

อภิธานการ



สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

จลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ด้วยความร้อน
ในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์นม

Heat Inactivation Kinetics of *Bacillus cereus* Spores in Milk
Pasteurization

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

วันลงทะเบียน... 19 ก.ค. 2556

เลขทะเบียน... 6324654

เลขเรียกหนังสือ... 2 SF

โดย

255
09836
2556

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอินท์ ประไชโย และคณะ

พฤษภาคม 2556

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

จลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ด้วยความร้อน
ในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์นม

Heat Inactivation Kinetics of *Bacillus cereus* Spores in Milk
Pasteurization

โดย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอินท์ ประไชโย ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมมหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมมหาวิทยาลัยนเรศวร
3. ดร.นที ทองศิริ ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำงานวิจัยชิ้นนี้จนสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ที่ใช้ในงานวิจัยมา ณ ที่นี้

ผู้วิจัย

พฤษภาคม 2556



บทคัดย่อ

งานวิจัยชิ้นนี้ทำการศึกษาจลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ของ *B. cereus* ด้วยความร้อนในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์นม โดยสปอร์ที่นำมาศึกษาประกอบด้วยสปอร์ของ *B. cereus* ที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันของโรงงานนมในเขตภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BC1 (ถังเก็บน้ำนมดิบ) BC2 (ถังฆ่าเชื้อ) และ BC3 (เครื่องบรรจุ) ผลการศึกษาความสามารถในการทนร้อนในสารละลายเปปโทน 0.1% เปรียบเทียบกับในน้ำนมของสปอร์ทั้งสามไอโซเลทที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราส่วนปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ที่ 80 และ 85 องศาเซลเซียสของสปอร์ที่นำมาศึกษามีค่าอยู่ระหว่าง 0.9 -1.0 แต่ค่า $NN_{0,98^\circ\text{C}}$ ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นและมีค่าต่ำสุดที่ 98 องศาเซลเซียส โดย BC1 BC2 และ BC3 มีค่า $NN_{0,98^\circ\text{C}}$ ในสารละลาย เปปโทน 0.1% เท่ากับ 0.25 0.25 และไม่สามารถตรวจนับได้ ตามลำดับ ในขณะที่ค่า $NN_{0,98^\circ\text{C}}$ ของ BC1 BC2 และ BC3 ในสารละลายนม เท่ากับ 0.36 0.36 และ 0.23 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสปอร์ของ BC2 และ BC3 มีความสามารถในการทนต่อความร้อนสูงกว่าสปอร์ของ BC1 ที่อุณหภูมิเดียวกันทั้งในสารละลายเปปโทน 0.1% และในน้ำนม นอกจากนี้ยังพบว่า $D_{98^\circ\text{C}}$ ของ BC1 BC2 และ BC3 ในสารละลายเปปโทน 0.1% มีค่าเท่ากับ 10.93 6.46 และ 14.48 นาทีตามลำดับ ในขณะที่ $D_{98^\circ\text{C}}$ ของ BC1 BC2 และ BC3 ในน้ำนม เท่ากับ 7.29 22.08 และ 17.54 นาทีตามลำดับ จะเห็นได้ว่า D-value ของทั้งสปอร์สามไอโซเลทในสารละลายนมมีค่าสูงกว่าในสารละลายเปปโทน 0.1% แต่ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อพิจารณาค่า Z-value พบว่าสปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทมีค่า Z-value ใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในช่วง 13.28 -16.36 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาค่า F-value โดยคำนวณจากค่า D-value ที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถลดปริมาณสปอร์ *B. cereus* ลงจนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข (4 log reduction) พบว่าที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส จะต้องใช้เวลาประมาณ 29.16 88.32 และ 70.16 นาทีในการลดปริมาณสปอร์ของไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ลง 4 \log_{10} ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ไม่ไปตามเกณฑ์ของผลิตภัณฑ์พาสเจอร์ไรซ์ ทั้งยังไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงาน เนื่องจากทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต ผลการเปรียบเทียบแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ด้วยความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ พบว่าแบบจำลองจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (First-Order Kinetic Models) มีความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองมากกว่าแบบจำลองล็อกโลจิสติก (log-logistic Models) เมื่อพิจารณาจากค่า MSE จากข้อมูลที่ได้จะเห็นว่าสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานสามารถทนต่อความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์ได้สูง ดังนั้นความร้อนที่ใช้กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอสำหรับการควบคุมและลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ สถานประกอบการควรมีการหามาตรการอื่นเสริม เช่น หลักการผลิตที่ดี (GMP) และกระบวนการ CIP ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันและลดการปนเปื้อนหลังการฆ่าเชื้อ

คำสำคัญ: จลนพลศาสตร์การยับยั้งด้วยความร้อน สปอร์ บาซิลลัส ซีเรียส กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ขั้นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

Abstract

This study investigated the heat inactivation kinetics of *B. cereus* spores in milk pasteurization process. Spore samples were isolated from different environments of dairy plant in the lower northern region including BC1 (raw milk tank), BC2 (thermize tank) and BC3 (packing machine). The heat resistance of those spores in peptone 0.1% and milk solutions were carried out at 80, 85, 90, 93, 95 and 98°C. The results revealed that survival ratio (N/N_0) at 80 and 85°C of all isolates were 0.9 -1.0. The ratio decreased as the temperature increased and the lowest values were observed at 98°C. The $NN_{0,98^\circ\text{C}}$ of BC1, BC2 and BC3 in peptone 0.1% were 0.25, 0.25 and ND, respectively whereas those in milk were 0.36, 0.36 and 0.23, respectively. This indicated that spores of BC2 and BC3 exhibited higher heat resistance than those of BC1 at similar temperature in both heating media. In addition, the data also showed that $D_{98^\circ\text{C}}$ of BC1, BC2 and BC3 in peptone 0.1% were 10.93, 6.46 and 14.48 min, respectively whereas those of BC1, BC2 and BC3 in milk were 7.29, 22.08 and 17.54 min, respectively. Even though, the D-values of all isolates in milk were higher than those in peptone solutions but they were not significantly different ($p>0.05$). Regarding Z-value, spores of all three isolates exhibited similar z-value (13.28 – 16.36 °C). Based on this data, F-value was calculated from the lowest D-value and the standard log reduction requirement of MOH (4 log reduction). It was shown that time required reducing 4 log of BC1, BC2 and BC3 spores at 98°C were 29.146, 88.32 and 70.16 min, respectively. It can be seen that the duration and temperature of the process does not meet the criteria of pasteurization product. Moreover, it is not suitable for the applications in factory due to higher production costs. The comparative study of mathematical models to describe the heat inactivation kinetics of *B. cereus* spores in pasteurization showed that the first-order kinetic models was more appropriate than the log-logistic models due to MSE values. This study demonstrated that *B. cereus* spores isolated from dairy plants are highly capable of withstand pasteurization temperature. Therefore, pasteurization process alone may not be sufficient to control and reduce the number of *B. cereus* spores in the product. The enterprises should implement other preventive measures such as Good Manufacturing Practice (GMP) and effective CIP in order to prevent and reduce post-process contamination.

Keywords: Heat Inactivation Kinetics, Spore, *Bacillus cereus*, Pasteurization, Mathematical Models

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อ	iv
บทสรุปผู้บริหาร	x
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	3
<i>Bacillus cereus</i>	3
เอนโดสปอร์	4
นมและผลิตภัณฑ์นม	7
การปนเปื้อนของ <i>B. cereus</i> ในผลิตภัณฑ์นม	9
การแปรรูปด้วยความร้อนในผลิตภัณฑ์นม	11
ความสามารถในการทนความร้อน	15
จลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ <i>B. cereus</i>	15
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	46
ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ	48
บรรณานุกรม	49
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ	54

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณลักษณะทางเคมีของนม	9
2	เกณฑ์กำหนดจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตนม	9
3	ปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ของสปอร์ <i>B. cereus</i> แต่ละไอโซเลทภายหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 70 นาทีในสารละลายเปปโทน 0.1%	27
4	ปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ของสปอร์ <i>B. cereus</i> แต่ละไอโซเลทภายหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 70 นาทีในสารละลายนม	29
5	ค่า D-value และ Z-value ของสปอร์ <i>B. cereus</i> แต่ละไอโซเลทในสารละลายนมและสารละลายเปปโทน 0.1% ที่ระดับอุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส	31
6	ค่า F หรือระยะเวลาที่ต้องการที่อุณหภูมิต่างๆ ในการลดปริมาณสปอร์ <i>B. cereus</i> ในผลิตภัณฑ์นมให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน	34
7	ค่าพารามิเตอร์ของ First-order model และ Log-logistic model ที่ใช้สำหรับการทำนายการรอดชีวิตของสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส	36

สารบัญรูปร่าง

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของเอนโดสปอร์	2
2	กระบวนการเกิดสปอร์ (Sporulation)	3
3	การคำนวณค่า D-value ของจุลินทรีย์	14
4	การคำนวณหาค่า Z-value	15
5	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 เหลือรอดในสารละลายเปปไทน์ 0.1% ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ	25
6	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC2 เหลือรอดในสารละลายเปปไทน์ 0.1% ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ	26
7	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC3 เหลือรอดในสารละลายเปปไทน์ 0.1% ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ	26
8	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 เหลือรอดในสารละลายนม ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ	28
9	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC2 เหลือรอดในสารละลายนม ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ	28
10	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC3 เหลือรอดในสารละลายนม ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ	29
11	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า D-value ของสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส ในสารละลายเปปไทน์ 0.1%	31
12	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า D-value ของสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส ในสารละลาย,	32
13	การรอดชีวิตของสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic	37
14	การรอดชีวิตของสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic	37
15	การรอดชีวิตของสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic	38
16	การรอดชีวิตของสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 ที่อุณหภูมิ 83 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic	38
17	การรอดชีวิตของสปอร์ <i>B. cereus</i> ไอโซเลท BC1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic	39

บทสรุปผู้บริหาร Executive summary

ในปัจจุบันตลาดนมพาสเจอร์ไรซ์ในประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวสูงเพื่อสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคที่มีมากขึ้น เนื่องจากนมพาสเจอร์ไรซ์มีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับน้ำนมดิบ แต่มีความปลอดภัยสำหรับการบริโภค และมีอายุการเก็บรักษานานกว่า การปนเปื้อนของ *Bacillus cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์จัดว่าเป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมนม เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีนเอส โลเปส และฟอสโฟไลเปส ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นผิดปกติ (off-flavors) ลิ้ม (sweet curding) และครีมขม (bitty cream) ส่งผลให้อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์สั้นกว่าที่ควรจะเป็น (Giffel et. al., 1997; Lin et. al, 1998) นอกจากนี้ *B. cereus* ยังเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษอีกด้วย (Eley, 1996; Jay, 2000; Geiner et. al., 2007) *B. cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิช่วง pH และ water activity กว้าง อีกทั้งยังสามารถสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี *B. cereus* ยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารทั้งของคนและของสัตว์หลายชนิด จึงสามารถพบสปอร์ของเชื้อชนิดนี้ได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น แหล่งน้ำ ดิน และพื้นผิวต่างๆ

การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของสปอร์ในน้ำนมดิบก่อนการฆ่าเชื้อ และการปนเปื้อนภายหลังการฆ่าเชื้อจากสภาวะแวดล้อมในโรงงานนม (Lin et. al, 1998) ข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์ของโรงงานผลิตภัณฑ์นมแห่งหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง พบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ ซึ่งประมาณร้อยละ 80 ของโคโลนีที่พบเป็น *B. cereus* (ปรียะทัศน์ีย์ และ ดรุณี, 2552) โดย *B. cereus* ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์ มีแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญคือน้ำนมดิบก่อนการฆ่าเชื้อ และอุปกรณ์การผลิต ถึงแม้ว่า *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อน แต่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูงได้ โดยทั่วไปการผลิตน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์จะผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ไม่สูงนัก (อุณหภูมิระหว่าง 63 -72 องศาเซลเซียส) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์อาจไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* ดังนั้นการศึกษาความสามารถในการทนต่อความร้อน (heat resistance) และจลนพลศาสตร์ของการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานนม จึงมีความสำคัญเนื่องจากจะทำให้สามารถคาดคะเนสภาวะการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ได้ ซึ่งจะนำไปสู่การลดปริมาณนมที่เสื่อมเสียก่อนวันหมดอายุ ลดต้นทุนการผลิตของโรงงานรวมทั้งช่วยเพิ่มความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์อีกด้วย

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานอุตสาหกรรมนมในเขตภาคเหนือตอนล่าง จากนั้นทำการเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์การยับยั้งด้วยความร้อนสำหรับสปอร์ *B. cereus* โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม และทำการ

คาดคะเนสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้ทำการทดสอบความสามารถในการทนความร้อนของสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากกระบวนการผลิตนมของโรงงานอุตสาหกรรมนมแห่งหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยจำแนกตามแหล่งที่พบ ได้แก่ ถังเก็บน้ำนมดิบ ถังเทอร์มิช และอุปกรณ์เครื่องบรรจุ ข้อมูลที่ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาจลนพลศาสตร์การรอดชีวิตของสปอร์ภายใต้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์เซชันโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่แตกต่างกันสองชนิด (first order kinetic model และ weibull distribution model) ซึ่งจะนำไปสู่การคาดคะเนสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ด้วยความร้อน เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนากระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต โดยงานวิจัยชิ้นนี้จะทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการพาสเจอร์ไรซ์เพื่อการยับยั้งสปอร์ของ *B. cereus* ซึ่งทางโรงงานอุตสาหกรรมนมสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งจะช่วยลดปริมาณการปนเปื้อนของสปอร์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ และนำไปสู่การลดปริมาณนมที่เสื่อมเสียก่อนวันหมดอายุ ลดต้นทุนการผลิตของโรงงาน และช่วยในการประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ด้วย และยังสามารถใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานสำหรับการวิจัยเชิงลึกในการออกแบบและทดสอบแบบจำลองการยับยั้งด้วยความร้อนชนิด isothermal และ non-isothermal ได้

วิธีการทดลอง

1. นำ *B. cereus* ที่แยกจากได้จากโรงงานนมในเขตภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 3 isolates ได้แก่ BC1 ที่แยกได้จากน้ำนมดิบ BC2 ที่แยกได้จากถังฆ่าเชื้อและ BC3 ที่แยกได้จากเครื่องบรรจุ M1 ตามลำดับ มาเลี้ยงให้เกิดสปอร์ ตามวิธีของ Fernandez et al. (2001) ตรวจสอบสปอร์โดยการใช้อัลลอยจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บเกี่ยวสปอร์โดยวิธีการฟลัดดิ้ง (flooding) ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เก็บส่วนน้ำไว้ จากนั้นไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (HSIANGTAI, CN - 1040, Thailand) ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนของเหลวไปแล้วทำการล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ทำการล้างสปอร์ด้วยวิธีการนี้ 3 ครั้ง นำสปอร์ที่ได้มาแขวนลอยในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

2. ทำการทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* โดยการนำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อเป็นการทำลายเซลล์ที่ยังมีชีวิต (vegetative cell) จากนั้นทำการเจือจางสารแขวนลอยสปอร์เจือจางในสารละลายเปปโทนให้ได้ปริมาณสปอร์ตั้งต้นประมาณ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสปอร์

ในสารละลายเปปโทน 0.1% และสารละลายน้ำมัน โดยตุตสารละลายสปอร์แขวนลอยมา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Select Heat Block Heater (Model SBD 110 - 2, Thailand) ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างตามระยะเวลาที่กำหนด เป็นเวลา 70 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำหลอดไมโครเซนทริฟิวส์จุ่มลงในอ่างน้ำแข็ง (ice - bath) ทันที ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอด รายงานผลเป็น cfu/ml ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. คำนวณหาค่า D-value และ Z-value นำข้อมูลที่ได้ในขั้นตอนที่ 2 มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอด (\log_{10} CFU/ml) และเวลา (นาที) จากนั้นทำการคำนวณหาค่า D-value จากความชันของกราฟโดยใช้โปรแกรม DMFit Toolbox อ้างอิงจากสมการของ Baranyi et al. (1993) (www.combase.cc) สำหรับค่า Z-value คำนวณได้จากความชันของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง \log_{10} D-value และอุณหภูมิ โดยใช้ DMFit Toolbox อ้างอิงจากสมการของ Baranyi et al. (1993) (www.combase.cc) จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่า D-value Z-value และ F-value ที่ได้ เพื่อให้ทราบสถานะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus*

4. นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการทนความร้อนของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 มาประมาณค่าหาพารามิเตอร์สำหรับแบบจำลองจลนพลศาสตร์ลำดับหนึ่ง (First-Order Kinetic Models) และแบบจำลองล็อกโลจิสติก (log-logistic Models) โดยใช้โปรแกรม MATLAB® (2009a) เปรียบเทียบความเหมาะสมของค่าที่ได้จากค่า mean square error (MSE)

5. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ประมวลผลจากเครื่องคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5

ผลการทดลอง

1. ความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ในสารละลายเปปโทน 0.1%

เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลท (BC1 BC2 และ BC3) ในสารละลายเปปโทน 0.1% ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส พบว่าสปอร์ของ *B. cereus* มีพฤติกรรมคล้ายคลึงกัน นั่นคือ ที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส ปริมาณสปอร์มีการลดลงเพียงเล็กน้อย หรือคงที่เมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้สปอร์มีปริมาณลดลง ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยจะเห็นได้ว่าสปอร์ของ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทมีปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ภายหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส อยู่ระหว่าง 0.9 -1.0 แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นค่าสัดส่วนการรอดชีวิตกลับลดลง โดยทุกไอโซเลทมีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตต่ำสุดที่ 98 องศาเซลเซียส โดย BC1 BC2 และ BC3 มีค่า

ค่าสัดส่วนการรอดชีวิตที่ 98 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.25 0.25 และไม่สามารถตรวจนับได้ ตามลำดับ เซลเซียส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าช่วงอุณหภูมิระหว่าง 80 – 85 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการออกของสปอร์ ดังนั้นจึงส่งผลปริมาณสปอร์ไม่ต่างจากปริมาณสปอร์เริ่มต้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส กลับพบว่าปริมาณสปอร์ *B. cereus* มีการลดลงตั้งแต่วันที่ 5 – 10 เป็นต้นไป แสดงว่าอุณหภูมิต่ำนี้สามารถทำลายโครงสร้างและองค์ประกอบภายในสปอร์ได้

ตารางที่ 1: ปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ของสปอร์ *B. cereus* แต่ละไอโซเลทภายหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 70 นาทีในสารละลายเปปโตน 0.1%

Isolates	Temperature (°C)	Initial number (N_0)	Final number (N)	Survival ratio (log N/N_0)
BC1	80	4.43×10^3	5.10×10^3	1.02
	85	2.54×10^4	9.83×10^2	0.88
	90	1.93×10^3	ND	ND
	93	2.90×10^4	7.00×10^1	0.41
	95	1.86×10^3	ND	ND
	98	4.33×10^4	1.50×10^1	0.25
BC2	80	6.53×10^2	4.03×10^2	0.93
	85	3.40×10^2	1.77×10^2	0.89
	90	3.06×10^2	ND	ND
	93	6.00×10^4	3.50×10^2	0.53
	95	3.26×10^3	ND	ND
	98	7.50×10^4	1.67×10^1	0.25
BC3	80	2.86×10^5	2.21×10^5	0.98
	85	2.13×10^5	7.03×10^4	0.91
	90	6.45×10^4	6.00×10^2	0.58
	93	1.65×10^4	4.50×10^2	0.63
	95	7.13×10^4	1.20×10^2	0.43
	98	4.87×10^4	ND	ND

2. ความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ในสารละลายนม

เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลท (BC1 BC2 และ BC3) ในสารละลายนม ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส พบว่าสปอร์ของ *B. cereus* มีพฤติกรรมคล้ายคลึงกัน นั่นคือ ที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส ปริมาณสปอร์มีการลดลงเพียงเล็กน้อย หรือคงที่เมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้สปอร์มีปริมาณลดลง (ตารางที่ 2) โดยจะเห็นได้ว่า

สปอร์ของ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทมีปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ภายหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส อยู่ระหว่าง 0.9 -1.0 แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นค่าสัดส่วนการรอดชีวิตกลับลดลง โดยทุกไอโซเลทมีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตต่ำสุดที่ 98 องศาเซลเซียส โดย BC1 BC2 และ BC3 มีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตที่ 98 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.36 0.36 และ 0.23 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสัดส่วนการรอดชีวิตของสปอร์ในสารละลายนมมีค่าสูงกว่าในสารละลาย เปปโทน 0.1% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารละลายนมมีส่วนประกอบของสารๆ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุ ซึ่งมีส่วนช่วยในการป้องกันสปอร์จากความร้อนและเป็นแหล่งอาหารสำหรับการซ่อมแซมเซลล์ในกรณีที่ได้รับ

ตารางที่ 2: ปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ของสปอร์ *B. cereus* แต่ละไอโซเลทภายหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 70 นาทีในสารละลายนม

Isolates	Temperature (°C)	Initial number (N_0)	Final number (N)	Survival ratio ($\log N/N_0$)
BC1	80	2.87×10^5	2.82×10^5	0.99
	85	4.40×10^5	9.55×10^4	0.88
	90	4.86×10^5	1.40×10^4	0.73
	93	1.23×10^5	2.86×10^3	0.48
	95	3.40×10^5	4.53×10^3	0.66
	98	5.67×10^4	5.00×10^1	0.36
BC2	80	2.84×10^5	1.54×10^5	0.95
	85	1.49×10^5	6.97×10^5	0.94
	90	1.13×10^5	3.02×10^3	0.57
	93	6.50×10^4	2.87×10^2	0.51
	95	1.29×10^5	6.90×10^2	0.56
	98	7.23×10^4	5.50×10^1	0.36
BC3	80	1.88×10^5	2.04×10^5	1.01
	85	4.19×10^5	2.31×10^5	0.95
	90	7.13×10^4	8.70×10^2	0.61
	93	4.23×10^4	2.83×10^2	0.53
	95	2.64×10^4	1.22×10^3	0.70
	98	2.32×10^4	1.00×10^1	0.23

3. ค่า D-value Z-value และ F-value ของสปอร์ *B. cereus*

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถในการทนความร้อนของสปอร์ *B. cereus* แต่ละไอโซเลทจากค่า D-value ในสารละลายเปปโทน 0.1% และสารละลายนม พบว่าในสารละลายเปปโทน 0.1% BC1 มีค่า D-value ที่ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เท่ากับ 149.96 78.57 34.82 22.62 และ 10.93 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ในขณะที่ BC2 มีค่า D-value ที่อุณหภูมิเดียวกันเท่ากับ 182.81 64.90 40.15 21.84

และ 6.46 นาทีตามลำดับ ส่วน BC3 มีค่า D-value ที่อุณหภูมิเดียวกันเท่ากับ 286.66 108.41 25.38 23.83 และ 14.48 นาทีตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าค่าสปอร์ของ BC1 ซึ่งเป็นสปอร์ที่แยกได้จาก น้ำนมดิบมีความ สามารถในการทนร้อนต่ำกว่าสปอร์ของ BC2 และ BC3 ซึ่งแยกได้จากถั่วเขียวและเครื่อง บรรจุ M1 ที่อุณหภูมิเดียวกัน

สำหรับค่า D-value ของสปอร์ทั้งสามไอโซเลทในสารละลายนม พบว่า BC1 มีค่า D-value ที่ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เท่ากับ 140.93 81.64 28.73 15.19 11.70 และ 7.29 นาทีตามลำดับ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ BC2 มีค่า D-value ที่อุณหภูมิเดียวกันเท่ากับ 195.7 182.40 22.19 23.13 20.01 และ 22.08 นาทีตามลำดับ ส่วน BC3 มีค่า D-value ที่อุณหภูมิเดียวกันเท่ากับ 258.02 86.47 24.81 19.07 18.45 และ 17.54 นาทีตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกับสารละลายเปปโทน 0.1% นั่นคือ สปอร์ของ BC1 ซึ่งเป็นสปอร์ที่แยกได้จากน้ำนมดิบมีความสามารถในการทนร้อนต่ำกว่าสปอร์ของ BC2 และ BC3 ซึ่งแยกได้จากถั่วเขียวและเครื่องบรรจุ M1 ที่อุณหภูมิเดียวกัน และค่า D-value ของทั้งสปอร์สามไอโซ เลทในสารละลายนมมีค่าสูงกว่าในสารละลายเปปโทน 0.1% แต่ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาค่า Z-value ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ต้องการเพื่อทำให้ค่า D_T-value ลดลง 1 log₁₀ cycle พบว่าค่า Z-value ของไอโซเลท BC1 ในสารละลายเปปโทน 0.1% และสารละลายนม มีค่าเท่ากับ 16.36 และ 13.28 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่สปอร์ BC2 ในสารละลายทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากับ 14.38 และ 15.31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ BC3 มีค่าเท่ากับ 13.92 และ 15.27 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3: ค่า D-value และ Z-value ของสปอร์ *B. cereus* แต่ละไอโซเลทในสารละลายนมและสารละลาย เปปโทน 0.1% ที่ระดับอุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	D-value					
	สารละลายนม			สารละลายเปปโทน 0.1%		
	BC1	BC2	BC3	BC1	BC2	BC3
80	140.93 ^{Ca}	195.7 ^{Ba}	258.02 ^{Ba}	149.96 ^{Ba}	182.81 ^{Ca}	286.66 ^{Ca}
85	81.64 ^{Ba}	182.40 ^{Ba}	86.47 ^{Aa}	78.57 ^{ABab}	64.90 ^{Ba}	108.41 ^{Bab}
90	28.73 ^{Aa}	22.19 ^{*Aa}	24.81 ^{Aa}	34.82 ^{ABa}	40.15 ^{*ABa}	25.38 ^{Aa}
93	15.19 ^{*Aa}	23.13 ^{Aa}	19.07 ^{Aa}	22.62 ^{*ABb}	21.84 ^{Ab}	23.83 ^{Ab}
95	11.70 ^{Aa}	20.01 ^{Aa}	18.45 ^{Aa}	10.93 ^{Aab}	6.46 ^{Aa}	14.48 ^{Ab}
98	7.29 ^{Aa}	22.08 ^{Ac}	17.54 ^{Abc}	8.67 ^{Aa}	12.74 ^{Aab}	15.18 ^{Aab}
Z-value	13.28 ^{ab}	15.31 ^{ab}	15.27 ^{ab}	16.36 ^b	14.38 ^{ab}	13.92 ^{ab}

หมายเหตุ

- อักษรอังกฤษพิมพ์เล็ก(a-z) แสดงความแตกต่างระหว่างแถวของแต่ละสายพันธุ์ของ สารละลายนม และ เปปโทน 0.1%ในแต่ละ อุณหภูมิ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- อักษรอังกฤษพิมพ์ใหญ่(A-Z) แสดงความแตกต่างระหว่างคอลัมน์ของแต่ละอุณหภูมิของ สารละลายนม และ เปปโทน 0.1%ในแต่ ละสายพันธุ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- สัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างระหว่าง สารละลายนม และ เปปโทน 0.1

การตอบสนองต่อระดับอุณหภูมิต่างๆของสปอร์ *B. cereus* แต่ละสายพันธุ์จะมีการตอบสนองเพื่อความอยู่รอดต่างกัน อาจเป็นเพราะแหล่งที่มาของแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ซึ่งแหล่งที่มาจากระบวนการให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิสูง การที่สปอร์ *B. cereus* สามารถทนต่อความร้อนได้เป็นผลมาจากกระบวนการตอบสนองต่อความเครียด (stress response) โดยจะเห็นได้ว่าสปอร์ของไอโซเลท BC2 และ BC3 ที่แยกได้จากถั่วเขียวและเครื่องบรรจุ M1 มีค่าสัดส่วนการเหลือรอด D-value และ Z-value สูงกว่าสปอร์ของ BC1 ที่แยกได้จากถั่วเขียวดิบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่สภาวะแวดล้อมในถั่วเขียวและเครื่องบรรจุมีความเครียดมากกว่าถั่วเขียวดิบ เพราะทั้งในถั่วเขียวและเครื่องบรรจุนั้นโดยทั่วไปมักมีอุณหภูมิสูงกว่าถั่วเขียวดิบ จึงอาจส่งผลให้แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายใต้สภาวะดังกล่าวมีกลไกการปรับตัวและตอบสนองต่อความร้อนเพื่อความอยู่รอด ทำให้สามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ดีควรมีการศึกษาถึงกลไกของปรากฏการณ์ดังกล่าวในเชิงลึกต่อไป ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shaheen และคณะ (2010) ที่รายงานว่า การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในไซโลเก็บนมเป็นผลมาจากการต้านทานความร้อนของสปอร์ *B. cereus* (Shaheen et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า สปอร์ *B. cereus* มีความสามารถในการทนความร้อนได้ในน้ำนมดิบหรือนมที่ไม่ผ่านการปรุงแต่งจากการพาสเจอร์ไรส์ได้ เนื่องมาจากการทำความสะอาดที่พื้นผิวภาชนะไม่เพียงพอ (Flint et al., 1997)

จากการศึกษาในครั้งนี้อย่างพบว่าสปอร์ *B. cereus* มีความสามารถในการทนร้อนสูง ไม่สามารถกำจัดได้โดยใช้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที (Anderson et al., 1995) สปอร์ที่เหลือรอดอาจออกและเจริญขึ้นมาใหม่ ส่งผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ได้ ดังจะเห็นได้จากตัวอย่างของนมโรงเรียนซึ่งเป็นนมพาสเจอร์ไรส์ เกิดการเสื่อมเสียเนื่องจากสปอร์ของ *B. cereus* เกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1938 (Stone et al., 1952) ความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ที่พบในนม (Wong et al., 1987; Shaheen et al., 2010) อาจทำให้สปอร์ *B. cereus* เหลือรอดจากการให้ความร้อนระหว่างกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์และเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสปอร์ *B. cereus* สามารถสร้างสารพิษประเภทเอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาหารเป็นพิษในมนุษย์ได้

จากข้อมูลที่ได้สามารถคำนวณหาค่า F-value ซึ่งเป็นระยะเวลาที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ที่สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ต้องการ โดยสามารถคำนวณได้จากการนำค่า D-value ที่อุณหภูมินั้น (D_T) คูณกับปริมาณเชื้อที่ต้องการให้ลดลง ข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนของสปอร์ *B. cereus* ในน้ำนมดิบของโรงงานอุตสาหกรรมแห่งหนึ่ง (ไม่แสดงข้อมูล) พบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณอยู่ในช่วง 2– 4 \log_{10} cfu/ml ตามที่มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ระบุไว้ว่าให้มีปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มได้ไม่เกิน 100 cfu/ml ดังนั้นค่า F-value หรือระยะเวลาในการให้ความร้อนเพื่อลดปริมาณสปอร์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่อุณหภูมิต่างๆ นั้น ต้องใช้เวลาดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าหากใช้อุณหภูมิสูงและมีปริมาณเชื้อปนเปื้อนต่ำก็จะใช้ระยะเวลาสั้น ในทางกลับกันหากมีปริมาณเชื้อปนเปื้อนสูงก็จะใช้ระยะเวลาสั้น โดยสปอร์ของไอโซเลท BC1 ใช้ระยะเวลาที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสต่ำที่สุด คือประมาณ 14.58

21.87 และ 29.16 นาที ในการลดปริมาณสปอร์ปนเปื้อนลง 2 3 และ 4 \log_{10} ตามลำดับ ในขณะที่สปอร์ของ ไอโซเลท BC2 ใช้ระยะเวลาที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสสูงที่สุด เท่ากับ 44.16 66.24 และ 88.32 นาที ในการลดปริมาณสปอร์ปนเปื้อนลง 2 3 และ 4 \log_{10} ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงาน เนื่องจากทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต รวมทั้งความร้อนและระยะเวลาที่ต้องใช้สูงผลิตภัณฑ์ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ของผลิตภัณฑ์พาสเจอร์ไรซ์

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาความสามารถในการทนร้อนในสารละลายเปปโทน 0.1% เปรียบเทียบกับในน้ำนมของ สปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลท พบว่าสปอร์ที่นำมาศึกษาทั้งหมดสามารถทนต่อความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียสได้ แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส ความร้อนเริ่ม มีบทบาทในการยับยั้งสปอร์เหล่านี้ โดยสามารถพิจารณาได้จากค่าสัดส่วนการรอดชีวิต (survival ratio, N/N_0) และในทุกไอโซเลทและสารละลายที่ทำการศึกษา ค่า N/N_0 มีค่าต่ำสุดที่ 98 องศาเซลเซียส โดย BC1 BC2 และ BC3 มีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตที่ 98 องศาเซลเซียสในสารละลายเปปโทน 0.1% เท่ากับ 0.25 0.25 และไม่สามารถตรวจนับได้ ตามลำดับ เซลเซียส ในขณะที่ BC1 BC2 และ BC3 มีค่าสัดส่วนการรอดชีวิต ที่ 98 องศาเซลเซียสในสารละลายนมเท่ากับ 0.36 0.36 และ 0.23 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่า สปอร์ของ BC2 และ BC3 ที่แยกได้จากถังฆ่าเชื้อและเครื่องบรรจุ M1 มีความสามารถในการทนต่อความร้อนสูงกว่าสปอร์ของ BC1 ที่แยกได้จากน้ำนมดิบที่อุณหภูมิเดียวกันทั้งใน สารละลายเปปโทน 0.1% และในน้ำนม โดยในสารละลายเปปโทน 0.1% ค่า $D_{98^\circ\text{C}}$ ของ BC1 BC2 และ BC3 เท่ากับ 10.93 6.46 และ 14.48 นาทีตามลำดับ ในขณะที่ในน้ำนม $D_{98^\circ\text{C}}$ ของ BC1 BC2 และ BC3 มีค่า เท่ากับ 7.29 22.08 และ 17.54 นาทีตามลำดับ ทั้งยังพบว่าค่า D-value ของทั้งสปอร์สามไอโซเลทใน สารละลายนมมีค่าสูงกว่าในสารละลายเปปโทน 0.1% แต่ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ พิจารณา ค่า Z-value พบว่าสปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทมีค่า Z-value ใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในช่วง 13.28 -16.36 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาค่า F-value โดยคำนวณจากค่า D-value ที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถลดปริมาณสปอร์ *B. cereus* ลงจนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข (4 log reduction) พบว่าที่อุณหภูมิ 98 องศา เซลเซียส จะต้องใช้เวลาประมาณ 29.16 88.32 และ 70.16 นาทีในการลดปริมาณสปอร์ของไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ลง 4 \log_{10} ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ไม่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ของ ผลิตภัณฑ์พาสเจอร์ไรซ์ ทั้งยังไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงาน เนื่องจากทำให้เพิ่มต้นทุนในการ ผลิต

เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ด้วยความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ พบว่า แบบจำลองจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (First-Order Kinetic

Models) มีความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองมากกว่าแบบจำลองล็อกโลจิสติก (log-logistic Models) เมื่อพิจารณาจากค่า MSE เปรียบเทียบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทั้งสองชนิด

จากข้อมูลที่ได้จะเห็นว่าสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานสามารถทนต่อความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์ได้สูง ดังนั้นความร้อนที่ใช้กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอสำหรับการควบคุมและลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ สถานประกอบการควรมีการหามาตรการอื่นเสริม เช่น หลักการผลิตที่ดี (GMP) และกระบวนการ CIP ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันและลดการปนเปื้อนหลังการฆ่าเชื้อ



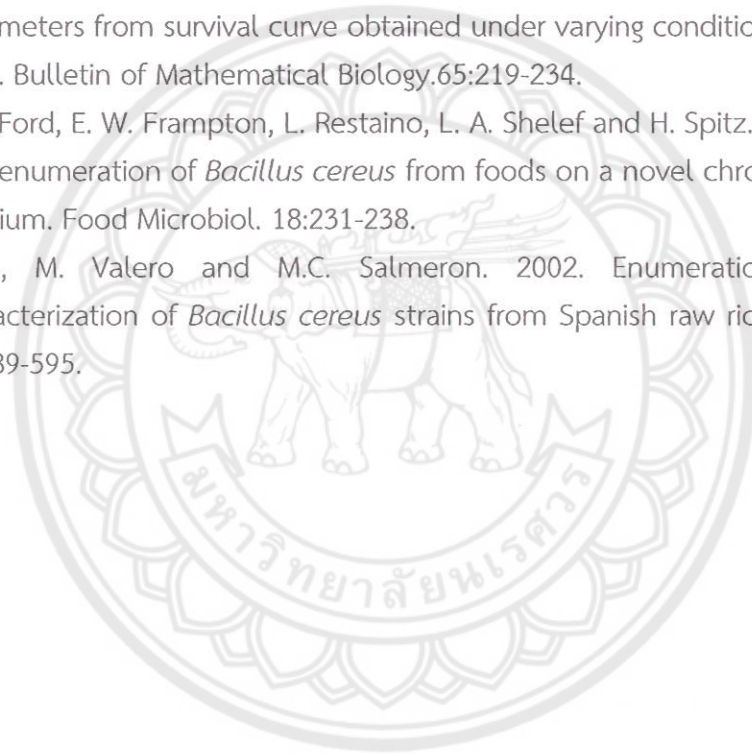
ตารางที่ 6: ค่า F หรือระยะเวลาที่ต้องการที่อุณหภูมิต่างๆ ในการลดปริมาณสปอร์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

Isolates	อุณหภูมิ (°C)	D-value (min)	เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (min)	ปริมาณเชื้อที่ต้องการให้ลดลง (Required Log reduction)	Isolates	อุณหภูมิ (°C)	D-value (min)	เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (min)	ปริมาณเชื้อที่ต้องการให้ลดลง (Required Log reduction)	Isolates	อุณหภูมิ (°C)	D-value (min)	เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (min)	ปริมาณเชื้อที่ต้องการให้ลดลง (Required Log reduction)		
BC 1	80	140.93	281.86	2	BC 2	80	195.7	391.4	2	BC 3	80	258.02	516.04	2		
			422.79	3				587.1	3				774.06	3		
			563.72	4				782.8	4				1032.08	4		
	85	81.64	163.28	2		85	85	182.40	364.8		2	90	90	24.81	172.94	2
			244.92	3					547.2		3				259.41	3
			326.56	4					729.6		4				345.88	4
	90	28.73	57.46	2		90	90	22.19	44.38		2	93	93	19.07	49.62	2
			86.19	3					66.57		3				74.43	3
			114.92	4					88.76		4				99.24	4
	93	15.19	30.38	2		93	93	23.13	46.26		2	95	95	18.45	38.14	2
			45.57	3					69.39		3				57.21	3
			60.76	4					92.52		4				76.28	4
95	11.70	23.4	2	95	95	20.01	40.02	2	98	98	17.54	36.9	2			
		35.1	3				60.03	3				55.35	3			
		46.8	4				80.04	4				73.8	4			
98	7.29	14.58	2	98	98	22.08	44.16	2	98	98	17.54	35.08	2			
		21.87	3				66.24	3				52.62	3			
		29.16	4				88.32	4				70.16	4			

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ ฝั้นถาวร. 2547. การศึกษาเชื้อ *Bacillus spp.* ในกระบวนการผลิตนม ยู.เอช.ที. ณ องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคเหนือตอนล่าง (จ.สุโขทัย). การศึกษาค้นคว้าด้วยตนเองปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร. จำนวน 95 หน้า.
- ปรีระห์ศันย์ ประไซโย. 2548. เอกสารประกอบการสอน รายวิชา 103495 หัวข้อเฉพาะทางอุตสาหกรรมเกษตร เรื่อง โรคที่เกิดจากอาหาร (Foodborne disease). คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร. จำนวน 104 หน้า
- ปรีระห์ศันย์ ประไซโย และดร.ณิ วงศ์แก้ว. 2552. การศึกษาแหล่งปนเปื้อนและประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการอุตสาหกรรมและวิจัยสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (IRPUS) ประจำปี 2551 เรื่อง การศึกษาแหล่งปนเปื้อนและประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ (I251C10015).
- Dogan, Z., K. Weidendorfer, M. Muller-Merbach, F. Lembke and J. Hinrichs. 2009. Inactivation kinetics of *Bacillus* spores in batch- and continuous-heating systems. 42:81-86.
- Fernandez, A., M. J. Ocio, P. S. Fernandez and A. Martinez. 2001. Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. 63:257-264.
- Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, C. Barsotti, A. Baggiani and S. Senesi. 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. FEMS Microbiol. Lett. 208:129-134.
- Giffel, M. C. Te, R. R. Beumer, P. E. Granum and F. M. Rombouts. 1997. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. Int. J. Food. Microbiol. 34:307-318.
- Gonzalez, I., M. Lopez, M. Mazas, A. Bernardo and R. Martin. 1996. Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of the three strains of *B. cereus*. Int. J. Food. Microbiol. 31:341-347.
- Hernandez-Herrero, L. A., M. J. Giner and M. Valero. 2008. Effective control of psychrotropic *Bacillus cereus* EPSO-35AS and INRA TZ415 spore outgrowth in carrot broth. Food Microbiol. 25:714-721.
- Jagannath, A. T. Tsuchido and J.-M. Membre. 2005. Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores using the modified Weibull and Bigelo equations. Food Microbiol. 22:233-239.
- Leguerinel, L. and P. Marfart. 2001. Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. Int. J. Food. Microbiol. 63:29-34.
- Lin, S., H. Schraft, J. A. Odumeru and M. W. Griffiths. 1998. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. Int. J. Food Microbiol. 43:159-171.

- Pacheco-Sanchez, C. de P. and P. R. de Massaguer. 2007. *Bacillus cereus* in Brazillian ultra high temperature milk. *Sci.Agric. (Piracicaba, Braz.)* 64(2): 152-161.
- Peleg, M., M. D. Norman, M. G. Corradini, A. J. van Asselt, P. de Jong and P. F. Ter Steeg. 2008. Estimating the heat resistance parameters of bacterial spores from their survival rations at the end of UHT and other heat treatments. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* 48:634-648.
- Peleg, M. 2006. *Advanced quantitative microbiology for food and biosystems: Models for predicting growth and inactivation.* Boca Raton, FL: CRC Press.
- Peleg, M., M. D. Norman, and M. G. Corradini. 2004. The logistic (Verhust) model for sigmoid microbial growth curve revisited. *Food Res. Int.* 40:808-818.
- Peleg, M., D. Norman, and O.H. Campanella. 2003. Estimation microbial inactivation parameters from survival curve obtained under varying conditions – the linear case. *Bulletin of Mathematical Biology.*65:219-234.
- Peng, H., V. Ford, E. W. Frampton, L. Restaino, L. A. Shelef and H. Spitz. 2001. Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. *Food Microbiol.* 18:231-238.
- Sarrias, J.A., M. Valero and M.C. Salmeron. 2002. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol.* 19:589-595.



บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันตลาดนมพาสเจอร์ไรซ์ในประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวสูงเพื่อสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคที่มีมากขึ้น เนื่องจากนมพาสเจอร์ไรซ์มีคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับน้ำนมดิบ แต่มีความปลอดภัยสำหรับการบริโภค และมีอายุการเก็บรักษานานกว่า การปนเปื้อนของ *Bacillus cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์จัดว่าเป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมนม เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีนเอส ไลเปส และฟอสโฟไลเปส ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นผิดปกติ (off-flavors) ลิ้ม (sweet curding) และครีมขม (bitty cream) ส่งผลให้อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์สั้นกว่าที่ควรจะเป็น (Giffel et. al., 1997; Lin et. al, 1998) นอกจากนี้ *B. cereus* ยังเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษอีกด้วย (Eley, 1996; Jay, 2000; Geiner et. al., 2007)

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ ช่วง pH และ water activity กว้าง อีกทั้งยังสามารถสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี *B. cereus* ยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารทั้งของคนและของสัตว์หลายชนิด จึงสามารถพบสปอร์ของเชื้อชนิดนี้ได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น แหล่งน้ำ ดิน และพื้นผิวต่างๆ

การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของสปอร์ในน้ำนมดิบก่อนการฆ่าเชื้อ และการปนเปื้อนภายหลังการฆ่าเชื้อจากสภาวะแวดล้อมในโรงงานนม (Lin et. al, 1998) ข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์ของโรงงานผลิตภัณฑ์นมแห่งหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง พบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ ซึ่งประมาณร้อยละ 80 ของโคโลนีที่พบเป็น *B. cereus* (ปริยะทัศน์ีย์ และ ดรณี, 2552) โดย *B. cereus* ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์ มีแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญคือน้ำนมดิบก่อนการฆ่าเชื้อ และอุปกรณ์การผลิต

ถึงแม้ว่า *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อน แต่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูงได้ โดยทั่วไปการผลิตน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์จะผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ไม่สูงนัก (อุณหภูมิระหว่าง 63-72 องศาเซลเซียส) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์อาจไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* ดังนั้นการศึกษาความสามารถในการทนต่อความร้อน (heat resistance) และจลนพลศาสตร์ของการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานนม จึงมีความสำคัญเนื่องจากจะทำให้สามารถคาดคะเนสภาวะการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ได้ ซึ่งจะนำไปสู่การลดปริมาณนมที่เสื่อมเสียก่อนวันหมดอายุ ลดต้นทุนการผลิตของโรงงาน รวมทั้งช่วยเพิ่มความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานอุตสาหกรรมนมพาสเจอร์ไรซ์ ในเขตภาคเหนือตอนล่าง
2. เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์การยับยั้งด้วยความร้อนสำหรับสปอร์ *B. cereus* โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม
3. ทำการคาดคะเนสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้ในข้อ 2 และทดสอบประสิทธิภาพของแบบจำลองที่ได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยชิ้นนี้ทำการทดสอบความสามารถในการทนความร้อนของสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ของโรงงานอุตสาหกรรมนมแห่งหนึ่ง ในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยจำแนกตามแหล่งที่พบ ได้แก่ ถังเก็บน้ำนมดิบ ถังเทอร์โมซ์ และอุปกรณ์เครื่องบรรจุ ข้อมูลที่ได้ถูกนำไปใช้ในการศึกษาจลนพลศาสตร์การรอดชีวิตของสปอร์ภายใต้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์เซชันโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่แตกต่างกันสองชนิด (first order kinetic model และ weibull distribution model) ซึ่งจะนำไปสู่การคาดคะเนสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ด้วยความร้อน เพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนากระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ต่อไป

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

B. cereus เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้เป็นอย่างดี และสปอร์ของเชื้อชนิดนี้ได้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น แหล่งน้ำ ดิน และฝุ่นละอองต่างๆ นอกจากนี้ *B. cereus* ยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์หลายชนิด ดังนั้นจึงส่งผลให้พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่หลากหลาย เช่น นมและผลิตภัณฑ์นม ข้าวสาร เครื่องเทศต่างๆ อาหารแห้ง ถั่ว ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์นมอบ การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากน้ำนมดิบ และ/หรือการปนเปื้อนจากอุปกรณ์การผลิตและสภาวะแวดล้อมในโรงงานภายหลังการฆ่าเชื้อ ซึ่งส่งผลกระทบต่อทั้งในแง่เศรษฐกิจและสังคม เนื่องจากเชื้อชนิดนี้นอกจากจะก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์แล้วยังเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษอีกด้วย

ถึงแม้ว่า *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อน แต่สปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการทนต่อความร้อนสูงได้ดี และข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยหลายชิ้นพบว่า สปอร์ของ *B. cereus* บางสายพันธุ์สามารถทนต่อความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์ได้ ดังนั้นการศึกษาความสามารถในการทนต่อความร้อนของสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานนม และจลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ *B. cereus* จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพราะนอกจากจะทำให้ทราบถึงการรอดชีวิตของสปอร์เหล่านี้ภายใต้สภาวะการให้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์เซชันแล้ว ยังจะทำให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ของ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตอีกด้วย ซึ่งจะนำไปสู่การลดต้นทุนการผลิตของโรงงาน รวมทั้งช่วยเพิ่มหลักประกันในด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ด้วย

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

Bacillus cereus

B. cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างท่อนขนาด $0.3 - 2.2 \times 1.2 - 7.0$ ไมโครเมตร สามารถสร้างสปอร์และเจริญได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เมื่อย้อมด้วยสีโพลีโครมเมทิลีนบลู (polychrome methylene blue) เซลล์จะติดสีฟ้าในขณะที่สปอร์จะติดสีแดง เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟลกเจลลาแบบเพอริทริคัส (peritrichous) เป็นแบคทีเรียไม่ทนกรด สามารถเจริญได้ในช่วง pH 4.9 - 9.3 ค่าวอเตอร์แอกทิวิตี (a_w) มากกว่าหรือเท่ากับ 0.93 และเติบโตได้ในที่มีเกลือต่ำกว่าร้อยละ 10 สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง (8 - 55 องศาเซลเซียส) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 30 องศาเซลเซียส *Bacillus* บางสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเทอร์โมดิวริกไซโครโทรปิก (thermoduric psychrotropic) เช่น *B. cereus* ในขณะที่บางกลุ่มถูกจัดเป็นเทอร์โมไฟล์ (thermophile) เช่น *B. stearothermophilus* *B. sporothermodurans* และ *B. licheniformis* ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มหลังนี้สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 120 องศาเซลเซียส (Dogan et al., 2009) นอกจากนี้ *B. cereus* ยังทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆได้ดี สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ตามดิน หรือแหล่งน้ำ โดยทั่วไปแบคทีเรียในตระกูล *Bacillus* ไม่ทนความร้อนแต่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูงได้

B. cereus สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ หากผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเซลล์มีชีวิตหรือสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น *B. cereus* มีความสามารถในการสร้างสารพิษหลายชนิดที่ส่งผลต่อเซลล์ผู้อาศัย ได้แก่ สารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) เอนไซม์เลซิทีเนส (enzyme lecithinase) เอนไซม์โปรติเอส (protease) เอนไซม์เบตาแลคตาเมส (β - lactamase) เอนไซม์สฟิงโกมายอีลิเนส (sphingomyelinase) เซเรโอลัยซิน (cereolysin) ฮีโมลัยซินบี และแอล (hemolysin B L) เป็นต้น นอกจากนี้ *B. cereus* ยังสามารถผลิตสารปฏิชีวนะชนิดโพลีเปปไทด์ (polypeptide antibiotics) ได้อีกด้วย

อาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *B. cereus* แบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ ได้แก่

1) อาหารเป็นพิษชนิดที่ก่อให้เกิดการอาเจียน (Emetic illness) อาหารเป็นพิษชนิดนี้ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้และอาเจียนหลังจากการบริโภคอาหารที่มีสารพิษชนิดอีเมติก (Emetic toxin) เข้าไปประมาณ 1 - 6 ชั่วโมง สารพิษชนิดนี้เป็นสารประกอบเปปไทด์ที่ทนความร้อนสูง อาหารที่เป็นเกี่ยวข้องได้แก่อาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลัก เช่น มันฝรั่ง ข้าว และพาสต้า มักเป็นอาหารที่หลีกเลี่ยงการบริโภคแล้วผ่านการอุ่นก่อนนำมาบริโภค ความร้อนดังกล่าวมีส่วนในการกระตุ้นสปอร์ให้งอก เจริญและสร้างสารพิษ ในช่วงแรกที่มีการระบาด อาหารเป็นพิษชนิดนี้ถูกเรียกว่า “โรคร้านอาหารจีน (Chinese Restaurant Syndrome)” เนื่องผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นลูกค้าที่เข้ามาใช้บริการในร้านอาหารจีน ซึ่งมีการนำข้าวค้างคืนมาให้ความร้อนใหม่เพื่อจำหน่าย

2) อาหารเป็นพิษชนิดที่ก่อให้เกิดอาการท้องร่วง (Diarrhea illness) อาหารเป็นพิษชนิดนี้มีระยะฟักตัวประมาณ 8 - 16 ชั่วโมง หลังจากผู้ป่วยบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษชนิดไดอาเรียล (Diarrheal toxin) สารพิษชนิดนี้ที่ไม่ทนความร้อนและกรด ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสียอย่างรุนแรง ปวดเกร็งในช่องท้อง คลื่นไส้แต่ไม่มียาอาการอาเจียนร่วมด้วย อาหารที่เป็นสาเหตุค่อนข้างมีความหลากหลาย เช่น พายไก่ ซอสวานิลลา มันทบ มีทโลฟ (meat loaf) หรือสลัดมันฝรั่ง

จากการที่สปอร์ของเชื้อชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไป การปนเปื้อนสู่อาหารจึงเกิดได้ง่าย อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อนของ *B. cereus* จะเป็นอันตรายก็ต่อเมื่อมีปริมาณเซลล์ในระดับสูง ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัม อาหารหรือมากกว่าเท่านั้น (ปริยาศศินีย์, 2548) ดังนั้นหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยในอาหารเช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข และ Codex Alimentarius Commission จึงได้มีการกำหนดมาตรฐานการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในอาหารหลายชนิดเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 267 พ.ศ. 2545 มีการระบุปริมาณการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ไว้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค โดยกำหนดให้พบ *B. cereus* ได้ไม่เกิน 100 CFU/มิลลิลิตร

เอนโดสปอร์

แบคทีเรียแกรมบวกบางสปีชีส์มีความสามารถในการสร้างโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่าเอนโดสปอร์ (endospore) ซึ่งช่วยให้เซลล์มีความทนทานต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดียิ่งขึ้น เช่น ความร้อนสูง รังสีอัลตราไวโอเลต สารเคมีฆ่าเชื้อ และความแห้งแล้ง แบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ได้ประกอบด้วย *Bacillus Thermoactinomyces Desulfotomaculum Clostridium* และ *Sporosarcina* มีรายงานว่าเอนโดสปอร์ของ *Clostridium botulinum* ทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือดได้เป็นเวลาหลายชั่วโมง ระดับความสามารถในการทนความร้อนของเอนโดสปอร์แตกต่างกันไปตามสปีชีส์ โดยทั่วไปเอนโดสปอร์สามารถทนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ได้อย่างน้อย 10 นาที เอนโดสปอร์นับว่ามีความสำคัญในแง่ของจุลชีววิทยาการอาหารและการแพทย์ เนื่องจากแบคทีเรียก่อโรคที่พบในอาหารส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้

เอนโดสปอร์มีโครงสร้างที่ซับซ้อน (รูปที่ 1) โครงสร้างที่สำคัญประกอบด้วย

1. เยื่อหุ้มชั้นนอก (Exosporium) ซึ่งเป็นชั้นโปรตีนบางๆ ที่ห่อหุ้มสปอร์ไว้
2. สปอร์โคท (Spore coat) เป็นชั้นของสารประกอบโปรตีนที่พบได้เฉพาะในสปอร์เท่านั้น โปรตีนเหล่านี้เรียงซ้อนกันหลายชั้นจนมีความหนาพอสมควร สปอร์โคทมีคุณสมบัติพิเศษที่ไม่ยอมให้สารต่างๆ ซึมผ่านได้ (Impermeable) จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันเซลล์จากสารเคมีที่เป็นอันตราย
3. คอร์ตเทกซ์ (Cortex) เป็นชั้นของเปปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ที่เชื่อมต่อกันอย่างหลวมๆ และมีกรดไดพิโคลินิก (Dipicolinic acid; DPA) เป็นองค์ประกอบหลัก DPA จะเชื่อมต่อบนโครอสลิงค์ (cross link) กับแคลเซียมที่ฝังตัวอยู่ในชั้นของสปอร์โคท และมีบทบาทสำคัญในการทำให้สปอร์สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้เป็นอย่างดี เนื่องจากพันธะเหล่านี้ทำให้สารต่างๆ ไม่สามารถผ่าน

เข้ามาภายในของสปอร์ได้ สัดส่วนของพันธะ DPA-calcium คิดเป็นร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้งของเอนโดสปอร์ทั้งหมด

4. คอร์ (Core) หรือสปอร์ชั้นในประกอบไปด้วยโครงสร้างพื้นฐานเช่นเดียวกับเซลล์ทั่วไป ได้แก่ ผนังเซลล์ (cell wall) เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) นิวคลีโออิด (nucleoid) และไซโตพลาสซึม (cytoplasm) สปอร์ชั้นในมีน้ำเป็นองค์ประกอบเพียงร้อยละ 10 – 30 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำในเซลล์มีชีวิตทั่วไป (vegetative cells) ส่งผลให้ไซโตพลาสซึมของสปอร์ชั้นในมีสถานะเป็นเจล และช่วยให้เอนโดสปอร์สามารถรอดชีวิตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้ง แต่คุณลักษณะดังกล่าวจะส่งผลให้เอนไซม์ไซโตพลาสซึมอยู่ในสภาพที่ไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ค่า pH ของไซโตพลาสซึมของสปอร์ชั้นในที่ต่ำกว่าค่า pH ของเซลล์มีชีวิตประมาณหนึ่งหน่วยจะช่วยในการรอดชีวิตของสปอร์ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด แบคทีเรียยังสามารถสร้างโปรตีนขนาดเล็กที่ละลายในกรดได้ (small acid soluble spore proteins, SASPs) ขึ้นมาในช่วงของการเกิดสปอร์ โปรตีนเหล่านี้จะจับตัวกับ DNA ที่อยู่ในสปอร์ชั้นใน SASPs ทำหน้าที่ในการป้องกัน DNA จากรังสี UV ความแห้งแล้ง และความร้อนแห้ง นอกจากนี้ SASPs ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนของสปอร์ในระหว่างการงอกอีกด้วย

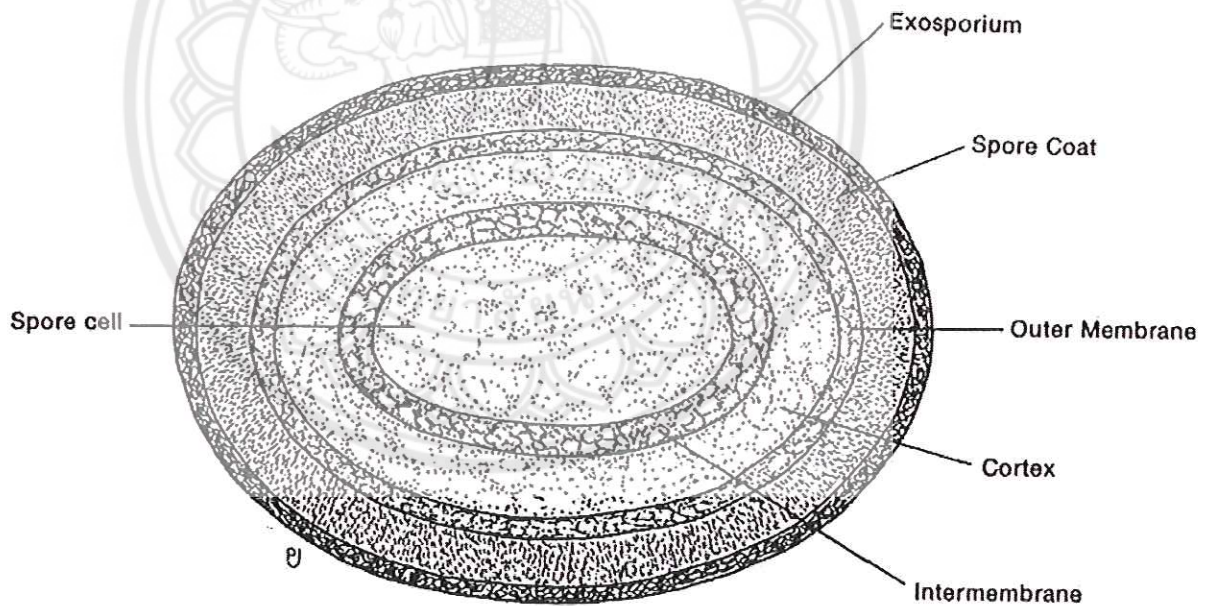


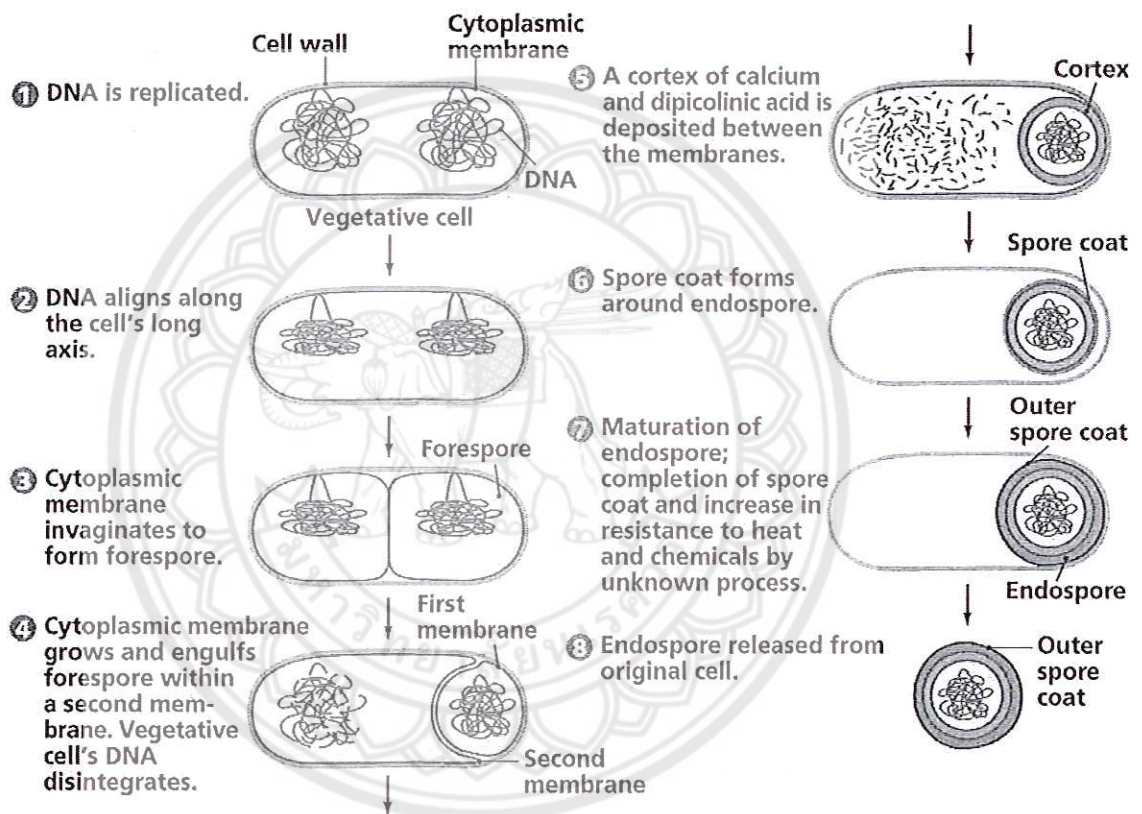
Fig. 8.1. Endospore

รูปที่ 1: โครงสร้างของเอนโดสปอร์

ที่มา: <http://pscantie.myweb.uga.edu/definition.html>

การสร้างสปอร์เป็นกลไกเพื่อการอยู่รอดของแบคทีเรีย เอนโดสปอร์จะถูกสร้างขึ้นขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต กระบวนการสร้างสปอร์ (Sporogenesis หรือ Sporulation) กิน

เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง กระบวนการนี้มีความซับซ้อน (รูปที่ 2) โดยเริ่มจากการที่แบคทีเรียมีการแบ่งตัวของ DNA เป็นสองชุด จากนั้น DNA ชุดใหม่ที่ถูกสร้างขึ้นจะมีการจัดเรียงตัวตามแนวยาวของเซลล์และสร้างเส้นใย (Axial filament) ขึ้นเพื่อยึดติดกับเซลล์เมมเบรน ต่อมาชั้นของเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) จะเกิดการม้วนตัวเข้าหุ้ม DNA อย่างสมบูรณ์จนเกิดเป็น forespore ที่มีเยื่อหุ้มสปอร์สองชั้น ส่วน DNA ชุดเดิมจะสลายตัวไป จากนั้นจะเกิดการสร้างชั้นคอร์เท็กซ์ขึ้นในบริเวณช่องว่างระหว่างเมมเบรนทั้งสองโดยการสะสมของโมเลกุลแคลเซียมและ DPA จากนั้นชั้นของสปอร์โคทจะก่อตัวขึ้นรอบๆ เอนโดสปอร์ ในช่วงนี้สปอร์จะเจริญขึ้นจนโตเต็มที่ และถูกปล่อยออกมาเมื่อสปอร์แรงเจียมถูกทำลาย



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

รูปที่ 2 : กระบวนการเกิดสปอร์ (Sporulation)

ที่มา : http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%203/03-22_Sporulation_L.jpg

การเปลี่ยนแปลงสภาพจากสปอร์ไปสู่เซลล์มีชีวิต เรียกว่ากระบวนการงอกของสปอร์ (Spore germination) เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนเช่นเดียวกับการสร้างสปอร์ แบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ คือ

1. ระยะกระตุ้น (Activation) โดยทั่วไปเอนโดสปอร์จะไม่เกิดการงอกหากไม่ได้รับการกระตุ้น ถึงแม้จะอยู่ภายใต้สภาวะที่มีอาหารสมบูรณ์การกระตุ้นอาจเป็นทางกายภาพหรือสารเคมีก็ได้ เช่น การกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 60 – 70 องศาเซลเซียส (heat shock activation) การกระตุ้นด้วย

สารเคมีที่ทำให้ผิวสปอร์เปียกชื้น (surface wetting activation) สารเคมีที่นิยมใช้ได้แก่ คลอไรด์ โคบอลต์ แมงกานีส ฟอสเฟต สังกะสี หรืออาจเป็นสารที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่น อะดีนีน อะลานีน แคลเซียมไดฟิโคลิเนต คาร์บอนไดออกไซด์ กลูโคส กรดแลคติก และไทโรซีน ในขั้นตอนนี้สิ่งกระตุ้นจะมีบทบาทในการย่อยสลายเยื่อหุ้มชั้นนอก สปอร์โคท และคอร์เท็กซ์ ทำให้สารต่างๆ สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์และกระตุ้นกระบวนการเมแทบอลิซึมของสปอร์ได้ ไฮเดรต

2. ระยะการงอก (Germination) เป็นระยะที่สปอร์เปลี่ยนจากสภาวะจำศีล (dormant) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนและสะท้อนแสงได้ดีไปเป็นเซลล์ที่พร้อมสำหรับการเจริญเติบโต ระยะนี้เริ่มจากการเกิดร่อง (germination groove) ขึ้นในสปอร์โคท ร่องนี้จะเป็ทางลำเลียงน้ำและสารอาหารเข้าสู่สปอร์ ในระยะนี้สปอร์มีลักษณะพองโต เยื่อหุ้มสปอร์แตก ความทนทานต่อความร้อนและภาวะวิกฤตหายไป ส่วนต่าง ๆ ของสปอร์เริ่มสลายไปพร้อมกับกิจกรรมทางเมแทบอลิซึมที่เพิ่มขึ้น มีการขับของเสียออกจากเซลล์ ประมาณร้อยละ 30 ของสารที่ขับออกมาเป็นพวกแคลเซียมไดฟิโคลิเนต โปรตีนต่าง ๆ กรดอะมิโน และไกลโคเพปไทด์ ณ จุดนี้สปอร์เกิดการงอกอย่างสมบูรณ์ เซลล์ยึดติดสีธรรมชาติได้ ไม่สะท้อนแสง และความชุ่มชื้นของสารแขวนลอยสปอร์จะลดลง

3. ระยะการเจริญเติบโต (Outgrowth) เป็นระยะที่เกิดขึ้นหลังจากสปอร์งอกแล้ว เซลล์จะมีการเจริญต่อไปและมีความต้องการสารอาหารสำหรับการเจริญ ระยะแรกของการเจริญสปอร์จะบวมออกจนเห็นได้ชัด และมีการสร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ชุดใหม่

นมและผลิตภัณฑ์นม

นมเป็นแหล่งของสารอาหารที่สำคัญ นมวัวหรือนมโคซึ่งนิยมนำมาบริโภคมั้มีองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ น้ำ ปริมาณร้อยละ 87 มันเนย (milk fat) ร้อยละ 4 น้ำตาลแลคโตส ร้อยละ 4 โปรตีน ร้อยละ 3 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเคซีน (casein) และเคซีน ปริมาณร้อยละ 0.7 เกลือแร่ที่มีมากในนม คือ แคลเซียมและฟอสฟอรัส นอกจากนี้นมโคยังเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินเอ ดี และบีสอง เนื่องจากนมเป็นแหล่งอาหารที่ดีและมีความสมบูรณ์ของสารอาหารต่างๆ มาก จึงได้มีการนำนมมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆหลายชนิด เช่น นมพาสเจอร์ไรซ์ นมผง นมอัดเม็ด นมข้นหวานบรรจุหลอด เนยแข็ง ไอศกรีม นอกจากการแปรรูปนมดิบเป็นนมพร้อมดื่มและผลิตภัณฑ์นมชนิดอื่นๆแล้ว การแยกองค์ประกอบของน้ำนมออกเป็นไขมันนม และโปรตีนนม เช่น เคซีน และเวย์ (whey) เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมนมอบและอุตสาหกรรมอาหารอื่น ๆ ยังเป็นการเพิ่มการใช้ประโยชน์จากนมให้มากขึ้น ในประเทศไทยรัฐบาลมีนโยบายส่งเสริมการทำฟาร์มนมและสนับสนุนอุตสาหกรรมแปรรูปนม ทั้งยังมีการรณรงค์ให้มิโครการดื่มนมในโรงเรียนระดับประถมศึกษาและต่ำกว่าทั่วประเทศ ทำให้อุตสาหกรรมนมภายในประเทศมีกำลังการผลิตสูง และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มจัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมและมีส่วนแบ่งในตลาดมากที่สุด โดยผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มอาจแยกเป็น 3 ชนิดตามอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ดังนี้ คือ

1. นมพาสเจอร์ไรซ์ (pasteurized milk) คือ นมสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 65 องศาเซลเซียส และคงที่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที หรือทำให้ร้อนไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงที่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 15 วินาที แล้วจึงทำให้เย็นลงทันทีที่ 5 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า ความร้อนที่ใช้สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในคน (pathogens) ทำให้นมปลอดภัยในการบริโภค แต่ความร้อนที่ใช้ไม่เพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสีย ดังนั้นนมประเภทนี้จึงมีอายุการเก็บสั้น ประมาณ 3 - 7 วัน และต้องเก็บที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส นมพาสเจอร์ไรซ์ที่มีขายในท้องตลาดอาจบรรจุภาชนะพลาสติกลักษณะเป็นถุงหรือขวด หรืออาจบรรจุในกล่องกระดาษลามิเนต

2. นมสเตอร์ไรซ์ (sterilized milk) นมสดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาที่เหมาะสม อุณหภูมินี้สามารถทำลายทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้นมเสียด้วย จึงสามารถเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานถ้ายังไม่เปิดภาชนะบรรจุ นมชนิดนี้มักนิยมบรรจุกระป๋องปิดสนิทและใช้ความร้อนฆ่าเชื้อ แต่เนื่องจากการใช้อุณหภูมิที่สูง อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารต่างๆในนม เช่น โปรตีน น้ำตาลนม ไขมัน ทำให้นมมีสี กลิ่นและรสชาติต่างไปจากนมนมดิบ เช่น มีสีน้ำตาลมากขึ้น มีรสขมเล็กน้อย หรือมีกลิ่นนมที่ผ่านการต้ม (cooked flavour)

3. นมยูเอชที (Ultra High Temperature, UHT) คือ นมที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 133 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 1 วินาที แล้วบรรจุในภาชนะและสถานะที่ปลอดเชื้อ ความร้อนที่ใช้สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้นมเสีย การใช้เวลาในการฆ่าเชื้อที่สั้นช่วยลดการเปลี่ยนสี หรือกลิ่นรสนมต้มได้ นมชนิดนี้มักบรรจุในกล่องกระดาษลามิเนตแข็งทรงสี่เหลี่ยม สามารถเก็บได้นานประมาณ 5-6 เดือนที่อุณหภูมิห้อง เป็นผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มที่ได้รับความนิยมมากภายในประเทศ

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุขได้มีการกำหนดมาตรฐานด้านผลิตภัณฑ์นมตามกฎหมายอาหาร พ.ศ. 2522 ไว้ดังนี้ นมพร้อมดื่มจะต้องมีเนื้อมนม ไม่รวมมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.25 ของน้ำหนัก และมีมันเนยไม่น้อยกว่า ร้อยละ 3.2 ของน้ำหนัก มีโปรตีนนม ไม่น้อยกว่าร้อยละ 2.8 ของน้ำหนักเนื้อมนม ไม่รวมมันเนย ไม่มีนม น้ำเหลืองเจือปน ไม่มีสารเจือปนที่อาจเป็นพิษในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น สารตกค้างจากยาฆ่าแมลง สารปฏิชีวนะ และอะฟลาท็อกซิน เป็นต้น ต้องปราศจากเชื้อโรคอันอาจจะติดต่อกันได้ เช่น เชื้อวัณโรค เชื้อที่ทำให้เกิดโรคแท้งติดต่อ เป็นต้น และผลิตภัณฑ์ต้องสามารถเก็บรักษาได้ไม่เกิน 10 วัน นับจากวันที่ผลิต

นอกจากนี้สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ยังได้มีการกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม สำหรับนมสด (มอก. 738-2547) ไว้ดังนี้ (ตารางที่ 1 และ 2)

ตาราง 1 : คุณลักษณะทางเคมีของนม

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด			วิธีทดสอบ
		นมพาสเจอร์ไรส์	นมสเตอริไลซ์	นมยูเอชที	
1.	มันเนย (butter fat) ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	3.4	3.4	3.4	AOAC (2000) ข้อ 33.2.25
2.	โปรตีน (crude protein) ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	3.0	3.0	3.0	AOAC (2000) ข้อ 33.2.11
3.	เนื้อมนม (total solids) ร้อยละโดยน้ำหนัก ไม่น้อยกว่า	12.0	12.0	12.0	AOAC (2000) ข้อ 32.2.44
4.	สารปฏิชีวนะ (antibiotic) ไม่มากกว่า (เทียบกับกลุ่มเพนนิ -ซิลิน) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	0.004	0.004	0.004	หมายเหตุ AOAC (2000)
5.	อะฟลาทอกซิน M ₁ (aflatoxin M ₁) ไม่มากกว่า ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม	0.5	0.5	0.5	ข้อ 49.3.02

(ที่มา: [http:// dome.eng.cmu.ac.th/2006/resources/fulltext/TIS738-2547](http://dome.eng.cmu.ac.th/2006/resources/fulltext/TIS738-2547))

ตาราง 2 : เกณฑ์กำหนดจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตนม

รายการที่	คุณลักษณะ	เกณฑ์ที่กำหนด	
		นมพาสเจอร์ไรส์	นมสเตอริไลซ์และนมยูเอชที
1.	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคโลนีในนมสด 1.0 ลูกบาศก์เซนติเมตร 1.1 ตัวอย่างจากโรงงาน 1.2 ตัวอย่างจากร้านจำหน่ายปลีก	ไม่เกิน 10,000 ไม่เกิน 50,000	ต้องไม่พบ ต้องไม่พบ
2.	เอสเคอริเชีย โคไล (<i>Escherichia coli</i>) 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ
3.	โคลิฟอร์ม (coliform) โคโลนี ในนมสด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร	ไม่เกิน 10	ไม่ต้องตรวจ
4.	เทอร์โมฟิลิกแบคทีเรีย (thermophilic bacteria) โคโลนีในนมสด 0.1 ลูกบาศก์เซนติเมตร	ไม่ต้องตรวจ	ต้องไม่พบ
5.	จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะเชื้อ - มายโคแบคทีเรีย ทูเบอคูโลซิส (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>) - ซาลโมเนลลา (<i>Salmonella</i>) - สเตรปโตค็อกคัส (<i>Streptococcus</i>) - สตาฟีโลค็อกคัสออเรียส (<i>Staphylococcus aureus</i>) - ชิเจลล่า (<i>Shigella</i>) - วิบริโอ โคลเลอรา (<i>Vibrio cholera</i>)	ต้องไม่พบ	ต้องไม่พบ

(ที่มา: [http:// dome.eng.cmu.ac.th/2006/resources/fulltext/TIS738-2547](http://dome.eng.cmu.ac.th/2006/resources/fulltext/TIS738-2547))

การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นม

การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในนมจัดเป็นปัญหาสำคัญสำหรับผู้ประกอบการนม เนื่องจากเชื้อชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์นม เช่นการเกิดกลิ่นผิดปกติ (off-flavors) ลิ้ม (sweet curding) และครีมขม (bitty cream) รวมทั้งเป็นสาเหตุของการเกิดอาหารเป็นพิษอีกด้วย (Giffel et. al., 1997; Lin et. al, 1998) *B. cereus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้าง และบางสายพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มไซโคไฟล์

(psychrophile) ซึ่งคุณสมบัตินี้ช่วยให้ *B. cereus* สามารถเจริญและสร้างสารพิษในนมพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิแช่เย็นได้ การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากสปอร์ในน้ำนมดิบ หรือจากสภาวะแวดล้อมในโรงงานนม นอกจากนี้แบคทีเรียเทอร์โมดิวริกไซโครโทรฟิก (thermoduric psychrotropic bacteria) ชนิดนี้ยังสามารถปนเปื้อนสู่ผลิตภัณฑ์ภายหลังการฆ่าเชื้อได้หากอุปกรณ์การผลิตไม่มีการบำรุงรักษาและทำความสะอาดที่เหมาะสม (Lin et. al, 1998) อย่างไรก็ตามข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาแหล่งปนเปื้อนของ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ของโรงงานผลิตภัณฑ์นมแห่งหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง พบว่าการปนเปื้อนของ *B. cereus* ทั้งในวัตถุดิบ อุปกรณ์การผลิต และผลิตภัณฑ์ โดย *B. cereus* ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์ และมีปริมาณอยู่ในช่วง 2.98 – 4.12 log₁₀ cfu/ml โดยแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญได้แก่น้ำนมดิบ และอุปกรณ์การผลิต ผลการทดสอบเพื่อยืนยันพบว่าประมาณร้อยละ 80 ของโคโลนีที่พบเป็น *B. cereus* (ปริยชาติศนีย์ และ ดรณี, 2552) ถึงแม้ว่า *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อน แต่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูงได้ มีรายงานว่าสปอร์ของ *B. cereus* มีค่า D_{100°C} เท่ากับ 2.7 – 3.1 นาที ในทางนม (skim milk) และ D_{100°C} เท่ากับ 8 นาที ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 (Fernandez et. al, 2001) ดังนั้นข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าความเสี่ยงของการเกิดอันตรายเนื่องจากเชื้อโรคของสปอร์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์อยู่ในระดับสูง

การแปรรูปด้วยความร้อนในผลิตภัณฑ์นม

การแปรรูปอาหารส่วนใหญ่มักใช้ความร้อนเป็นปัจจัยหลักในการทำลายและยับยั้งจุลินทรีย์ โดยความร้อนมีผลทำให้โปรตีน (เอนไซม์) ในเซลล์ของจุลินทรีย์เสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เพราะโปรตีนและเอนไซม์ เป็นองค์ประกอบสำคัญของกลไกการทำงานต่าง ๆ ในเซลล์ กระบวนการใช้ความร้อนในการทำลายจุลินทรีย์มีหลายระดับขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ ในกระบวนการผลิตนมอุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระดับ ได้แก่

1. ระดับพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) เป็นการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส โดยผู้ผลิตสามารถเลือกใช้อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 63 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที (Low Temperature Long Time) แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิเท่ากับหรือต่ำกว่า 5 องศาเซลเซียส หรือใช้อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 15 วินาที (High Temperature Short Time) แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า การฆ่าเชื้อวิธีนี้สามารถทำลายเอนไซม์ต่าง ๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ แต่ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียทนร้อนได้ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสีย ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการงอกของสปอร์หรือจุลินทรีย์เหลือรอด

2. ระดับสเตอริไลส์ (Sterilization) เป็นการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาที่เหมาะสม เพื่อทำลายทำลายจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้งสปอร์ของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ปริมาณความร้อนที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะอยู่ในระดับที่เรียกว่า การฆ่าเชื้อเชิงการค้า (commercial sterilization) เนื่องจากมิได้ทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดแบบที่ใช้ในการฆ่าเชื้อทางการแพทย์

อาหารที่ผ่านการแปรรูปในระดับการฆ่าเชื้อเชิงการค้าอาจยังมีสปอร์ของแบคทีเรียทนร้อน (Thermophiles) หลงเหลืออยู่ แต่ไม่เป็นปัญหาเนื่องจากอาหารถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องหรือต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส สปอร์ของแบคทีเรียทนร้อนจึงไม่งอกและเพิ่มจำนวนทำให้อาหารเน่าเสีย วิธีนี้จะทำให้สี กลิ่น รสของนมเปลี่ยนแปลงไป เกิดกลิ่นนมต้มไหม้ (Over cooked) ขึ้น สีนมออกเหลือง และทำให้วิตามินบางตัวที่อยู่ใน นำนมดิบลดลง

ความสามารถในการทนความร้อน

ถึงแม้ว่าความร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารจะถูกออกแบบมาให้สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียในอาหารได้ แต่ยังคงพบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถรอดชีวิตจากกระบวนการดังกล่าวได้ และส่งผลเสียต่อผู้ผลิตและผู้บริโภคทั้งในแง่เศรษฐกิจและสังคม การที่จุลินทรีย์บางกลุ่มมีความสามารถในการทนความร้อนได้ดีกว่าจุลินทรีย์ทั่วไป อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์เหล่านั้นมีความสามารถในการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม (stress response) ได้ดีกว่าปกติ กลไกสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถในการตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม ได้แก่ กลไกโฮมีโอสแตซิส (homeostasis) ซึ่งหมายถึง ความสามารถของจุลินทรีย์ในการรักษาสสมดุลของสภาวะแวดล้อมภายในเซลล์ให้มีความคงตัวเมื่อสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง หรือแรงดันออสโมติก เกิดการเปลี่ยนแปลง เพราะเมื่อสภาวะแวดล้อมภายในไม่อยู่ในสมดุลย่อมส่งผลต่อการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ ตัวอย่างของกลไกนี้ได้แก่ การขนส่ง H^+ ออกนอกเซลล์เมื่อเซลล์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด โฮมีโอสแตซิสแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1. แอคทีฟโฮมีโอสแตซิส (Active homeostasis) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานในการรักษาสสมดุลของสภาพแวดล้อมภายในเซลล์เมื่อสภาพแวดล้อมภายนอกเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น การสังเคราะห์องค์ประกอบใหม่ การซ่อมแซมองค์ประกอบที่ได้รับความเสียหาย หรือการขนส่งโมเลกุลบางชนิดผ่านเซลล์เมมเบรน

2. พาสซีฟโฮมีโอสแตซิส (Passive homeostasis) เป็นกลไกที่จุลินทรีย์ใช้โครงสร้างหรือองค์ประกอบของเซลล์ที่มีอยู่แล้วในการตอบสนองต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น สปอร์ หรือ เอนวิโลป (envelope) เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูง แห้งแล้ง เซลล์จะมีการเปลี่ยนรูปร่างจากเซลล์มีชีวิตไปเป็นสปอร์ซึ่งมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า และเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมสปอร์จะเกิดการงอกใหม่เป็นเซลล์อีกครั้งหนึ่ง โดยทั่วไปสปอร์ของแบคทีเรียสามารถทนความร้อนได้ดีกว่าเซลล์ปกติ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจาก โครงสร้างของสปอร์ที่ทำให้เกิดความทนทาน เช่น การมีน้ำเป็นองค์ประกอบในปริมาณต่ำ มีส่วนประกอบของ DPA และแคลเซียมในปริมาณสูง

3. ป๊อปปูเลชันโฮมีโอสแตซิส (Population homeostasis) เป็นกลไกที่เกิดขึ้นเมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญร่วมกันเป็นกลุ่ม และมีการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (cell-to-cell signaling) เพื่อกระตุ้นให้กลุ่มจุลินทรีย์นั้นๆ สามารถรอดชีวิตภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น จุลินทรีย์ที่มีการเจริญในลักษณะของไบโอฟิล์มจะมีความสามารถในการทนต่อความร้อน สารเคมี ยาปฏิชีวนะ และความเป็นกรด-ด่าง ได้ดีกว่าจุลินทรีย์แพลงก์ทอนิก

มีงานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ของแบคทีเรียและสปอร์ชนิดเดียวกันอาจมีความสามารถในการทนร้อนที่แตกต่างกัน ถ้าหากเซลล์เหล่านั้นได้รับการกระตุ้นที่แตกต่างกัน ปรากฏการณ์นี้เรียกว่าการตอบสนองต่อความเครียด (Stress response) หมายถึง การที่เซลล์เหล่านั้นได้รับการกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (sub-optimal condition) เป็นช่วงระยะเวลาสั้นๆ ส่งผลให้เซลล์มีความทนทานต่อความเครียดที่ได้รับมากขึ้น เช่น *E. coli* ที่สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด (pH 5.0 -5.8) เป็นระยะเวลาหนึ่งหรือสองช่วงอายุ แบคทีเรียเหล่านั้นจะสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด (pH 2-4) ความร้อน (60-70 องศาเซลเซียส) ความเย็น a_w ต่ำ และสารฆ่าเชื้อได้ดีกว่าเซลล์ทั่วไปที่ไม่ได้ผ่านการกระตุ้นนี้ การตอบสนองต่อความเครียดแบ่งออกได้เป็นสองประเภท ได้แก่

1. การตอบสนองต่อความเครียดทั่วไป (General stress response) เป็นปรากฏการณ์ที่เมื่อเซลล์แบคทีเรียได้รับการกระตุ้นด้วยความเครียดชนิดใดแล้ว จะมีความทนทานต่อความเครียดชนิดนั้นๆ เพิ่มขึ้น เช่น เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนจะมีความทนทานต่อความร้อนเพิ่มขึ้น Etoa และ Michiels (1988) รายงานว่า การให้ความร้อน ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จะทำให้ความต้านทานความร้อนของสปอร์เพิ่มขึ้น

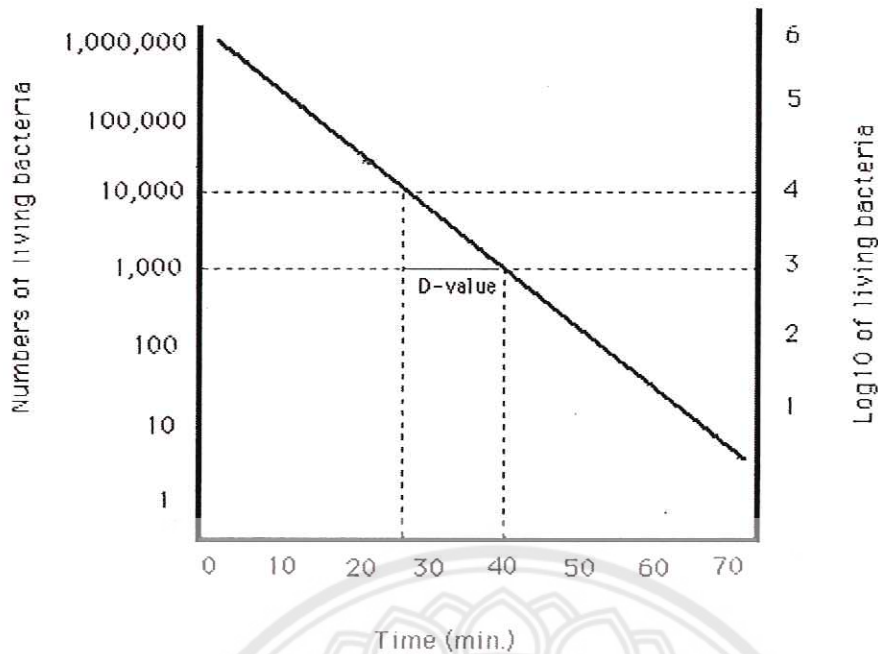
2. การตอบสนองต่อความเครียดแบบเฉพาะเจาะจง (Specific stress response) เป็นปรากฏการณ์ที่เมื่อเซลล์แบคทีเรียได้รับการกระตุ้นด้วยความเครียดไม่ว่าจะเป็นชนิดใดก็ตาม จะมีความทนทานต่อความเครียดชนิดอื่นๆ เพิ่มขึ้น เช่น เซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนจะมีความทนทานต่อความร้อน สภาวะที่เป็นกรด สภาวะที่มีค่า a_w ต่ำ หรือ H_2O_2 เพิ่มขึ้น

การตอบสนองต่อความเครียดต่างๆ เป็นผลมาจากการที่เซลล์แบคทีเรียสามารถสร้างโปรตีนชนิดหนึ่งขึ้นมาได้ โปรตีนชนิดนี้เรียกว่าโปรตีนที่เกิดจากการกระตุ้นของความเครียด (stress shock protein; SSP) SSP เป็นกลุ่มของโปรตีนที่ถูกชักจูงโดยความเครียดชนิดต่างๆ และมีชื่อเรียกตามชนิดของความเครียดที่เป็นสาเหตุ เช่น โปรตีนที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยความร้อน (heat shock protein; HSP) โปรตีนที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยความเป็นกรด (acid shock protein; ASP) หรือโปรตีนที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยแรงดันออสโมติก (osmotic shock protein; OSP) การสร้าง SSP ถูกควบคุมโดยยีน RpoS (σ^S) ซึ่งเป็นซิกมาแฟกเตอร์ของหน่วยย่อยของเอนไซม์ RNA polymerase ที่มีบทบาทในการควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับความทนทานต่อความเครียดหลายตัว that regulate many important stress resistant genes เป็นผลมาจากการที่เซลล์ถูกกระตุ้น ยีน RpoS จะไม่เสถียรภายใต้สภาวะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและสภาวะที่ไม่มี ความเครียด เนื่องจากกระบวนการ proteolysis degradation ดังจะเห็นได้จากเซลล์ในสภาวะเหล่านี้จะมีความทนต่อความเครียดต่ำ แต่การสลายตัวนี้จะหยุดลงเมื่อเซลล์เข้าสู่ stationary phase หรือในสภาวะที่มีความเครียด ทำให้ความเข้มข้นและระดับกิจกรรมของ RpoS เพิ่มขึ้นส่งผลให้เซลล์ในสภาวะนี้มีความทนต่อความเครียดต่างๆ ได้ดี นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าภายใต้สภาวะที่ประชากรจุลินทรีย์หนาแน่น การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (cell-to-cell signaling) มีส่วนกระตุ้นระดับกิจกรรมของ RpoS

ความร้อนเป็นหนึ่งในความเครียดที่แบคทีเรียต้องเผชิญอยู่เป็นประจำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการยับยั้งด้วยความร้อน (Heat inactivation) ซึ่งเป็นการทำให้จุลินทรีย์เสียสภาพด้วยความร้อน ความร้อนทำให้โปรตีนและเอนไซม์ในเซลล์ของจุลินทรีย์เสียสภาพ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ เพราะโปรตีนและเอนไซม์เป็นองค์ประกอบสำคัญของกลไกการทำงานต่าง ๆ แบคทีเรียตอบสนองต่อความร้อนด้วยการสร้าง HSP (heat shock proteins: HSPs) ขึ้น แต่การตอบสนองต่อความร้อนเป็นการตอบสนองต่อความเครียดชนิดทั่วไป ดังนั้นการสร้าง HSPs จึงอาจถูกกระตุ้นด้วยความเครียดชนิดอื่นได้เช่น การเปลี่ยนแปลง pH หรือแรงดันออสโมติก HSPs ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด เช่น แชปเปอโรน (chaperones) โปรตีเอส (protease) และ ซิกมาแฟกเตอร์ (rpoS) HSPs มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเสียสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์มีความทนทานต่อสภาพที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ ได้ (cross-protection) เช่น ความร้อน เกลือ โลหะหนัก มีรายงานว่า *E. coli* ที่ได้รับความร้อนระดับ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้กลายเป็นเซลล์ที่มีความทนทานต่อแรงดันออสโมติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเป็นกรด-ด่าง และความร้อนมากขึ้น เนื่องจากมีการสังเคราะห์ HSP นอกจากนี้ยังพบว่า HSP มีความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษที่เพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด และ HSP ของจุลินทรีย์บางชนิดถูกจัดเป็นสาเหตุของการเกิดโรค ดังนั้นจึงจะเห็นได้ว่าการที่แบคทีเรียมีความสามารถในการทนร้อนเพิ่มขึ้น อาจส่งผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการฆ่าเชื้อ

โดยทั่วไปการแปรรูปด้วยความร้อนจะทำการคำนวณปริมาณความร้อนที่เหมาะสมจากค่า D-value Z-value และ F-value

ค่า D - value (Decimal Reduction Time) คือ เวลาเป็นนาทีที่ใช้ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ลง 1 log₁₀ cycle ที่อุณหภูมิหนึ่งๆ โดยคำนวณจากค่าความชันของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์รอดชีวิตและเวลาที่อุณหภูมิคงที่หนึ่งๆ ค่า D-value ที่สูงแสดงว่าเชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถในการรอดชีวิตที่อุณหภูมินั้นได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีค่า D-value ต่ำ

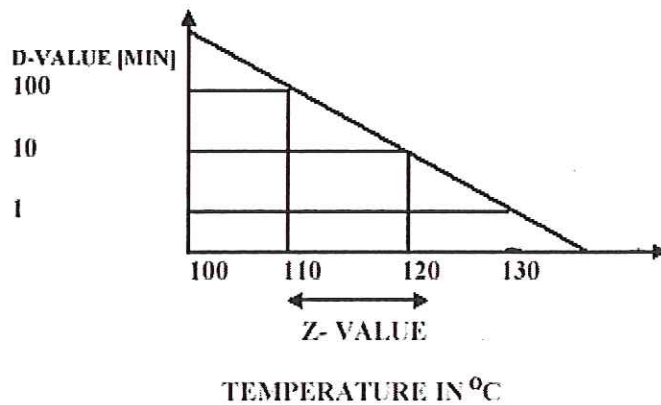


รูปที่ 3: การคำนวณค่า D-value ของจุลินทรีย์ (ที่มา : [http://web.thu.edu.tw/lien/www/Milk%20and%20Dairy%20Products_95\(2\)/4%20Thermal%20Destruction%20of%20Microorganisms.doc](http://web.thu.edu.tw/lien/www/Milk%20and%20Dairy%20Products_95(2)/4%20Thermal%20Destruction%20of%20Microorganisms.doc))

ค่า Z - value เป็นทั่วไปค่าที่ใช้ในการคำนวณระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน โดยค่า Z-value คืออุณหภูมิที่ต้องการในการทำให้ค่า D - value ลดลง 1 log₁₀ cycle คำนวณได้จากความชันของกราฟระหว่าง log₁₀ D - value และอุณหภูมิสำหรับค่า D-value นั้นๆ

ในขณะที่ค่า D-value แสดงให้เห็นถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ค่า Z-value แสดงให้เห็นถึงความทนต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงของเชื้อเหล่านั้น เช่น เชื้อชนิดหนึ่งต้องใช้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสในการทำให้ค่า D-value ลดลง 1 log ดังนั้นเชื้อมีค่า Z-value เท่ากับ 10 หากเชื้อมีค่า D-value ที่ 100 องศาเซลเซียสเท่ากับ 4.5 นาที แสดงว่าทุก 10 องศาเซลเซียสที่เพิ่มขึ้น ค่า D-value ของเชื้อมีค่าจะลดลง 1 log นั่นคือค่า D-value ที่ 110 องศาเซลเซียสของเชื้อมีค่าเท่ากับ 0.45 นาที และในทางกลับกันทุก 10 องศาเซลเซียสที่ลดลง ค่า D-value จะเพิ่มขึ้น 1 log นั่นคือค่า D-value ที่ 90 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 45 นาที

TIHERMAL RESISTANCE CURVE



$$Z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_1 - \log D_2}$$

รูปที่ 4: การคำนวณหาค่า Z-value (ที่มา : [http://web.thu.edu.tw/lien/www/Milk%20and%20Dairy%20Products_95\(2\)/4%20Thermal%20Destruction%20of%20Microorganisms.doc](http://web.thu.edu.tw/lien/www/Milk%20and%20Dairy%20Products_95(2)/4%20Thermal%20Destruction%20of%20Microorganisms.doc))

ค่า F-value หมายถึง เวลาเป็นนาทีที่ใช้ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ต้องการภายใต้อุณหภูมิที่กำหนด โดยทั่วไปค่า F-value จะต้องมีตัวเลขของอุณหภูมิกำกับ เช่น F_{90} หมายถึงค่า F ที่ 90 องศาเซลเซียส หากไม่มีตัวเลขกำกับหรือใช้เลข 0 จะหมายถึงค่า F ที่ 121 องศาเซลเซียส หรือ 250 องศาฟาเรนไฮต์ ในกระบวนการแปรรูปอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ (low acid canned food) ค่า F_0 ถูกกำหนดไว้ที่ 12 D ซึ่งมีค่าเท่ากับเวลาที่ใช้เพื่อลดปริมาณแบคทีเรียเมโซฟิลิกที่สร้างสปอร์และทนต่อความร้อนได้ดีที่สุดในผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องลง 12 log cycle ยกตัวอย่างเช่น หากในผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องมีปริมาณสปอร์ตั้งต้น 10,000 สปอร์ (10^4) เมื่อผ่านกระบวนการ 12 D ปริมาณสปอร์จะลดลงเหลือ 10^{-8} สปอร์ตามทฤษฎี หรือจะมีสปอร์ 1 สปอร์ในอาหารกระป๋อง 100,000,000 กระป๋อง และหากค่า D-value ที่ 121 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ 1 นาที ค่า F value สำหรับกระบวนการนี้จะมีค่าเท่ากับ D-value * ปริมาณเชื้อที่ต้องการให้ลดลง = 1 นาที * 12 log reduction = 12 นาที

จลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ *B. cereus*

การยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรียด้วยความร้อนได้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องและแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่มเทอร์โมดริคไซโครโทริก เช่น *B. cereus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเสื่อมเสียของนมและผลิตภัณฑ์นม เนื่องจากสปอร์เหล่านี้มีความสามารถในการทนต่อความร้อนได้สูง (Dogan et al., 2009; Peleg et al., 2008; Fernandez et al., 2001) ในทางทฤษฎีความสามารถในการทนร้อน (heat resistance) ถูกอธิบายในรูปของค่า D-value (Decimal Reduction Time) หรือ เวลาเป็นนาทีที่ใช้ในการลดปริมาณเซลล์/สปอร์ลง 1 \log_{10} cycle ที่อุณหภูมิ T และค่า Z-value หรืออุณหภูมิที่ต้องการเพื่อให้ค่า D-value ลดลง 1 \log_{10} cycle ซึ่งการคำนวณค่าเหล่านี้ตั้งอยู่บนสมมุติฐานที่ว่าจลนพลศาสตร์การยับยั้งเป็นไปตามกฎ first order kinetics นั่นคือการเหลือรอดของสปอร์มีความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงกับเวลาภายใต้

อุณหภูมิคงที่ และสามารถอธิบายได้โดยใช้สมการของอาร์เรเนียส (Arrhenius equation) แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียเมื่อถูกยับยั้งด้วยความร้อนไม่ได้เป็นไปตาม จลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (first order kinetics) เสมอไป (Peleg, 2006) ดังนั้นหากยังมีการคำนวณ จลนพลศาสตร์การยับยั้งโดยใช้ทฤษฎีนี้อยู่ อาจทำให้ได้ค่าพารามิเตอร์ที่ไม่ใช่ค่าที่แท้จริง ทำให้การตั้งค่าต่างๆ สำหรับกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เซชันที่ใช้ยังไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของ ผลิตภัณฑ์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด/สายพันธุ์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ กระบวนการให้ความร้อน และกระบวนการหลังการให้ความร้อน ด้วยเหตุผลนี้จึงจำเป็นต้องทราบข้อมูลทางจลนพลศาสตร์ การยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่พบในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ของแต่ละแห่งซึ่งมีความ แตกต่างกันและมีความเฉพาะเจาะจงสูง เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งแบคทีเรียที่ต้องการ

แบบจำลองการรอดชีวิตแบคทีเรีย

การยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรียด้วยความร้อนเป็นหัวข้อหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจและทำการศึกษา เนื่องจากสปอร์มีความสามารถในการทนร้อนสูง นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มไซโครโทโรปิก เมโซฟิลิกและเทอร์โมฟิลิกที่สร้างสปอร์ได้มักเป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในน้ำนมดิบ และเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมเสียและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *B. cereus* แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มเทอร์โมดิวริกไซโครโทโรปิกสปอร์ฟอร์เมอร์ (thermoduric psychrotropic spore former) ข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษา การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ของโรงงานผลิตภัณฑ์นมบางแห่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง พบว่า มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ ซึ่งประมาณร้อยละ 80 ของโคโลนีที่พบเป็น *B. cereus* (ปริยะทัศน์ีย์ และ ดรุณี, 2552) โดย *B. cereus* ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์ มีแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญ คือ น้ำนมดิบก่อนการฆ่าเชื้อ และอุปกรณ์การผลิต โดยทั่วไปการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์จะผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ไม่สูงนัก (อุณหภูมิระหว่าง 63 – 72 องศาเซลเซียส) และ *B. cereus* จัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อน และความร้อนในระดับนี้สามารถทำลายเซลล์ที่ยังมีชีวิตของ *B. cereus* ได้ แต่มันสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูงได้ ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของสปอร์ในน้ำนมดิบ จึงมีความเป็นไปได้ว่าความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์อาจไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* และอาจส่งผลกระทบต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังนั้นเพื่อให้ได้มาซึ่งสภาวะในการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาแบบจำลองการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ภายใต้การให้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์เซชัน แต่การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียดังกล่าวโดยการทำการทดลองจริงที่ทุกสภาวะมีความเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีข้อจำกัดทั้งด้านแรงงาน ค่าใช้จ่าย และระยะเวลาในการทดลอง อย่างไรก็ตามยังมีอีกทางเลือกหนึ่งได้แก่การนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาประยุกต์ใช้ ซึ่งการกระทำเช่นนี้เป็นการศึกษาโดยการจำลองปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้น โดยอาศัยข้อมูลที่เกิดขึ้นจริงภายใต้สภาวะหนึ่งๆ ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้มักเป็นแนวทางที่มีความแม่นยำสูง ดังนั้นการนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาใช้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์

แบบจำลองจลนพลศาสตร์ (Dynamic Models) ของการยับยั้งสปอร์ *B. cereus*

การยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรียด้วยความร้อนได้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องและแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียในกลุ่มเทอร์โมคูริกไซโครโทรปิก เช่น *B. cereus* เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มไซโครโทรปิก เมโซฟิลิกและเทอร์โมฟิลิกที่สร้างสปอร์ได้นี้ มักเป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในน้ำนมดิบ และเนื่องจากสปอร์เหล่านี้มีความสามารถในการทนต่อความร้อนได้สูง จึงมีบทบาทสำคัญในการเสื่อมเสียของนมและผลิตภัณฑ์นม (Dogan et al., 2009; Peleg et al., 2008; Fernandez et al., 2001)

ข้อมูลเบื้องต้นจากการศึกษาการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรส์ของโรงงานผลิตภัณฑ์นมบางแห่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง พบว่า มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ ซึ่งประมาณร้อยละ 80 ของโคโลนีที่พบเป็น *B. cereus* (ปรียะทัศน์ีย์ และ ดรุณี, 2552) โดย *B. cereus* ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์ มีแหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญ คือ น้ำนมดิบก่อนการฆ่าเชื้อ และอุปกรณ์การผลิต โดยทั่วไปการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์จะผ่านกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิระหว่าง 63 – 72 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่า *B. cereus* จะถูกจัดว่าเป็นแบคทีเรียที่ไม่ทนร้อน โดยความร้อนในระดับนี้สามารถทำลายเซลล์ที่ยังมีชีวิตของ *B. cereus* ได้ แต่ *B. cereus* สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูงได้ ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของสปอร์ในน้ำนมดิบ จึงมีความเป็นไปได้ว่าความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์อาจไม่เพียงพอต่อการทำลายสปอร์ของ *B. cereus* และอาจส่งผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

แบบจำลองจลนพลศาสตร์ (Dynamic Models) ของการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่นิยมใช้ในการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียแบบดั้งเดิม เพื่อกำหนดความปลอดภัยในกระบวนการผลิตอาหาร เป็นแบบจำลองที่สร้างขึ้นโดยอาศัยทฤษฎีที่ว่า การยับยั้งสปอร์เป็นไปตามจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (first order kinetics) โดยสมการเชิงอนุพันธ์

$$\frac{dS_t}{dt} = -k'S_t$$

เมื่อ S_t คือ อัตราการรอดชีวิต ($N_{(t)} / N_0$)

k' คือ ค่าคงที่ ซึ่งประมาณได้จากความสัมพันธ์

$$k = N_0 e^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)}$$

เมื่อ E_a คือ พลังงานกระตุ้น

R คือ ค่าคงที่

T คือ อุณหภูมิ (K)

ในการศึกษาโดยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์นั้น ความสามารถในการทนร้อน (heat resistance) มักถูกอธิบายในรูปของค่า D-value (Decimal Reduction Time) หรือ เวลาเป็นนาทีที่ใช้ในการลดปริมาณ

เซลล์/สปอร์ลง 10 เท่า หรือ 1 log cycle ที่อุณหภูมิ T และค่า Z-value หรืออุณหภูมิที่ต้องการเพื่อให้ค่า D-value ลดลง 1 log cycle นั่นคือภายใต้อุณหภูมิคงที่ log ของจำนวนสปอร์ที่เหลือรอดมีความสัมพันธ์อย่างเป็นเส้นตรงกับเวลา

อย่างไรก็ตามงานวิจัยหลายชิ้นได้แสดงให้เห็นว่าการรอดชีวิตของแบคทีเรียเมื่อถูกยับยั้งด้วยความร้อนไม่ได้เป็นไปตามจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (first order kinetics) เสมอไป ตัวอย่างเช่น Van Boekel (19) พิสูจน์ให้เห็นว่ากราฟแสดงการรอดชีวิตที่เป็นเส้นตรงนั้นมีน้อยมาก จนถูกจัดเป็นกรณีพิเศษมากกว่าเป็นทฤษฎี ได้ทำการศึกษากการรอดชีวิตของแบคทีเรีย 55 ชนิดที่อุณหภูมิต่างกัน และพบว่า มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่มีกราฟการรอดชีวิตที่อาจจัดเป็นเส้นตรงได้ (คิดเป็นร้อยละ 4) ในขณะที่ 39 ชนิด (ร้อยละ 71) มีกราฟการรอดชีวิตเป็นแบบโค้งลง (downward concavity) อย่างชัดเจน และอีก 14 ชนิด (ร้อยละ 25.5) กราฟการรอดชีวิตเป็นแบบโค้งขึ้น (upward concavity) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการรอดชีวิตของแบคทีเรีย ที่อาศัยสมมติฐานว่าการเปลี่ยนแปลงของอัตราการรอดชีวิต เป็นไปตามหลักจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (first order kinetics) ไม่สามารถจำลองเหตุการณ์ที่เกิดขึ้น โดยกลไกทางชีววิทยา (biological mechanism) ของการรอดชีวิตโดยการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียบางชนิดเมื่อผ่านสภาวะความร้อนอย่างแม่นยำได้

แบบจำลองชนิดแจกแจง (Distributions models) เป็นการพัฒนาแบบจำลองการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยมีสมมติฐานว่าแต่ละชนิดของแบคทีเรียหรือสปอร์มีความน่าจะเป็นที่จะรอดชีวิตต่างกัน โดยที่ความน่าจะเป็นของการรอดชีวิตนั้น มีการแจกแจงที่แตกต่างกันออกไปด้วย ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าแบบจำลองการรอดชีวิตชนิดแจกแจงแบบไวบูล (Weibull Distribution) เป็นฟังก์ชันการแจกแจงที่ใช้อธิบายระบบหรือเหตุการณ์ที่มีระดับความหลากหลายหรือแปรปรวนได้ดี (Henz et al.,1996; Cunha et al.,1998) แบบจำลองมีความยืดหยุ่น (Couvert and et al.,2005; Martinus, 2002) สามารถใช้ทำนายการอยู่รอดได้ดี

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ชนิดแจกแจงแบบไวบูล (weibull model) เขียนสมการได้ดังนี้

$$S(t) = e^{-\left(\frac{t}{a}\right)^n}$$

เมื่อ $S(t)$ คือ อัตราการรอดชีวิตขณะหนึ่ง คำนวณได้จาก $N(t)/N_0$ เมื่อ $N(t)$ คือ ปริมาณเซลล์ ณ เวลาใดๆ ส่วน N_0 คือปริมาณเซลล์เริ่มต้น ณ เวลา $t = 0$

t คือ เวลา ณ ขณะหนึ่ง

a คือ ขนาดการกระจาย

n คือ รูปร่างการกระจาย

โดย a และ n เป็นพารามิเตอร์ของการกระจาย

ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงมีเป้าหมายในการศึกษาจลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานนมโดยตรง โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ชนิดแจกแจงแบบไวบูล เพื่อให้ทราบถึงพารามิเตอร์ของรูปแบบการกระจายในสมการแบบไวบูล ซึ่งสมมติฐานของแบบจำลองจลนพลศาสตร์การยับยั้งโดยการแจกแจงนี้ ยังสามารถช่วยในการคำนวณหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่พบในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ของโรงงานแต่ละแห่ง ซึ่งมีความแตกต่างกันและมีความเฉพาะเจาะจงสูงได้อีกด้วย ทั้งนี้ผลการคำนวณจะนำไปสู่สภาวะการให้ความร้อนที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรียด้วยความร้อน และนำไปสู่การทดสอบประสิทธิภาพของสภาวะดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ โดยการพัฒนาศักยภาพในการแข่งขัน มุ่งเน้นด้านการผลิตอาหารปลอดภัยและลดต้นทุนการผลิตต่อไป



บทที่ 3

วัสดุและวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *B. cereus* จากงานวิจัยของอรอินท์และคณะ (2552) จำนวน 3 ไอโซเลท จำแนกตามแหล่งที่มา ดังนี้

1. สปอร์ที่แยกได้จากน้ำนมดิบ (BC1)
2. สปอร์ที่แยกได้จากถั่วงาเชื้อ (BC2)
3. สปอร์ที่แยกได้จากเครื่องบรรจุ M1 (BC3)

3.1.2. สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB , HIMEDIA Laboratories , India)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Couth Agar (PCA , HIMEDIA Laboratories , India)
3. ผงวุ้น (Agar , Pearl Mermaid , Thailand)
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl , Merck , Germany)
5. แมงกานีส (II) ซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$, UNIVAR , Australia)
6. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, Merck , Germany)
7. กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$, UNIVAR , Australia)
8. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$, UNIVAR , Australia)
9. แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_4 \cdot 4H_2O$, UNIVAR , Australia)
10. คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, UNIVAR , Australia)
11. ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, UNIVAR , Australia)
12. นม UHT (นมไทย – เดนมาร์ก รสจืด , Thailand)
13. เปปโทน (HIMEDIA Laboratories , India)
14. น้ำแข็ง

3.1.3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. กล้องจุลทรรศน์ (Leica, ATC 2000, United States of America)

2. เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (HSIANGTAI , CN - 1040 , Thailand)
3. เครื่อง Select Heat Block Heater (Modal , SBD 110 - 2 , Thailand)
4. หม้อนิ่งความดันไอน้ำชนิดไฟฟ้า (KT 30L, ALP, Tokyo Japan)
5. เครื่องชั่งสารแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ARC 2140, Ohaus, Thailand)
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (205Q, N-Bitek)
7. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Shellab, USA)
8. ตู้บลมร้อน (UM-Oven 120L, UMCA, USA)
9. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, Thailand)
10. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette, CAPP, Germany)
11. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Thailand)
12. ตู้เก็บตัวอย่าง (Sanyo, Thailand)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1. การเตรียมสปอร์

3.2.1.1 นำ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานนม ในเขตภาคเหนือตอนล่าง จำนวน 5 isolates ได้แก่ *B. cereus* ที่แยกได้จากนํ้านมดิบ (BC 1) *B. cereus* ที่แยกได้จากล้งฆ่าเชื้อ (BC 2) และ *B. cereus* ที่แยกได้จากเครื่องบรรจุ M1 ตามลำดับ (BC3) มาเลี้ยงให้เกิดสปอร์ ตามวิธีของ Fernandez et al. (2001) โดยทำการถ่ายลงในอาหารเหลว Nutrient Broth (NB) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ 0.5 มิลลิลิตร มาทำการ spread plate ลงบนอาหารแข็ง Fortified Nutrient Agar (FNA) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบสปอร์โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บเกี่ยวสปอร์ โดยวิธีการฟลัดติง (flooding) ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เก็บส่วนน้ำไว้ จากนั้นไปปั่นเหวี่ยง ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (HSIANGTAI, CN - 1040, Thailand) ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนของเหลวไปแล้วทำการล้างสปอร์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ทำการล้างสปอร์ด้วยวิธีการนี้ 3 ครั้ง นำสปอร์ที่ได้มาแขวนลอยในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

3.2.1.2 ทำการวิเคราะห์ปริมาณสปอร์ตั้งต้นในสารแขวนลอยสปอร์ โดยทำการเจือจางสารแขวนลอยสปอร์ในสารละลายเปปโทน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อปริมาตร) จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ทำการสเปรดเพลทลงบนอาหารแข็ง Plate Count Agar (PCA) แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี รายงานผลเป็น cfu/ml

3.2.2. การทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus*

3.2.2.1 นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้จากขั้นตอน 3.2.1 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อเป็นการทำลายเซลล์ที่ยังมีชีวิต (vegetative cell) จากนั้นทำการเจือจางสารแขวนลอยสปอร์เจือจางในสารละลายเปปโทนให้ได้ปริมาณสปอร์ตั้งต้นประมาณ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2.2 ทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ในสารละลายเปปโทน โดยดูการละลายสปอร์แขวนลอยมา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Select Heat Block Heater (Model SBD 110 - 2, Thailand) ที่อุณหภูมิ 80 85 90 95 และ 98 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 และ 70 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำหลอดไมโครเซนทริฟิวส์จุ่มลงในอ่างน้ำแข็ง (ice - bath) ทันที ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอด โดยการนำตัวอย่างที่ได้มาทำการเจือจางในสารละลายเปปโทน จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ทำการสเปรดลงบนอาหาร Plate Count Agar (PCA) แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอด รายงานผลเป็น cfu/ml ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2.3 ทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ในนม UHT นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้จากขั้นตอน 3.2.1 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อเป็นการทำลายเซลล์ที่ยังมีชีวิต (vegetative cell) จากนั้นทำการเจือจางสารแขวนลอยสปอร์เจือจางในนม UHT ให้ได้ปริมาณสปอร์ตั้งต้นประมาณ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูสปอร์แขวนลอยที่ได้มา 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง Select Heat Block Heater (Modal , SBD 110 - 2 , Thailand) ที่อุณหภูมิ 80 85 90 95 และ 98 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 และ 70 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำหลอดไมโครเซนทริฟิวส์จุ่มลงในอ่างน้ำแข็ง (ice - bath) ทันที ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอด โดยการนำตัวอย่างที่ได้มาทำการเจือจางในสารละลายเปปโทน จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ทำการสเปรดลงบนอาหาร Plate Count Agar (PCA) แล้วบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เหลือรอด รายงานผลเป็น cfu/ml ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2.4 คำนวณหาค่า D-value และ Z-value นำข้อมูลที่ได้ในขั้นตอนที่ 3.2.2.2 และ 3.2.2.3 มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอด (\log_{10} CFU/ml) และเวลา (นาที) จากนั้นทำการคำนวณหาค่า D-value และ z-value โดยค่า Decimal Reduction Time (D-value) คือ เวลาเป็นนาทีที่ใช้ในการลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ลง 1 \log_{10} cycle ที่อุณหภูมิ T คำนวณได้จากความชันของกราฟระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอด (\log_{10} CFU/ml) และเวลา (นาที) โดยใช้ DMFit Toolbox อ้างอิงจากสมการของ Baranyi et al. (1993) (www.combase.cc) ค่า Z-value คือ อุณหภูมิที่ต้องการเพื่อทำให้ค่า D-value ลดลง 1 \log_{10} cycle คำนวณจากความชันของกราฟระหว่าง \log_{10} D-value และอุณหภูมิ โดยใช้ DMFit Toolbox อ้างอิงจากสมการของ Baranyi et al. (1993)

(www.combase.cc) จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่า D-value Z-value และ F-value ที่ได้ เพื่อให้ทราบสถานะที่เหมาะสมในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus*

3.2.3. การประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ด้วยความร้อน

นำข้อมูลจากการศึกษาการทนความร้อนของสปอร์ *B. cereus* สายพันธุ์ BC 1 BC 2 และ BC 3 มาประมาณค่าหาพารามิเตอร์ของแบบจำลองข้างต้นโดยใช้โปรแกรม MATLAB® Release 2009a เปรียบเทียบแบบจำลองแต่ละแบบที่เหมาะสมกับข้อมูลจากการทดลอง โดยใช้ค่า mean square error (MSE) เปรียบเทียบความแตกต่างของแบบจำลอง ค่า MSE ของแบบจำลองมีค่าน้อยจะมีความเหมาะสมดีกับข้อมูลที่จากการทดลอง แบบจำลองการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่

1.1 แบบจำลองจลนพลศาสตร์ลำดับหนึ่ง (First-Order Kinetic Models)

$$r_s = \frac{dS_t}{dt} = -k'S_t$$

$$S_t = \ln \left(\frac{N}{N_0} \right)$$

เมื่อ r_s	คือ	อัตราการรอดชีวิต (cfu/ml/min)
S_t	คือ	การรอดชีวิตของสปอร์ของ <i>B. cereus</i>
N	คือ	จำนวนสปอร์ของ <i>B. cereus</i> ที่เหลือรอด (cfu/ml)
N_0	คือ	จำนวนสปอร์ที่เหลือรอดสูงสุด (cfu/ml)

1.2 แบบจำลองล็อกโลจิสติก (log-logistic Models)

$$\frac{dS_t}{dt} = -k \cdot S_t \left(1 - \frac{S_t}{S_{As}} \right)$$

เมื่อ

$$S_{As} = \ln \left(\frac{N_{max}}{N_0} \right)$$

N_{max} คือ จำนวนสปอร์ที่เหลือรอดสูงสุด

3.2.4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ประมวลผลจากเครื่องคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5 จากบริษัท SPSS Thailand



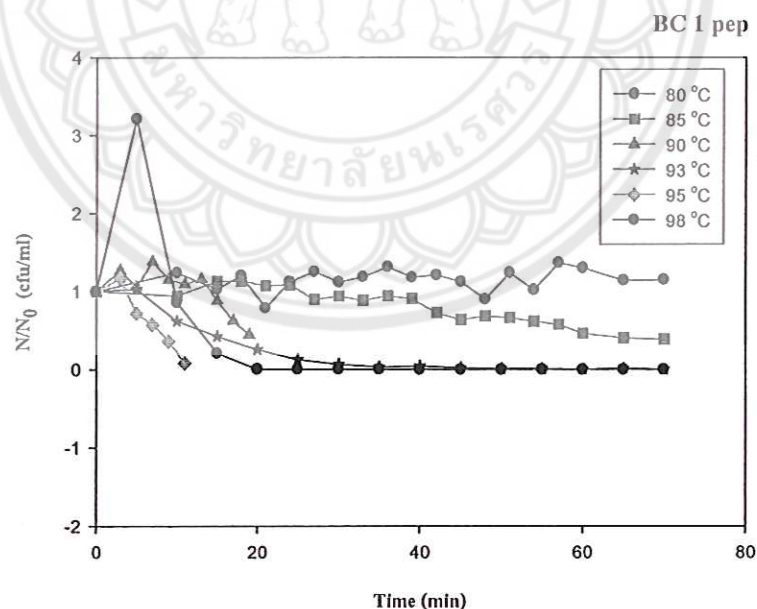


บทที่ 4

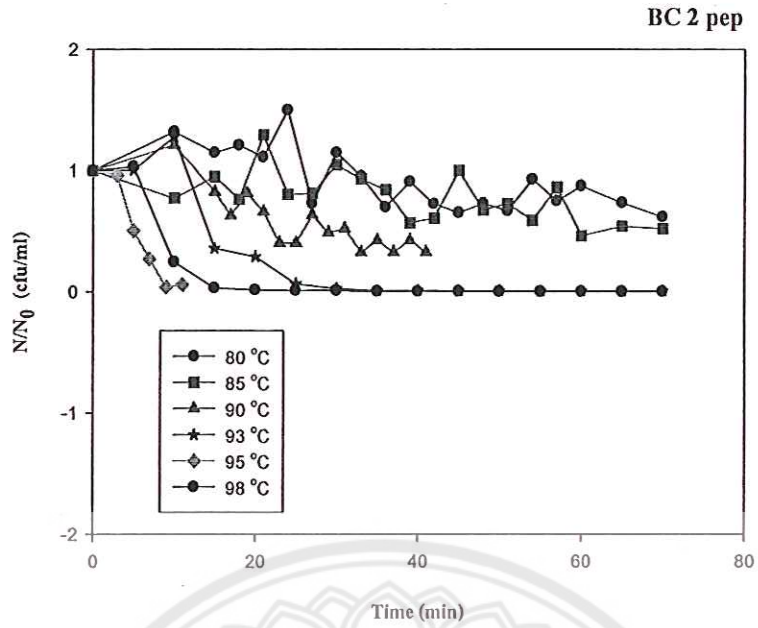
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ในสารละลายเปปโทน 0.1%

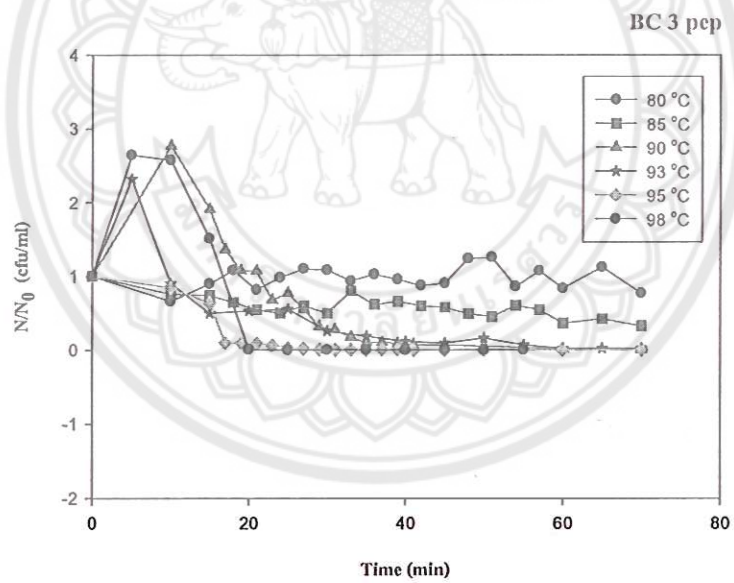
เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลท (BC1 BC2 และ BC3) ในสารละลายเปปโทน 0.1% ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส พบว่าสปอร์ของ *B. cereus* มีพฤติกรรมคล้ายคลึงกัน นั่นคือ ที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส ปริมาณสปอร์มีการลดลงเพียงเล็กน้อย หรือคงที่เมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้สปอร์มีปริมาณลดลง ดังแสดงในรูปที่ 5 -7 และตารางที่ 3 โดยจะเห็นได้ว่าสปอร์ของ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทมีปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ภายหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส อยู่ระหว่าง 0.9 -1.0 แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นค่าสัดส่วนการรอดชีวิตกลับลดลง โดยทุกไอโซเลทมีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตต่ำสุดที่ 98 องศาเซลเซียส โดย BC1 BC2 และ BC3 มีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตที่ 98 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.25 0.25 และไม่สามารถตรวจนับได้ ตามลำดับเซลเซียส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าช่วงอุณหภูมิระหว่าง 80 - 85 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์ ดังนั้นจึงส่งผลปริมาณสปอร์ไม่ต่างจากปริมาณสปอร์เริ่มต้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส กลับพบว่าปริมาณสปอร์ *B. cereus* มีการลดลงตั้งแต่วันที่ 5 - 10 เป็นต้นไป แสดงว่าอุณหภูมิต่ำระดับนี้สามารถทำลายโครงสร้างและองค์ประกอบภายในสปอร์ได้



รูปที่ 5: ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC1 เหลือรอดในสารละลายเปปโทน 0.1% ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ



รูปที่ 6: ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC2 เหลือรอดในสารละลายเปปโตน 0.1% ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ



รูปที่ 7: ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC3 เหลือรอดในสารละลายเปปโตน 0.1% ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ

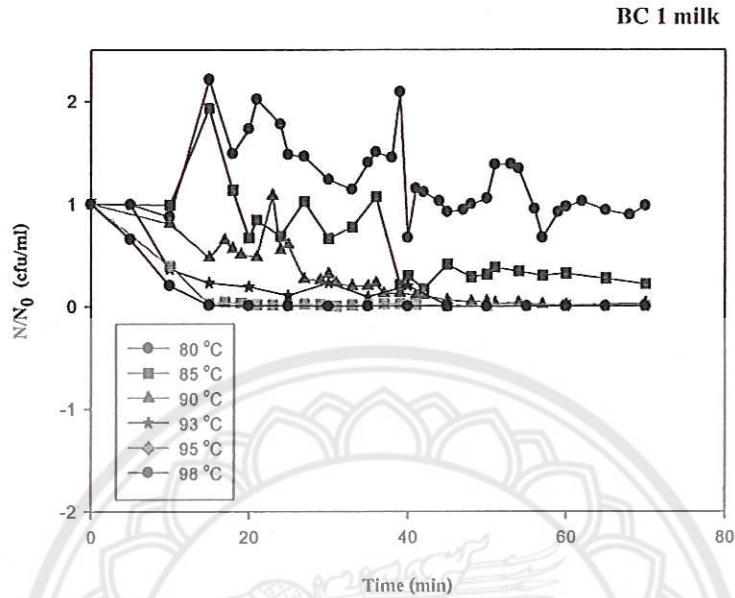
ตารางที่ 3: ปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ของสปอร์ *B. cereus* แต่ละไอโซเลทภายหลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 70 นาทีในสารละลายเปปโตน 0.1%

Isolates	Temperature (°C)	Initial number (N_0)	Final number (N)	Survival ratio ($\log N/N_0$)
BC1	80	4.43×10^3	5.10×10^3	1.02
	85	2.54×10^4	9.83×10^2	0.88
	90	1.93×10^3	ND	ND
	93	2.90×10^4	7.00×10^1	0.41
	95	1.86×10^3	ND	ND
	98	4.33×10^4	1.50×10^1	0.25
BC2	80	6.53×10^2	4.03×10^2	0.93
	85	3.40×10^2	1.77×10^2	0.89
	90	3.06×10^2	ND	ND
	93	6.00×10^4	3.50×10^2	0.53
	95	3.26×10^3	ND	ND
	98	7.50×10^4	1.67×10^1	0.25
BC3	80	2.86×10^5	2.21×10^5	0.98
	85	2.13×10^5	7.03×10^4	0.91
	90	6.45×10^4	6.00×10^2	0.58
	93	1.65×10^4	4.50×10^2	0.63
	95	7.13×10^4	1.20×10^2	0.43
	98	4.87×10^4	ND	ND

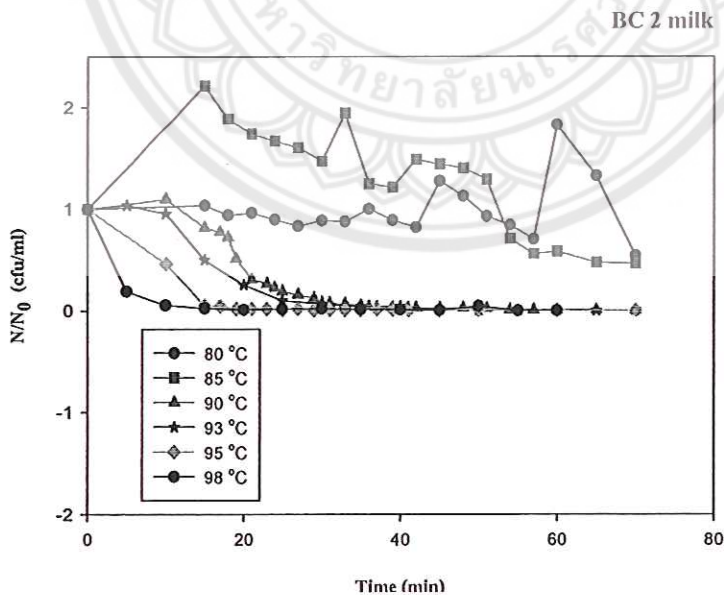
2. ความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ในสารละลายนม

เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลท (BC1 BC2 และ BC3) ในสารละลายนม ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส พบว่าสปอร์ของ *B. cereus* มีพฤติกรรมคล้ายคลึงกัน นั่นคือ ที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส ปริมาณสปอร์มีการลดลงเพียงเล็กน้อย หรือคงที่เมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้สปอร์มีปริมาณลดลง ดังแสดงในรูปที่ 8 - 10 และ ตารางที่ 4 โดยจะเห็นได้ว่าสปอร์ของ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทมีปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ภายหลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส อยู่ระหว่าง 0.9 -1.0 แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นค่าสัดส่วนการรอดชีวิตกลับลดลง โดยทุกไอโซเลทมีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตต่ำสุดที่ 98 องศาเซลเซียส โดย BC1 BC2 และ BC3 มีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตที่ 98 องศาเซลเซียสเท่ากับ 0.36 0.36 และ 0.23 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสัดส่วนการรอดชีวิตของสปอร์ในสารละลายนมมีค่าสูงกว่าในสารละลาย

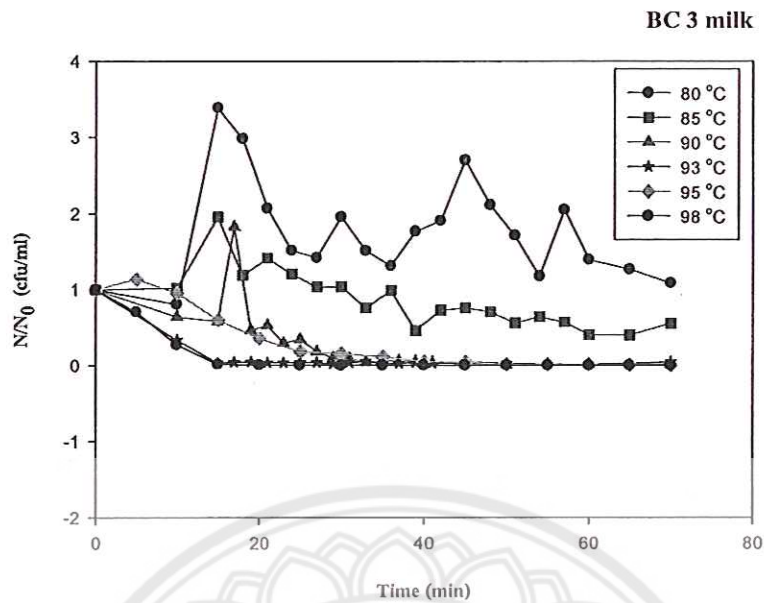
เปปโทน 0.1% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารละลายนมมีส่วนประกอบของสารๆ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุ ซึ่งมีส่วนช่วยในการป้องกันสปอร์จากความร้อนและเป็นแหล่งอาหารสำหรับการซ่อมแซมเซลล์ในกรณีที่ได้รับ



รูปที่ 8: ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC1 เหลือรอดในสารละลายนม ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ



รูปที่ 9: ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC2 เหลือรอดในสารละลายนม ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ



รูปที่ 10: ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC3 เหลือรอดในสารละลายนม ที่อุณหภูมิต่างๆ (80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส) ณ เวลาใดๆ

ตารางที่ 4: ปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ของสปอร์ *B. cereus* แต่ละไอโซเลทภายหลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 70 นาทีในสารละลายนม

Isolates	Temperature (°C)	Initial number (N_0)	Final number (N)	Survival ratio ($\log N/N_0$)
BC1	80	2.87×10^5	2.82×10^5	0.99
	85	4.40×10^5	9.55×10^4	0.88
	90	4.86×10^5	1.40×10^4	0.73
	93	1.23×10^5	2.86×10^3	0.48
	95	3.40×10^5	4.53×10^3	0.66
	98	5.67×10^4	5.00×10^1	0.36
BC2	80	2.84×10^5	1.54×10^5	0.95
	85	1.49×10^5	6.97×10^4	0.94
	90	1.13×10^5	3.02×10^3	0.57
	93	6.50×10^4	2.87×10^2	0.51
	95	1.29×10^5	6.90×10^2	0.56
	98	7.23×10^4	5.50×10^1	0.36
BC3	80	1.88×10^5	2.04×10^5	1.01
	85	4.19×10^5	2.31×10^5	0.95
	90	7.13×10^4	8.70×10^2	0.61

	93	4.23×10^4	2.83×10^2	0.53
	95	2.64×10^4	1.22×10^3	0.70
	98	2.32×10^4	1.00×10^1	0.23

3. ค่า D-value Z-value และ F-value ของสปอร์ *B. cereus*

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความสามารถในการทนความร้อนของสปอร์ *B. cereus* แต่ละไอโซเลทจากค่า D-value ในสารละลายเปปโทน 0.1% และสารละลายนม พบว่าในสารละลายเปปโทน 0.1% BC1 มีค่า D-value ที่ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เท่ากับ 149.96 78.57 34.82 22.62 และ 10.93 นาทีตามลำดับ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ BC2 มีค่า D-value ที่อุณหภูมิเดียวกันเท่ากับ 182.81 64.90 40.15 21.84 และ 6.46 นาทีตามลำดับ ส่วน BC3 มีค่า D-value ที่อุณหภูมิเดียวกันเท่ากับ 286.66 108.41 25.38 23.83 และ 14.48 นาทีตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าค่าสปอร์ของ BC1 ซึ่งเป็นสปอร์ที่แยกได้จากน้ำนมดิบมีความสามารถในการทนร้อนต่ำกว่าสปอร์ของ BC2 และ BC3 ซึ่งแยกได้จากถั่วเขียวและเครื่องบรรจุ M1 ที่อุณหภูมิเดียวกัน

สำหรับค่า D-value ของสปอร์ทั้งสามไอโซเลทในสารละลายนม พบว่า BC1 มีค่า D-value ที่ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส เท่ากับ 140.93 81.64 28.73 15.19 11.70 และ 7.29 นาทีตามลำดับ (ตารางที่ 5) ในขณะที่ BC2 มีค่า D-value ที่อุณหภูมิเดียวกันเท่ากับ 195.7 182.40 22.19 23.13 20.01 และ 22.08 นาทีตามลำดับ ส่วน BC3 มีค่า D-value ที่อุณหภูมิเดียวกันเท่ากับ 258.02 86.47 24.81 19.07 18.45 และ 17.54 นาทีตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกับสารละลายเปปโทน 0.1% นั่นคือสปอร์ของ BC1 ซึ่งเป็นสปอร์ที่แยกได้จากน้ำนมดิบมีความสามารถในการทนร้อนต่ำกว่าสปอร์ของ BC2 และ BC3 ซึ่งแยกได้จากถั่วเขียวและเครื่องบรรจุ M1 ที่อุณหภูมิเดียวกัน และค่า D-value ของทั้งสปอร์สามไอโซเลทในสารละลายนมมีค่าสูงกว่าในสารละลายเปปโทน 0.1% แต่ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

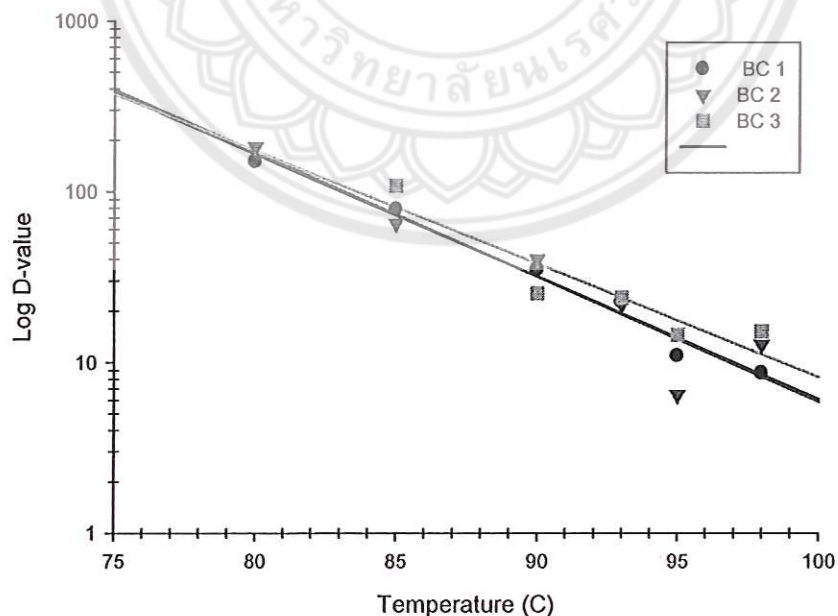
เมื่อพิจารณาค่า Z-value ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ต้องการเพื่อทำให้ค่า D_T -value ลดลง 1 \log_{10} cycle พบว่าค่า Z-value ของไอโซเลท BC1 ในสารละลายเปปโทน 0.1% (รูปที่ 8) และสารละลายนม (รูปที่ 9) มีค่าเท่ากับ 16.36 และ 13.28 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่สปอร์ BC2 ในสารละลายทั้งสองชนิดมีค่าเท่ากับ 14.38 และ 15.31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ BC3 มีค่าเท่ากับ 13.92 และ 15.27 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5: ค่า D-value และ Z-value ของสปอร์ *B. cereus* แต่ละไอโซเลทในสารละลายนมและสารละลายเปปโตน 0.1% ที่ระดับอุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส

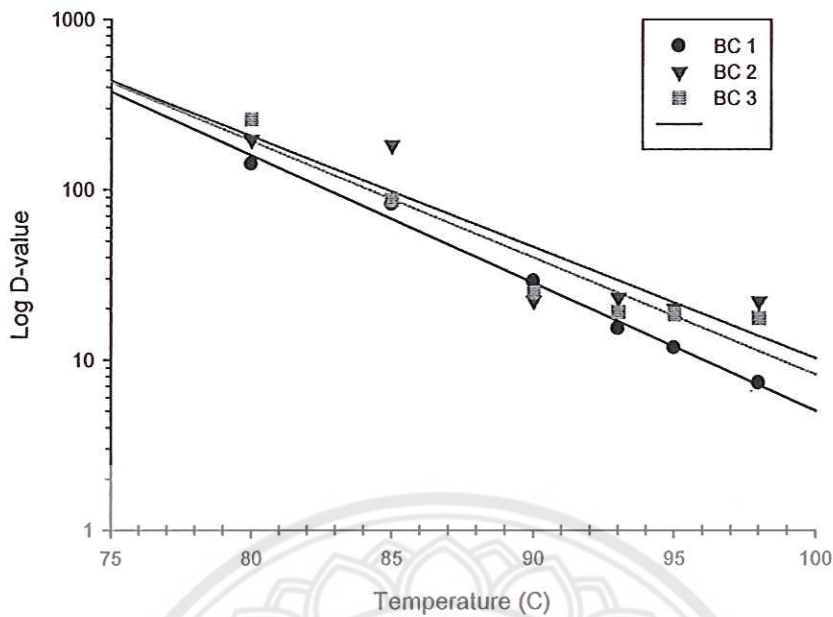
อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	D-value					
	สารละลายนม			สารละลายเปปโตน 0.1%		
	BC1	BC2	BC3	BC1	BC2	BC3
80	140.93 ^{Ca}	195.7 ^{Ba}	258.02 ^{Ba}	149.96 ^{Ba}	182.81 ^{Ca}	286.66 ^{Ca}
85	81.64 ^{Ba}	182.40 ^{Ba}	86.47 ^{Aa}	78.57 ^{ABab}	64.90 ^{Ba}	108.41 ^{Bab}
90	28.73 ^{Aa}	22.19 ^{*Aa}	24.81 ^{Aa}	34.82 ^{ABa}	40.15 ^{*ABa}	25.38 ^{Aa}
93	15.19 ^{*Aa}	23.13 ^{Aa}	19.07 ^{Aa}	22.62 ^{*ABb}	21.84 ^{Ab}	23.83 ^{Ab}
95	11.70 ^{Aa}	20.01 ^{Aa}	18.45 ^{Aa}	10.93 ^{Aab}	6.46 ^{Aa}	14.48 ^{Ab}
98	7.29 ^{Aa}	22.08 ^{Ac}	17.54 ^{Abc}	8.67 ^{Aa}	12.74 ^{Aab}	15.18 ^{Aab}
Z-value	13.28 ^{ab}	15.31 ^{ab}	15.27 ^{ab}	16.36 ^b	14.38 ^{ab}	13.92 ^{ab}

หมายเหตุ

- อักษรอังกฤษพิมพ์เล็ก(a-z) แสดงความแตกต่างระหว่างแถวของแต่ละสายพันธุ์ของ สารละลายนม และ เปปโตน 0.1%ในแต่ละอุณหภูมิ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- อักษรอังกฤษพิมพ์ใหญ่(A-Z) แสดงความแตกต่างระหว่างคอลัมน์ของแต่ละอุณหภูมิของ สารละลายนม และ เปปโตน 0.1%ในแต่ละสายพันธุ์ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%
- สัญลักษณ์ * แสดงความแตกต่างระหว่าง สารละลายนม และ เปปโตน 0.1



รูปที่ 11: ความสัมพันธ์ระหว่างค่า D-value ของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส ในสารละลายเปปโตน 0.1%



รูปที่ 12: ความสัมพันธ์ระหว่างค่า D-value ของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส ในสารละลายนม

การตอบสนองต่อระดับอุณหภูมิต่างๆของสปอร์ *B. cereus* แต่ละสายพันธุ์จะมีการตอบสนองเพื่อความอยู่รอดต่างกัน อาจเป็นเพราะแหล่งที่มาของแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกัน ซึ่งแหล่งที่มาจากกระบวนการให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิสูง การที่สปอร์ *B. cereus* สามารถทนต่อความร้อนได้เป็นผลมาจากกระบวนการตอบสนองต่อความเครียด (stress response) โดยจะเห็นได้ว่าสปอร์ของไอโซเลท BC2 และ BC3 ที่แยกได้จากถั่วเขียวและเครื่องบรรจุ M1 มีค่าสัดส่วนการเหลือรอด D-value และ Z-value สูงกว่าสปอร์ของ BC1 ที่แยกได้จากถั่วเขียวและเครื่องบรรจุ M1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่สภาวะแวดล้อมในถั่วเขียวและเครื่องบรรจุมีความเครียดมากกว่าถั่วเขียวและเครื่องบรรจุ เพราะทั้งในถั่วเขียวและเครื่องบรรจุนั้นโดยทั่วไปมักมีอุณหภูมิสูงกว่าถั่วเขียวและเครื่องบรรจุ จึงอาจส่งผลให้แบคทีเรียที่อยู่ในถั่วเขียวและเครื่องบรรจุมีกลไกการปรับตัวและตอบสนองต่อความร้อนเพื่อความอยู่รอด ทำให้สามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ดีควรมีการศึกษาถึงกลไกของปรากฏการณ์ดังกล่าวในเชิงลึกต่อไป ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shaheen และคณะ (2010) ที่รายงานว่า การปนเปื้อนของ *B. cereus* ในไซโลเก็บนมเป็นผลมาจากการต้านทานความร้อนของสปอร์ *B. cereus* (Shaheen et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า สปอร์ *B. cereus* มีความสามารถในการทนความร้อนได้ในน้ำนมดิบหรือนมที่ไม่ผ่านการปรุงแต่งจากการพาสเจอร์ไรส์ได้เนื่องมาจากการทำความสะอาดที่พื้นผิวภาชนะไม่เพียงพอ (Flint et al., 1997)

จากการศึกษาในครั้งนี่ยังพบว่าสปอร์ *B. cereus* มีความสามารถในการทนร้อนสูง ไม่สามารถกำจัดได้โดยใช้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที (Anderson et al., 1995) สปอร์ที่เหลือรอดอาจออกและเจริญขึ้นมาใหม่ ส่งผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ที่ได้ดังจะเห็นได้จากตัวอย่างของนมโรงเรียนซึ่งเป็นนมพาสเจอร์ไรส์ เกิดการเสื่อมเสียเนื่องจากสปอร์ของ *B.*

cereus เกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1938 (Stone et al., 1952) ความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ที่พบในนม (Wong et al., 1987; Shaheen et al., 2010) อาจทำให้สปอร์ *B. cereus* หลุดรอดจากการให้ความร้อนระหว่างกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์และเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสปอร์ *B. cereus* สามารถสร้างสารพิษประเภทเอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาหารเป็นพิษในมนุษย์ได้

จากข้อมูลที่ได้สามารถคำนวณหาค่า F-value ซึ่งเป็นระยะเวลาที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ที่สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ต้องการจากสมการ

$$F_T = D_T(\log N_0 - \log N)$$

เมื่อ F_T = ระยะเวลาเป็นนาทีที่อุณหภูมิ T

D_T = ค่า D-value ที่อุณหภูมิ T

N_0 = ปริมาณเชื้อตั้งต้น

N = ปริมาณเชื้อสุดท้าย

จากข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนของสปอร์ *B. cereus* ในน้ำนมดิบของโรงงานอุตสาหกรรมแห่งหนึ่ง (ไม่แสดงข้อมูล) พบว่าส่วนใหญ่มีปริมาณอยู่ในช่วง 2–4 \log_{10} cfu/ml ตามที่มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ระบุไว้ว่าให้มีปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มได้ไม่เกิน 100 cfu/ml ดังนั้นค่า F-value หรือระยะเวลาในการให้ความร้อนเพื่อลดปริมาณสปอร์ให้ เป็นไปตามมาตรฐานที่อุณหภูมิต่างๆ นั้น ต้องใช้เวลาดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าหากใช้อุณหภูมิสูง และมีปริมาณเชื้อปนเปื้อนต่ำก็จะใช้ระยะเวลาสั้น ในทางกลับกันหากมีปริมาณเชื้อปนเปื้อนสูงก็จะใช้ระยะเวลา นาน โดยสปอร์ของไอโซเลท BC1 ใช้ระยะเวลาที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสต่ำที่สุด คือประมาณ 14.58 21.87 และ 29.16 นาที ในการลดปริมาณสปอร์ปนเปื้อนลง 2 3 และ 4 \log_{10} ตามลำดับ ในขณะที่สปอร์ของ ไอโซเลท BC2 ใช้ระยะเวลาที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียสสูงที่สุด เท่ากับ 44.16 66.24 และ 88.32 นาที ใน การลดปริมาณสปอร์ปนเปื้อนลง 2 3 และ 4 \log_{10} ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ไม่ เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงาน เนื่องจากทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต รวมทั้งความร้อนและ ระยะเวลาที่ต้องใช้สูงผลิตภัณฑ์ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ของผลิตภัณฑ์พาสเจอร์ไรซ์

ตารางที่ 6: ค่า F หรือระยะเวลาที่ต้องการที่อุณหภูมิต่างๆ ในการลดปริมาณสปอร์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

Isolates	อุณหภูมิ (°C)	D-value (min)	เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (min)	ปริมาณเชื้อที่ต้องการให้ลดลง (Required Log reduction)	Isolates	อุณหภูมิ (°C)	D-value (min)	เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (min)	ปริมาณเชื้อที่ต้องการให้ลดลง (Required Log reduction)	Isolates	อุณหภูมิ (°C)	D-value (min)	เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (min)	ปริมาณเชื้อที่ต้องการให้ลดลง (Required Log reduction)
BC 1	80	140.93	281.86	2	BC 2	80	195.7	391.4	2	BC 3	80	258.02	516.04	2
			422.79	3				587.1	3				774.06	3
			563.72	4				782.8	4				1032.08	4
			163.28	2				364.8	2				172.94	2
	85	81.64	244.92	3		85	182.40	547.2	3		85	86.47	259.41	3
			326.56	4				729.6	4				345.88	4
			57.46	2				44.38	2				49.62	2
			86.19	3				66.57	3				74.43	3
	90	28.73	114.92	4		90	22.19	88.76	4		90	24.81	99.24	4
			30.38	2				46.26	2				38.14	2
			45.57	3				69.39	3				57.21	3
			60.76	4				92.52	4				76.28	4
	93	15.19	23.4	2		93	23.13	40.02	2		93	19.07	36.9	2
			35.1	3				60.03	3				55.35	3
			46.8	4				80.04	4				73.8	4
			14.58	2				44.16	2				35.08	2
	95	11.70	21.87	3		95	20.01	66.24	3		95	18.45	52.62	3
			29.16	4				88.32	4				70.16	4
			7.29	2				44.16	2				35.08	2
			21.87	3				66.24	3				52.62	3

4. การประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ด้วยความร้อน

แบบจำลองทั้ง 2 แบบที่นำเสนอถูกนำมาประมาณค่าพารามิเตอร์ ได้ดังตารางที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบจำลอง โดยค่า MSE น้อยแสดงความเหมาะสมดีกับข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (Kutner, 2003 ; Nau, 2005) พบว่าแบบจำลองจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (First-Order Kinetic Models) มีความน่าเชื่อถือที่อุณหภูมิ 85 - 98 องศาเซลเซียส ในไอโซเลท BC1 ที่อุณหภูมิ 90 - 98 องศาเซลเซียส ในไอโซเลท BC2 และที่อุณหภูมิ 93 - 98 องศาเซลเซียส ในไอโซเลท BC3 ส่วนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในไอโซเลท BC1 ที่อุณหภูมิ 80 - 85 องศาเซลเซียส ในไอโซเลท BC2 และที่อุณหภูมิ 80 - 93 องศาเซลเซียส เส้นโค้งจากการทำนายก่อนข้างฉากผ่านจุดข้อมูลที่ได้จากการทดลองสังเกตได้จากรูปที่ 13 19 20 23 24 และ 25 แต่มีความน่าเชื่อถือน้อยกว่าอุณหภูมิที่น่าเชื่อถือที่กล่าวข้างต้น แบบจำลองล็อกโลจิสติก (log-logistic Models) ที่อุณหภูมิ 93 - 98 องศาเซลเซียส ของไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 มีความน่าเชื่อถือมากกว่าที่อุณหภูมิ 80 - 90 องศาเซลเซียส

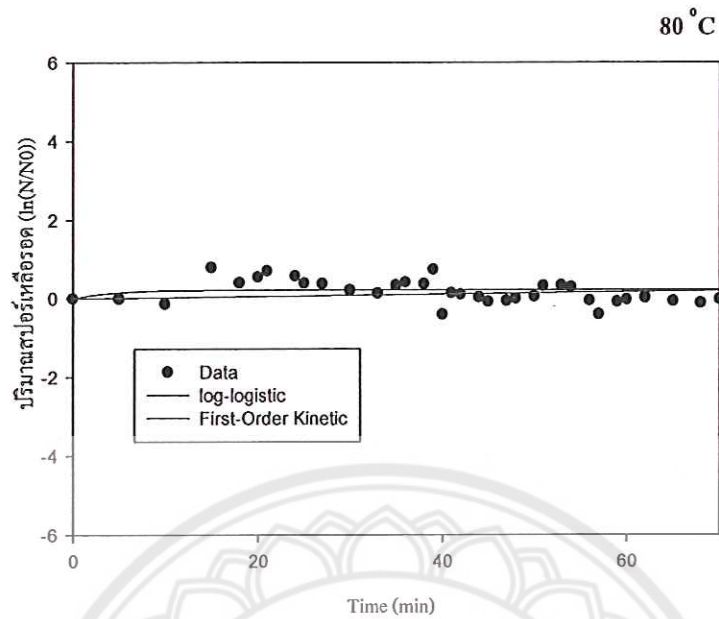
เมื่อเปรียบเทียบการทำนายทั้งสองแบบจำลองพบว่า แบบจำลองจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (First-Order Kinetic Models) ที่มีความน่าเชื่อถือจะมีความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองมากกว่าแบบจำลองล็อกโลจิสติก (log-logistic Models) โดยพิจารณาจากค่า MSE จากรายงานวิจัยแบบจำลองจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (First-Order Kinetic Models) ถูกใช้อธิบายการลดลงแบบทวีคูณ (exponential) เป็นเวลาหลายปี วิศวกรกระบวนการนำแบบจำลองนี้มาใช้ในการสร้างกระบวนการอาหารปลอดภัย (Heldman and Newsome, 2003) และ ความเหมาะสมสำหรับข้อมูลอยู่ในระดับดี (Rudra, 2010)

โดยภาพรวมแล้วแบบจำลองที่นำเสนอสามารถอธิบายการลดลงของจำนวนสปอร์ของ *B. cereus* ได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับหรือต่ำกว่า 85 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิสูงกว่า 85 องศาเซลเซียส นั้นแบบจำลองทั้งสองอธิบายได้ดีพอใช้ คืออธิบายได้ดีในช่วงเวลาประมาณ 30 นาทีแรกของการให้ความร้อน หลังจากนั้นจะทำนายได้มากกว่าความเป็นจริง (over estimation) แต่อย่างไรก็ตามแบบจำลองทั้งสองแบบที่เลือกมานี้มีพฤติกรรมที่สอดคล้องกับการทดลองจริง หากต้องการความถูกต้องมากยิ่งขึ้นก็จำเป็นต้องมีการปรับปรุงแบบจำลองเพิ่มเติม

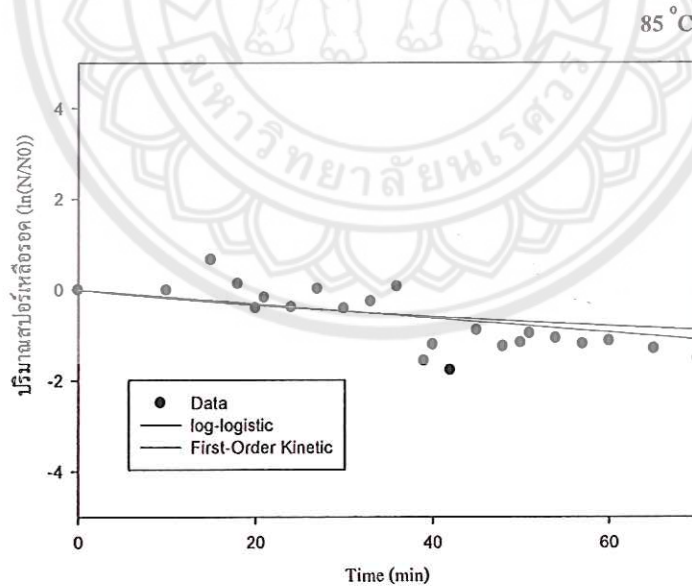
ตารางที่ 7: ค่าพารามิเตอร์ของ First-order model และ Log-logistic model ที่ใช้สำหรับการทำนายการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ที่อุณหภูมิ 80 85 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส

ไอโซเลท	Temp (องศา เซลเซียส)	ชนิดแบบจำลองทางคณิตศาสตร์				
		First-order kinetic		Log-logistic		
		k	MSE	k	S_{AS}	MSE
BC 1	80	-0.003	6.232	-0.2673	1.25	4.93
	85	0.02	0.016	-1.10E-05	5.65E-04	2.54
	90	0.04	0.706	-1.30E-05	1.75E-04	1.06
	93	0.07	0.158	-4.00E-06	2.80E-05	0.28
	95	0.14	0.038	-8.00E-06	1.10E-05	0.09
	98	0.14	0.043	-3.00E-06	8.00E-06	0.16
BC 2	80	-1.50E-05	1.33	-1.80E-05	5.86	1.33
	85	-1.95E-03	6.38	-0.62	1.3	4.92
	90	0.05	0.79	-1.20E-05	1.10E-04	1.34
	93	0.06	0.29	-1.60E-05	1.47E-04	0.61
	95	0.13	0.06	-9.00E-06	1.60E-05	0.13
	98	0.32	0.004	-1.09E-04	9.30E-05	0.006
BC 3	80	0.00	19.99	-1.927918	1.80	7.89
	85	0.01	2.05	-4.00E-06	5.63E-04	2.12
	90	0.04	2.07	-7.00E-06	8.70E-05	2.45
	93	0.05	0.30	-1.30E-05	1.49E-04	0.62
	95	0.14	0.03	-1.40E-05	2.40E-05	0.05
	98	0.13	0.06	-9.00E-06	2.80E-05	0.19

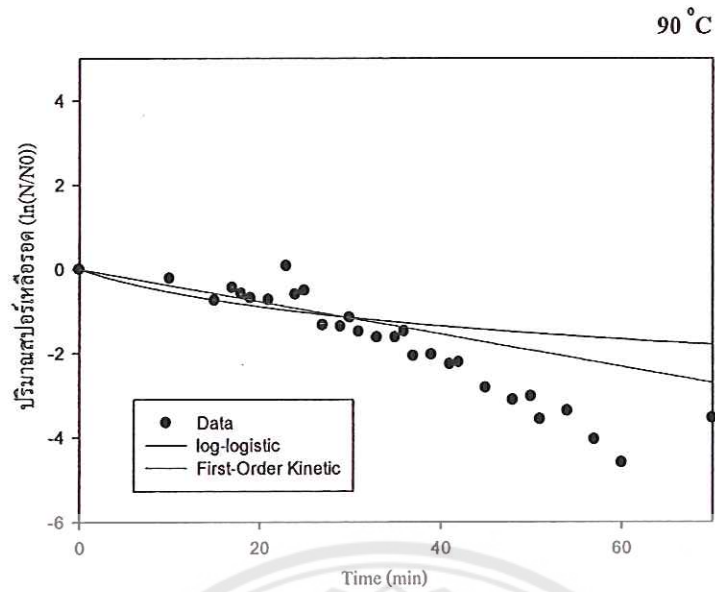
BC 1



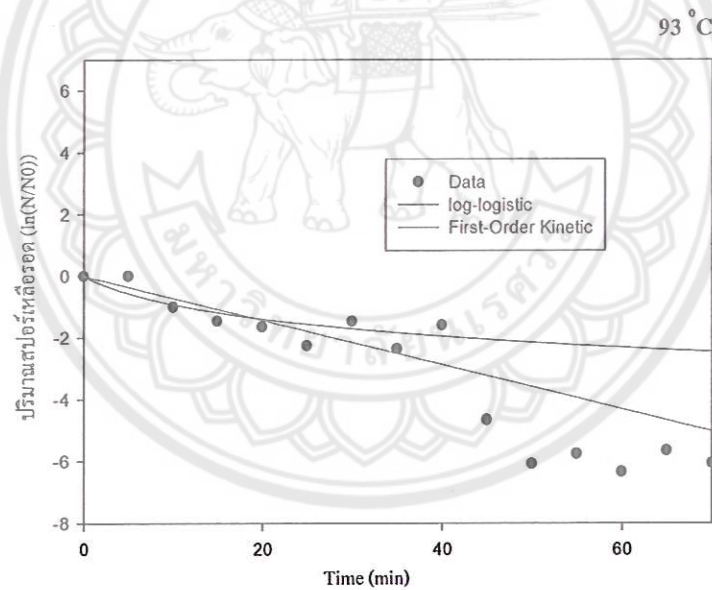
รูปที่ 13: การรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC1 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



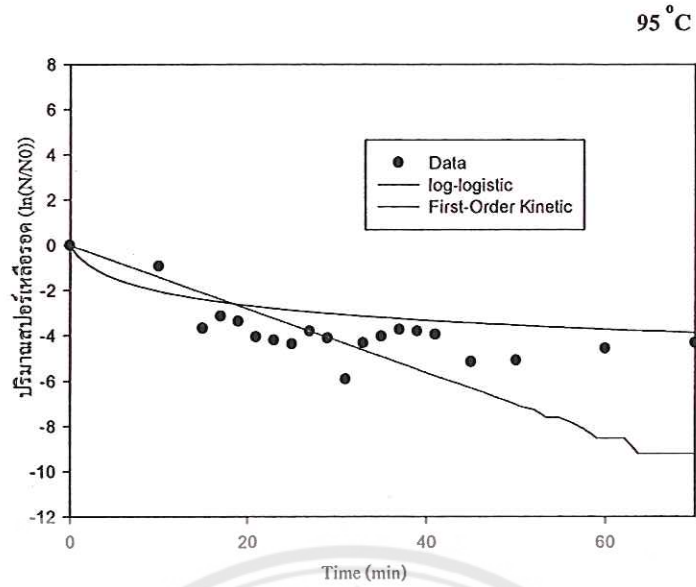
รูปที่ 14: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์สปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC 1 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



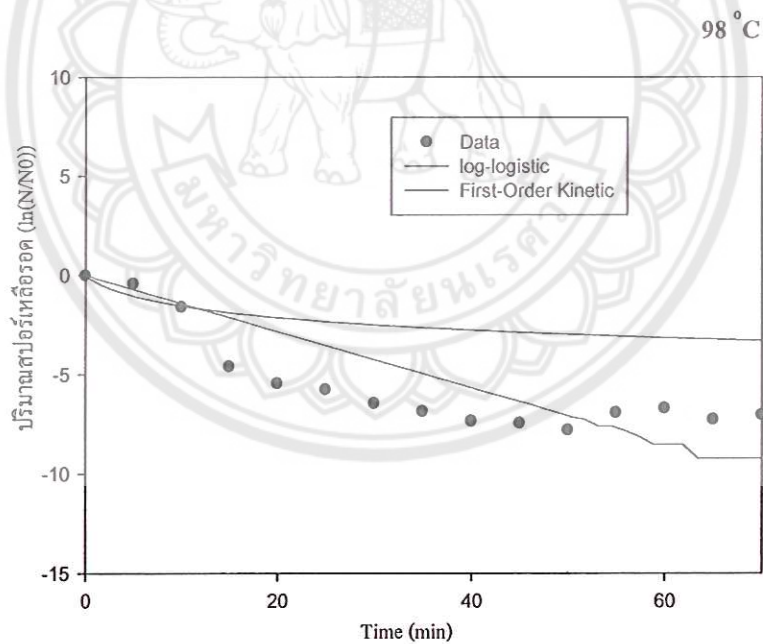
รูปที่ 15: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC 1 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



รูปที่ 16: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC 1 ที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic

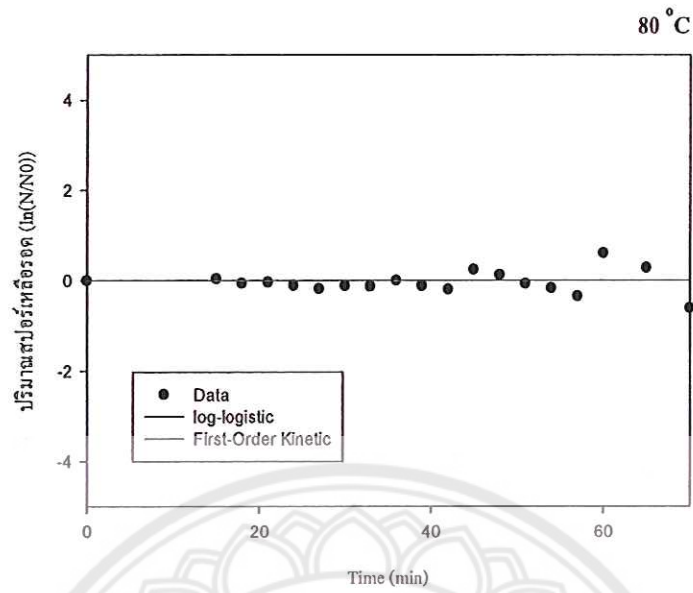


รูปที่ 17: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic

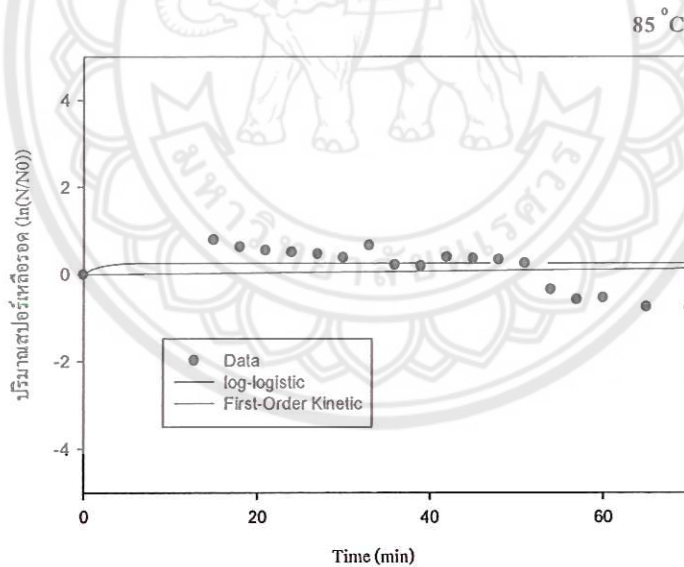


รูปที่ 18: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC 1 ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic

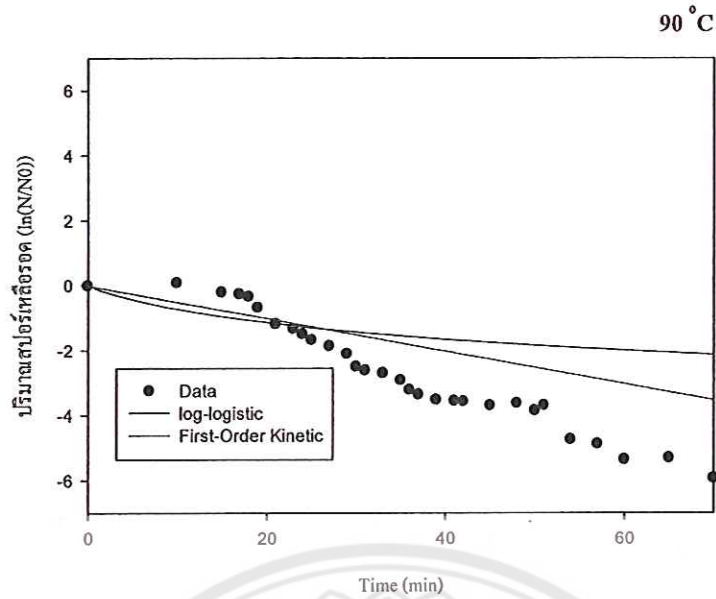
BC 2



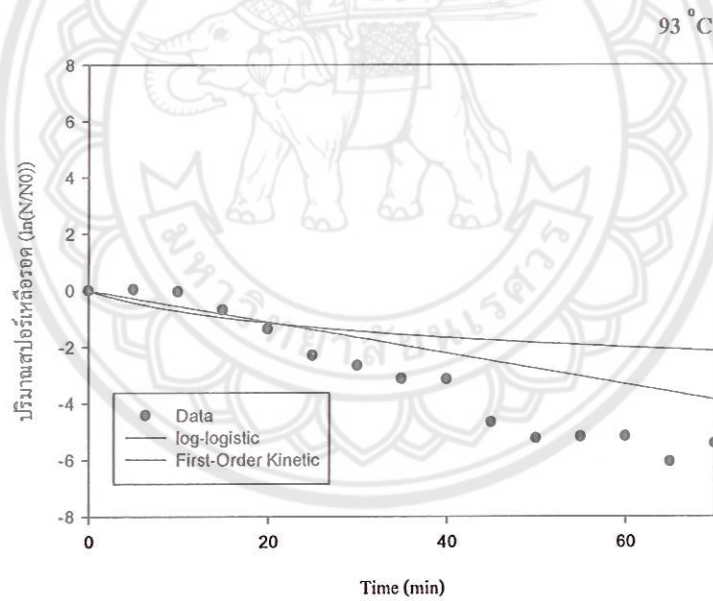
รูปที่ 19: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC2 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



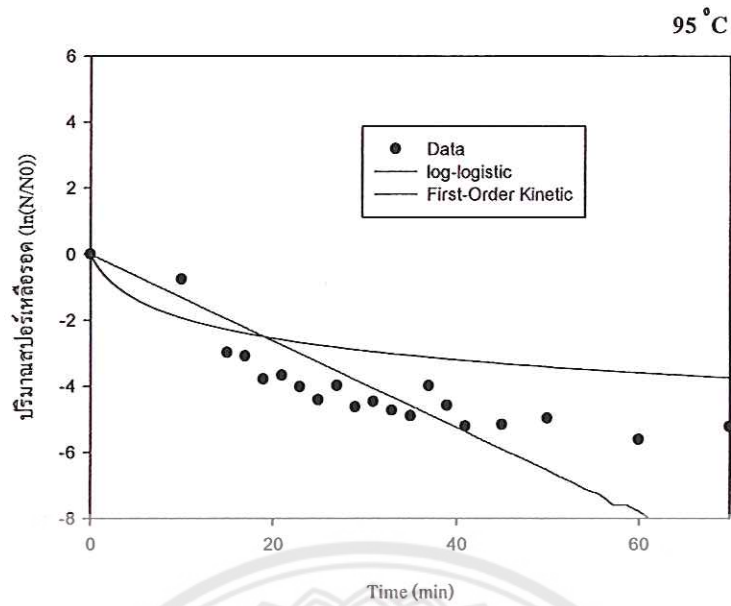
รูปที่ 20: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC2 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



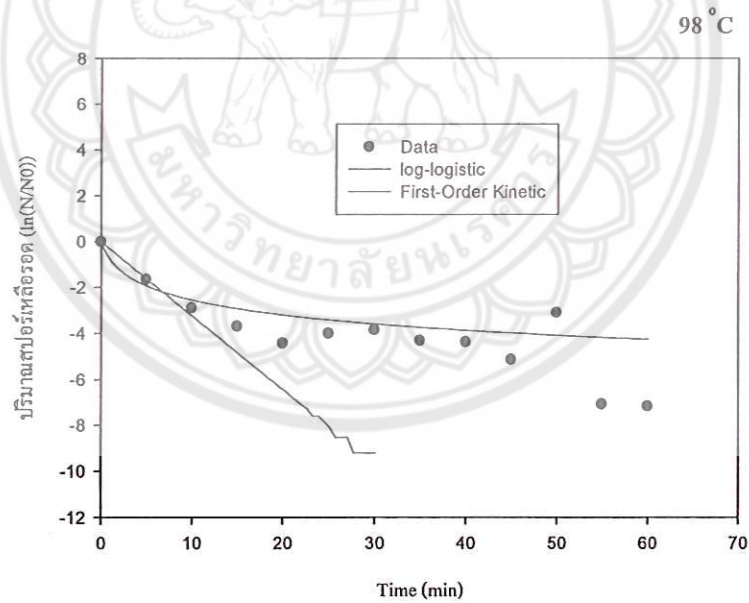
รูปที่ 21: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC2 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



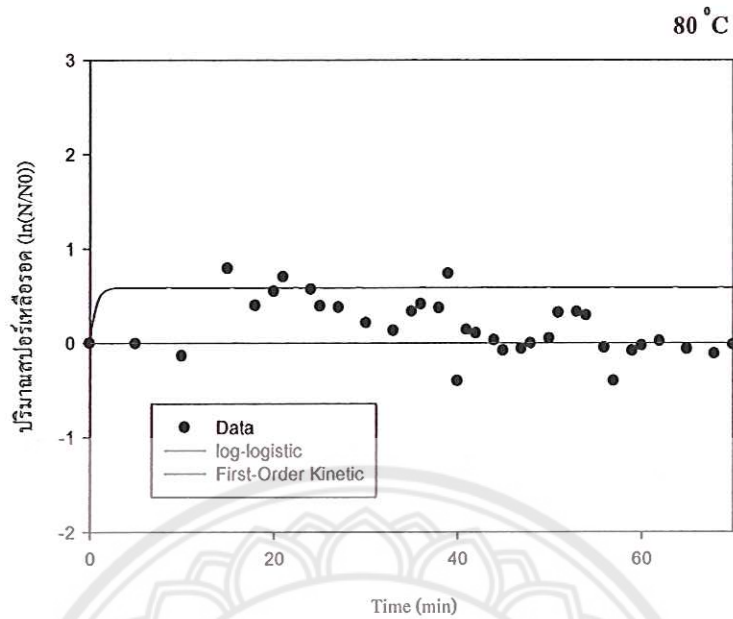
รูปที่ 22: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC2 ที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



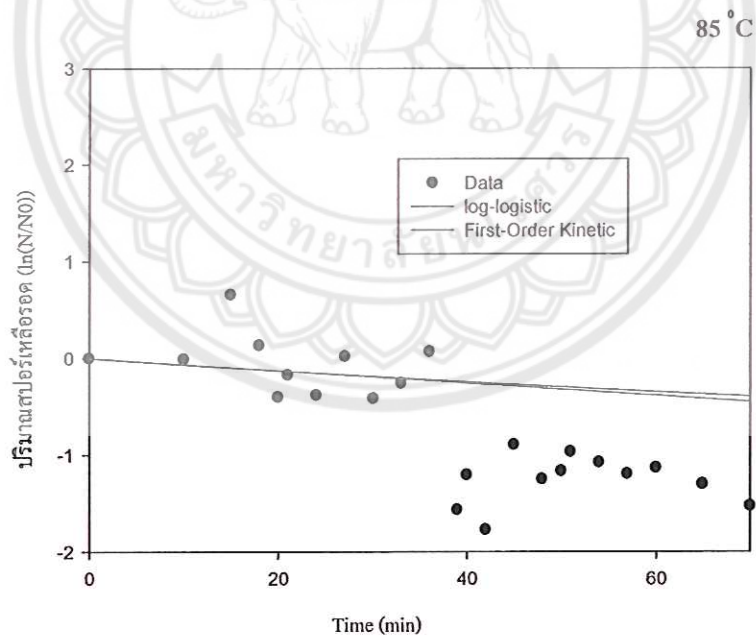
รูปที่ 23: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



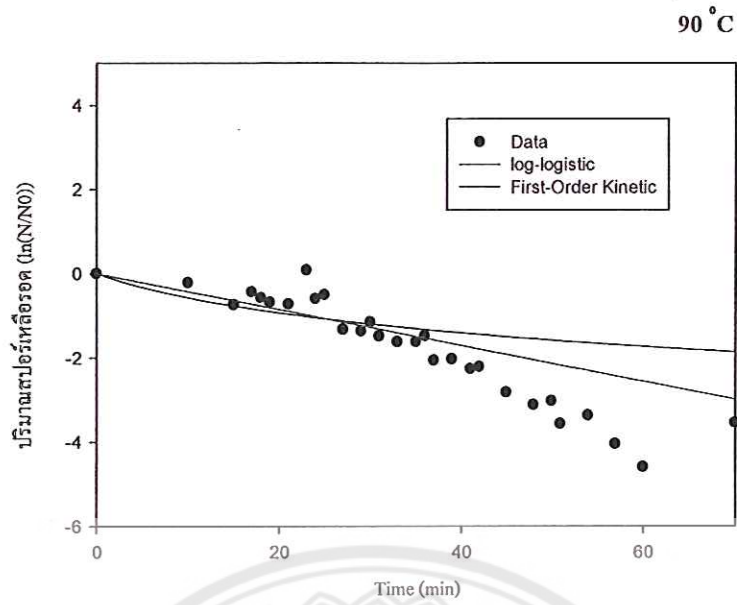
รูปที่ 24: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC2 ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



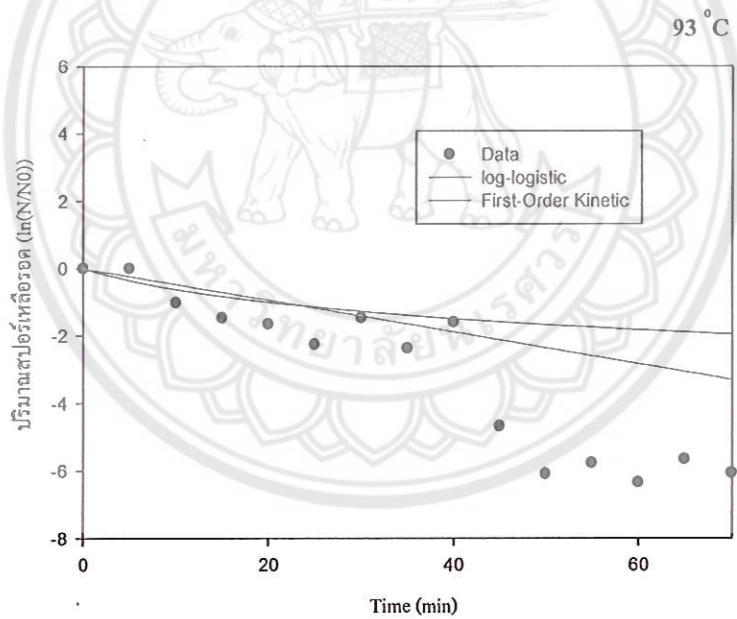
รูปที่ 25: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC3 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



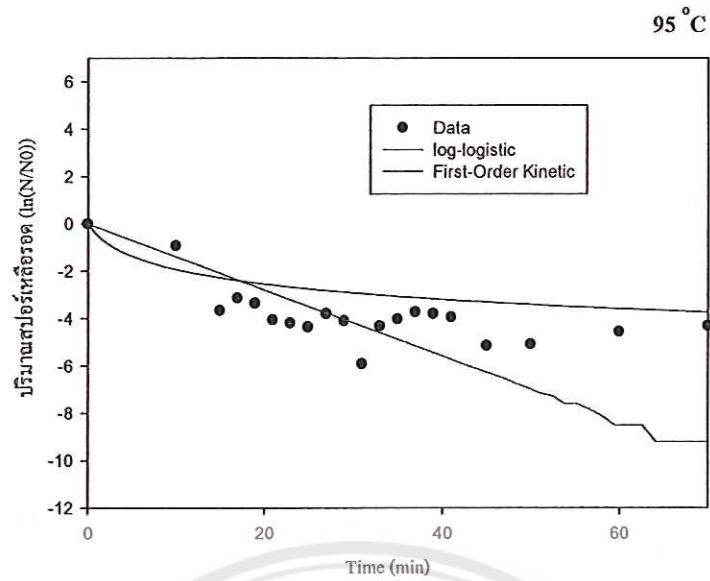
รูปที่ 26: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC3 ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



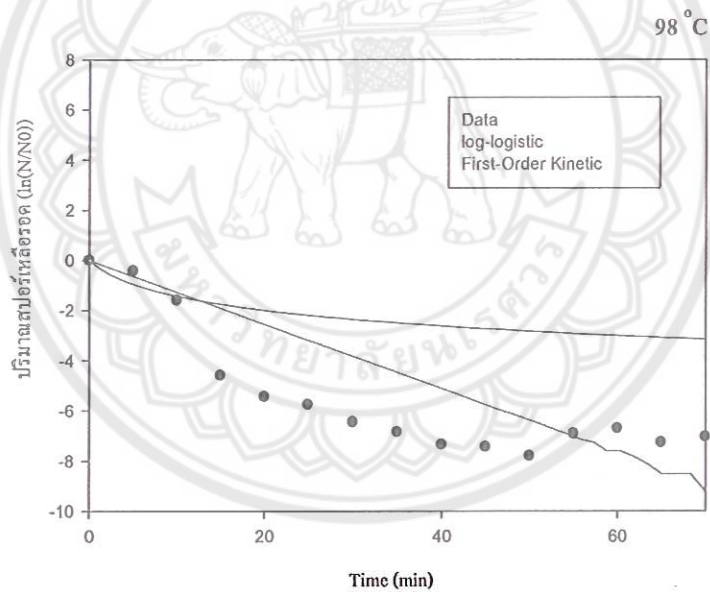
รูปที่ 27: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC3 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



รูปที่ 28: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC 3 ที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



รูปที่ 29: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC 3 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic



รูปที่ 30: แสดงการรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ไอโซเลท BC3 ที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เทียบการทำนายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ First-order kinetic และ Log-logistic

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาความสามารถในการทนร้อนในสารละลายเปปโทน 0.1% เปรียบเทียบกับในน้ำนมของสปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลท พบว่าสปอร์ที่นำมาศึกษาทั้งหมดสามารถทนต่อความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียสได้ โดยจะเห็นได้จากการที่สัดส่วนของปริมาณจุลินทรีย์เหลือรอด (N/N_0) ภายหลังได้รับความร้อนที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 70 นาที มีค่าอยู่ระหว่าง 0.9 -1.0 ซึ่งแสดงว่าปริมาณสปอร์มีค่าคงที่หรือลดลงน้อยกว่าร้อยละ 10 ในสารละลายทั้งสองชนิดที่นำมาทดสอบ เพียงเล็กน้อย แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 90 93 95 และ 98 องศาเซลเซียส ค่าดังกล่าวเริ่มลดลงโดยแปรผกผันกับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่าต่ำสุดที่ 98 องศาเซลเซียส ในทุกไอโซเลทและสารละลายที่ทำการศึกษา โดย BC1 BC2 และ BC3 มีค่าค่าสัดส่วนการรอดชีวิตที่ 98 องศาเซลเซียสในสารละลายเปปโทน 0.1% เท่ากับ 0.25 0.25 และไม่สามารถตรวจนับได้ ตามลำดับ เซลเซียส ในขณะที่ BC1 BC2 และ BC3 มีค่าสัดส่วนการรอดชีวิตที่ 98 องศาเซลเซียสในสารละลายนมเท่ากับ 0.36 0.36 และ 0.23 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่า สปอร์ของ BC2 และ BC3 ที่แยกได้จากถังฆ่าเชื้อและเครื่องบรรจุ M1 มีความสามารถในการทนต่อความร้อนสูงกว่าสปอร์ของ BC1 ที่แยกได้จากน้ำนมดิบที่อุณหภูมิเดียวกันทั้งในสารละลายเปปโทน 0.1% และในน้ำนม โดยในสารละลายเปปโทน 0.1% ค่า $D_{98^{\circ}\text{C}}$ ของ BC1 BC2 และ BC3 เท่ากับ 10.93 6.46 และ 14.48 นาทีตามลำดับ ในขณะที่ในน้ำนม $D_{98^{\circ}\text{C}}$ ของ BC1 BC2 และ BC3 มีค่าเท่ากับ 7.29 22.08 และ 17.54 นาทีตามลำดับ ทั้งยังพบว่าค่า D-value ของทั้งสปอร์สามไอโซเลทในสารละลายนมมีค่าสูงกว่าในสารละลายเปปโทน 0.1% แต่ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาค่า Z-value พบว่าสปอร์ *B. cereus* ทั้งสามไอโซเลทมีค่า Z-value ใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในช่วง 13.28 -16.36 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาค่า F-value โดยคำนวณจากค่า D-value ที่ต่ำที่สุดที่จะสามารถลดปริมาณสปอร์ *B. cereus* ลงจนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานกระทรวงสาธารณสุข (4 log reduction) พบว่าที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส จะต้องใช้เวลาประมาณ 29.16 88.32 และ 70.16 นาทีในการลดปริมาณสปอร์ของไอโซเลท BC1 BC2 และ BC3 ลง 4 \log_{10} ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะเวลาและอุณหภูมิที่ใช้ไม่ไม่เป็นไปตามเกณฑ์ของผลิตภัณฑ์พาสเจอร์ไรซ์ ทั้งยังไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงาน เนื่องจากทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต

เมื่อทำการเปรียบเทียบแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ในการยับยั้งสปอร์ *B. cereus* ด้วยความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ พบว่า แบบจำลองจลนพลศาสตร์อันดับหนึ่ง (First-Order Kinetic Models) มีความเหมาะสมกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองมากกว่าแบบจำลองล็อกโลจิสติก (log-logistic Models) เมื่อพิจารณาจากค่า MSE เปรียบเทียบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ทั้งสองชนิด

จากข้อมูลที่ได้จะเห็นว่าสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้จากโรงงานสามารถทนต่อความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์ได้สูง ดังนั้นความร้อนที่ใช้กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์เพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอสำหรับการควบคุมและลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ สถานประกอบการควรมีการหามาตรการอื่นเสริม เช่น หลักการผลิตที่ดี (GMP) และกระบวนการ CIP ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อป้องกันและลดการปนเปื้อนหลังการฆ่าเชื้อ



ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ “จลนพลศาสตร์การยับยั้งสปอร์ของ *Bacillus cereus* ด้วยความร้อนในกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์นม” มีดังนี้

1. ผลงานวิจัย เรื่อง “แหล่งปนเปื้อนและความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากโรงงานนม” นำเสนอแบบปากเปล่าในการประชุมวิชาการ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 12 – 13 มีนาคม 2555 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ. พิษณุโลก (ภาคผนวก ก1)



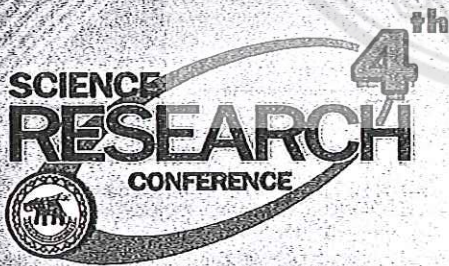
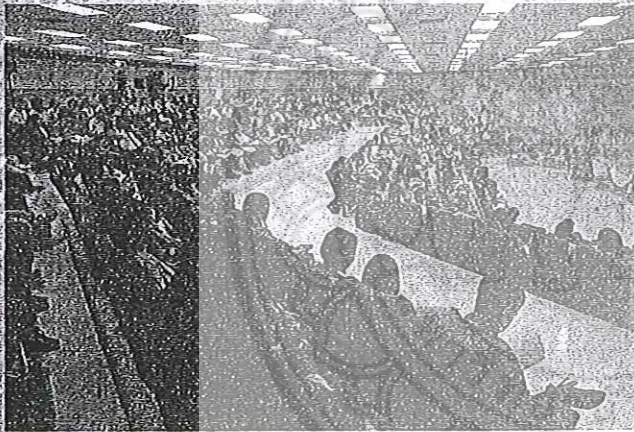
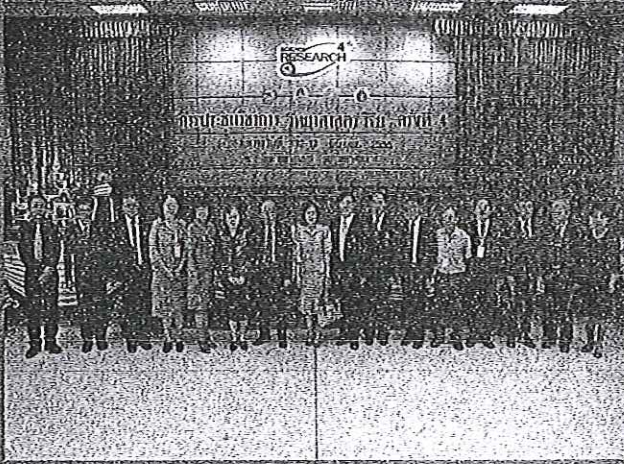
บรรณานุกรม

- ณรงค์ ฟื้นถาวร. 2547. การศึกษาเชื้อ *Bacillus spp.* ในกระบวนการผลิตนม ยู.เอช.ที. ณ องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย สำนักงานภาคเหนือตอนล่าง (จ.สุโขทัย). การศึกษาค้นคว้าด้วยตนเองปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร. จำนวน 95 หน้า.
- ปรียะทัศน์ีย์ ประไซโย. 2548. เอกสารประกอบการสอน รายวิชา 103495 หัวข้อเฉพาะทางอุตสาหกรรมเกษตร เรื่อง โรคที่เกิดจากอาหาร (Foodborne disease). คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร. จำนวน 104 หน้า
- ปรียะทัศน์ีย์ ประไซโย และดร.ณิ วงศ์แก้ว. 2552. การศึกษาแหล่งปนเปื้อนและประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการอุตสาหกรรมและวิจัยสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (IRPUS) ประจำปี 2551 เรื่อง การศึกษาแหล่งปนเปื้อนและประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์ (I251C10015).
- Andersson, A., U. Ronner and P. E. Granum. (1995). What problems does the food industry have with the spore - forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. International Journal of Food Microbiology. 28, 145 – 155.
- Beaman, T. C. and Gerhardt, P. (1986). Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. Applied and Environmental Microbiology. 52(6), 1242-1246.
- Dogan, Z., K. Weidendorfer, M. Muller-Merbach, F. Lembke and J. Hinrichs. 2009. Inactivation kinetics of *Bacillus* spores in batch- and continuous-heating systems. 42:81-86.
- Fernandez, A., M. J. Ocio, P. S. Fernandez and A. Martinez. 2001. Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. 63:257-264.

- Flint, S.H., Bremer, P. J. and Brooks, J.D.(1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling*. The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. 11(1), 81-97
- Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, C. Barsotti, A. Baggiani and S. Senesi. 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* 208:129-134.
- Giffel, M. C. Te, R. R. Beumer, P. E. Granum and F. M. Rombouts. 1997. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. *Int. J. Food. Microbiol.* 34:307-318.
- Gonzalez, I., M. Lopez, M. Mazas, A. Bernardo and R. Martin. 1996. Effect of pH of the recovery medium on the apparent heat resistance of the three strains of *B. cereus*. *Int. J. Food. Microbiol.* 31:341-347.
- Granum, P. E., Brynestad, S. and Kramer, J. K. (1993). Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *International Journal of Food Microbiology.* 17(4), 269-279.
- Heldman, D. R, and Newsome, R. L. (2003). Kinetic models for microbial survival during processing. *Food technology.* 57, (40-46).
- Hernandez-Herrero, L. A., M. J. Giner and M. Valero. 2008. Effective control of psychrotropic *Bacillus cereus* EPSO-35AS and INRA TZ415 spore outgrowth in carrot broth. *Food Microbiol.* 25:714-721.
- Jagannath, A. T. Tsuchido and J.-M. Membre. 2005. Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores using the modified Weibull and Bigelo equations. *Food Microbiol.* 22:233-239.

- Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., and Neter, J. (2003). Applied Linear Regression Models. Retrieved February 29, 2012, https://netfiles.umn.edu/users/nacht001/www/nachtsheim/kut86916_ch02.pdf.
- Leguerinel, L. and P. Marfart. 2001. Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. Int. J. Food. Microbiol. 63:29-34.
- Lin, S., H. Schraft, J. A. Odumeru and M. W. Griffiths. 1998. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. Int. J. Food Microbiol. 43:159-171.
- Nau, B. (2005). What's the bottom line? How to compare models. Retrieved on 29 February 2013, <http://people.duke.edu/~rnau/compare.htm>.
- Pacheco-Sanchez, C. de P. and P. R. de Massaguer. 2007. *Bacillus cereus* in Brazilian ultra high temperature milk. Sci.Agric. (Piracicaba, Braz.) 64(2): 152-161.
- Peleg, M., M. D. Norman, M. G. Corradini, A. J. van Asselt, P. de Jong and P. F. Ter Steeg. 2008. Estimating the heat resistance parameters of bacterial spores from their survival ratios at the end of UHT and other heat treatments. Crit. Rev. Food Sci. Nut. 48:634-648.
- Peleg, M. 2006. Advanced quantitative microbiology for food and biosystems: Models for predicting growth and inactivation. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Peleg, M., M. D. Norman, and M. G. Corradini. 2004. The logistic (Verhust) model for sigmoid microbial growth curve revisited. Food Res. Int. 40:808-818.
- Peleg, M., D. Norman, and O.H. Campanella. 2003. Estimation microbial inactivation parameters from survival curve obtained under varying conditions – the linear case. Bulletin of Mathematical Biology.65:219-234.
- Peng, H., V. Ford, E. W. Frampton, L. Restaino, L. A. Shelef and H. Spitz. 2001. Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. Food Microbiol. 18:231-238.

- Rudra, S. G, Chhibber, S, and Shivhare, U. S. (2010). Thermal death kinetics of *B. stearothermophilus* in coriander leaf puree. *Biosystems engineering* .106, (544-550).
- Sarrias, J.A., M. Valero and M.C. Salmeron. 2002. Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiol.* 19:589-595.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., Christiansson, A., Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology.* 27, 347- 355.
- Stone, J. M. and Rowlands, A. (1952). 'Broken' or 'bitty' cream in raw and pasteurized milk. *Journal of Dairy Research.* 19, 51-62.
- Warth, A. D. (1980). Heat stability of *Bacillus cereus* enzymes within spores and in extracts *Journal of bacteriology.* 143(1), 27-34.
- Wong, H. C., Chang M. H., and Fan, J. Y. (1987). Incidence and Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Contaminating Dairy Products. *Applied and environmental Microbiology.* 54, 699-702.



มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ มหาวิทยาลัยบูรพา มหาวิทยาลัยพะเยา

Proceedings

การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 4

The 4th Science Research National Conference

วันที่ 12-13 มีนาคม 2555 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

เรื่อง	หน้า
กลุ่มที่ 2 สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ศึกษา (ต่อ)	BI
๑ คุณสมบัติเชิงอิมัลชันของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TISTR 781 แพร่สาย ไชบุตดี, กิตติมา เขียวอรุณ, อรวรรณ กฤตสุนันท์กุล และ วรสิทธิ์ โทจำปา	85-90
๑ Effect of Soaking Times of Pickle Green Mustard in Pineapple Shell Extract on Dark Color of Canned Pickle Green Mustard <i>Rujira Lueang-om and Chockchai Theerakulkait</i>	91-94
๑ การเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนระหว่างการจัดการเรียนรู้โดยใช้บทเรียนสำเร็จรูป กับการจัดการเรียนรู้ตามปกติ เรื่องการสืบพันธุ์ของพืชดอก ของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 จันฉาย โสหา, จีระพรรณ สุขศรีงาม และ ชูศรี ตลับมวบ	95-100
๑ การเปรียบเทียบผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนวิชาชีววิทยา โดยใช้บทเรียนสำเร็จรูป เรื่อง ระบบไหลเวียนเลือดของมนุษย์กับการเรียนแบบปกติ ของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 5 สุดาวรัตน์ โต้ชาติ, จีระพรรณ สุขศรีงาม และ ชูศรี ตลับมวบ	101-106
๑ การพัฒนาผลสัมฤทธิ์ทางการเรียน เรื่อง เคมิที่เป็นพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต และเจดคติต่อวิชาชีววิทยาของนักเรียนชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4 โดยใช้ชุดกิจกรรมร่วมกับวัฏจักรการเรียนรู้ 5E กฤติยา ศาสตรา และ สุภาพร พรไธโร	107-112
๑ การสำรวจพรรณไม้วงศ์ขิงในเขตพื้นที่เขื่อนสิริกิติ์ จ.อุตรดิตถ์ คงศักดิ์ พรหมเทพ, ปรียานันท์ แสนโกชโร และ พันธิตรา กมล	113-115
๑ ความเป็นไปได้ในการใช้ไอโซนควมคุณภาพน้ำในสระว่ายน้ำ สุกานดา ปานศรีและ ชาญวิทย์ ไชมิตานนท์	116-119
๑ สารเคมีสำหรับยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บนยางแผ่นดิบ กิตติภานต์ กุแก้ว, สุรพิชญ์ ลอยกุลนันท์, ปิยะดา สุวรรณดิษฐากุล และ ชาญวิทย์ ไชมิตานนท์	120-123
๑ การย่อยสลายของพลาสติกชีวภาพในดินจากปอฝัองกลบขยะผสมกากตะกอนภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน นาวัน เสนุสินธุ์, ชนาวัต ลีจากภัย และ ชาญวิทย์ ไชมิตานนท์	124-128
๑ การลดความเป็นพิษของสารชีวาลีโนโดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก อรุณรัศมี แสงศิลา, Annie Pfohl-Leszkowicz, และ ปรียาภรณ์ อิศรานูวัฒน์	129-133
๑ ปริมาณน้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ และเบต้า-กลูแคน ในสารสกัดจากเห็ดกินได้ พิชญา พานนนท์, จำไพ เกษมศรีสาธุ และ ปรียาภรณ์ อิศรานูวัฒน์	134-139
๑ ผลสัมฤทธิ์ทางการเรียนของนักเรียนที่ผ่านการวัดแววค่านักวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีโครงการขยายโรงเรียนเทคโนโลยีฐานวิทยาศาสตร์สู่ภูมิภาคสาขาเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร ชัชวาลย์ กันทะลา, วิสูตร อาสนวิจิตร, อาทิตย์ ยาวุฑฒิ และ จุฑาวรัตน์ ศิริจันทร์ชื่น	140-143
๑ พิษเฉียบพลันและฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดดอกทองกวาวในหนูเบาหวาน ณัฏฐชนก สิงหนเสนา, วิลาวรรณย์ พร้อมพรม และ ชูศรี ตลับมวบ	144-148
๑ ผลของความเค็มต่อการเจริญและปริมาณโปรตีนของของไซยาโนแบคทีเรีย <i>Oscillatoria sp.</i> , <i>Nostoc sp.</i> และ <i>Anabaena sp.</i> ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่มีความเค็มจากเกลือ ไพธิรธรณ์ ธรรมชิตานุกัมภ์, อภิรดา สถาปัตยานนท์, กนกภานต์ นาคทอง, ชัยศาสตร์ ตเชนทร์สุวรรณ และ สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ	149-153
๑ ผลของสารสกัดดอกทองกวาวต่อปริมาณเอ็นซูลินในหนูเบาหวาน กรกนก ตรงศูนย์, วีรพร กพิศาสตร์ และ ชูศรี ตลับมวบ	154-156
๑ แหล่งปนเปื้อนและความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ <i>Bacillus cereus</i> ในน้ำมันที่แยกได้จากโรงงานนม พรรณนิภา มุ่นเขย, พัชราภรณ์ เอื้องอ้าย, ครุณี วงศ์แก้ว, วรสิทธิ์ โทจำปา, นที ทองศิริ และ อรอินทร์ ประไชโย	157-162
๑ Detection of Peroxidase Activity in Cyanobacteria <i>Chaiyasad Kachensuwan, Surasak Laloknamz and Somkiat Phomphisulthimas</i>	163-167
๑ การย่อยสลายพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแลคติกแอซิดโดย <i>Bacillus sp.</i> ที่คัดแยกจากดิน นิตยาพร สมภักดิ์, อัญชญา พัฒนสุพงษ์, อภิเดช แสงดี และ ปรียาภรณ์ อิศรานูวัฒน์	168-171

แหล่งปนเปื้อนและความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *Bacillus cereus* ที่แยกได้จากโรงงานนม

Contamination sources and Heat resistance of *B. cereus* spores isolated from dairy plant

พรรณนิภา มุ่นชัย¹, พัชราภรณ์ เอื้องอ้าย¹, ดรุณี วงศ์แก้ว¹, วรสิทธิ์ โทจำปา¹, นที ทองศิริ² และอรอินท์ ประไชโย¹

Pannipa Munchoei¹, Patcharaporn Euangeay¹, Darunee Wongkaew¹, Worasit Torchumpa¹, Natee Tongsiri² and Orn-in Prachaiyo¹

¹ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

²ภาควิชาคณิตศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

*Corresponding Author: om-inp@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ผลการศึกษาแหล่งปนเปื้อนของ *B. cereus* ในโรงงานนมแห่งหนึ่งพบว่ามีการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตในปริมาณ 0.35 - 4.12 log₁₀ cfu/ml โดยการปนเปื้อนส่วนใหญ่อยู่ในรูปสปอร์ แหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญได้แก่วัตถุดิบ และอุปกรณ์การผลิต ผลการทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ที่แยกได้ในน้ำนมที่อุณหภูมิ 80 85 90 และ 95 องศาเซลเซียส พบว่าสปอร์ของ BC4 และ BC5 ที่แยกได้จากเครื่องบรรจุนมมีความสามารถในการทนต่อความร้อนสูงกว่าสายพันธุ์ BC1 แยกได้จากน้ำนมดิบ และ BC 2 แยกจากถังเทอร์มิไซท์ที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่มีค่า Z-value ใกล้เคียงกันในช่วง 8.41-13.40 °C จากการศึกษาเวลาที่ใช้ในการลดปริมาณสปอร์ให้เป็นไปตามมาตรฐานพบว่า F-value มีค่าสูงซึ่งไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงาน ดังนั้นทางสถานประกอบการควรมีมาตรการอื่นเสริมเพื่อป้องกันและลดการปนเปื้อนหลังการฆ่าเชื้อ

คำสำคัญ: ความสามารถในการทนร้อน/*B.cereus*/อุตสาหกรรมนม/สปอร์

Abstract

The result of *B. cereus* contamination source in dairy plant indicated that the contamination level of this pathogen were in the range of 0.35 - 1.42 log₁₀ cfu/ml. The contamination was typically in the form of spore. The crucial contamination sources were raw milk and equipment. The heat resistant study at 80 85 90 and 95 °C showed that the spore of BC4 and BC5 (isolated from packing machine) exhibited higher D-value than those of BC1 (isolated from thermize tank) at similar temperature. However, all isolated strains exhibited similar Z-value (8.41 - 13.40°C). The result suggested that the F-value required for spore inactivation was not practical therefore the dairy plant shall have alternative control measures for *B. cereus* contamination and inactivation.

1. บทนำ

ในปัจจุบันตลาดนมพาสเจอร์ไรซ์ในประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวสูงเพื่อสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคที่มีมากขึ้น เนื่องจากนมพาสเจอร์ไรซ์มีคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาการใกล้เคียงกับน้ำนมดิบ มีความปลอดภัย และมีอายุการเก็บรักษาในตู้เย็นนาน โดยทั่วไปการผลิตน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์จะผ่านกรรมวิธีการ

ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนไม่ต่ำกว่า 63 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 30 นาที หรือทำให้ร้อนไม่ต่ำกว่า 72 องศาเซลเซียส และคงอยู่ที่อุณหภูมินี้ไม่น้อยกว่า 16 วินาที จากนั้นทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า (ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 266 เรื่องนมปรุงแต่ง, 2545) ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรมฉบับที่ 3300 พ.ศ.2547 ได้ระบุไว้ว่า ให้น้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ต้องมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 10,000 cfu/ml ณ แหล่งผลิต และไม่เกิน 50,000 cfu/ml ตลอดระยะเวลาเมื่อออกจากแหล่งผลิตจนถึงวันหมดอายุการบริโภคที่ระบุบนฉลาก ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน 8 องศาเซลเซียส และมีอายุได้ 10 วัน แต่ข้อมูลเบื้องต้นพบว่านมพาสเจอร์ไรซ์มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณ *B. cereus* สูงกว่ามาตรฐานนอกจากนี้ยังมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพของนมโรงเรียนต่อสุขภาพผู้บริโภคเช่น วันที่ 5 สิงหาคม 2554 เด็กนักเรียนหลายโรงเรียนในเขต ด.คลองโยง พุทธมณฑล จ.นครปฐม เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย บางรายถึงขั้นอาเจียนโดยมีสาเหตุมาจากการบริโภคนมโรงเรียนที่มีปริมาณเชื้อเกินกำหนดมาตรฐาน *B. cereus* เป็นหนึ่งในแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและเป็นปัญหาหลักในโรงงานนม (Shirley et al.,1997) เนื่องจาก *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อม ดิน ฝุ่น และแหล่งน้ำ โอกาสปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารจึงเกิดได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในฟาร์มโคนมที่มีการดูแลด้านสุขลักษณะไม่เพียงพอ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวก สร้างสปอร์ และเจริญได้ดีในที่มีอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่ 30 องศาเซลเซียสแต่สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 4-50 องศาเซลเซียส และ pH 4.9 - 9.3 แบคทีเรียชนิดนี้ไม่ทนร้อนแต่สามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนสูงและมีกลยุทธ์ในการอยู่รอดต่อสภาวะต่างๆได้ (Ranad et al.,2010) มีรายงานว่าสปอร์ของ *B. cereus* มีค่า D_{100°C} เท่ากับ 2.7 - 3.1 นาที ในหางนม (skim milk) (Mikolajcik,1970) และ D_{100°C} เท่ากับ 8 นาที ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) ที่ pH 7.0 นอกจากนี้ *B. cereus* ยังเป็นแบคทีเรียก่อโรค โดยเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ อาการอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *B. cereus* มี 2 ลักษณะคือ 1) ชนิดท้องเสีย (diarrheal syndrome) อาหารเป็นพิษชนิดนี้มีระยะฟักตัวประมาณ 8 - 16 ชั่วโมง เกิดการได้รับสารพิษ enterotoxins ซึ่งไม่ทนต่อความร้อน 2) ชนิดคลื่นไส้อาเจียน (emetic syndrome) มีอาการรุนแรงและรวดเร็วกว่าแบบแรก มีระยะฟักตัวเพียง 1 - 6 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารพิษชนิด emetic toxins ซึ่งเป็นสารพิษที่ทนต่อความร้อน

ดังนั้นการศึกษาถึงแหล่งปนเปื้อนและความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการประกันความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ งานวิจัยชิ้นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแหล่งและปริมาณการปนเปื้อน รวมถึงความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* ที่อุณหภูมิระดับพาสเจอร์ไรซ์ เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันและควบคุมปริมาณ *B. cereus* ในกระบวนการผลิต

2. วิธีการ

2.1 การศึกษาแหล่งและปริมาณการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์

ทำการเก็บตัวอย่างจากจุดต่างๆ โดยแบ่งตัวอย่างที่การศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างนมและตัวอย่างสภาพแวดล้อม ตัวอย่างนมประกอบด้วย 1) นำนมดิบจาก 4 ศูนย์ 2) นมในถังเทอร์โมสแตท และ 3) ผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์ชนิดถุง ตัวอย่างสภาพแวดล้อมเก็บจากท่อเข้า-ออกเครื่องบรรจุ 3 ชุด ก่อนและหลังกระบวนการ Cleaning-In-Place (CIP) ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 ครั้ง นำตัวอย่างที่ได้มาทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อมีชีวิต (viable cell counts) และปริมาณสปอร์ โดยอ้างอิงจากวิธีของ Lin et al. (1998) ใช้เทคนิคการสเปรดเพลทบนอาหาร Mannitol-Egg-yolk-Polymyxin-Agar (MYP agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจาก 18-24 ชั่วโมง รายงานผลเป็น cfu/ml โคลิฟอร์มที่คาดว่าเป็น *B. cereus* มีสีชมพู และมีตะกอนขุ่นล้นมรอบ นำโคโลนิที่ ต้องสงสัยไปทดสอบทางชีวเคมีเพื่อยืนยันว่าเป็น *B. cereus* โดยการย้อมแกรม ความสามารถในการหมักน้ำตาล D(+) glucose ปฏิกริยา VP (Voges-Proskauer reaction) และความสามารถในการใช้ในเตรท (Nitrate reduction) (Giffel et al. 1997).

2.2 เตรียมสปอร์

เตรียมสปอร์จากโคโลนิที่ยืนยันว่าเป็น *B. cereus* จำนวน 5 isolates จำแนกตามแหล่งที่มา ได้แก่ สปอร์ที่แยกได้จากนมนมดิบ (BC1) ถังเทอร์โมสแตท (BC2) เครื่องบรรจุ M1 (BC3) เครื่องบรรจุ M2(BC4) และเครื่องบรรจุ M3 (BC5) ซึ่งเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนปลูกถ่ายทำการกระตุ้นเซลล์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการปลูกถ่ายสปอร์ลงใน Nutrient Broth (NB) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ใช้ตัวอย่าง 0.2 มิลลิลิตรนำไปเลี้ยงบนอาหาร Fortified Nutrient Agar (FNA) (Johnson et al., 1982, Mazas et al., 1995) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เก็บเกี่ยวสปอร์โดยใช้ปากกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตรเทให้ท่วมอาหาร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยง (HSIANGTAI, รุ่น CN-1040, บริษัท Lio Lab International จำกัด, ไต้หวัน) ที่ 5,000 rpm 30 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้ง ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ทำการเจือจางสปอร์ที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

2.3 การทดสอบความสามารถในการทนร้อน

ทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ *B. cereus* สายพันธุ์ BC1 BC2 BC3 BC4 และ BC5 ในน้ำนมสดที่อุณหภูมิ 80 85 และ 90 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Fernandez et. al (2001) นำสปอร์ที่ได้จากตอนที่ 1 มาเจือจางให้มีปริมาณสปอร์ตั้งต้นประมาณ $10^5 - 10^6$ cfu/ml นำสารแขวนลอยที่ได้ 1.5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนใน heating box (HOYA รุ่น SBD 110-2, บริษัท Lio Lab International จำกัด, ประเทศไทย) ที่มีการควบคุมอุณหภูมิให้ได้ตามต้องการ (80°C 85°C 90°C และ 95 °C) วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเหลือรอดตามเวลาที่กำหนด เมื่อครบเวลานำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขึ้นมาจุ่มในอ่างน้ำแข็ง ทำการเจือจางในสารละลายเปปไทน์ 0.1% ให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนับปริมาณเชื้อที่เหลือรอดโดยวิธีสเปรดเพลทบนอาหาร Plate Count Agar (PCA) (Fluka chemical ,Buchs, Switzerland) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็น cfu/ml ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.4 คำนวณค่า D-value Z-value และ F-value

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 2.3 มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือรอด (\log_{10} CFU/ml) และเวลา (นาที) แล้วคำนวณค่า D-value z-value และ F-value

ค่า D-value (Decimal Reduction Time) คือ ระยะเวลาเป็นนาทีที่ใช้ในการลดปริมาณสปอร์ของ *B. cereus* ลง 1 \log_{10} cycle ที่อุณหภูมิ T คำนวณโดยใช้ DMFit Toolbox อ้างอิงจากสมการของ Baranyi et al. (1993) (www.combase.cc) โดยใช้ค่า \log_{10} cfu/ml ที่ได้จากการทดลอง 3 ครั้ง

ค่า Z-value คืออุณหภูมิที่ต้องการเพื่อทำให้ค่า D-value ลดลง 1 \log_{10} cycle คำนวณจากความชันของกราฟระหว่าง \log_{10} D-value และอุณหภูมิ

ค่า F-value คือ ระยะเวลาเป็นนาทีที่อุณหภูมิหนึ่งๆ ที่สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ต้องการ สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$F_T = D_T(\log N_0 - \log N)$$

เมื่อ F_T = ระยะเวลาเป็นนาทีที่อุณหภูมิ T

D_T = ค่า D-value ที่อุณหภูมิ T

N_0 = ปริมาณเชื้อตั้งต้น

N = ปริมาณเชื้อสุดท้าย

3. ผลและอภิปราย

3.1 แหล่งและปริมาณการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณ *B. cereus* ในตัวอย่างจากโรงงานนมสดในตารางที่ 1 นำนมดิบมีปริมาณ *B. cereus* มีชีวิตอยู่ในช่วง 0.35 – 1.30 \log_{10} cfu/ml โดยนมนมดิบจากศูนย์ 4 มีปริมาณต่ำสุดและศูนย์ 3 มีปริมาณสูงสุด ส่วนปริมาณสปอร์อยู่ในช่วง 2.70 – 3.44 \log_{10} cfu/ml โดยนมนมดิบจากศูนย์ 1 มีปริมาณต่ำสุดและศูนย์ 3 มีปริมาณสูงสุด นมในถังเทอร์โมสแตทซึ่งเป็นนมที่ผ่านกระบวนการเทอร์มิเซชัน (Thermization process) ซึ่งเป็นการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

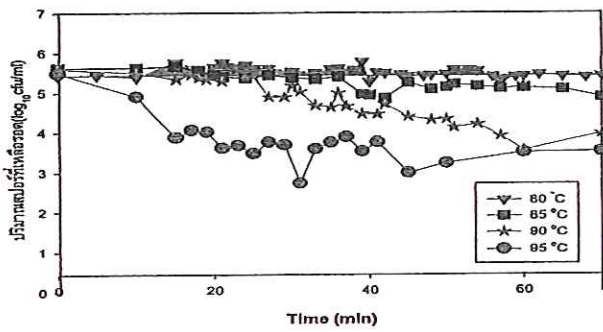
เบื้องต้นที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส 15 วินาที แล้วถูกทำให้เย็นทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลล์มีชีวิตและสปอร์อยู่ในช่วง 1.6 และ 3.55 – 4.12 log₁₀ cfu/ml ตามลำดับ ส่วนผลิตภัณฑ์นมพาสเจอร์ไรซ์มีปริมาณเซลล์มีชีวิตอยู่ในช่วง 1.69 – 2.43 log₁₀ cfu/ml และสปอร์อยู่ในช่วง 3.14 – 3.71 log₁₀ cfu/ml ผลการทำ swab test ของชุดอุปกรณ์การผลิต พบว่าก่อนกระบวนการ CIP ไม่พบ *B. cereus* ทั้งในรูปของเซลล์มีชีวิตและสปอร์ ในขณะที่หลังกระบวนการ CIP ปริมาณเซลล์มีชีวิตอยู่ในช่วง 2.24 – 3.17 log₁₀ cfu/ml ส่วนสปอร์อยู่ระหว่าง 2.98 – 3.85 log₁₀ cfu/ml ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนของ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตจริงและการปนเปื้อนส่วนใหญ่อยู่ในรูปของสปอร์

โดยสาเหตุหลักของการปนเปื้อนได้แก่วัตถุดิบ และการทำความสะอาดอุปกรณ์การผลิตที่ไม่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบเพื่อยืนยันว่าโคโลนีที่พบว่าประมาณร้อยละ 80 ของโคโลนีที่พบเป็น *B. cereus* โดยเป็นแบบที่เรียกรวมพวก รูปร่างท่อนสามารถหมักน้ำตาล D-กลูโคสได้ มีผลปฏิกิริยา VP และ nitrate reduction เป็นบวก จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีของสปอร์ที่แยกได้จากน้ำนมดิบ (BC1) สปอร์ที่แยกได้จากถังเทอร์โมซ์ (BC2) สปอร์ที่แยกได้จากเครื่องบรรจุ M1 (BC3) สปอร์ที่แยกได้จากเครื่องบรรจุ M2 (BC4) และสปอร์ที่แยกได้จากเครื่องบรรจุ M3 (BC5) เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

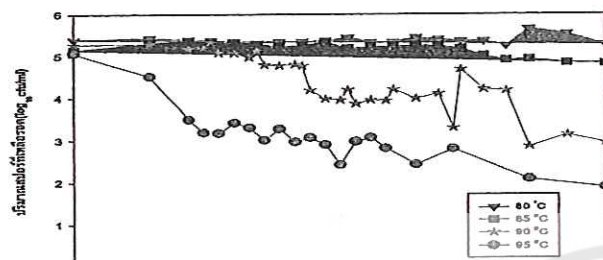
ตารางที่ 1 ปริมาณเซลล์มีชีวิตและสปอร์ *B. cereus* จากแหล่งต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์

ตัวอย่าง	รายละเอียด	ปริมาณเซลล์มีชีวิต (log ₁₀ cfu/ml)	ปริมาณสปอร์ (log ₁₀ cfu/ml)	% <i>B. cereus</i> positive**
น้ำนมดิบ	ศูนย์ 1	1.00 + 1.41	2.70 + 0.74	80.0
	ศูนย์ 2	1.01 + 1.42	2.77 + 0.48	
	ศูนย์ 3	1.30 + 1.10	3.44 + 0.27	
	ศูนย์ 4	0.35 + 0.49	2.95 + 0.49	
นมในถังเทอร์โมซ์	ถัง 201	1.61 + 0.18	3.55 + 0.45	80.0
	ถัง 202	1.62 + 0.35	4.12 + 0.34	
นมพาสเจอร์ไรซ์บรรจุถุง	นมจากถัง 201-M1	2.16 + 0.62	3.57 + 0.13	80.0
	นมจากถัง 201-M2	1.69 + 0.55	3.45 + 1.12	
	นมจากถัง 201-M3	1.72 + 1.41	3.51 + 0.56	
	นมจากถัง 202-M1	1.93 + 0.37	3.37 + 0.34	
	นมจากถัง 202-M2	2.19 + 0.27	3.71 + 0.26	
	นมจากถัง 202-M3	2.16 + 0.06	3.55 + 0.68	
เครื่องบรรจุ M1	ก่อนทำ CIP	ND	ND	100.0
	หลังทำ CIP	2.73 + 0.25	3.42 + 0.05	
เครื่องบรรจุ M2	ก่อนทำ CIP	ND	ND	80.0
	หลังทำ CIP	3.17 + 0.56	3.85 + 0.02	
เครื่องบรรจุ M3	ก่อนทำ CIP	ND	ND	80.0
	ข้อมูลหลัง CIP หายไปไหน			

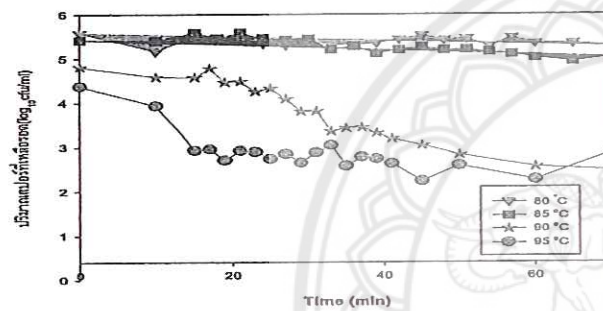
* ND = not detected



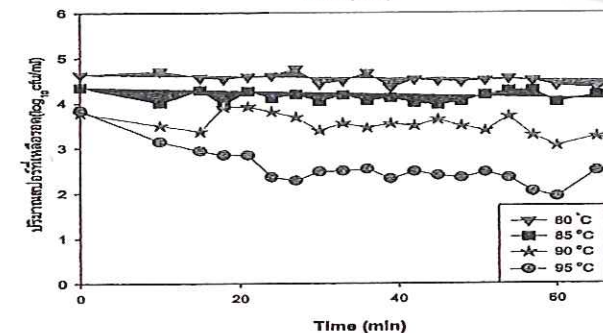
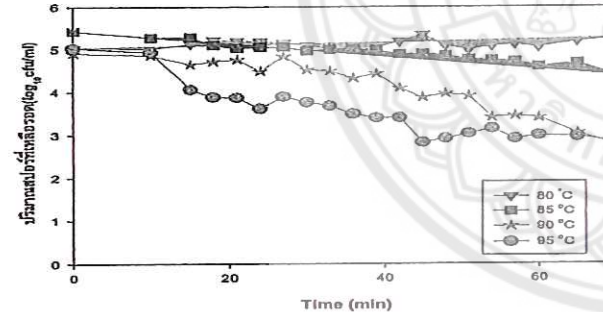
BC 2



BC 3



BC 4



รูปที่ 1 : แสดงปริมาณสปอร์ *B. cereus* ที่เหลือรอดที่อุณหภูมิ 80 °C (▽), 85 °C (▣), 90 °C (☆) และ 95 °C (●) ที่เวลาใดๆของแต่ละสายพันธุ์

3.2 การรอดชีวิตของสปอร์ *B. cereus* ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผลการทดสอบความสามารถในการทนร้อนในน้ำนมสด (รูปที่ 1) พบว่าในทุกอุณหภูมิเมื่อเวลาผ่านไปสปอร์ที่เหลือรอดมีปริมาณลดลงแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อการรอดชีวิตของสปอร์ แต่ปริมาณการเหลือรอดมีความแตกต่างกันกับอุณหภูมิที่ใช้ โดยที่อุณหภูมิ 80 °C และ 85 °C ยังคงมีปริมาณสปอร์ที่เหลือรอดใกล้เคียงกับสปอร์ดั้งต้นแสดงให้เห็นว่าสปอร์ *B. cereus* ที่แยกได้มีความทนต่อความร้อนระดับ 80 °C และ 85 °C อาจเป็นเพราะองค์ประกอบทางเคมีของสปอร์สปอร์มีความสามารถในการทนร้อนได้ดีเช่น เอนไซม์ที่ทนความร้อน (Warth, 1980) มีน้ำอิสระน้อย (Teofila and et.al., 1986) มีแร่ธาตุมากโดยเฉพาะแคลเซียมโคพิโคลิเนต (Calcium dipicolinate) ซึ่งไม่พบในส่วนอื่นของเซลล์ และชั้น spore coat มีกรดอะมิโนซิสทีนีนมากทำให้สปอร์ทนความร้อนได้ดี เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง 90 °C และ 95 °C ความสามารถในการทนความร้อนของสปอร์ลดลงเนื่องจาก ความร้อนอุณหภูมิระดับนี้ขึ้นไปสามารถทำลายโครงสร้างสปอร์และองค์ประกอบได้

3.3 D-value Z-value และ F-value ของสปอร์ *B. cereus*

ตารางที่ 2: ค่า D-value และ Z-value ของสปอร์ *B. cereus* แต่ละ isolates

Isolates	D-value (min)				Z-value (°C)
	80 °C	85 °C	90 °C	95 °C	
BC1	277.78 ^b	92.59 ^d	25.77 ^b	11.07 ^a	10.52 ^{ab}
BC2	178.57 ^a	46.73 ^a	22.12 ^a	13.09 ^a	13.40 ^b
BC3	714.29 ^c	77.52 ^b	21.93 ^a	11.34 ^a	8.41 ^a
BC4	1250 ^d	81.3 ^c	31.55 ^c	23.09 ^c	8.91 ^a
BC5	277.78 ^b	140.85 ^e	35.46 ^d	17.67 ^b	11.93 ^{ab}

^{a-z} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT ที่อุณหภูมิเดียวกันของแต่ละ isolate

ตารางที่ 2 แสดงค่า D-value และ Z-value ของสปอร์ *B. cereus* แต่ละสายพันธุ์พบว่าค่า D-value ของแต่ละสายพันธุ์มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นโดยที่อุณหภูมิ 80 °C BC 4 มีค่า D-value สูงที่สุดเท่ากับ 1250 นาทีและ BC 1 และ BC 5 ไม่มีความแตกต่างกัน อุณหภูมิ 85 °C BC5 มีค่า D-value สูงที่สุดเท่ากับ 140.85 นาทีในแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อุณหภูมิ 90 °C BC5 มีค่า D-value สูงที่สุดเท่ากับ 35.46 นาที BC 2 และ BC 3 ไม่มีความแตกต่างกันและอุณหภูมิ 95 °C BC4 มีค่า D-value สูงที่สุดเท่ากับ 23.09 นาที BC1 BC 2 และ BC 3 ไม่มีความแตกต่างกัน ข้อมูลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าแหล่งที่มาที่มีผลต่อความสามารถในการทนร้อนของสปอร์ที่แยกได้ ดังจะเห็นได้ว่า BC 4 และ BC 5 ซึ่งแยกได้จากเครื่องบรรจุมีค่า D_{90} และ D_{85} สูงกว่า BC 1 และ BC2 ที่อุณหภูมิ 90 °C และ 95 °C เนื่องจาก BC 1 และ BC2 ที่แยกได้จากน้ำนมดิบและถังเทอร์โมไซ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิดกระบวนการ stress response เมื่อ *B. cereus* ได้รับความร้อนในระดับที่ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้ แมคทีเรียจะมีกลไกการปรับตัวและ

ตอบสนองต่อสภาวะดังกล่าวเพื่อความอยู่รอด ส่งผลให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ ส่วน BC 3 ซึ่งมาจากเครื่องบรรจุเช่นกันแต่ค่าการต้านทานความร้อนน้อยกว่า BC 1 และ BC2 อาจเกิดจากความแตกต่างในการแสดงออกเมื่อตอบสนองต่อความร้อน มีรายงานว่าพบสปอร์ *B. cereus* ปนเปื้อนใน silo เก็บนมหลายสายพันธุ์ซึ่งเป็นผลมาจากการต้านทานความร้อนของสปอร์ *B. cereus* (Ranad, et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานความสามารถในการทนความร้อนได้ในน้ำนมดิบหรือหมักที่ไม่ผ่านการปรุงแต่งจากการพาสเจอร์ไรส์ได้เนื่องมาจากการทำความสะอาดที่พื้นผิวภาชนะไม่เพียงพอ (Flint, Bremer, & Brooks, 1997) สำหรับ Z-value ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้ D-value ลดลง 1 log cycle พบว่า BC2 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 13.40 °C

จากการศึกษาแหล่งปนเปื้อน แสดงให้เห็นว่า *B. cereus* ส่วนใหญ่ที่พบในผลิตภัณฑ์และอุปกรณ์การผลิตนั้นอยู่ในรูปของสปอร์ และมีปริมาณอยู่ในช่วง 2.98 – 4.12 log₁₀ cfu/ml มาตรฐานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ระบุไว้ว่าให้มีปริมาณ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์นมพร้อมดื่มได้ไม่เกิน 100 cfu/ml ค่า F-value หรือระยะเวลาในการให้ความร้อนเพื่อลดปริมาณสปอร์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่อุณหภูมิต่าง ๆ นั้น ต้องใช้เวลาดังแสดงในตารางที่ 3 ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะเวลาที่ใช้ในการลดสปอร์ *B. cereus* ลง 2 log ในแต่ละสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 80 °C จะใช้เวลานานเช่น BC 4 ที่มีค่าการต้านทานความร้อนสูงที่สุดเวลาที่ใช้ลดปริมาณสปอร์ลง 2 log เท่ากับ 2500 นาที แต่ ถ้าวัดลง 4 log จะใช้เวลาถึง 5000 นาที หากใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็น 95 °C เวลาที่ใช้จะลดลงโดยลด 2 log จะใช้เวลา 46.18 นาที ส่วนลดลง 4 log จะใช้เวลา 92.36 นาที ซึ่งน้อยกว่าที่ อุณหภูมิ 80 °C จากข้อมูลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงาน เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาสั้นส่งผลต่อต้นทุนการผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 3 ค่า F หรือระยะเวลาที่ต้องการที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในการลดปริมาณสปอร์ *B. cereus* ให้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

Isolate	Temperature (°C)	D-value(min)	เวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (min)	log reduction
BC1	80	277.78	555.56	2
			1111.12	4
	95	11.07	22.14	2
			44.28	4
BC2	80	178.57	357.14	2
			714.28	4
	95	13.09	26.18	2
			52.36	4
BC3	80	714.29	1428.58	2
			2857.16	4

	95	11.34	22.68	2
			45.36	4
BC4	80	1250	2500	2
			5000	4
	95	23.09	46.18	2
			92.36	4
BC5	80	277.78	555.56	2
			1111.12	4
	95	17.67	35.34	2
			70.68	4

4. สรุป

จากการศึกษาแหล่งปนเปื้อนพบว่าสาเหตุหลักของการปนเปื้อนได้แก่วัตถุดิบซึ่งก็คือ น้านมดิบ และอุปกรณ์การผลิตโดยพบว่าร้อยละ 80 ของโคโลนีที่พบเป็น *B. cereus* พบมากรูปของสปอร์เมื่อนำมาศึกษาการรอดชีวิตพบว่าสปอร์ *B. cereus* สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C และ 85 °C ได้โดยปริมาณที่เหลือรอดใกล้เคียงกับปริมาณสปอร์ดั้งเดิม ส่วนที่ อุณหภูมิ 90 °C และ 95 °C ปริมาณสปอร์ *B. cereus* ลดลง การศึกษาค่าการต้านทานความร้อนพบว่าอุณหภูมิ 80 °C BC 4 มีค่า D-value สูงที่สุดเท่ากับ 1250 นาที และ BC 1 และ BC 5 ไม่มีความแตกต่างกัน อุณหภูมิ 85 °C BC5 มีค่า D-value สูงที่สุดเท่ากับ 140.85 นาที ในแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อุณหภูมิ 90 °C BC5 มีค่า D-value สูงที่สุดเท่ากับ 35.46 นาที และอุณหภูมิ 95 °C BC4 มีค่า D-value สูงที่สุดเท่ากับ 23.09 นาที ส่วน Z-value พบว่า BC2 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 13.40 °C และการศึกษาระยะเวลาในการให้ความร้อนเพื่อลดปริมาณสปอร์ให้เป็นไปตามมาตรฐานที่อุณหภูมิต่าง ๆ นั้น (F-value) พบว่าเวลาที่ใช้ในการลดปริมาณสปอร์ให้เป็นไปตามมาตรฐานจะต้องใช้เวลานานไม่เหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ในโรงงาน เนื่องจากทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต ดังนั้นข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้กระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ที่ อุณหภูมิ 80 °C 15 วินาที เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอสำหรับควบคุมปริมาณสปอร์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ได้ ควรมีมาตรการอื่นเสริมในการควบคุมและลดปริมาณสปอร์ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์เช่น การแนะนำหลักเกณฑ์การผลิตที่ดี (GMP) สำหรับเกษตรกรในการผลิตและขนส่งน้ำนมดิบ และ การศึกษากระบวนการ CIP ที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมสำหรับการทำความสะอาดและฆ่าเชื้ออุปกรณ์การผลิต และเพื่อป้องกันและลดการปนเปื้อนหลังฆ่าเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาแหล่งปนเปื้อนและประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรซ์" ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2554

เอกสารอ้างอิง

- ดร. วีระศักดิ์ แก้ว และ ปรียะทัศน์ ประไพโย .(2552). โครงการวิจัย การศึกษาแหล่งปนเปื้อนและประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *B. cereus* ในกระบวนการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์.
- ดร. สุภาพร ล้ำเลิศชน .(2551). เอกสารประกอบการสอน เรื่อง ลักษณะโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์แบคทีเรีย รายวิชา จุลชีววิทยาทั่วไป . มหาวิทยาลัยนเรศวร : ภาควิชา จุลชีววิทยา และปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์.
- Baranyi, J. Roberts, T.A. and McClure, P. (1993) A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10(1) , 43–59
- Cox, W. A. (1975). Problems associated with bacterial spores in heat-treated milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology* 28(2) , 59-68.
- Fernandez, A., Oclo, M.J., Fernandez, P.S and Martinez, A. (2001). Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameter of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 63(3) , 257 – 264.
- Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J.A. and Griffiths, M.W.. (1998) Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 43(3) , 159 – 171.
- Mikolajcik, E.M. (1970).Thermodestruction of *Bacillus* spores in milk. *Journal of Milk and Food Technology* 33 (2), 61-63.
- Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., A. M., Christiansson, A. and Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology* 27 , 347-355.
- Flint, S.H., Bremer, P. J. and Brooks, J.D.(1997) Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 11(1), 81-97