ASTC 2021

การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ครั้งที่ 8

Proceedings

วิทยาศาสตร์ วิจัย นวัตกรรม น้อมนำศาสตร์พระราชา เพื่อพัฒนาประเทศ

Academic Science and Technology Conference

วันศุกร์ที่ 26 มีนาคม 2564

(รูปแบบ Online)

ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความต้านทานความร้อนของแบคทีเรียชอบเกลือ และทนความร้อน ในน้ำปลาโซเดียมต่ำ

Effect of Temperature on Heat Resistance of Halophilic and Thermotolerant Bacteria in Low Sodium Fish Sauce

เกศรา แซกพุทรา[1] หัตถ์ชนก วัฒนเลิศสุวัตร[1] อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์[*1] และณฐมล จินดาพรรณ[1]
Gatesara Saekputsa[1], Hatchanok Wuttanaloudsuwut[1], Ampun Chaikulsareewath*[1] and Nathamol Chindapan[1]
[1]ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม
**ผู้ประสานงานหลัก อีเมล: ampun.cha@siam.edu*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความต้านทานความร้อนของแบคทีเรียชอบเกลือ และทนความร้อน จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต No.1, No.2 และ No.3 ในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 14 เมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มีปริมาณลดลงเมื่อใช้เวลาในการให้ความร้อนมากขึ้น และมีความต้านความร้อนน้อยลง เมื่ออยู่ในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น โดยพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต No.1 มีค่าความต้านทานความร้อน D_{75}, D_{85} และ D_{95} เท่ากับ 48.08, 4.20 และ 1.33 นาที ตามลำดับ แบคทีเรีย ไอโซเลต No.2 มีค่า D_{75}, D_{85} และ D_{95} เท่ากับ 9.12, 4.14 และ 1.47 นาที และแบคทีเรียไอโซเลต No.3 มีค่า D_{75}, D_{85} และ D_{95} เท่ากับ 37.31, 6.40 และ 1.84 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำแบคทีเรียไอโซเลต No.3 มาศึกษาความต้านทานความร้อน เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น ร้อยละ 14 พบว่ามีค่าความต้านทานความร้อน ค่า D_{75}, D_{85} และ D_{95} เท่ากับ 8.06 1.95 และ 1.57 นาที ตามลำดับ

คำสำคัญ: *ความต้านทานความร้อน แบคทีเรียชอบเกลือ แบคทีเรียทนความร้อน น้ำปลาโซเดียมต่ำ*

Abstract

This research was studied on heat resistance of three halophilic and thermotolerant bacteria. Isolated bacteria No.1, 2 and 3 in low sodium fish sauce (14% sodium chloride) were exposed to heat treatments at 75, 85 and 95°C. Three isolated bacteria populations decreased with increasing heating times. Heat resistance (D-value) of three isolated bacteria reduced with increasing temperatures. The results indicated that D_{75}, D_{85} and D_{95} of isolated bacteria No.1 were 48.08, 4.20 and 1.33 minutes, respectively. The D_{75}, D_{85} and D_{95} of isolated bacteria No.2 were 9.12, 4.14 and 1.47 minutes, respectively. The D_{75}, D_{85} and D_{95} of isolated bacteria No.3 were 37.31, 6.40 and 1.84 minutes, respectively. The isolated bacteria No.3 was selected to investigate heat resistance in 14% sodium chloride solution. It found that D_{75}, D_{85} and D_{95} of isolated bacteria No.3 was 8.06, 1.95 and 1.57 minutes, respectively.

Keywords: *Heat resistance, Halophilic bacteria, Thermotolerant bacteria, Low sodium fish sauce*

บทนำ

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสชนิดหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีรสเค็ม สีน้ำตาลใสและกลิ่นหอม น้ำปลาผลิตได้จากการหมักปลากับเกลือในอัตราส่วนปลาต่อเกลือ 3:1 โดยปริมาณเกลือที่สูงจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในขณะที่จุลินทรีย์ที่ชอบความเค็ม (halophilic microorganisms) สามารถเจริญได้กระบวนการหมักน้ำปลาเกิดจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เอนโดจีนัสโปรตีเนส (endogenous proteinases) ในกล้ามเนื้อปลาและลำไส้ ตลอดจนจากที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น ซึ่งทำให้เกิดกรดอะมิโนและสารอื่นๆ ซึ่งมีกลิ่นรสอันเป็นคุณลักษณะเด่นของน้ำปลา และมีคุณค่าโปรตีนสูงตามธรรมชาติ กรดอะมิโนส่วนใหญ่ที่พบในน้ำปลาได้แก่กรดกลูตามิค (glutamic acid) กรดแอสปาร์ติก (aspatic acid) และไลซีน (lysine) อีกทั้งยังได้โซเดียมคลอไรด์สูงไม่น้อยกว่าร้อยละ 20 ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง ซึ่งหากบริโภคร่วมกับอาหารอื่นๆ ในแต่ละวัน อาจทำให้ผู้บริโภคได้รับโซเดียมมากเกินความจำเป็น ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้ที่เป็นโรคต่างๆเช่น โรคไตและความดันโลหิตสูง เป็นต้น[1] ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาการลดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลาให้ลดลง ซึ่งจากการศึกษาของ Chindapan et al. (2009)[2] และ Chindapan et al. (2011)[1] ได้ทำการศึกษาการลดปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ โดยวิธีการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า (electrodialysis) ซึ่งสามารถกำจัดโซเดียมคลอไรด์ออกจากน้ำปลาให้เหลือเพียงร้อยละ 14 โดยกระทบต่อคุณภาพน้อยที่สุด แต่เมื่อลดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ลงก็จะส่งผลเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต ทั้งทำให้อาหารเน่าเสียและก่อให้เกิดโรค เนื่องจากค่าวอเตอร์แอคติวิตี้เพิ่มขึ้น[1] จากนั้นได้มีงานวิจัยของอลิษา โพธิ์ใบ, ปจาวลีย์ จันแดง (2556)[3] ที่ศึกษาผลของพาสเจอไรเซชั่นที่มีต่อคุณภาพของน้ำปลาเกลือต่ำ พบว่าการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีขึ้นไป สามารถกำจัดจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด แต่ถ้าใช้อุณหภูมิ และเวลาต่ำกว่านี้จะยังคงมีจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนได้หลงเหลืออยู่ จากนั้นพชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง (2557)[4] ได้ทำการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือ และทนความร้อนจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ โดยนำน้ำปลาโซเดียมต่ำไปให้อุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำมาคัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือ จากการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลต ซึ่งหากจุลินทรีย์เหล่านี้ยังคงเหลือรอดหลังจากการให้ความร้อน ก็ส่งผลถึงผลิตภัณฑ์ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย หรือเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งเวลาและอุณหภูมิในการให้ความร้อนกับอาหาร ขึ้นอยู่กับความต้านทานความร้อนของเซลล์จุลินทรีย์ที่ต้องการทำลายและความไวต่อความร้อนของผลิตภัณฑ์ โดยพิจารณาจากค่า D ของเอนไซม์และจุลินทรีย์ซึ่งมีความทนทานต่อความร้อนที่สุดที่อาจอยู่ในอาหารนั้นๆ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาหาค่าความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการกำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อน้ำปลาโซเดียมต่ำที่ผ่านการผลิตโดยวิธีการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัตถุดิบ

น้ำปลาโซเดียมต่ำที่ผลิตโดยวิธีการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า จากงานวิจัยของพชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง (2557)[4] โดยนำน้ำปลาซึ่งจัดซื้อโดยบริษัท ไมท์ตี้ อินเตอร์เนชั่นแนล ที่ประกอบด้วยเกลือเริ่มต้น ร้อยละ 25 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร มาผ่านกระบวนการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า ด้วยเครื่องแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า (Pilot-scale electrodialysis) ซึ่งถูกออกแบบให้ทำงานเป็นกะและประกอบด้วยเซลล์แยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า (PCCell, model ED 1000 H, Heusweiler, Germany) จำนวน 40 คู่เซลล์ที่มีพื้นที่แลกเปลี่ยนไอออนทั้งหมด 8 ตารางเมตร ที่ 15.5 แอมแปร์ เป็นเวลา 240 นาที

2. การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำปลา

นำน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ14 ที่ได้ทำตามวิธีการของพชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง (2557)[4] มาวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ต่อไปนี้

1) ปริมาณเกลือโดยใช้วิธี Volhard method [6]
2) ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้โดยใช้ Water activity meter (Aqualab, model CX3TE, Pullman, USA)

3) ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl [6]

4) ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดโดยใช้ Hand-held refractometer (Atago,model S-28, Tokyo, Japan)

3. การเตรียมจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง คัดแยกได้มาจากงานวิจัยของพชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง (2557)[4] ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเกลือและทนความร้อนจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ จำนวน 3 ไอโซเลต (No.1, 2 และ 3) มาทำการทดลอง โดยนำมาเตรียมเป็นหัวเชื้อ ได้ดังต่อไปนี้

1) นำแบคทีเรีย จำนวน 3 ลูป มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600})

4) เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth จนความเข้มข้นของเชื้อ มีค่า OD_{600} เท่ากับ 1.00

4.ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 14

ดัดแปลงมาจากวิธีของพชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง (2557)[4] และ สโรชา จันทร์เพ็ญ และคณะ (2557)[5] โดยทำการทดลองดังนี้

1) เติมหัวเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 14 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด ขนาด 16x150 mm จำนวน 18 หลอด จากนั้นแบ่งใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จำนวน 3 อุณหภูมิ อุณหภูมิละ 6 หลอด ได้แก่ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส บ่มน้ำปลาบรรจุในหลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เก็บตัวอย่างน้ำปลาที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลต No.1 และ No.2 มาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ โดยที่ 75 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 4, 8, 12, 16, 20 นาที ที่ 85 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 นาที และที่ 95 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 นาที ส่วนเชื้อไอโซเลต No.3 มาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ โดยที่ 75 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 นาที ส่วนที่ 85 และ 95 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 นาที

2) วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดหลังการให้ความร้อน ด้วยวิธี pour plate โดยนำตัวอย่างที่เก็บมาแต่ละครั้งไปเจือจางเชื้อจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม แบบ ten fold dilution โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ปราศจากเชื้อเป็นสารเจือจาง

3) เติมตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3

4) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5) นับจำนวนโคโลนี จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า Colony Forming Unit (CFU)/มิลลิลิตร

6) พลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อน (log CFU ต่อมิลลิลิตร) กับเวลา แล้วหาสมการเส้นตรง เพื่อนำค่าความชัน มาคำนวณหาค่า D โดยค่า D = - 1/slope ของแต่ละอุณหภูมิที่ให้ความร้อน

5. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 14

ดัดแปลงมาจากวิธีของพชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง (2557)[4] และ สโรชา จันทร์เพ็ญ และคณะ (2557)[5] โดยทำการทดลองดังนี้

1) เติมหัวเชื้อไอโซเลต No.3 ที่เตรียมได้ในข้อ 3 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความ

เข้มข้น ร้อยละ 14 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองแบบมีฝาปิด ขนาด 16x150 mm จำนวน 18 หลอด จากนั้นแบ่งใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) จำนวน 3 อุณหภูมิ อุณหภูมิละ 6 หลอด ได้แก่ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส บ่มน้ำปลาบรรจุหลอดในหลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เก็บตัวอย่างน้ำปลาที่ใส่แบคทีเรียไอโซเลต No.3 มาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ โดยที่ 75 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10 นาที ส่วนที่ 85 และ 95 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 นาที

2) วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ที่เหลือรอดหลังการให้ความร้อน ด้วยวิธี pour plate เช่นเดียวกับวิธีในข้อ 4

3) พลอตกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อน (log CFU ต่อมิลลิลิตร) กับเวลา แล้วหาสมการเส้นตรง เพื่อนำค่าความชัน มาคำนวณหาค่า D โดยค่า D = - 1/slope ของแต่ละอุณหภูมิที่ให้ความร้อน

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

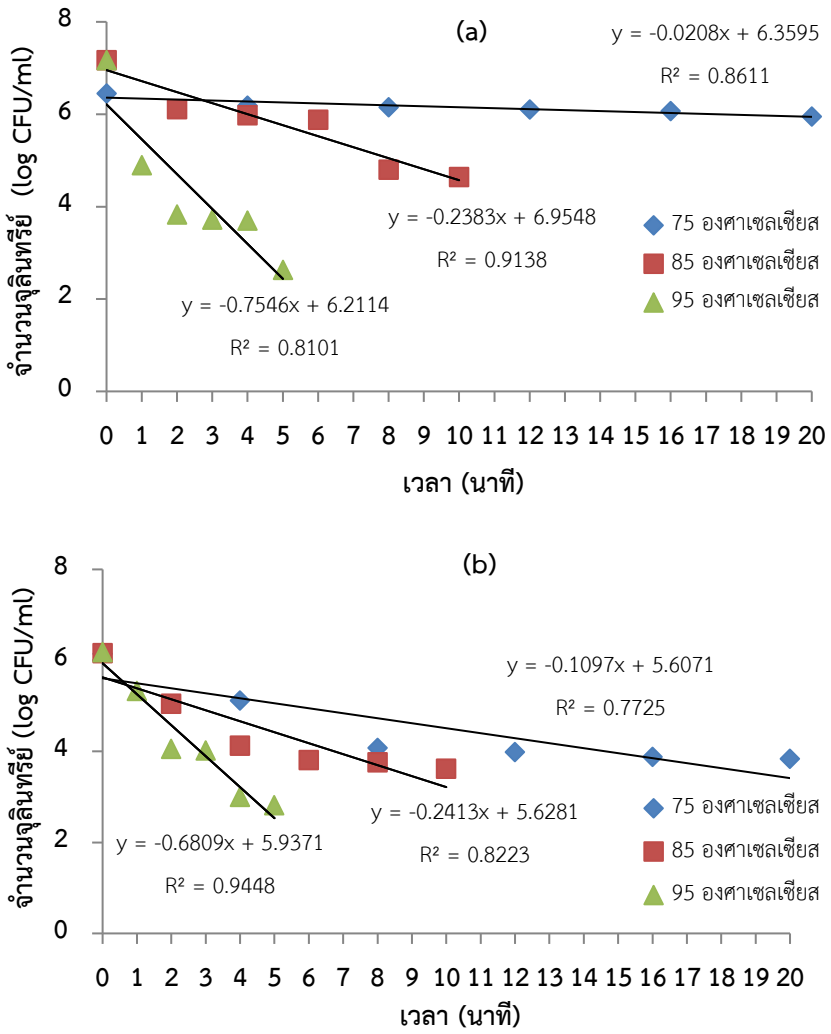
1. การวิเคราะห์คุณภาพของน้ำปลา

จากผลการศึกษาการเตรียมตัวอย่างน้ำปลาโซเดียมต่ำที่ผลิตได้จากการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า พบว่าน้ำปลาโซเดียมต่ำมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละโดยน้ำหนัก) เท่ากับ 13.69 ± 0.62 มีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ เท่ากับ 0.87 ± 0.02 มีปริมาณโปรตีน (ร้อยละโดยน้ำหนัก) เท่ากับ 5.64 ± 0.33 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (ร้อยละโดยน้ำหนัก) เท่ากับ 25.20 จากการลดลงของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (ปริมาณเกลือเริ่มต้น ร้อยละ 25.0-25.3 โดยน้ำหนัก) ส่งผลให้ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ของน้ำปลาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจะกระทบต่ออายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยของอาหารทางด้านจุลินทรีย์ อีกทั้งยังเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคชนิดทนเกลือได้สูงกว่าร้อยละ 14 เช่น *Staphylococcus aureus* ที่ทนเกลือได้สูงถึงร้อยละ 20 (FDA 2001)[7] และยังอาจเสี่ยงต่อการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 10-12 (FDA 2001)[7] รวมทั้งจุลินทรีย์ชอบเกลือชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียซึ่งโดยทั่วไปสามารถทนความร้อนได้สูงกว่าจุลินทรีย์ก่อโรค จึงทำให้พชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง (2557)[4] ได้ทำการวิจัยศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือ และทนความร้อนจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ โดยนำน้ำปลาโซเดียมต่ำไปให้อุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำมาคัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือ จากการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลต (No.1, No.2 และ No.3) ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียชอบเกลือ และทนความร้อน เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมบวก และสร้างเอนโดสปอร์ โดยที่เอนโดสปอร์ของแบคทีเรียที่สร้างขึ้นนี้ ทำให้แบคทีเรียทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้นำแบคทีเรียได้ 3 ไอโซเลตมาทำการศึกษาความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในการทดลองขั้นต่อไป

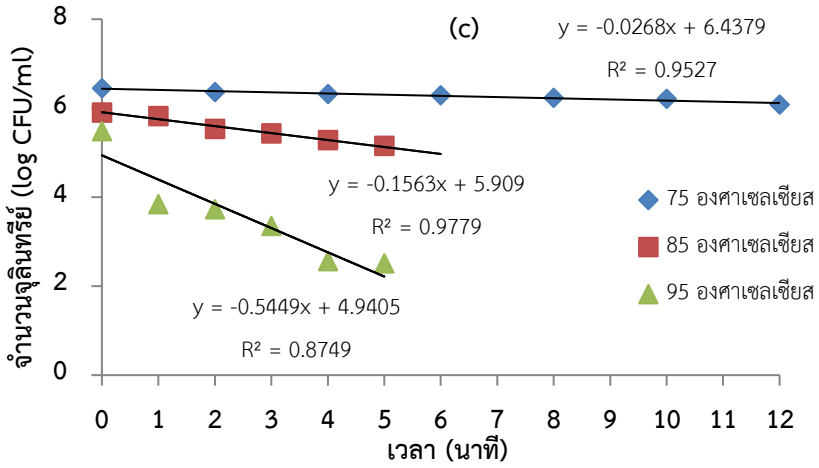
2. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 14

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต (No.1, 2 และ 3) ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยของพชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง (2557)[4] มาศึกษาหาค่าการต้านทานความร้อน โดยใส่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ลงในน้ำปลาโซเดียมต่ำ ซึ่งมีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 14 จากนั้นนำน้ำปลามาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส แล้วหาจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดหลังผ่านการให้ความร้อน ในการทดลองจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลต ในการศึกษามีการเก็บตัวอย่างขึ้นมาตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตในแต่ละอุณหภูมิซึ่งใช้เวลาแตกต่างกัน เนื่องจากหากเก็บตัวอย่างที่เวลาเดียวกัน เมื่อใช้ความร้อนอุณหภูมิสูง พบว่าจุลินทรีย์จะตายรวดเร็วมาก จนไม่เหลือรอดที่จะนำมาหาค่าความต้านทานความร้อน จากการทดลองเมื่อนำจำนวนของแบคทีเรียที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อนมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า logCFU/ml กับเวลา พบว่าอุณหภูมิและเวลามีผลต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต โดยที่จำนวนแบคทีเรียจะลดลงเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานขึ้นซึ่งจะลดลงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล (ภาพที่ 1) โดยที่ logCFU/ml กับเวลาจะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง พบว่าจำนวนการรอดชีวิตของ

เชื้อไอโซเลต No.1 และ No.3 ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส จะค่อยๆ ลดลงอย่างช้า แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 85 และ 95 องศาเซลเซียส เชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนเชื้อ No.2 จะลดจำนวนลงอย่างอย่างรวดเร็ว เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าหากให้ความร้อนอุณหภูมิสูงขึ้น ก็จะทำให้จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตมีจำนวนน้อยลงเรื่อยๆ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Stoeckel at el. (2016)[8] ที่ทำการศึกษาโดยนำแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้จำนวน 16 สายพันธุ์ ใส่ในน้ำนม แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110, 120 และ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิแตกต่างกันมาศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย พบว่าจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตมีจำนวนน้อยลง เท่ากับ ร้อยละ 69, 38 และ13 เมื่อให้ความร้อนที่ 110, 120 และ 125 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



ภาพที่ 1 จำนวนของแบคทีเรียไอโซเลต No.1 (a), No.2 (b) และ No.3 (c) ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส เมื่ออยู่ในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 14



ภาพที่ 1 จำนวนของแบคทีเรียไอโซเลต No.1 (a), No.2 (b) และ No.3 (c) ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส เมื่ออยู่ในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 14 (ต่อ)

เมื่อคำนวณค่าความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ (D-value) โดยที่ค่า D-value คือระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งให้ลดลง ร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle ที่อุณหภูมิใดอุณหภูมิหนึ่ง คำนวณได้จากความชันของสมการเส้นตรงจากกราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ ระหว่างค่า log ของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อน (log CFU/ml) จากการคำนวณค่า D ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ในน้ำปลาโซเดียมต่ำ ที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่า D-value ของแบคทีเรียไอโซเลต No. 1, 2 และ 3

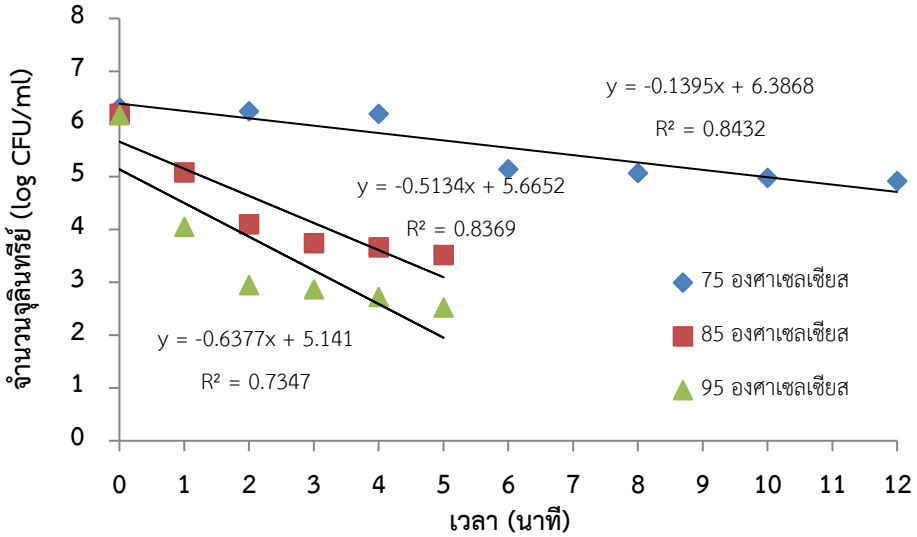
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่า D-value เฉลี่ย±SD		
	ไอโซเลต No.1	ไอโซเลต No.2	ไอโซเลต No.3
75	48.08±0.64	9.12±0.23	37.31±0.30
85	4.20±0.08	4.14±0.02	6.40±0.34
95	1.33±0.02	1.47±0.01	1.84±0.03

จากตารางที่ 1 พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ค่าความต้านทานความร้อน (D-value) ของแบคทีเรียไอโซเลต No.1 มีมากกว่าไอโซเลต No.2 และ No.3 ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 และ 95 องศาเซลเซียส จะทำให้ค่า D-value ของไอโซเลต No.3 มีค่ามากกว่าไอโซเลต No.1 และ No.2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ความร้อนสูง คือ 85-95 องศาเซลเซียส แบคทีเรียไอโซเลต No.3 จะมีความต้านทานความร้อนได้มากกว่า No.1 และ No.2 ค่า D-value สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ปัจจัยดังกล่าวได้แก่ ปริมาณน้ำ ไขมัน เกลือ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน จำนวนจุลินทรีย์ อายุของเซลล์ อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ สารยับยั้งการเจริญ เวลา และอุณหภูมิ ชนิดของเซลล์จุลินทรีย์และการเจริญในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ โดยที่ในอาหารที่มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตสูงจะช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์[9] ดังนั้นองค์ประกอบทางเคมีของสารบางอย่าง เช่น โปรตีน เป็นต้น ที่อยู่ในน้ำปลาอาจมีผลต่อความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ โดยโมเลกุลของสารเหล่านี้จะช่วยลดการถ่ายเทความร้อนภายในระบบ จึงช่วยให้การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์มีค่าสูงขึ้น

3. ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 14

นำแบคทีเรียไอโซเลต No.3 มาใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 14 และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส จากนั้นหาจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดหลังผ่านการให้ความร้อนตามระยะเวลาต่างๆ และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า logCFU/ml กับเวลา (ภาพที่ 2) พบว่าปริมาณแบคทีเรียจะลดลงเมื่อให้เวลาในการให้ความร้อนมากขึ้นทั้ง 3 อุณหภูมิ โดยที่อัตราการลดลงของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (85 และ 95 องศาเซลเซียส) และจำนวนแบคทีเรียจะลดลงเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานขึ้นโดยจะลดลงแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล

เมื่อนำจำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดหลังผ่านการให้ความร้อนมาคำนวณค่าความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ (D-value) พบว่าไอโซเลต No.3 มีค่า D เท่ากับ 7.17, 1.95 และ 1.57 นาที ที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากนั้นเปรียบเทียบค่าความต้านทานความร้อนของแบคทีเรียไอโซเลต No.3 เมื่ออยู่ในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นของเกลือ ร้อยละ 14 และในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 14 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต No.3 ในที่มีความเข้มข้นสารละลายโซเดียมคลอไรด์ จะมีค่าความต้านทานความร้อนน้อยกว่าเมื่ออยู่ในน้ำปลาโซเดียมต่ำ แม้จะมีปริมาณเกลือเท่ากัน เนื่องจากน้ำปลาโซเดียมต่ำมีส่วนประกอบของสารต่างๆ เช่น โปรตีน และแร่ธาตุต่างๆ ที่มีส่วนช่วยในการป้องกันจุลินทรีย์จากความร้อน และเป็นแหล่งอาหารสำหรับการซ่อมแซมเซลล์ในกรณีที่ได้รับบาดเจ็บ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของอรอินทุ์ ประไชโย และคณะ[10] ที่ทำการศึกษาการทนความร้อนของสปอร์ *Bacillus cereus* ในสารละลายนม เปรียบเทียบกับในสารละลายเปปโทน เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยพบว่า *B. cereus* สารพันธุ์ BC1, BC2 และ BC3 มีสัดส่วนการรอดชีวิตของสปอร์ในสารละลายนมสูงกว่าในสารละลาย สารละลายเปปโทน ร้อยละ 0.1 เนื่องจากในสารละลายนมมีส่วนประกอบของสารต่างๆ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุ ซึ่งมีส่วนช่วยป้องกันสปอร์จากความร้อน และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gabriel, Azanna (2004)[11] ที่นำจุลินทรีย์ *Acanthamoeba* sp. cysts ใส่ในอาหาร Perna viridis broth (สารอาหารที่สกัดมาจากหอยแมลงภู่) และ Phosphate-buffered saline แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ 60, 75 และ 100 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาหาค่าความต้านทานความร้อน (D-value) พบว่าจุลินทรีย์เมื่ออยู่ใน Perna viridis broth มีค่าความต้านทานความร้อนมากกว่าใน Phosphate-buffered saline ในทุกๆ อุณหภูมิ เนื่องจากในอาหาร Perna viridis broth มีส่วนประกอบของอาหารที่มากกว่า โดยมีทั้งโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งส่วนประกอบของอาหารพวกนี้จะทำให้อาหารที่ใช้ในการทดสอบมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ และมีส่วนช่วยในการป้องกันการถูกทำลายด้วยความร้อน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Stoeckel at el. (2016)[8] ที่ทำการศึกษาโดยนำแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ได้จำนวน 16 สายพันธุ์ ใส่ในน้ำนมและ phosphate buffer แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110, 120 และ 125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิแตกต่างกันมาศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่ 110, 120 และ 125 องศาเซลเซียส แบคทีเรียจะรอดชีวิตเมื่ออยู่ในน้ำนมเท่ากับ ร้อยละ 69, 38 และ 13 ตามลำดับ และจะรอดชีวิตเมื่ออยู่ใน phosphate buffer เท่ากับ ร้อยละ 94, 69 และ 44 ตามลำดับ



ภาพที่ 2 จำนวนของแบคทีเรียไอโซเลต No.3 ที่รอดชีวิตหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส เมื่ออยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 14

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบค่า D-value ของแบคทีเรียไอโซเลต No.3 เมื่ออยู่ในน้ำปลาโซเดียมต่ำความเข้มข้นเกลือร้อยละ 14 และในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 14

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่า D-value เฉลี่ย±SD	
	น้ำปลาโซเดียมต่ำ	สารละลายโซเดียมคลอไรด์
75	37.38±0.30	7.17±0.13
85	6.37±0.34	1.95±0.01
95	1.84±0.04	1.57±0.04

สรุปผลการวิจัย

จากการนำแบคทีเรียชอบเกลือ และทนความร้อน จำนวน 3 ไอโซเลต (No.1, 2 และ 3) มาศึกษาความสามารถในการต้านทานความร้อนในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 14 ที่อุณหภูมิต่างๆ (75, 85 และ 95 องศาเซลเซียส) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มีปริมาณลดลงเมื่อใช้เวลาในการให้ความร้อนมากขึ้น และมีความต้านความร้อนน้อยลงเมื่ออยู่ในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น และพบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีค่าความต้านทานความร้อน (D-value) ในแต่ละอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส แบคทีเรียไอโซเลต No.1 มีค่า D-value มากกว่าไอโซเลต No.2 และ No.3 ส่วนที่อุณหภูมิ 85 และ 95 องศาเซลเซียส แบคทีเรียไอโซเลต No.3 มีค่ามากกว่าไอโซเลต No.1 และ No.2 และยังพบอีกว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าความต้านทานความร้อนของแบคทีเรียไอโซเลต No.3 เมื่ออยู่ในน้ำปลาโซเดียมต่ำที่มีความเข้มข้นเกลือ ร้อยละ 14 กับ เมื่ออยู่ในน้ำเกลือ ความเข้มข้นร้อยละ 14 พบว่า แบคทีเรียจะมีความต้านทานต่อความร้อนเมื่ออยู่ในน้ำปลาโซเดียมต่ำมากกว่าในน้ำเกลือ จากการศึกษาจะสามารถนำค่าความต้านทานความร้อนที่ได้ไปใช้เป็นดัชนีกำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อที่ถูกต้องต่อไป เพื่อทำให้น้ำปลาโซเดียมต่ำสามารถเก็บได้นาน และเกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบริษัทไมท์ตี้อินเตอร์เนชันแนล จำกัด ที่อนุเคราะห์ให้ตัวอย่างน้ำปลามาใช้ในการทดลอง และเตรียมน้ำปลาโซเดียมต่ำ และคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ที่อนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Chindapan N, Devahastin S, Chiewchan N, Sablani, SS. Desalination of fish sauce by electrodialysis: Effect on selected aroma compounds and amino acid compositions. J. Food Sci 2011;76:S451-7.
2. Chindapan N, Devahastin S, Chiewchan N, Electrodialysis desalination of fish sauce: electrodialysis performance and product quality. J. Food Sci 2009;74:E363-71.
3. อลิษา โพธิ์ใบ, ปจาวลีย์ จันแดง. ศึกษาผลของพาสเจอไรเซชั่นที่มีต่อคุณภาพของน้ำปลาโซเดียมต่ำซึ่งผลิตจากกระบวนการแยกสารผ่านเยื่อด้วยไฟฟ้า [ภาคนิพนธ์]. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยสยาม 2556.
4. พชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, ศุภณัฐ หวังรุ่งเรือง. การคัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือและเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ:สมบัติการต้านทานความร้อน [ภาคนิพนธ์]. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยสยาม 2557.
5. สโรชา จันทร์เพ็ญ, จิตศิริ ราชตนะพันธุ์, ศศิธร ตรงจิตภักดี. การศึกษาความต้านทานความร้อนของ *Pichia kudriavzevii* TISTR 5147 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5110 ในน้ำมะนาว. การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 49; 1-4 กุมภาพันธ์ 2554. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2554.
6. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC 1995.
7. FDA. Table #A-1: Limiting conditions for pathogen growth. Appendix 4, *In* fish and fishery products hazards and controls guide, 3rd ed., p. 281, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Seafood. Washington, DC 2001.
8. Stoeckel M, Lücking G, Ehling-Schulz M, Atamer Z, Hinrichs J, Bacterial spores isolated from ingredients, intermediate and final products obtained from dairies: thermal resistance in milk. Dairy Sci. and Technol 2016; 96:569–77.
9. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Modern food microbiology. 7th ed. New York: Springer Science+Business Media 2005.
10. อรอินทุ์ ประไชโย, วรสิทธิ์ โทจำปา, นที ทองศิริ. จลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ด้วยความร้อนในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์นม. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร 2555.
11. Gabriel AA, Azanna MPV. Heat resistance of *Acanthamoeba* sp. cysts in green mussel broth and phosphate-buffered saline. Food Sci. and Technol. Res 2004;10(3):320-3.

การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ครั้งที่ 8 ประจำปี 2564

"วิทยาศาสตร์ วิจัย นวัตกรรม น้อมนำศาสตร์พระราชา เพื่อพัฒนาประเทศ"

(Academic Science and Technology Conference ASTC2021)

วันศุกร์ที่ 26 มีนาคม 2564

ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

ผู้สนับสนุน

สถาบันวิจัยและพัฒนา VRURDI มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

คณะกรรมการส่งเสริมกิจการมหาวิทยาลัย
ราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

analytikjena
An Endress+Hauser Company