี ทั้งนี้ Jorgensen และคณะ (1995) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จากร้อยละ 0.5 เป็น 4.0 จะทำให้ความสามารถในการต้านทานความร้อนของเชื้อเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่ม osmotic pressure ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เกิดสภาวะ osmotic shock ซึ่งจะกระตุ้นการสร้างโปรตีนชนิดพิเศษ เรียกว่า general stress protein หรือ *Gsps* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างและมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะเครียด โดยพบในสภาวะการให้ความร้อนหรือการลดลงของ a_w โปรตีนดังกล่าวคาดว่าจะทำให้เชื้อมีความต้านทานความร้อนเพิ่มขึ้น รายงานดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ นอกจากนี้ ค่าพีเอชของน้ำมาริเนตมีค่าเท่ากับ 7.6 ซึ่งอยู่ในสภาวะเป็นกลาง สภาพดังกล่าวจะเอื้อต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ โดย Stumbo (1973) สรุปว่าค่าความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์จะลดลงในอาหารที่มีกรดด่างต่ำและเพิ่มขึ้นในอาหารที่มีค่ากรดด่างเป็นกลาง

เมื่อเปรียบเทียบค่า D ของการให้ความร้อนทั้ง 2 วิธีพบว่าการให้ความร้อนในสภาวะนึ่งและย่างมีค่าต่ำกว่าความร้อนสภาวะนึ่งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ขัดแย้งกับ

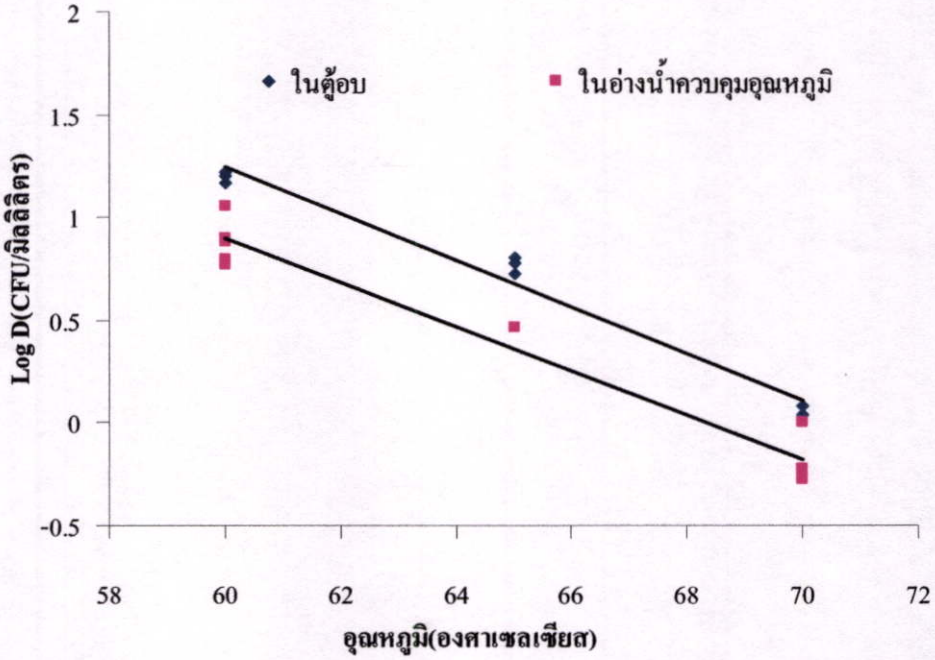
ข้อมูลของวิไล (2549) ที่กล่าวว่าหากต้องการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีลมร้อนต้องใช้เวลาในการให้ความร้อนที่นานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ที่น้อยลงอาจมีผลมาจากระยะเวลาในการให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่กำหนด โดยพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิจนถึงระดับที่ต้องการในสภาวะนึ่งและย่างในตู้อบ จะใช้เวลานานกว่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ที่ผิวไก่อยู่ในสภาพบาดเจ็บ (cell injury) และไม่สามารถทนความร้อนได้ ความร้อนทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบภายในเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แคตาเลสและเอนไซม์ซุปเปอร์ดิสมิวเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลายจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุพันธ์จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Gould, 1989) อย่างไรก็ตามการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของนิศานาถ (2543) ที่ทดลองหาความสามารถในการต้านทานความร้อนแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ NCTC 11994 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE ที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.0 พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 58 และ 60 องศาเซลเซียสคือที่ sub- lethal temperature และ lethal temperature จุลินทรีย์จะมีกลไกสร้างโปรตีนชนิดพิเศษคือ Gsps ซึ่งจะสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่เครียด แต่การให้ความร้อนที่ระดับดังกล่าวในระยะเวลานาน จุลินทรีย์ไม่สามารถต้านทานความร้อนได้ และจะสูญเสียกิจกรรมในที่สุด

จากข้อมูลการทดลองในน้ำไก่มาริเนตกับข้อมูลของ ICMSF (1996) พบว่า ค่า D จาก ICMSF ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในเนื้อไก่บดผสม มีค่าเท่ากับ 0.16-2.0 นาที ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ โดยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ค่า D ในน้ำไก่มาริเนตมีค่าเท่ากับ 1.2 นาทีและในไก่มาริเนตเท่ากับ 0.6 นาที ส่วนค่า D ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจากตาราง ICMSF ในเนื้อบดหมักเท่ากับ 16.7 นาที ซึ่งมากกว่าค่า D ที่ได้จากผลการทดลองในน้ำไก่มาริเนต ซึ่งมีค่าเท่ากับ 15.9 นาที และในไก่มาริเนตมีค่าเท่ากับ 6.6 นาที การที่ผลการทดลองมีความแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของตัวอย่างทดลองที่แตกต่างกัน ในน้ำไก่มาริเนตมีปริมาณของน้ำมากทำให้ค่าความจุความร้อนมากกว่าหรือปริมาณความร้อนในอาหารมีค่ามากกว่าซึ่งมีผลต่อค่า D หรือทำให้ความสามารถในการต้านทานความร้อนของเชื้อลดลง และในเนื้อบดมีลักษณะของเส้นใยและสัดส่วนมวลของโปรตีนที่มากกว่าเนื้อไก่ ซึ่งมีผลต่อค่าความร้อนจำเพาะของตัวอย่างทดลองหรือปริมาณความร้อนในเนื้อบดที่น้อยกว่าในน้ำไก่มาริเนต (ธนาคม, 2547)

นอกจากนี้สายพันธุ์ของแบคทีเรีย *L. monocytogene* ที่ใช้ศึกษาก็มีผลต่อการต้านทานความร้อนโดย Golden และคณะ (1988) ได้ศึกษาความสามารถในการต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ทั้ง 4 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TPB คือสายพันธุ์ Scott A, LCDC 81-861, DA-3 และ Brie-1 พบว่า ค่า D ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 7.4, 10.4, 5.7 และ 16.0 นาที ตามลำดับ ดังนั้นสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ที่แตกต่างกันทำให้ความสามารถในการต้านทานความร้อนแตกต่างกัน

4.5. ค่า z ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

ค่า z หมายถึง ช่วงอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ทำให้ thermal death time เปลี่ยนแปลงจากเดิม 1 log cycle หรือร้อยละ 90 ซึ่งค่า z จะสามารถหาได้จากการพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า log D และอุณหภูมิของการให้ความร้อนทั้ง 2 สภาวะ สามารถแสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ค่า z ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ไก่มาริเนตระหว่างการให้ความร้อนในสภาวะนึ่งและย่างในตู้อบ และการให้ความร้อนด้วยไอน้ำในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

จากผลการทดลอง ค่า z ในน้ำไก่มาริเนตด้วยวิธีทดสอบในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และในไก่มาริเนตโดยให้ความร้อนในสภาวะนึ่งย่างมีค่าเท่ากับ 8.85 และ 9.30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเมื่อทดสอบหาความแตกต่างของเส้นกราฟทั้งสองทางสถิติด้วยวิธีทดสอบ Anova พบว่าค่า z ที่ได้จากสภาวะการให้ความร้อนทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าจุลินทรีย์มีความไวต่อความร้อนไม่แตกต่างกันทั้งการให้ความร้อนในตู้อบ และในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Fain และคณะ, 1989) เนื่องจากหลักการถ่ายเทความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิและในตู้อบ มีหลักการที่คล้ายคลึงกัน โดยในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นการให้ควมร้อนแบบพาความร้อน เช่นเดียวกับการให้ความร้อนในตู้อบซึ่งเป็นการให้ความร้อนแบบผสมระหว่างการนำ, การพา และการแผ่รังสีความร้อน โดยหลักการให้ความร้อนในตู้อบดังกล่าวจะค่อนไปทางการพาความร้อนเนื่องจากมีไอน้ำส่วนหนึ่งเป็นตัวกลางในการถ่ายเทความร้อนสู่ผิวของอาหาร (ทวีวัฒน์, 2539)

4.6 ผลการ Validation เพื่อยืนยันกระบวนการให้ความร้อนของไก่มาริเนตด้วยสภาวะนึ่งและย่าง

4.6.1 ค่า F ที่อุณหภูมิต่างๆ

ค่า D ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจากการคำนวนมีค่าเท่ากับ 0.02 วินาที (ดังแสดงวิธีการคำนวณในภาคผนวก 3 ข) เมื่อนำไปคำนวนหาค่า F เพื่อกำหนดเวลาในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ลงเท่ากับ 7 log cycle ณ อุณหภูมิ 60, 65 ,70 และ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการให้ความร้อนเท่ากับ 46.5 ,20.4, 4.0 นาที และ 0.1 วินาที ตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงระยะเวลาในการให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการและค่า F ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ(°ซ)	เวลาเริ่มต้นจนถึง ณ อุณหภูมิที่กำหนด (นาที)	ค่า F จากสูตร (นาที)*	ค่า F จากการคำนวณ (นาที)**
60	7.5	46.5	53
65	8.0	20.4	27.5
70	8.5	4.0	11.5
100	12.0	0.1 (วินาที)	7.5

หมายเหตุ * จากสูตร $F = D(\log N_o - \log N)$ วิธีการคำนวณตามภาคผนวก 4ข

** จากสูตร $\log(RT-CT) = -t/f_h + \log(j(RT-IT))$

4.6.2 ผลการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของไก่มาริเนตหลังผ่านความร้อนในสภาวะนึ่งและย่างที่อุณหภูมิ 60, 65, 70 และ 100 องศาเซลเซียส

เมื่อนำไก่มาริเนตที่ปนเปื้อนแบคทีเรีย *L. monocytogenes* มาให้ความร้อนจนอุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นลดลงจาก 10^9 เป็น 10^8 CFU/ กรัม และเมื่อให้ความร้อนต่อไปที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 46.5 นาที ตามระยะเวลาที่คำนวณในการทำลายเชื้อลง 7 log cycle พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าวได้ (ตารางที่ 4.4) ทั้งนี้เนื่องจากการคำนวณค่า F เพื่อทำลายเชื้อลง 7 log cycle ในขณะที่ ณ เวลาเท่ากับ 0 นาทีมีเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 8 log cycle เมื่อต่อเวลาในการให้ความร้อนเพื่อทำลายเชื้อลง 8 log cycle หรือใช้เวลาเท่ากับ 54.1 นาที (วิธีการคำนวณในภาคผนวก 4ข) ซึ่งผลการทดลองตรวจไม่พบเชื้อ

ณ อุณหภูมิ 65 , 70 และ 100 องศาเซลเซียสตามลำดับ ตรวจไม่พบเชื้อ *L. monocytogenes* หลังผ่านความร้อน โดยที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ตรวจไม่พบเชื้อ *L. monocytogenes* ที่เวลา

เริ่มต้นนาทีที่ 0 เนื่องจากเชื้อถูกทำลายในช่วงระยะเวลาในการให้ความร้อนเริ่มต้น ดังนั้นเมื่อให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.0 วินาที จึงตรวจไม่พบเชื้อ *L. monocytogenes* หลังผ่านความร้อน

ตารางที่ 4.4 ผลวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาของไก่มาริเนตที่ผ่านความร้อนในสภาวะนิ่งและย่าง ที่อุณหภูมิ 60 , 65 , 70 และ 100 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (°ซ)	จำนวนแบคทีเรีย *L. monocytogenes* (CFU/ กรัม)		
	ที่เวลาเริ่มต้นก่อนผ่านความร้อน	เวลา ณ อุณหภูมิที่กำหนด	ที่ F จากสูตร
60	6.8×10^{9}	8.8×10^{8}	ตรวจพบ
65	5.4×10^{9}	9.3×10^{7}	ตรวจไม่พบ
70	7.1×10^{9}	8.7×10^{7}	ตรวจไม่พบ
100	6.6×10^{9}	ตรวจไม่พบ	ตรวจไม่พบ

หมายเหตุ F จากสูตรคำนวณจาก $F = D(\log N_0 - \log N)$

อย่างไรก็ตามการให้ความร้อน ณ อุณหภูมิ 60, 65 ,70 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาเท่ากับ 46.5 ,20.4, 4.0 นาที และ 0.1 วินาที เพื่อทำลายเชื้อที่ 7 log cycle (ตามตารางที่ 4.3 ค่า F จากสูตร) พบว่าค่า F ที่ได้จากสูตรไม่ใช่ค่า F ที่แท้จริง เนื่องจากเวลาในการให้ความร้อนต้องเริ่มต้นจาก lethal rate คือที่เวลาเริ่มต้นจนถึงอุณหภูมิที่กำหนด (come up time) ดังนั้นจากการทดลองที่อุณหภูมิ 60, 65 ,70 และ 100 องศาเซลเซียส เวลาในการให้ความร้อนทั้งหมดเท่ากับ 54, 28.4, 12.5 นาที และ 12.1 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับค่า F จากการคำนวณ (ตารางที่ 4.3) โดยใช้หลักการการแทรกผ่านความร้อนด้วยการคำนวณเวลาเริ่มต้นของการฆ่าเชื้อที่แก้ไขแล้ว(corrected zero, CZ) (ไพบูลย์, 2532) โดยคำนวณค่า F จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ จะได้ค่า F ที่อุณหภูมิ 60-100 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 4.3 ซึ่งการอินทิเกรทรวมกับ come up time จะทำให้ได้ค่า F ที่แตกต่างจากค่า F จากการคำนวน โดยเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อที่ 7 log cycleที่อุณหภูมิเท่ากับ 60 และ 65 องศาเซลเซียสมีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยคือเท่ากับ 0.6 นาที แต่เมื่ออุณหภูมิในการอบย่างสูงขึ้น เป็น 70 และ 100 องศาเซลเซียส ค่า F ที่ได้มีค่าแตกต่างกันมากขึ้นโดยมีผลต่างถึง 7.5 นาที อย่างไรก็ตามค่า F จากสูตรเมื่อรวม come up time พบว่ามีค่ามากกว่าค่า F จากการคำนวณ ซึ่งผลการทดลองตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่เหลือรอด (ตารางที่4.4) พบว่าผลที่ได้มีความสอดคล้องกัน เนื่องจากอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสจะไม่พบเชื้อเมื่ออุณหภูมิเนื้อไก่มาริเนตถึงอุณหภูมิที่กำหนด ทั้งนี้อาจมีผลมากจากช่วงเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนก่อนถึงอุณหภูมิที่กำหนดใช้เวลา 12 นาทีซึ่ง

เวลาดังกล่าวมีผลต่อการทำลายเชื้อเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการตาย (lethal temperature) ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ที่อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส (Jay, 1992) ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิดังกล่าว จุลินทรีย์จะเริ่มสูญเสียกิจกรรมภายในเซลล์และตายลง

ผลการทดลองสอดคล้องกับการกำหนดค่าทางทฤษฎีคือค่า F ที่ต้องการลดเชื้อที่ 7 log reduction ซึ่งก่อนการตรวจนับโคโลนีด้วยวิธี pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Palcam มีการนำชิ้นเนื้อบ่มในอาหารเหลว TSBYE ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบอาหารมีความขุ่น เนื่องจากตัวอย่างไก่ที่ใช้ทดลองไม่ผ่านการฆ่าเชื้อก่อนจึงมีโอกาสที่เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆสามารถเจริญได้ และการให้ความร้อนจากการคำนวณค่า F ไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด ดังนั้นการคำนวณหาค่า D และ F จะเป็นการทำนายความเป็นไปได้ที่เชื้อจุลินทรีย์จะเหลือเพียง 1 เซลล์จากอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวิไล (2543) ที่ระบุว่าในทางทฤษฎีไม่สามารถทำลายแบคทีเรียให้เหลือ 0 ได้ ตามแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเหลือรอดของจุลินทรีย์และเวลาในการให้ความร้อน โดยจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดจะถูกพลอทบนแกน log ดังนั้นปริมาณเซลล์ที่เหลือน้อยที่สุดจะเท่ากับ 1 เซลล์ ซึ่งจากผลการทดลองเมื่อนำมานับเซลล์ในอาหาร Palcam ด้วยวิธี pour plate ผลการทดลองตรวจไม่พบเชื้อ *L. monocytogenes* เนื่องจากวิธีการนับเซลล์จะมีการเจือจางที่ระดับ 10^{-1} ดังนั้นจึง อาจมีเซลล์ที่ยังเหลือรอดในสารละลายเจือจาง

อย่างไรก็ตาม Cole และ คณะ (1990) รายงานว่าเซลล์ *L . monocytogenes* ที่ผ่านความร้อนอาจทำให้เซลล์บาดเจ็บไวต่อสารที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective media ซึ่งนิยมใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นและเอื้ออำนวยให้เฉพาะแบคทีเรียที่ต้องการตรวจนับจำนวนเจริญ ทำให้อาจตรวจไม่พบ *L. monocytogenes* ที่บาดเจ็บในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ซึ่งในการทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Palcam ที่มีสารยับยั้งคือ Acriflavin hydrochloride เป็นส่วนประกอบ แต่จากการทดลองพบว่าเซลล์ที่ผ่านความร้อน เมื่อตรวจนับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective media คือ Palcam agar หรือชนิด completed media ได้แก่ TSA-YE จะให้ผลการทดลองใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการทดลองของนิศานาถ (2543) ที่ได้ทดลองนำเซลล์ *L. monocytogenes* ที่ผ่านความร้อน และเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 มาตรวจนับในอาหารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว ซึ่งผลการตรวจนับได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ค่า D ของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 ที่อุณหภูมิ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียสด้วยวิธีการนึ่งในน้ำไก่มาริเนต มีค่า 15.9, 5.9 และ 1.2 นาที ตามลำดับ และมีค่า z เท่ากับ 8.85 องศาเซลเซียส ส่วนค่า D ของเชื้อในไก่มาริเนตที่ผ่านความร้อนสภาวะนึ่งและย่างในตู้อบ มีค่าเท่ากับ 6.6, 2.9 และ 0.6 นาที ตามลำดับ และมีค่า z เท่ากับ 9.30 องศาเซลเซียส

สภาวะและตัวกลางในการให้ความร้อนมีผลต่อค่า D ของจุลินทรีย์ แบคทีเรีย *L. monocytogenes* จะมีความไวต่อการให้ความร้อนในสภาวะการนึ่งและย่างได้ดีกว่าวิธีการนึ่งเพียงอย่างเดียว

การยืนยันผลการทดลองโดยให้ความร้อนไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ 60 ถึง 100 องศาเซลเซียส ในสภาวะนึ่งและย่างในตู้อบโดยการกำหนด F_0 ที่ 7 log reduction มีค่าตั้งแต่ 0.1 วินาที ถึง 46.5 นาที พบว่าประสบผลสำเร็จตามการคำนวณ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อและสารละลายเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นควรทดลองโดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของสารละลายเซลล์ OD ที่ 600 นาโนเมตร และจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อใช้เป็นมาตรฐานในการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ โดยค่า OD ที่ 600 นาโนเมตรไม่ควรเกิน 0.7 เนื่องจากแบคทีเรียที่มีความหนาแน่นเกินไปจะทำให้แสงที่ถูกหักเหไปแล้วถูกหักเหกลับเข้ามาใหม่ ทำให้ค่าการดูดกลืนต่ำกว่าความเป็นจริง และไม่เป็นสัดส่วนกับจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ (วัฒนาลัยและสรวง, 2536)

5.2.2 ก่อนการทดลองควรตรวจสอบกลไกและระบบควบคุมต่างๆของเครื่องมือวัดและอุปกรณ์ที่ให้ความร้อนให้สามารถทำงานเป็นปกติ โดยจะต้องมีการสอบเทียบ และ thermocouple ที่ใช้ต้องมีความทนทานต่อสภาวะการให้ความร้อน และต้องสามารถตรวจสอบอุณหภูมิซ้ำได้

5.2.3 ในการศึกษาการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์โดยการหาค่า D ซึ่งศึกษาในหลอดทดลอง ควรลดปัจจัยต่างๆที่อาจมีผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายเทและการแทรกผ่านความร้อน คือ กำหนดปริมาตรตัวอย่างน้ำไก่มาริเนตให้น้อยสุด และหลอดทดลองควรมีขนาดเล็กที่สุด

5.2.4 การศึกษาการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเหลือรอดของจุลินทรีย์และเวลาในการให้ความร้อน หากกราฟที่ได้มีลักษณะเป็นหาง (tailing shape) อาจเกิดจากการตกตะกอนระหว่างโปรตีนกับของเหลวในหลอดทดลองซึ่งช่วย

ป้องกันไม่ให้ความร้อนเข้าทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ หรือเกิดจากเซลล์จับตัวเป็นก้อน ดังนั้นควรมีการเขย่าหรือคนให้ตะกอนและสารละลายเซลล์กระจายก่อนที่จะเริ่มให้ความร้อน

5.2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ selective media เช่น Palcam และ Oxford พบว่าแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ที่อยู่ในสภาวะทีอ่อนแอ หรือบาดเจ็บจะไม่สามารถเจริญได้ แต่จะต้องเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSYEA (Tryptic soy agar + 0.6% yeast extract) ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่จำเพาะต่อการเจริญ (nonselective enumeration agar) (Augustin และคณะ ,1998)

5.2.6 ไก่ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองจะต้องไม่มีสารเคมีตกค้างเช่น คลอแรมฟีนิคอล หรือยาปฏิชีวนะ เนื่องจากสารดังกล่าวอาจมีผลต่อการต้านทานความร้อนของแบคทีเรีย ซึ่ง กมลวรรณ (2542) รายงานว่า สารคลอแรมฟีนิคอลมีคุณสมบัติยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์จุลินทรีย์ที่ช่วยในการต้านทานความร้อน

บรรณานุกรม

กมลวรรณ ปรารถนาดี. 2541 ."การปรับตัวของ *E. coli 0157 : H7* ต่อสภาพกรดและความร้อนในอาหารประเภทกรด" . ใน**สัมนาปริญญาโท** . คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. น.30-37

ธนาคม สุนทรชัยนาคแสง. 2547 . กรุงเทพ ฯ.ท้อป แปลจาก แจ็ค พี ฮอลแมน. การถ่ายเทความร้อน. น. 2-160

ดวงพร คันธโชติ. 2537. **อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ**. กรุงเทพฯ. โอเดียนสโตร์ . น . 119-156

ทวีวัฒน์ สุภารส. 2539. "การถ่ายเทความร้อน." หน้า 29-47. **ในเอกสารประกอบคำสอนการถ่ายเทร้อน**. ภาควิชาครุศาสตร์เครื่องกล. คณะวิศวกรรมศาสตร์ .มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ

ทนง ภัครัชพันธุ์. 2524. **การใช้ความร้อนในขบวนการแปรรูป**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. น.1-160

นันทนา อรุณฤกษ์. 2537. **การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรปส์**. มหาวิทยาลัยบูรพา. กรุงเทพ ฯ. น. 208-412

นิศานาถ ตัณฑัยย์. 2543. "ผลของความร้อนและโซเดียมคลอไรด์ต่อการอยู่รอดของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลพร้อมบริโภค." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. น.7-45

บุษกร อุตรภิชาติ. 2547. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. น.179-206

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. 2528. จุลิชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. น. 210-247

ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก. 2532. กรรมวิธีการแปรรูปอาหาร . สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. น. 181-187

มาลินี ตันติยาภรณ์. 2541. **พันธุศาสตร์จุลินทรีย์**. ครั้งที่ 2. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สจล. กรุงเทพฯ. น. 80

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2535. **วิศวกรรมแปรรูปอาหาร**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. น.2-42

เรณู ทวิชชาติวิทยากูล. 2540. "ความสำคัญของ *Listeria monocytogenes* ในอุตสาหกรรมอาหาร." **วารสารสถาบันอาหาร**. 2 (2):น.27-28

วราวุฒิ ครูส่ง. 2539. **การถนอมและการแปรรูปอาหาร**. สาขาวิชาคหกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช. กรุงเทพฯ. น.25-66

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. **คู่มือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ** ., เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย.กรุงเทพ ฯ. สาธารณสุขมูลฐานอาเซี่ยน. น. 1-1.7

วิไล รังสาดทอง. 2543. **เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร** . ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. กรุงเทพฯ. เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น. น.125-165

ศิวาพร ศิวเวชช. 2542. **การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร**. ครั้งที่ 5 ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. กรุงเทพฯ. น.48-56

สาวิตรี วทัญญูไพศาล. 2546. "ผลของการให้ความร้อนด้วยเตาอบไมโครเวฟต่อการทำลายเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อวัวบดที่มีการเติมสารปรุงแต่งรสอาหาร." **วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ**. น.4:58-64

สุมาลี เหลืองสกุล. 2539. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. ครั้งที่ 4. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร. กรุงเทพ ฯ. น.75-95

สุวิมล กีรติพิบูล . 2548 . " การควบคุม *Listeria spp.* ในผลิตภัณฑ์อาหารโดยใช้ระบบ GMP และ HACCP." **สัมนาวิชาการเรื่องความเสี่ยงของอาหารจากการปนเปื้อนแบคทีเรีย Listeria ในสิ่งแวดล้อม**.: คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ ฯ.

Allwood, M. C. and A. D. Russell. 1967. "Mechanism of thermal injury in *S. aureus* relationship between viability and leakage.'' **J. Appl. Microbiology**. 15 : 1266-9

American can company. Food research. Available from : http://fao.org/DOCREP/003/R6918E/R6918E02.HTM [September 29,2006]

AOAC. 1995. **Official method of analysis**. Association of official analytical chemist.16th ed.,Washington, D.C. 1298 p.

Augustin ,J.C., V.Carlier and J.Rozier. 1998 . " Mathematical modeling of heat resistance of *Listeria monocytogenes* ." **J. Appl. Microbiology** . 84 : 185-191.

BAM.1984 . **Bacteriological Annual of the Division of Microbiology Center for Safety and Applied Nutrition** , U.S. Food and Drug administration, USA.223 p.

Bille, J.1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe foodborne listeriosis, Amsterdam: Elsevier, pp.71-74. *Cited by* Jay J.M. Modern food microbiology. 4th ed. Chapman & Hall, New York, 701 p.

Brackett,R.E. 1988."Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water." **Food .Techno.** 42 (4) : 162-164.

Buchnan,R.L., H.G.Stahl and R.C.Whiting, 1989 . "Effects and interaction of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes.*" **J. Food Prot.** 52 (12) : 844-851.

Bunning,V.K., R.G.Crawford , J.T.Tierney and J.T.Peeler. 1990."Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock." **Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 3216-3219.

Codex Alimentaries Commission .2002 . **Validation of food hygiene control measures.** Thirty-fifth session. Washington, D.C. United States of America.

Cole,M.V, Jones and C.Holyoak. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeris monocytogenes*, J. Appl. Bacteriol. 69: 63-72

Collins-Thompson, D.L. and V.K.Bunning. 1992, "Thermoduric microorganism and heat resistance measurement ." In Vanderzants, C. and D.F. Spilittstoesser. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Amer. Pub. Health ass., Washington. 121p.

Conner, D.E., R.E.Brackett and L.R. Beuchat. 1986. "Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice." **Appl. Environ. Microbiol.** 52 : 59-63.

Department of bacteriology. 2006. Control of microbes, University of Wisconsin-Madison . [Online].Available from : http://www.bact.wisc.edu/Microtextbook/index.php?name=Section&req [March21 ,2006]

Doyle, M.E. 1999 . Survey of the various techniques used in *Listeria* intervention . **Lett. Food Research Institute** , University of Wisconsin-Madison : 9-12.

EU commission regulation . "Microbiological criteria for foodstuffs". (EC) No.2073/2005 of 15 November 2005

El-Kest, S.E., A.E.Yousef and E.H.Marth. 1991. "Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms. A review." **J. Food Prot.** 55 (8) : 639-648.

Estela, L.A., J.N. Sofos and B.B.Flores. 1991. " Bacteriophage typing of *Listeria monocytogenes* culture isolated from seafood." **J. Food Prot.** 55 (1) :13-17.

Fain, A.R., J. E. Line, A.B.Moran, L.M.Martin, R.V.Lechowich, J.M.Carosella and W.L.Brown. 1989. "Lethality of heat to *Listeria monocytogenes* Scott A D value and z value determinations in ground beef and turkey." **J. Food Prot.** 54 (10) :756-761.

Farber, J.M. and B.E.Brown. 1990. "Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat." **Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 1584-1587.

Farber, J.M. and P.I.Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes* , a food-borne pathogen. **Microbiol. Rev.** 55 : 476-511.

Faber, J.M. and F.Pagotto. 1992. "The effect of acid shock on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*." **Lett. Appl. Microbiol.** 15 (5) : 197-201.

Fleming. D.W., S.L.Cochi, K.L.MacDonald, J.Brondum, P.S.Hayes, B.D.Pikayis, M.B.Holmes, A.Audurier, C.V.Broome, and A.L.Reingold, 1985. Pasteurize milk as vehicle of infection in and outbreak of listeriosis. N.Engl. J.of. Med. 312 (7) : 44-407. *Cited by* Jay,J. M. Modern Food Microbiology. 4th ed.Chapman & Hall, New York. 701 p.

Heid,J.L. and M.A.Joslyn, 1967. Fundamentals of food processing operation . The AVI Publ. Co., Westport Conn : 580 p.

Frazier,W.C. and D.C.Westhoff. 1988. **Food microbiology.** 4th ed. McGraw-Hill. New York, Sydney. 341 p.

Food and Drug Administration. 1992. **Bacteriogical analysis manual.** 7th ed. AOAC Int., Arlington. 529 p.

Golden,D.A., L.R.Beuchat, and R.E.Brackett. 1998. "Interactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing." **Food Microbial.** 5 : 17-23.

Gould,G.W.1989. "Heat-Induced injury and inactivation." **Mechanism of action of food preservation procedure**. Unilever research laboratory., Sharnbrook. Elsvier Science publisher. Befford .11-33.

Gray,M.L. and A.H.Killinger. 1966. "*Listeria monocytogenes* and listeric infections ." Bacteriol. Review 30 : 309-82. *Cited by* Jay, J.M. Modern food microbiology. 4th ed. Chapman & Hall, New York. 701 p.

Heid,J. L. and M.A.Joslyn. 1967. **Fundamentals of food processing operation**. The AVI . Westport Conn. 580p.

Huang,L . 2004 . "Thermal resistance of *Listeria monocytogenes , Salmonella Heidelberg , Escherichia coli 0157:H7* at elevated temperatures." **J. Food Prot.**. 67(8) : 1666-1670 .

ICMSF 1996 . **Microorganism in food's characteristic of microbial pathogen** . Academic Press. New York. 311 p.

International Standard 1998 . **Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* part 2 Enumeration method** . ISO 11290-2 : 13-18.

International Standard 2006 . **Microbiology of food and animal feeding stuffs-Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations**. ISO/TS 19036 :2006.

Jay, J. M. 1992. **Modern food microbiology**. 4th ed. Chapman & Hall, New york. 701 p.

Jorgensen, F., P.J.Stephens and S.Knochel. 1995. "The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*." **J. Appl. Bacteriol**. 79 : 274-281.

Juneja,V.K. and B.S.Eblen. 1999. "Predictive thermal inactivation model of *Listeria monocytogenes* with temperature pH, NaCl and sodium pyrophosphate as controlling factor." **J. Food Prot.** 62 (9) : 986-993.

Linan, M.J., L.Mascola, X.D.Lou, V.Goulet, S.May, C.Salminen, D.W.Hird, M.L.Yonekura, P.Hayers, R.Hayers, R.Weaver, A.Aduurier, B.D.Plikaytis, S.L.Fannin, A.Kleks and C.V.Broome. 1988. "Epidemic listeriosis associated with Maxican style cheese." N. Engl. J of Med. 319(13) : 823-8.. *Cited by* Jay,J.M.. Modern food microbiology. 4th ed. Champman & Hall, New York. 701 p.

Linton,R. H., M.D.Pierson, and J.R.Bishop. 1990. "Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock." **J. Food Prot**. 53 : 924-927.

Linton, R.H., J.B.Webster, M.D.Pierson, J.R.Bishop and C.R.Hackney. 1992. "The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A." **J. Food Prot**. 55 : 84-7.

Lou, Y. and A.E.Yousef. 1997. "Adaptation to sublethal environmental stress protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors." **Appl. Environ. Microbiol**. 63 : 1252-1255

MacCathy, S.A. 1997. "Incidence and survival of of *Listeria monocytogenes* in ready to eat seafood products." **J. of Food Prot**. 60 (4) : 352-356

Mackey, B.M., C.Pritchet, A.Norris, and G.C.Mead, 1990. "Heat resistance of Listeria strain differences and effects of meat type and curing salts. **Lett.Appl. Microbiol**. 10: 251-255.

Marshall, D.L. and R.H.Schmidt. 1988. "Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk pre incubated with selected Pseudomonas." **J. Food Prot**. 51:277-282

Murphy R.Y.2004. "Thermal inactivation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ground chicken thigh/leg meat and skin . **J. Poultry science** .83 : 1218-1225.

Murray, E.G.D., R.A.Webb, and M.B.R.Swarm. 1926. "A disease of rabbits characterized by a hitherto undescribed Bacillus Bacterium Monocytogenes." J. of Pathol. Bacteriol. 29 : 407-439. *Cited by* Roberts,T.A., A.C.Baird-Parker and R.B. Tompkin. 1996. Microorganism in foods 5 : Microbiological specification of food pathogens. Blackie Academic & Prof., New York. 513 p.

Myrseth A. Canning pronciples. Fishery Industries Division of FAO. New Zealand . [Online]. Available from www.nzifst.org.nz/unitoperations/httrapps2.htm [September29,2005]

Pagan, R., S.Condon,. and F.S.Sala. 1997. "Effects of several factors on heat shock induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*." **Appl. Environ. Microbiol**. 63 : 3225-3232

Palumbo, S.A. and A.C.Williams, 1990. " Effect of temperature relative humidity and suspending menstrual on the resistance of *Listeria monocytogenes* to drying." **J. Food Prot.** 53 (5) : 357-381

Piette,G. 2002 . Process validation for safety. Food research and development centre. Agriculture and Agri-Food. Canada.[Online]. Available from : http://www.ifis.co.uk/forum/Sept_2002/validation.html [September12,2004]

Reichart, O. and C.Mohascsi-Farkas. 1994. Mathematical modeling of combined effect of water activity, pH and redox potential on the heat destruction. Int. J. Food Microbiol. 24 : 103-112. *Cited by* Juneja,V.K. and B.S. Bblen. 1999. Predictive thermal inactivation model for *Listria monocytogenes* with temperature, pH, NaCl and sodium pyrophosphate as controlling factor. J. Food Prot. 62(9) : 986-999.

Robert,T.A., A.C.Baird-Park and R.B.Tompkin. 1996. **Microorganism in Food.** Blackie Academic & Prof. , New York. 513 p.

Samelis,J. and J.Metaxopoulos. 1999 . "Incidence and principle sources of *Listeria spp.* And *Listeria monocytogenes* contamination in processed and a meat processing plant ." **J. Food Microbiol** .16: p. 456-477.

Schoeni, J.L., K.Brunner, and M.P.Doyle. 1991. "Rates of thermal in beef and fermented breaker sausage." **J. Food Proc.** 54 (5) : 334-337.

Seeliger,H.P.R. and D.Jones. 1986. *Listeria* p.1235. **In P.H.A. Sneath, Bergey's manual of systematic bacteriology**, Vol.2 Williams and Wilkins : Baltimore , MD.1235-1245.

Stumbo,C.R. 1973 .**Thermobacteriology in food processing** .2nd ed .Academic Press Inc., London : 55 p.

Sumner, S.S. 1991. "Heat resistance of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in sucrose solution of various water activities." **Journal of food science.** 56(6) : 1741-1743

Tompkin,R.B. 2005 . The risk of product contamination from *Listeria* in the food processing environment . **In seminar of 3M Microbiology** at Central Sofitel hotel

Tucker,G. S. and R.Philip. 2001. Validation of heat process. **Thermal technologies in food processing.** Wood head publishing. 75-77.

Walker, S. J., P.Archer and J.G. Banks. 1990. "Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature." **Appl. Microbiol.** 30:29-32

Wong, H.C., W.L.Chao and S.J.Lee. 1990 . "Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan." **Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 3101-3104.

ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายเซลล์ *Listeria monocytogenes* และผลการทดสอบความบริสุทธิ์แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes*

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 การเตรียม Dilution Fluid (DF)

ส่วนประกอบ

Bacto dilution fluid	9.5	กรัม	(Difco, France)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร	

ผสมสารในน้ำกลั่นให้เข้ากัน เทใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Trypticase soy agar ที่มี Yeast extract ร้อยละ 0.6 (TSA-YE)

ส่วนประกอบ

Trypticase soy agar	45.0	กรัม	(Difco , France)
Yeast extract	6.0	กรัม	(Merck , Germany)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร	

ชั่งสาร TSA ซึ่งเตรียมสำเร็จแล้วเติม Yeast extract ละลายส่วนผสมทั้งหมดผสมโดยการต้มให้เดือดและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Trypticase soy broth ที่มี Yeast extract ร้อยละ 0.6 (TSB-YE)

ส่วนประกอบ

Trypticase soy broth	30.0	กรัม	(Difco , France)
Yeast extract	6.0	กรัม	(Merck , Germany)
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร	

ชั่งสาร TSA ซึ่งเตรียมสำเร็จแล้วเติม Yeast extract ละลายส่วนผสมทั้งหมดผสมโดยการต้มให้เดือดและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

<u>หมายเหตุ</u>	Trypticase soy broth	30.0	กรัม
ประกอบด้วย			
	Tryptone (pancreatic digest of casein)	17.0	กรัม
	Soytone (papaic digest of soybean meal)	3.0	กรัม
	Dextrose	2.5	กรัม
	Sodium chloride	5.0	กรัม
	Dipotassium phosphate	2.5	กรัม

1.4 Palcam (Merck , Bermany)

ส่วนประกอบ

1.4.1 Palcam agar base

Columbia blood agar base	39.00	กรัม
Yeast extract	3.00	กรัม
Glucose	0.50	กรัม
Aesculin	0.80	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.50	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Lithium chloride	15.00	กรัม

1.4.2 Palcam selective supplement

Polymixin B	5.0	มิลลิกรัม
Acriflavin hydrochloride	2.5	มิลลิกรัม
Ceftazidime	10.0	มิลลิกรัม

ชั่ง Palcam agar base 34 กรัมในน้ำกลั่น 0.5 ลิตรต้มในน้ำเดือด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้ววางทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิลดลงเป็น 50 องศาเซลเซียส เติม Palcam selective supplement 1 vial ที่เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 มิลลิลิตรต่อ Palcam agar base 0.5 ลิตร

1.2 การทดสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

1.2.1 การย้อมแกรม

สารเคมีที่ใช้

สีย้อมแกรมคริสตัลไวโอเล็ต

สีย้อมแกรมสารละลายไอโอดีน

สีย้อมแกรมสารละลายซัฟรานิน โอ

ร้อยละ 95 เอทธานอล

หยดน้ำลงบนกระจกสไลด์สะอาด 1 หยดและใช้ลูปเขี่ยโคโลนีโดยเกลี่ย (สเมียร์)ให้กระจายทั่วหยดน้ำแล้วรอจนแห้งจากนั้นนำมาผ่านเปลวไฟ 3-4 ครั้ง (ด้านตรงข้ามรอยสเมียร์) รอจนหายร้อนและหยดสีย้อมแกรมคริสตัลไวโอเล็ตให้ท่วมรอยสเมียร์ นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำไหลเบา ๆ ประมาณ 2-3 วินาทีหลังจากนั้นหยดสีย้อมแกรมสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์นาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำไหลเบา ๆ ประมาณ 2-3 วินาทีเอียงแผ่นกระจกสไลด์ หยดร้อยละ 95 เอทธานอลให้ไหลผ่านรอยสเมียร์ ไม่เกิน 30 วินาที หยดสีย้อมแกรมสารละลายซัฟรานินโอให้ท่วมรอยสเมียร์นาน 10 วินาที ล้างด้วยน้ำไหลเบา ๆ ซับให้แห้ง หรือปล่อยให้แห้งเอง หลังจากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ลักษณะเซลล์แบคทีเรีย *L. monocytogenes* จะติดสีแกรมบวก รูปท่อน สั้น ปลายมน

2. ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ATCC 7644 โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี test kit microbact 12 L(TECRA)

จาก ผลการทดลองภาพที่ ก.1 แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* มีความบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ หรือ สรุปว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบเป็นแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* บริสุทธิ์

TECRA® LISTERIA BIOCHEMICAL ID TEST SYSTEM

REPORT FORM

SAMPLE ID: - DATE : 12/12/48

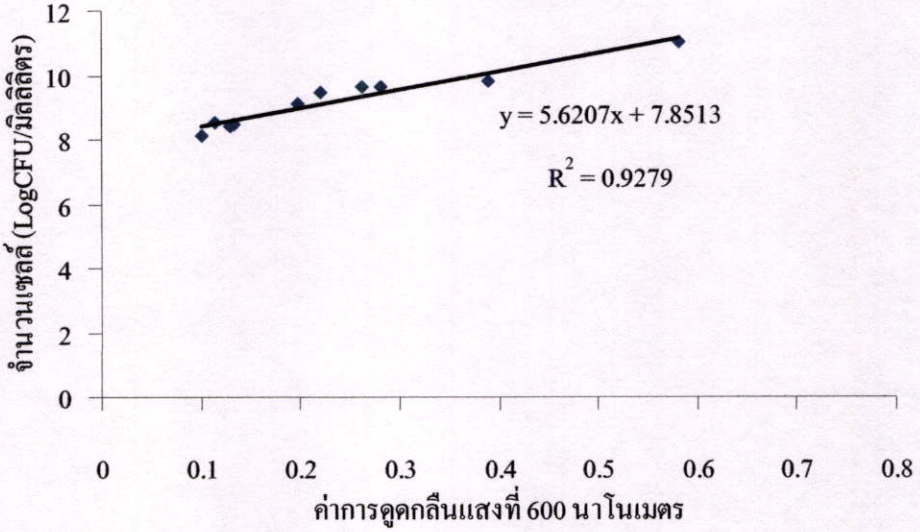
LAB reference :-

Well number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reaction	AECULIN	MANNITOL	XYLOSE	ARABITOL	RIBOSE	RHAMINOSE	TREHALOSE	TAGATOSE	GLUC-1-PLUS	M-D-GLUC	M-D-MAN	HEMOLYSIS
Result	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Reaction index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of positive reaction	4			5			5			7		

Profile number: 99% *Listeria monocytogenes*

ภาพที่ ก.1 ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ทางชีวเคมี

3. กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่น (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และจำนวนเซลล์ ที่ระดับเจือจางต่างๆ (OD standard curve)



ภาพที่ ก.2 กราฟ OD มาตรฐานที่ 600 นาโนเมตรต่อปริมาณเซลล์ *L monocytogenes*

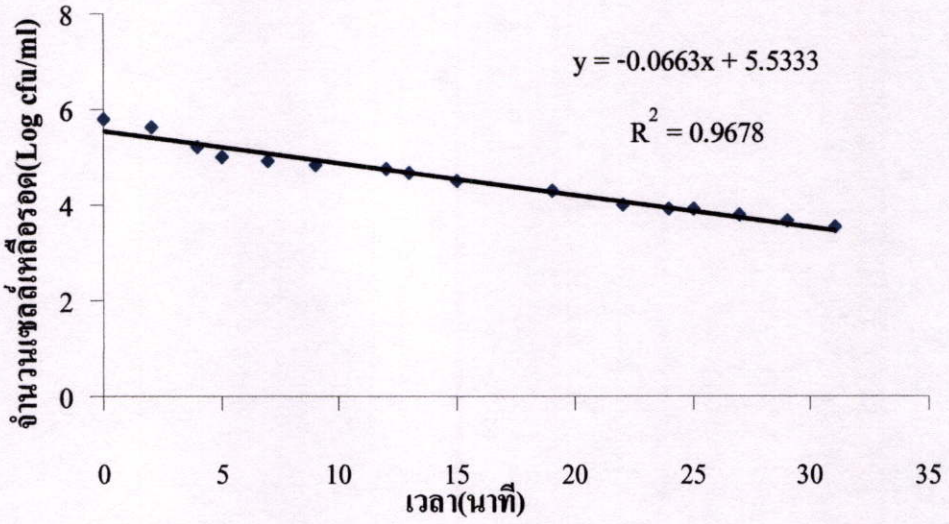
จากกราฟแสดงว่าเมื่อจำนวนเซลล์สูงขึ้น ค่า OD เพิ่มขึ้น โดยจากการทดลองเตรียมสารละลายเซลล์ *L monocytogenes* ที่ระดับความเข้มข้น 10^9CFU/ml ค่า OD ที่ 600 นาโนเมตรที่เหมาะสมคือที่ระดับ 0.4-0.6

ภาคผนวก ข

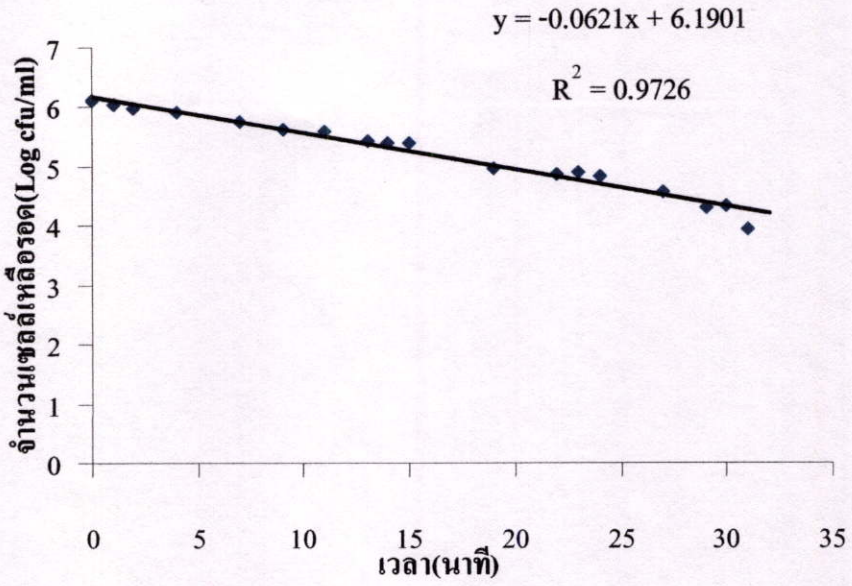
วิธีการคำนวณและผลการคำนวณ

1. วิธีการคำนวณค่าความต้านทานความร้อนหรือค่า D

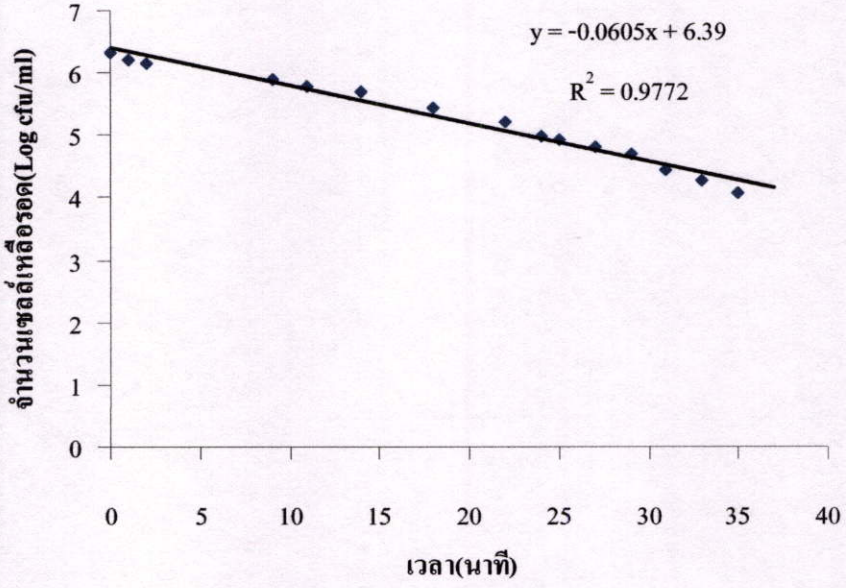
จากกราฟเส้นตรงชนิด semilog ของจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตและเวลา ซึ่งแสดงในรูปสมการเส้นตรง Y = ax+b เมื่อ a = ความชัน ดังภาพที่ ข.1-ข.3



ภาพที่ ข.1 กราฟการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในน้ำไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ครั้งที่ 1)



ภาพที่ ข.2 กราฟการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ครั้งที่ 2)



ภาพที่ ข.3 กราฟการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ครั้งที่ 3)

นำค่าความชันที่ได้จากกราฟแสดงจำนวนเซลล์ของ *L. monocytogenes* เซลล์ปกติที่รอดชีวิตในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ มาแสดงในตารางที่ ข.1

ตารางที่ ข.1 ความชันที่ได้จากเส้นแนวโน้มของกราฟแสดงปริมาณของเซลล์ *L. monocytogenes* ที่รอดชีวิตในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (^{o}ซ)	ความชันกราฟ		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
60	-0.0663	-0.0621	-0.0605

คำนวณค่า D จากสมการ

ค่า D = -1/slope

<u>ตัวอย่าง</u> การหาความต้านทานความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียสของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในสภาวะการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุม

จากตารางภาคผนวกที่ 8 การทดลองครั้งที่ 1 ความชันอุณหภูมินของกราฟเป็น -0.0663

ดังนั้นค่า D ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes*

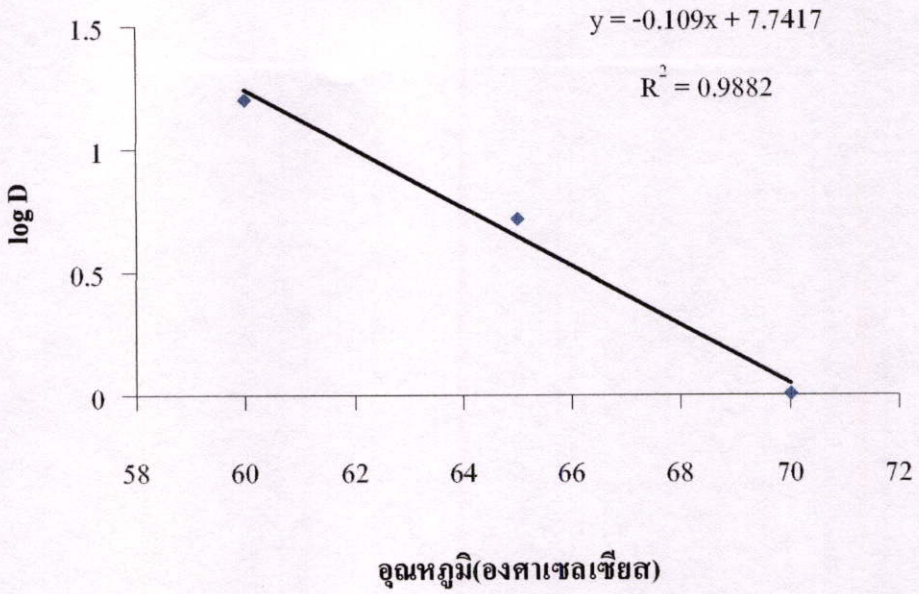
D_{60} = 1/0.0663

= 15.08 นาที

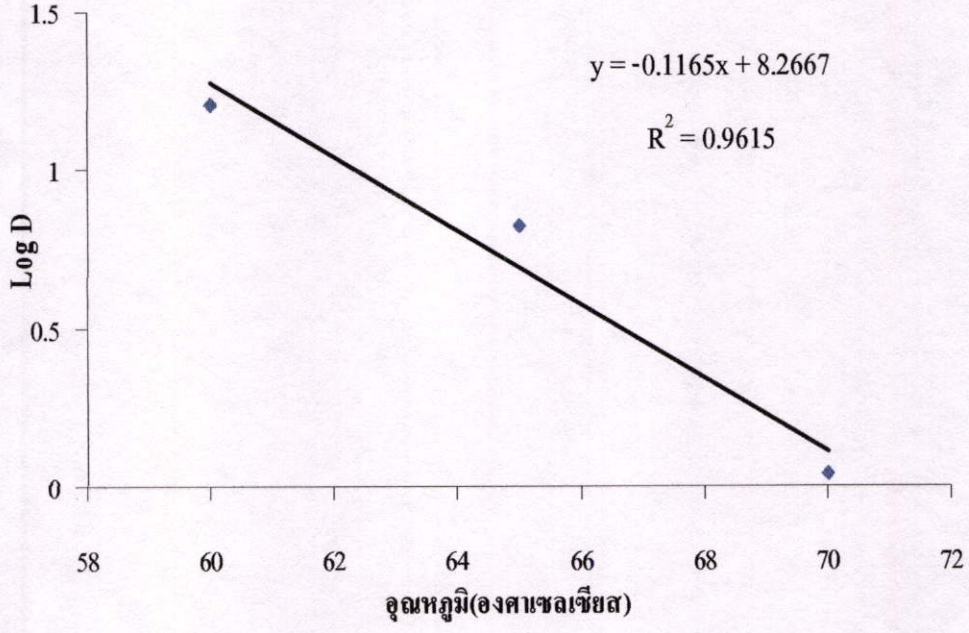
การหาค่า D ที่อุณหภูมิ 65 และ 70 องศาเซลเซียสของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* กระทำในทำนองเดียวกันนี้

2. วิธีการคำนวณค่า z

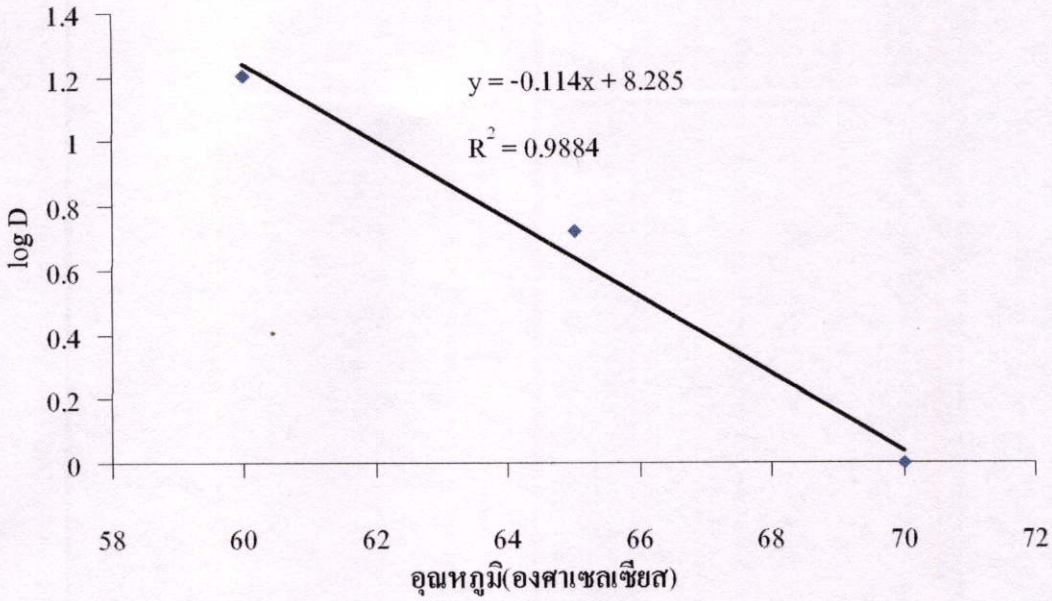
จากกราฟเส้นตรงชนิด semilog ของ Log D และอุณหภูมิต่างๆ ซึ่งแสดงในรูปสมการเส้นตรง Y = ax+b เมื่อ a = ความชัน ดังแสดงในภาพที่ ข.4-ข.6



ภาพที่ ข.4 กราฟ thermal death time แบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนต ครั้งที่ 1



ภาพที่ ข.5 กราฟ thermal death time แบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนต ครั้งที่ 2



ภาพที่ ข.6 กราฟ thermal death time แบคทีเรีย *L. monocytogenes* ของน้ำไก่มาริเนต ครั้งที่ 3

นำค่าความชันที่ได้จากกราฟลอการิทึมของค่า D และอุณหภูมิในช่วง 60-70 องศาเซลเซียสมาแสดงในตารางผนวกที่ ข.2

ตารางที่ ข.2 ความชันซึ่งได้จากเส้นแนวโน้มของกราฟลอการิทึมของค่า D และอุณหภูมิในช่วง60-70 องศาเซลเซียส

ความชันกราฟ		
ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
-0.109	-0.116	-0.114

คำนวณค่า z จากสมการ

ค่า z = -1/slope

<u>ตัวอย่าง</u> การหาค่า z ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในสภาวะการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

จากตารางภาคผนวกที่ ข.2 การทดลองที่ 1 ความชันของกราฟเป็น -0.109

ดังนั้นค่า z ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในสภาวะการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

ค่า z = 1/0.109

= 9.17 องศาเซลเซียส

การหาค่า z ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในสภาวะการให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิและในตู้อบกระทำในทำนองเดียวกันนี้

3.วิธีการคำนวณค่า D ที่ 100 องศาเซลเซียส

เมื่อต้องการออกแบบการให้ความร้อนแก่ไก่มาริเนตที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.1 ข

$$\log \frac{D}{D_0} = \frac{T_0 - T}{z} \quad \text{---------- (3.1ข)}$$

โดยที่ D = ค่า D value ที่ต้องการ ณ อุณหภูมิหนึ่ง

D_0 = ค่า D value ณ อุณหภูมิเริ่มต้น

T_0 = อุณหภูมิเริ่มต้น

T = อุณหภูมิที่ต้องการหาค่า D value

Z = อุณหภูมิที่ทำให้ค่า D เปลี่ยนไป 10 เท่า

แทนค่า $D_0 = D_{70} =$ 0.57 นาที

$T_0 = T_{70} =$ 70 องศาเซลเซียส

T = 100 องศาเซลเซียส

Z = 9.3 องศาเซลเซียส

แทนสูตร

$$\log \frac{D}{0.57} = \frac{70-100}{9.3}$$

$$D_{100} = 3.1 \times 10^{-4}$$

= 0.02 วินาที

สรุปได้ว่าที่ 100 องศาเซลเซียสจะต้องใช้เวลาเท่ากับ 0.02 วินาทีในการลดเชื้อ 1 log cycle หรือแบคทีเรีย *L. monocytogenes* จะลดลงร้อยละ 90 ที่ 100 องศาเซลเซียสจะต้องใช้เวลาเท่ากับ 0.02 วินาที

4.วิธีการคำนวณหาค่าเอฟศูนย์

ค่า F สามารถคำนวณได้จากสมการดังต่อไปนี้

$F = D(\log N_o - \log N)$

โดยที่ N_o = จำนวนเซลล์หรือสปอร์เริ่มต้น

N = จำนวนเซลล์หรือสปอร์สุดท้ายที่เหลืออยู่

D = ค่า D ของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษา

เมื่อต้องการลดเซลล์เท่ากับ 7 D

นำค่า D ที่อุณหภูมิ 60 65 70 และ 100องศาเซลเซียส

$F = D(\log N_o - \log N)$

แทนค่า $D_{60} = 6.64$

$F = 6.64 \times 7 = 46.5$ นาที

แทนค่า $D_{70} = 2.91$

$F = 2.91 \times 7 = 20.4$ นาที

แทนค่า $D_{100} = 0.019$

$F = 0.019 \times 7 = 0.13$ วินาที

เมื่อต้องการลดเซลล์เท่ากับ 8 D ที่ 60 องศาเซลเซียส

แทนค่า $D_{60} = 6.64$

$F = 6.64 \times 8 = 53.12$ นาที

ภาคผนวก ค.

ผลการทดลอง

1.ผลการทดสอบหาค่าพีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายในสารละลาย และร้อยละเกลือในน้ำไก่มาริเนต

ตารางที่ ค.1 ค่าพีเอช ปริมาณของแข็งที่ละลายในสารละลาย และร้อยละเกลือในน้ำไก่มาริเนต

ตัวอย่างทดสอบ	ครั้งที่ทดลอง	ค่าพีเอช	ร้อยละเกลือ	ปริมาณของแข็ง ทั้งหมดที่ละลายในสารละลาย (ร้อยละ)
น้ำไก่มาริเนต	1	7.7	11.5	13.5
	2	7.5	11.8	13.8
	3	7.6	11.6	13.6
	Mean	7.6[a]	11.6[a]	13.6[a]
	SD	$\pm$0.10	$\pm$0.15	$\pm$0.15

[a] หมายถึงผลการทดลองทั้ง 3 ครั้งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P \geq 0.05$)

2. ผลการทดลองจำนวนเซลล์ *L. monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นในการให้ความร้อนจากตู้อบในสภาวะนิ่งและย่าง

2.1 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ค.2 แสดงจำนวนเซลล์ *L. monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 60 องศาเซลเซียส

เวลา(นาที)	อุณหภูมิภายในตู้	อุณหภูมิที่ผิวไก่	ปริมาณเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร)
7	60.0	11.0	7.1×10^{9}
7.5	60.0	11.7	-
8	60.0	16.5	3.6×10^{9}
8.5	60.0	19.6	-
9	60.1	24.7	1.1×10^{9}
9.5	60.1	38.1	-
10	60.1	44.3	9.3×10^{8}
10.5	60.1	47.5	-
11	60.1	49.1	-
11.5	60.1	50.9	8.1×10^{8}
12	60.1	52.0	-
12.5	60.1	53.9	7.9×10^{8}
13	60.1	55.5	-
13.5	60.1	56.7	5.0×10^{8}
14	60.1	58.1	-
14.5	60.1	60.0	3.5×10^{8}
15	60.1	60.0	-

1.2 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ค.3 แสดงจำนวนเซลล์ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 65 องศาเซลเซียส

เวลา(นาที)	อุณหภูมิภายในตู้	อุณหภูมิที่ผิวไก่	ปริมาณเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร)
7	65.0	11.6	6.6×10^{9}
7.5	65.0	16.8	-
8	65.0	19.6	1.3×10^{9}
8.5	65.0	22.3	-
9	65.0	25.2	1.5×10^{9}
9.5	65.0	27.8	-
10.0	65.0	31.3	8.2×10^{8}
10.5	65.0	34.6	-
11.0	65.0	37.5	-
11.5	65.0	39.1	8.2×10^{8}
12.0	65.0	41.3	-
12.5	65.0	45.0	-
13.0	65.0	48.6	2.5×10^{8}
13.5	65.0	51.7	-
14.0	65.0	55.0	1.5×10^{8}
14.5	65.0	58.7	9.3×10^{7}
15.0	65.0	65.0	8.3×10^{7}
15.5	65.0	65.0	7.6×10^{7}
16.0	65.0	65.1	-

1.3 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ค.4 แสดงจำนวนเซลล์ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 70 องศาเซลเซียส

เวลา(นาที)	อุณหภูมิภายในตู้	อุณหภูมิที่ผิวไก่	ปริมาณเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร)
7.5	70.1	15.1	7.1×10^{9}
8	70.1	18.3	-
8.5	70.1	23.6	6.5×10^{9}
9	70.1	27	-
9.5	70.1	30.8	2.5×10^{9}
10.0	70.1	32.6	-
10.5	70.1	36.0	2.8×10^{8}
11.0	70.1	38	-
11.5	70.1	41.3	9.0×10^{8}
12.0	70.1	44.0	-
12.5	70.1	46.0	6.3×10^{8}
13.0	70.1	51.3	-
14.0	70.1	57.3	3.0×10^{8}
14.5	70.1	60.3	8.7×10^{7}
15.0	70.1	63.1	-
15.5	70.0	66.2	6.6×10^{7}
16.0	70.0	70.1	4.2×10^{7}
16.5	70.0	70.1	-
17.0	70.0	70.1	-
17.5	70.0	70.1	-

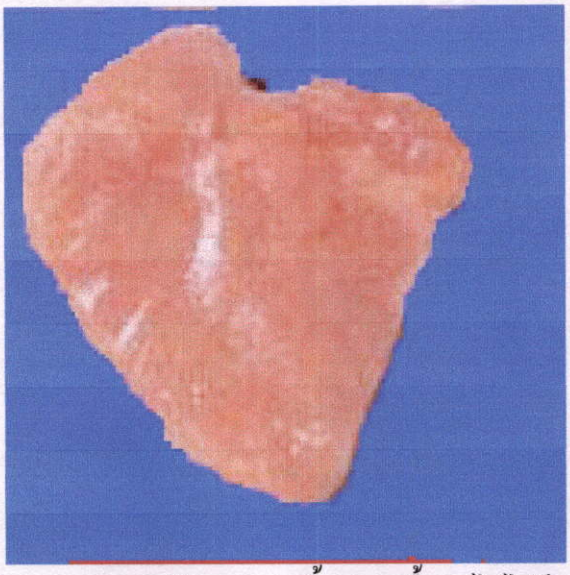
1.4 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ค.5 แสดงจำนวนเซลล์ *L.monocytogenes* ที่อุณหภูมิเริ่มต้นที่100 องศาเซลเซียส

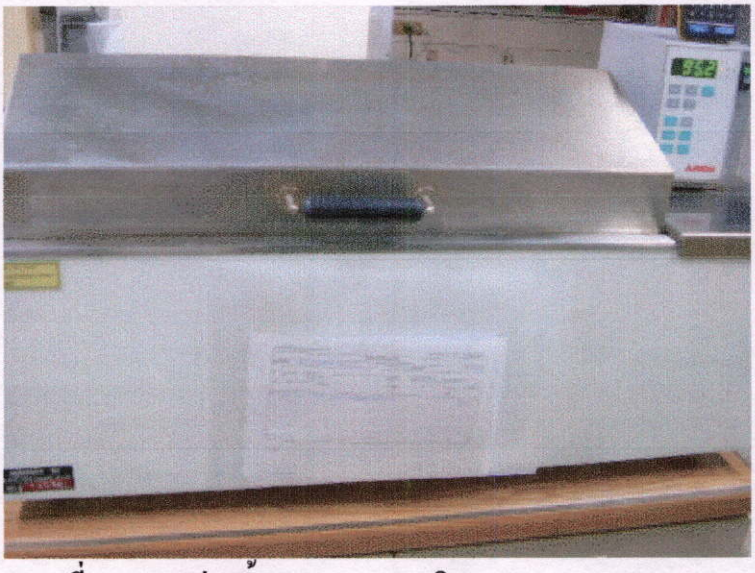
เวลา(นาที)	อุณหภูมิภายในตู้	อุณหภูมิที่ผิวไก่	ปริมาณเซลล์ (CFU/มิลลิลิตร)
9.5	100.2	12.0	6.6×10^{9}
10.0	100.2	18.6	-
10.5	100.2	22.5	2.6×10^{9}
11.0	100.1	30.7	-
11.5	100.1	36.6	4.6×10^{9}
12.0	100.0	41.3	-
12.5	100.0	45.1	7.3×10^{8}
13.0	100.0	47.8	-
13.5	100.0	54.0	2.0×10^{8}
14.0	100.0	60.2	-
14.5	100.0	65.2	4.4×10^{7}
15.0	100.0	69.7	-
15.5	100.0	75.2	3.1×10^{6}
16.0	100.0	78.8	-
16.5	100.0	84.0	9.1×10^{5}
17.0	100.0	88.4	-
17.5	100.0	91.5	8.1×10^{3}
18.0	100.0	95.0	-
18.5	100.2	96.7	2.5×10^{2}
19.0	100.2	96.9	-
19.5	100.2	97.3	-
20.0	100.1	98.1	-
20.5	100.1	98.9	-
21.0	100.1	99.6	-
21.5	100.1	100.1	

ภาคผนวก ง.

ภาพการทดลอง อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

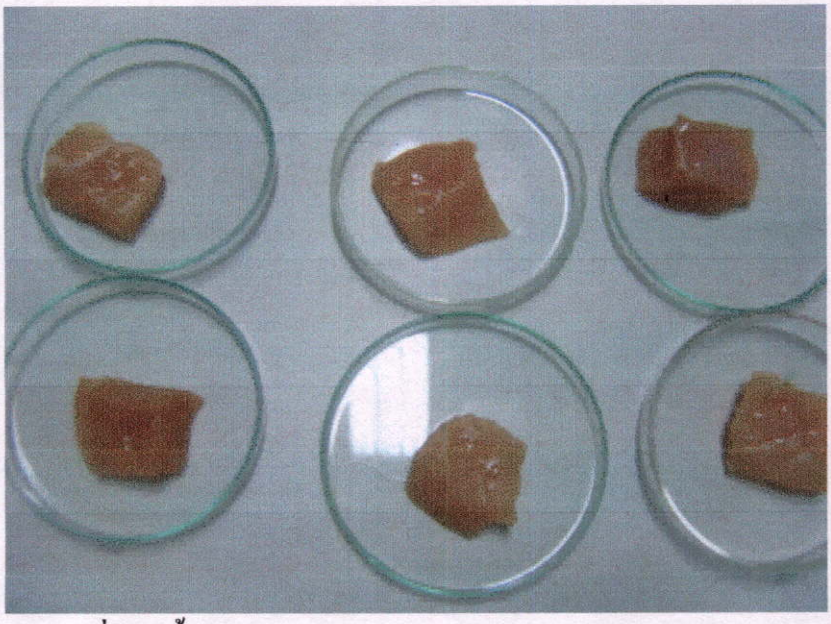


ภาพที่ ง.1 ภาพแสดงลักษณะของชิ้นส่วนเนื้ออกไก่ไม่มีหนังหุ้ม



ภาพที่ ง.2 ภาพอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Julabo MD , Germany)

ภาพที่ ง.3 ภาพตู้อบ combination oven (Rational model CM 6, Germany)



ภาพที่ ง.4 ชิ้นไก่มาริเนต spread แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes*