

การพัฒนาปริพันธ์ทางชีวภาพเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลา
ในการสแตอริไลซ์น้ำพริกแกง

นางสาวพรศิริ ศรีณรงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL TIME-TEMPERATURE INTEGRATOR FOR
STERILIZATION OF CHILI PASTE

Miss Pornsiri Srinarong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาปริพันธ์ทางชีวภาพเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลง
	อุณหภูมิและเวลาในการสเตอริไลซ์น้ำพริกแกง
โดย	นางสาวพรศิริ ศรีณรงค์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ทัดติยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สายวรุฬ ชาญวานิชศิริ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ทัดติยกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. วิไลลักษณ์ ชัยสิทธิ์)

พรศิริ ศรีณรงค์ : การพัฒนาปริพันธ์ทางชีวภาพเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลาในการสเตอริไลซ์น้ำพริกแกง. (DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL TIME-TEMPERATURE INTEGRATOR FOR STERILIZATION OF CHILI PASTE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร.จิราวัฒน์ ทัดติยกุล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ. ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา, 121 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการพัฒนาปริพันธ์เวลาอุณหภูมิ (Time-Temperature Integrator; TTI) โดยใช้เอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* เพื่อใช้ยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อ ส่วนแรกเป็นการศึกษาจลนศาสตร์การถูกทำลายด้วยความร้อนของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงในช่วงอุณหภูมิ 93.0 ถึง 121.1 °C ผลการทดลองพบว่า decimal reduction time (D) ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 93.0, 98.0, 105.7, 113.4 และ 121.1 °C มีค่าเท่ากับ 21.31, 9.63, 5.00, 2.30 และ 1.75 นาทีตามลำดับ และมีค่า Z เท่ากับ 25.93 °C จากนั้นศึกษาจลนศาสตร์การถูกทำลายด้วยความร้อนของเอนไซม์ α -amylase โดยแปรปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์ของเอนไซม์ 3 ระดับ ได้แก่ 20, 70 และ 120 ส่วนในล้านส่วน และค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity; a_w) 5 ระดับ ได้แก่ 0.826, 0.782, 0.760, 0.716 และ 0.686 พบว่าเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 70 ส่วนในล้านส่วน และมีค่า a_w เท่ากับ 0.786 มีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 1.80 นาที และค่า Z เท่ากับ 8.95 °C ซึ่งมีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ ใกล้เคียงกับสปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมากที่สุด จากนั้นเลือกเอนไซม์ที่สถานะดังกล่าวเป็น TTI และเปรียบเทียบประสิทธิภาพผลของการใช้ TTI ในการยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อ โดยการเปรียบเทียบค่า F ของเอนไซม์ที่คำนวณได้จาก 2 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี General method (F_{G-T}) กับวิธีที่ 2 คำนวณจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงระหว่างการให้ความร้อน (F_{TTI}) พบว่าค่า F_{TTI} มีความแตกต่างจาก ค่า F_{G-T} คิดเป็นร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย ได้เท่ากับ -4.88, -7.37 และ -9.58 ในกระบวนการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 111.1, 115.1 และ 121.1 °C ตามลำดับ จากร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยมีค่าติดลบ หรือค่า F_{TTI} มีค่าต่ำกว่าค่า F_{G-T} เป็นส่วนใหญ่ นั่น แสดงให้เห็นว่าการใช้ TTI สามารถใช้ยืนยันความปลอดภัยของกระบวนการฆ่าเชื้อได้ ส่วนสุดท้ายเป็นการศึกษาการแทรกผ่านความร้อนของผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงบรรจุรีทอร์ทเพาซ์ โดยการให้ความร้อนที่ 121.1 °C จากกราฟการแทรกผ่านของความร้อนได้ค่า f_h เท่ากับ 6.22 นาที ค่า j เท่ากับ 1.00 และค่า IT เท่ากับ 106.14 °C ซึ่งสามารถนำไปทำนายเวลาที่ต้องการในการฆ่าเชื้อตามวิธี formula เพื่อให้ได้ค่า F_0 เท่ากับ 3 นาที ได้เท่ากับ 12.03 นาที เมื่อทดลองฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 121.1 °C พบว่าใช้เวลาให้ความร้อน จริงเป็นเวลา 8 นาที (% Difference = -33.5 %)

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....

ปีการศึกษา.....2553.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์.....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5172378623 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : TIME-TEMPERATURE INTEGRATOR / STERILIZATION / CHILI PASTE

PORNSIRI SRINARONG : DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL TIME-TEMPERATURE
INTEGRATOR FOR STERILIZATION OF CHILI PASTE. THESIS ADVISOR : ASST.PROF.
JIRARAT TATTIYAKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST.PROF. CHEUNJIT
PRAKITCHAIWATTHANA, Ph.D., 121 pp

This research aimed to develop a Time-Temperature Integrator (TTI) from *B. licheniformis* α -amylase enzyme to be used as a verification indicator for a sterilization process. Firstly, thermal death kinetics of *C. sporogenes* spores in chili paste between 93.0 to 121.1 °C were studied. It was found that the decimal reduction times (D) of *C. sporogenes* spores in chili paste were 21.31, 9.63, 5.00, 2.30 and 1.75 min at 93.0, 98.0, 105.7, 113.4 and 121.1 °C, respectively, and the Z value was 25.93 °C. The next part involved the determination of the effects of calcium ions and water activity (a_w) on thermal degradation kinetics of *B. licheniformis* α -amylase enzyme. The thermal degradation of *B. licheniformis* α -amylase was determined at various calcium ion contents (20, 70 and 120 ppm) and water activities (0.826, 0.782, 0.760, 0.716 and 0.686). It was found that an appropriate concentration of calcium ion and reduced a_w resulted in an increase in heat resistance of the enzyme. At 70 ppm calcium ions and 0.786 a_w , the enzyme had $D_{121.1\text{ }^\circ\text{C}}$ and Z value of 1.80 minutes and 8.95 °C, respectively. The $D_{121.1\text{ }^\circ\text{C}}$ obtained for *B. licheniformis* α -amylase enzyme was comparable to that of *C. sporogenes* spores in chili paste. This enzyme was used as the TTI to investigate potential differences of process values. F values were determined from (1) the time-temperature profile by General method (F_{t-T}) and (2) the decrease in enzyme activity by heat (F_{TTI}). It was found that the deviation percentage between F_{TTI} and F_{t-T} were -4.88 -7.37 and -9.58 when sterilizing packaged chili paste at 111.1, 115.1 and 121.1 °C, respectively. Lower F_{TTI} values as compared to F_{t-T} values confirmed that the TTI can be used as a verification indicator without overestimating the sterilization process. The last part involved the heat penetration study of chili paste in retort pouch at 121.1 °C. The heat penetration study yielded f_h , j and IT were 6.22 minutes 1.00 and 106.14 °C, respectively. The predicted sterilization time to obtain F_0 of 3 minutes at 121.1 °C was 12.03 minutes. The verification experiment yielded 8 minutes sterilization time at 121.1 °C, which was equal to -33.5% difference when compared to the predicted time.

Department : Food Technology..... Student's Signature

Field of Study : Food Technology..... Advisor's Signature

Academic Year : 2010..... Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของ
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จีรารัตน์ ทัดติยกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้
 คำปรึกษา คำแนะนำ และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการทำวิทยานิพนธ์
 ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สายวรุฬ ชัยวานิชศิริ ประธานกรรมการสอบ
 วิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ และอาจารย์ ดร. วิไลลักษณ์ ชัยสิทธิ์ ที่ร่วม
 เป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งกรุณาชี้แนะแนวทางในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้
 มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2552
 โครงการวิจัย เรื่อง การหาภาวะที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อทางการค้าอาหารกึ่งแข็งในรีโอร์ทเพาท์
 เพื่อให้มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพด้านพลังงาน ขอขอบคุณศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ
 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่อนุเคราะห์เครื่องวัดกลิ่นตลอดการทำงาน
 วิจัย และบุคลากรที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ผลการทดลอง และ ขอขอบคุณ บริษัทแอลแคน
 แพ็คเกจจิ้ง สตรองแพ็ค จำกัด (มหาชน) ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์รีโอร์ทเพาท์แก่คณะผู้วิจัย
 ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ช่วยอำนวยความสะดวก
 สะดวกในด้านสถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือตลอดระยะเวลาที่ทำโครงการ และขอขอบคุณเพื่อนๆ
 ที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือและกำลังใจ รวมถึงแนะนำสิ่งที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ ทำให้
 งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
2 วารสารปริทัศน์	2
2.1 น้ำพริกแกง	2
2.2 การสเตอริไลซ์ (Sterilization)	5
2.3 ค่าต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน	10
2.4 <i>Clostridium botulinum</i>	15
2.5 <i>Clostridium sporogenes</i>	17
2.6 ปริพันธ์เวลาอุณหภูมิ (Time Temperature Integrator, TTI)	18
3 วิธีการทดลอง	22
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	22
3.2 ศึกษา Thermal Death Time ของสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ในน้ำพริกแกง	24
3.3 พัฒนา Time Temperature Integrator (TTI)	27
3.4 ศึกษาการใช้ TTI ที่พัฒนาจากเอนไซม์เพื่อยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงใน รีทอร์ทเพาซ์	28
3.5 ศึกษาสมบัติทางกายภาพและตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำพริกแกงที่ ผ่านการฆ่าเชื้อที่ภาวะที่เหมาะสม	29
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	32
4.1 การผลิตน้ำพริกแกง	32

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า	
4.2	Thermal Death Time ของสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ในน้ำพริกแกง	32
4.3	Thermal Death Time ของเอนไซม์ α -amylase	37
4.4	ประสิทธิผลของการใช้ Time Temperature Integrator (TTI) ที่พัฒนาจาก เอนไซม์เพื่อยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงในรีทอร์ทเพาซ์	58
4.5	สถานะที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงและสมบัติของน้ำพริกแกงที่ผ่าน การฆ่าเชื้อ	64
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	73
5.1	สรุปผลการทดลอง	73
5.2	ข้อเสนอแนะ	74
	รายการอ้างอิง	75
	ภาคผนวก	80
	ภาคผนวก ก	81
	ภาคผนวก ข	85
	ภาคผนวก ค	89
	ภาคผนวก ง	93
	ภาคผนวก จ	103
	ภาคผนวก ฉ	105
	ภาคผนวก ช	108
	ภาคผนวก ซ	110
	ภาคผนวก ฌ	118
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	121

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารสำคัญที่มีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ของเครื่องเทศต่างๆ	3
2.2	ค่า F_0 ของผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด.....	14
2.3	การจัดกลุ่มของ <i>C. botulinum</i> ตามชนิดของการสร้างสารพิษ	16
2.4	ลักษณะทางชีวเคมีของ Proteolytic <i>C. botulinum</i> และ <i>C. sporogenes</i>	18
3.1	องค์ประกอบในน้ำพริกแกงที่ใช้ในการทดลอง	25
4.1	ค่า D และ Z ของสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ในน้ำพริกแกง	36
4.2	ผลของปริมาณแคลเซียมไอออนต่อความทนความร้อนของเอนไซม์ α -amylase ที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.826	43
4.3	ผลของค่า water activity ต่อความทนความร้อนของเอนไซม์ α -amylase ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm	56
4.4	ค่า F ที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี General method (F_{LT})	59
4.5	ค่า F ของเอนไซม์ที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี General method และที่คำนวณจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงระหว่างการให้ความร้อนเอนไซม์	62
4.6	เวลาในการฆ่าเชื้อของน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 121.1 °C	65
4.7	การวิเคราะห์สมบัติของน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121.1 °C และผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 5 เดือน	69
4.8	การวิเคราะห์จุลินทรีย์ของน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121.1 °C และผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 5 เดือน	70
ข.1	ตารางแสดงความชันจากกราฟความอยู่รอดและค่า D ที่แต่ละอุณหภูมิ	86
ข.2	จำนวนสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ในน้ำพริกแกงเริ่มต้น (N_0) และจำนวนสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ในน้ำพริกแกงที่เหลือ (N) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ	87
ค.1	รายละเอียดเอนไซม์ α -amylase.....	89
ง.1	ตารางแสดงความชันจากกราฟและค่า D ที่แต่ละอุณหภูมิ	94

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ง.2	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826.....	96
ง.3	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826.....	97
ง.4	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826.....	98
ง.5	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782.....	99
ง.6	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760.....	100
ง.7	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716.....	101
ง.8	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686.....	102
จ.1	การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอาหารภายในรีโอร์ตเพาซ์ที่วางไว้ในตำแหน่งต่างๆ ภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	104
ฉ.1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า D และค่า Z ของเอนไซม์ α -amylase ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 20 70 และ 120 ppm	118
ฉ.2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า D และค่า Z ของเอนไซม์ α -amylase ที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.826 0.782 0.760 0.716 และ 0.686	119

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ฉ.3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า a_w pH ค่าสี (L^* a^* b^*) และ Young's modulus ของน้ำพริกแกงสด น้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121.1 °C และผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 5 เดือน	120

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	ขั้นตอนการกำหนดกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนของอาหารในภาชนะบรรจุแบบปิดสนิท 7
2.2	กราฟความอยู่รอดของ สปอร์ <i>C. sporogenes</i> PA 3679 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เท่ากับ 7.0 11
2.3	thermal death time curve ของ <i>C. sporogenes</i> 12
3.1	ตำแหน่งที่วัดอุณหภูมิ น้ำพริกแกงที่บรรจุภายในถุงรีทอร์ทเพาท์ ในหม้อหนึ่ง ฆ่าเชื้อ..... 29
4.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (นาทื), การทดลองซ้ำที่ 1..... 34
4.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (นาทื), การทดลองซ้ำที่ 2..... 34
4.3	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (นาทื), การทดลองซ้ำที่ 3..... 35
4.4	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ในน้ำพริกแกงกับอุณหภูมิ (°C), การทดลองซ้ำที่ 1-3 36
4.5	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาให้ความร้อน (นาทื) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 1..... 38
4.6	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาให้ความร้อน (นาทื) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 2..... 39
4.7	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาให้ความร้อน (นาทื) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 3..... 39
4.8	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาให้ความร้อน (นาทื) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 1..... 40

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.9	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 2.....	40
4.10	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 3.....	41
4.11	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 1.....	41
4.12	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 2.....	42
4.13	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 3.....	42
4.14	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)เมื่อเอนไซม์ มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การ ทดลองซ้ำที่ 1-3.....	44
4.15	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)เมื่อเอนไซม์ มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การ ทดลองซ้ำที่ 1-3.....	45
4.16	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)เมื่อเอนไซม์ มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การ ทดลองซ้ำที่ 1-3.....	45
4.17	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782, การทดลองซ้ำที่ 1.....	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.18	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782, การทดลองซ้ำที่ 2.....	47
4.19	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782, การทดลองซ้ำที่ 3.....	48
4.20	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760, การทดลองซ้ำที่ 1.....	48
4.21	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760, การทดลองซ้ำที่ 2.....	49
4.22	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760, การทดลองซ้ำที่ 3.....	49
4.23	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716, การทดลองซ้ำที่ 1.....	50
4.24	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716, การทดลองซ้ำที่ 2.....	50
4.25	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716, การทดลองซ้ำที่ 3.....	51
4.26	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาทิจ) เมื่อ เอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686, การทดลองซ้ำที่ 1.....	51

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.27	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาที) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686, การทดลองซ้ำที่ 2.....	52
4.28	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ทำให้ความร้อน (นาที) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686, การทดลองซ้ำที่ 3.....	52
4.29	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782, การทดลองซ้ำที่ 1-3.....	53
4.30	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760, การทดลองซ้ำที่ 1-3.....	54
4.31	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716, การทดลองซ้ำที่ 1-3.....	54
4.32	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686, การทดลองซ้ำที่ 1-3.....	55
4.33	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) ของเอนไซม์ α -amylase ที่มีการปรับปริมาณแคลเซียม 70 ppm และปรับค่า a_w เท่ากับ 0.782 และสปอร์ <i>C.sporogenes</i> ในน้ำพริกแกง	58
4.34	กราฟ Heat penetration curve ที่ 121.1°C	65
4.35	กราฟแสดงการจัดกลุ่มของข้อมูล (Principal component analysis, PCA) ระหว่างน้ำพริกแกงสด พริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อและหลังจากเก็บรักษานานทุก 1 เดือน โดยใช้จมูกอิเล็กทรอนิกส์ (E-nose)	71
ข.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ <i>C. sporogenes</i> ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาที่ทำให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (นาที)	85
ข.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	86

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ง.1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลือกธรรมชาติของอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของ เอนไซม์หลังจากได้รับความร้อนต่อกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ($\ln A/A_0$) และ เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	94
ง.2	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	95
จ.1	ตำแหน่งการวางเข็มวัดอุณหภูมิคู่วบเพื่อหาจุดร้อนซ้ำที่สุดในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ..	103
ฉ.1	Heat penetration curve ของผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงที่วางไว้ในตำแหน่งที่จุด ร้อนซ้ำ	105
ฉ.2	Come-up time correction	107

บทที่ 1

บทนำ

น้ำพริกแกงเป็นส่วนประกอบอาหารที่เป็นเอกลักษณ์ของไทย มีองค์ประกอบหลายอย่างทั้งเครื่องเทศและสมุนไพรนานาชนิด โดยทั่วไปมักผลิตขายวันต่อวันเนื่องจากกระบวนการผลิตน้ำพริกแกงเป็นเพียงการนำส่วนผสมมาบดเข้าด้วยกันเท่านั้นไม่ได้ผ่านกระบวนการถนอมอาหารทำให้น้ำพริกแกงมีอายุการเก็บรักษาสั้น การใช้เทคโนโลยีไฮเปอร์เดิล เช่น การลดกิจกรรมของน้ำ การใช้สารกันเสีย การปรับกรด สามารถถนอมน้ำพริกแกงได้ แต่ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากน้ำพริกแกงที่ได้มีรสชาติผิดแปลกไปไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งการนำน้ำพริกแกงไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนในรีทอร์ทเพาซ์จะทำให้สามารถเก็บรักษาน้ำพริกแกงได้นานขึ้นโดยไม่ต้องอาศัยสารเคมีถนอมอาหาร ทั้งยังสามารถรักษากลิ่นรสของน้ำพริกแกง ทำให้ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากขึ้น จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าน้ำพริกแกงมีค่ากิจกรรมของน้ำประมาณ 0.93 และมีค่าความเป็นกรดต่างมากกว่า 4.6 จึงจัดอยู่ในกลุ่มอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ หากต้องการผลิตในรูปแบบบรรจุในภาชนะบรรจุปิดสนิทเพื่อการจำหน่ายเป็นระยะเวลาและปลอดภัยต่อผู้บริโภค จำเป็นต้องผ่านกระบวนการถนอมอาหาร เช่นการใช้กระบวนการฆ่าเชื้อในระดับ commercial sterilization การกำหนดสภาวะสำหรับการฆ่าเชื้อ ต้องศึกษาความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์เป้าหมาย ศึกษาการแทรกผ่านความร้อนของผลิตภัณฑ์ในเครื่องฆ่าเชื้อ และนำข้อมูลทั้งสองไปใช้คำนวณกรรมวิธีในการฆ่าเชื้อในทางทฤษฎี หลังจากนั้นจำเป็นต้องยืนยันสภาวะที่คำนวณได้ทางทฤษฎี หรือยืนยันว่าเวลาในการฆ่าเชื้อที่คำนวณได้สามารถทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ในระดับที่ต้องการ แต่เนื่องจากน้ำพริกแกงเป็นอาหารไทยที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว มีเครื่องเทศที่ใช้เป็นองค์ประกอบหลากหลายชนิด ซึ่งเครื่องเทศเหล่านี้จะมีน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นอาจส่งผลให้จุลินทรีย์ที่มีในน้ำพริกแกงมีค่า Thermal Death Time (TDT) ต่างไปจากค่าที่มีรายงานไว้ จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาจลนศาสตร์การทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อนในน้ำพริกแกงเพื่อใช้ในการคำนวณหาสภาวะการฆ่าเชื้อในระดับที่เหมาะสม จากนั้นพัฒนา Time-Temperature Integrator (TTI) โดยใช้เอนไซม์ให้มีจลนศาสตร์การถูกทำลายด้วยความร้อนคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ และใช้เอนไซม์ดังกล่าวติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลาเพื่อยืนยันสภาวะในระหว่างการฆ่าเชื้อแทนสปอร์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 น้ำพริกแกง

น้ำพริกแกงใช้ในการปรุงอาหารประเภทแกง โดยมีส่วนผสมของเครื่องเทศชนิดต่างๆ ได้แก่ ข่า ตะไคร้ ผิวมะกรูด กระเทียม และพริกแห้ง เครื่องแกงไทยมีหลายชนิด เช่น แกงเผ็ด แกงเลียง แกงส้ม แกงเขียวหวาน แกงพะแนง และแกงมัสมั่น เป็นต้น โดยเครื่องแกงแต่ละชนิดจะมีปริมาณของส่วนประกอบแตกต่างกันแต่วิธีการเตรียมเหมือนกัน (กรรณิการ์ พรหมเสาร์ และนันทา เบญจศิริรักษ์, 2542) การผลิตน้ำพริกแกงจะนำเครื่องเทศที่เป็นส่วนประกอบของน้ำพริกแกงมาโขลกรวมกันจนแหลกละเอียด น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศที่เป็นส่วนประกอบจะส่งกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวตามชนิดของน้ำพริกแกงนั้นๆ (สุเมธนา วัฒนสินธุ์ และคณะ, 2543; กรรณิการ์ พรหมเสาร์ และนันทา เบญจศิริรักษ์, 2542)

ส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำพริกแกง ได้แก่ พริกแห้ง หอมแดง กระเทียม ตะไคร้ ผิวมะกรูด ข่า ลูกผักชี และยี่ห่วย บดผสมให้เข้ากัน อาจมีส่วนประกอบอื่น เช่น กะปิ น้ำตาล น้ำปลา เกลือ และอาจผสมกับกะทิหรือน้ำมันบริโภค (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548) น้ำพริกแกงใช้ในการเตรียมอาหารไทยประเภทแกงเผ็ดและยังสามารถนำไปปรุงเป็นอาหารได้อีกหลายประเภท เช่น แกงป่า ผัดเผ็ด และห่อหมก เป็นต้น (กรรณิการ์ พรหมเสาร์ และนันทา เบญจศิริรักษ์, 2542) ทำให้น้ำพริกแกงได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเป็นอย่างมาก

คุณลักษณะที่ต้องการของน้ำพริกแกง คือ สีและกลิ่นต้องเป็นไปตามธรรมชาติของ ส่วนประกอบที่ใช้ ปราศจากสีและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นหืน ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราาย กรวด ปนอยู่ในน้ำพริกแกง ในกรณีที่มีพริกแห้งเป็นส่วนประกอบอาจจะมีสาร Aflatoxin ปนเปื้อนได้ ซึ่งต้องมีปริมาณไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และอนุญาตให้ใช้วัตถุเจือปนอาหารได้ตามชนิดและปริมาณตาม กำหนดโดยมีเบนโซอิกหรือเกลือของกรดเบนโซอิก (คำนวณเป็นกรดเบนโซอิก) ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และกรดซอร์บิกหรือเกลือของกรดซอร์บิก (คำนวณเป็นกรดซอร์บิก) ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548)

2.1.1 สารที่มีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ในเครื่องเทศ

สารสกัดจากเครื่องเทศเป็นสารผสมระหว่างเรซิน (resin) กับกัม (gum) พบในโครงสร้างของพืชบางชนิด เช่น พืชในตระกูล Zingiberaceae, Orchidaceae, Myristaceae, Lauraceae, Umbelliferae และ Compositae เป็นต้น สารที่พืชเหล่านี้หลั่งออกมาเป็นสารที่มีความสำคัญและมาจากธรรมชาติซึ่งไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย (Hardman, 1972) สำหรับเครื่องเทศที่ใช้เป็นองค์ประกอบของน้ำพริกแกงจะมีน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารสำคัญที่มีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ของเครื่องเทศต่างๆ

เครื่องเทศ	ชื่อวิทยาศาสตร์	สารประกอบสำคัญ	จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง
พริก	<i>Capsicum annuum</i> Linn.	Capsaicin	แบคทีเรีย
กระเทียม	<i>Allium sativum</i> Linn.	Allicin, Diallyl trisulfide	แบคทีเรีย ยีสต์และรา
หัวหอมแดง	<i>Allium ascalonicum</i> Linn.	Methylpropyl disulfide Dipropyl trisulfide Allyl propyl disulfide	แบคทีเรีย และรา
มะกรูด	<i>Citrus hystrix</i> D.C.	Beta-pinene Limonene Sabinene	แบคทีเรีย และรา
ตะไคร้	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.	Citral Linalool Myrcene Eugenol Geraniol	แบคทีเรีย ยีสต์และรา
ข่า	<i>Alpinia nigra</i> (Gaertn.) B.L. Burtt	Cineol Eugenol Methyl cinnamate	แบคทีเรีย ยีสต์และรา

ที่มา : บัญญัติ ศรีสุขงาม (2527); สมศรี เจริญเกียรติกุล (2545)

Kim, Marshall และ Wei (1995) ทดลองใช้สาร 11 ชนิดจากน้ำมันหอมระเหยที่ผลิตออกมาจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ เพื่อยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ 5 ชนิดคือ *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio vulnificus* โดยทดลองที่ความเข้มข้นของสารจากน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 ใน Tween 20 (TWEEN20) เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยวิธี paper disc method พบว่า *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียที่ไวมากที่สุดต่อการยับยั้งโดยส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยในเครื่องเทศที่นำมาศึกษา โดยที่สารจากน้ำมันหอมระเหยที่มีชื่อว่า Carvacrol มีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย 5 ชนิดที่ใช้ทดสอบ แต่ระดับต่ำสุดที่แสดงผลการทำลาย *S. Typhimurium* และ *V. vulnificus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MBC) อยู่ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสาร Citral (เป็นสารหนึ่งที่สกัดได้จากตะไคร้) และสาร Perillaldehyde สามารถทำลาย *V. vulnificus* ได้ที่ระดับ MBC เท่ากับ 100 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสาร Citral Geraniol (พบในน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้) และสาร Perillaldehyde สามารถทำลาย *E. coli*, *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ MBC เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร Citronella (พบในน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูด) เข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำลาย *V. vulnificus* ได้ แต่ที่ความเข้มข้นระดับนี้ไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษอื่นๆที่นำมาทดสอบ จากการศึกษาค้นคว้าองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศมีศักยภาพในการนำมาใช้ป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในอาหารแปรรูป เนื่องจากสารเหล่านี้ อยู่ในหมวด GRAS (Generally Recognized As Safe) ซึ่งองค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้ในอาหารได้

Cellini และคณะ (1996) ศึกษาสมบัติของสารสกัดจากกระเทียมสด 2 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหาร คือ *Helicobacter pylori* ที่แยกได้จากคนไข้ซึ่งเป็นโรคกระเพาะอาหารจำนวน 16 isolate และ *H. pylori* ที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference) อีก 3 สายพันธุ์ พบว่าสารสกัดจากกระเทียมทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้นระหว่าง 2 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียที่ศึกษาได้ แต่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียนี้ได้ร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) อยู่ที่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าแบคทีเรียนี้ (Minimal Bactericidal Concentration, MBC) มีค่าเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ระดับ MIC เมื่อนำสารสกัดจากกระเทียมสดไปผ่านความร้อนแล้ว พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้ง *H. pylori* ลดลงเหลือร้อยละ 50 และ 25 ของค่าตั้งต้นตามลำดับ

Jone, Shabib และ Sherman (1997) ศึกษาความสามารถของสารออกฤทธิ์ในพริก คือ แคปไซซิน (capsaicin) ในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหาร

พบว่าสารแคปซัยซินที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *H. pylori* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* สายพันธุ์ที่พบในร่างกายมนุษย์ สรุปได้ว่าสารแคปซัยซินในพริก อาจมีผลป้องกันการเกิดโรคกระเพาะอาหารที่มีสาเหตุมาจาก *H. pylori*

สุมณฑา วัฒนสินธุ์, สายศิริ ศิลปวุฒิ และมยุรา วงศ์ยี่หวา (2543) ศึกษาสมบัติของสารสกัดจากเครื่องเทศสดที่เป็นส่วนประกอบของน้ำพริกแกงในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิด พบว่าสารสกัด (crude extract) จากผิวมะกรูดและข่ามี MIC สำหรับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ สารสกัด จากผิวมะกรูดที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ คือ *Listeria monocytogenes* ได้ ส่วนสารสกัดจากข่าแสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกชนิดนี้ชัดเจน โดยต้องใช้ความเข้มข้นเพิ่มเป็นสองเท่าคือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สารสกัดจากข่าและผิวมะกรูดที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษาทั้งสามระดับไม่แสดงผลยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* และปรากฏว่าสารสกัดจากกระเทียมและตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นทั้งสามระดับที่ศึกษา ไม่แสดงผลยับยั้งแบคทีเรียทั้งสามชนิดที่ใช้ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2.2 การสเตอริไลซ์ (Sterilization)

การสเตอริไลซ์เป็นการใช้อุณหภูมิ 100 °C หรือสูงกว่า เพื่อทำลายจุลินทรีย์รวมทั้งสปอร์ของจุลินทรีย์ทุกชนิด ทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารไว้ได้นานที่อุณหภูมิห้อง (อัญชลี ศิริโชติ, 2531)

2.2.1 การสเตอริไลซ์อาหารที่เป็นกรดต่ำ

การใช้ความร้อนในการถนอมอาหารเป็นการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหรือสปอร์ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารพิษในอาหารหรือทำให้อาหารนั้นเน่าเสีย จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารที่เป็นกรดและอาหารที่เป็นกรดสูงทนความร้อนได้ไม่เท่ากับจุลินทรีย์และสปอร์ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารที่เป็นกรดต่ำ ดังนั้น อาหารที่เป็นกรดต่ำจึงต้องการความร้อนในการฆ่าเชื้อมากกว่าอาหารที่เป็นกรดและอาหารที่เป็นกรดสูงหากต้องการเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน ในด้านความปลอดภัยสำหรับการให้ความร้อนอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ จะต้องให้ความร้อนจนมั่นใจได้ว่าสามารถทำลายสปอร์ของ *C. botulinum* ได้ในระดับ 12D

ในการฆ่าเชื้ออาหารที่มีความเป็นกรดต่างสูงกว่า 4.6 จะต้องคำนึงถึงจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องหลายชนิด ชนิดที่สำคัญที่สุด คือจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารพิษที่ทำอันตรายต่อระบบประสาท เช่น *C. botulinum* ซึ่งมีสปอร์ที่ทนความร้อนได้สูง และเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศในภาชนะบรรจุปิดสนิท กล่าวคือหากมีสปอร์ของ *C. botulinum* หลงเหลืออยู่หลังการให้ความร้อน สปอร์จะงอกเป็น vegetative cell และผลิตสารพิษในอาหาร ด้วยเหตุนี้เองในการฆ่าเชื้ออาหารพวกที่มีความเป็นกรดต่ำจะเน้นการทำลายสปอร์ของ *C. botulinum*

ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารในภาชนะบรรจุแบบปิดสนิทที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน โดยการฆ่าเชื้ออาหารพร้อมภาชนะบรรจุโดยใช้ความร้อนสูง ภาชนะที่ใช้บรรจุต้องเป็นบรรจุภัณฑ์ที่สามารถทนต่อความร้อนและความดันสูง ไม่เปลี่ยนแปลงสภาพระหว่างการฆ่าเชื้อ สามารถเก็บรักษาได้เป็นเวลานานโดยคุณภาพของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง และบรรจุภัณฑ์ต้องปิดสนิทไม่รั่วหรือปริแตกอันจะเป็นช่องทางให้จุลินทรีย์ต่างๆ จากภายนอกเข้าสู่ภาชนะบรรจุ เป็นสาเหตุให้อาหารเสียได้ อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนจะต้องสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่เกิดการเสื่อมเสีย

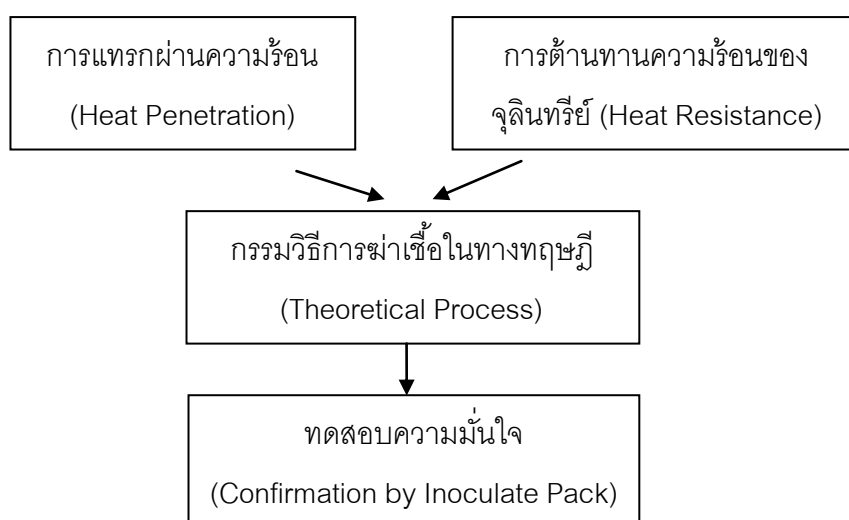
2.2.2 การสเตอริไลซ์ทางการค้า (Commercial sterilization)

การสเตอริไลซ์ทางการค้า หมายถึงการให้ความร้อนในกระบวนการแปรรูปอาหารที่สามารถทำลายเซลล์และสปอร์ของ *C. botulinum* จุลินทรีย์ที่ก่อโรค จุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษ จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ซึ่งทนความร้อน รวมถึงจุลินทรีย์ซึ่งก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยการฆ่าเชื้ออาหารที่เป็นกรดต่ำในอุตสาหกรรมนั้น จะกำหนดให้ฆ่าเชื้อในระดับการสเตอริไลซ์ทางการค้าเพื่อลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจและปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค เนื่องจากกระบวนการผลิตอาหารในภาชนะบรรจุแบบปิดสนิทนั้นไม่สามารถฆ่าเชื้ออาหารให้ปราศจากจุลินทรีย์ได้ตามหลักการสเตอริไลซ์เพราะต้องใช้ปริมาณความร้อนสูงหรือใช้เวลาในการฆ่าเชื่อนานมาก ซึ่งจะทำให้อาหารสูญเสียคุณภาพ (Doyle, Beuchat และ Montville, 1997) จึงต้องใช้กระบวนการฆ่าเชื้อทางการค้าหรืออาจเรียกว่าเป็นการฆ่าเชื้อแบบ 12D concept ซึ่งเป็นกระบวนการที่ให้ความร้อนอย่างเพียงพอเพื่อลดจำนวนสปอร์ลง 12 D (D-value หรือ Decimal reduction time หมายถึง ระยะเวลาเป็นนาทีที่ใช้ในการทำลายหรือลดจำนวนแบคทีเรียลงร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle reduction จากแบคทีเรียตั้งต้นภายใต้อุณหภูมิที่กำหนด) โดยหากมีสปอร์ตั้งต้นในอาหารเท่ากับ 10^{12} สปอร์ หลังการฆ่าเชื้อทางการค้าแล้วจะเหลือสปอร์อยู่เพียง 10^0 สปอร์ โดยทั่วไปจะใช้ 12D-process ในอาหารที่เป็นกรดต่ำเพื่อทำลาย

สปอร์ของ *C. botulinum* ซึ่งมีความทนทานต่อความร้อนสูงและเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (Ray, 2001)

2.2.3 การกำหนดกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (Process establishment)

ในการผลิตอาหารในภาชนะบรรจุแบบปิดสนิทชนิดใหม่จำเป็นต้องมีการกำหนดกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนก่อนเสมอเพื่อที่จะมั่นใจได้ว่าอาหารที่ผลิตนั้นมีความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนและสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค การกำหนดกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนนั้นสามารถทำได้ตามรูปที่ 2.1 โดยจะต้องทราบข้อมูลการแทรกผ่านความร้อนของอาหารชนิดนั้นๆ และข้อมูลการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการกำหนดกรรมวิธีการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนของอาหารในภาชนะบรรจุแบบปิดสนิท

2.2.3.1 การกระจายความร้อนในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ (Heat distribution)

ก่อนการศึกษาการแทรกผ่านความร้อนมีความจำเป็นต้องศึกษาการกระจายความร้อนภายในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อหาตำแหน่งในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อที่ได้รับความร้อนช้าที่สุดเพื่อใช้เป็นตำแหน่งอ้างอิงในการศึกษาการแทรกผ่านความร้อนต่อไป

การศึกษาระบายความร้อนในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในการศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากใน

หม้อหนึ่งฆ่าเชื้อหนึ่งๆ การกระจายความร้อนไม่สม่ำเสมอเท่ากันทุกจุด ภาชนะที่อยู่ใกล้กับจุดปล่อยไอน้ำจะได้รับความร้อนจากไอน้ำเร็วกว่าภาชนะที่อยู่ตำแหน่งอื่น ส่วนภาชนะที่อยู่ไกลจากจุดปล่อยไอน้ำหรืออยู่ตรงตำแหน่งที่ไอน้ำแทรกผ่านเข้าไปไม่ถึงซ้ำ การกระจายความร้อนสู่ภาชนะก็เกิดขึ้นช้าตามไปด้วย เมื่อเริ่มปล่อยไอน้ำ ภาชนะที่วางในตำแหน่งที่ต่างกันในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อจะมีอุณหภูมิภายในภาชนะแต่ละภาชนะไม่เท่ากัน เนื่องจากการกระจายความร้อนที่แตกต่างกัน ความแตกต่างนี้เองเป็นจุดสำคัญในการหาเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อ ซึ่งจะให้ตำแหน่งของภาชนะที่ความร้อนกระจายไปถึงช้าที่สุด หรือตำแหน่งที่อุณหภูมิของภาชนะมีอุณหภูมิขึ้นช้ากว่าภาชนะที่วางในตำแหน่งอื่นๆ เป็นตำแหน่งอ้างอิง เพราะถ้าใช้อุณหภูมิและเวลาที่ทำให้ภาชนะที่ความร้อนกระจายไปถึงช้าสุดอยู่ในสภาพปลอดเชื้อได้ ภาชนะอื่นๆ ที่ความร้อนกระจายไปถึงได้เร็วกว่าก็ย่อมได้รับความร้อนเพียงพอที่จะทำลายสปอร์ของจุลินทรีย์ได้

2.2.3.2 การแทรกผ่านของความร้อน (Heat penetration)

ในการกำหนดการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ในภาชนะปิดสนิทต้องศึกษาข้อมูลอัตราการแทรกผ่านความร้อนเข้าสู่จุดร้อนช้าที่สุดของผลิตภัณฑ์ (Slowest heating point หรือ Cold point) ขณะที่อาหารได้รับการถ่ายเทความร้อนในระหว่างการฆ่าเชื้อจะมีลักษณะการถ่ายเทความร้อน 3 แบบ ซึ่งขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพของอาหาร คือ

2.2.3.2.1 การนำความร้อน (Conductive heating)

ความร้อนจะถูกถ่ายโอนในทุกทิศทางผ่านผนังภาชนะบรรจุแล้วผ่านโมเลกุลของอาหารที่ไม่เคลื่อนที่ จุดร้อนช้าจะอยู่ที่กึ่งกลางของภาชนะ อาหารที่มีการถ่ายเทความร้อนแบบดังกล่าว ได้แก่ อาหารเนื้อ อาหารชั้นหนืดมาก และอาหารที่บรรจุแน่น

2.2.3.2.2 การพาความร้อน (Convective heating)

ความร้อนจะถูกถ่ายโอนโดยที่โมเลกุลของอาหารเคลื่อนที่ไปด้วย เมื่อได้รับความร้อนส่วนที่เป็นของเหลวจะได้รับความร้อนก่อนทำให้ความหนาแน่นน้อยลง จึงเคลื่อนที่ขึ้นด้านบน ในขณะที่ของเหลวที่อุณหภูมิต่ำกว่า มีความหนาแน่นมากกว่า จะเคลื่อนที่ลงด้านล่าง ทำให้เกิดการหมุนเวียนของอาหารภายในกระป๋อง จุดร้อนช้าจะอยู่ที่ตำแหน่งประมาณ $\frac{3}{4}$ นิ้วจากด้านล่าง

2.2.3.2.3 การถ่ายเทความร้อนแบบผสม (Complex heating)

เกิดจากการถ่ายเทความร้อนทั้ง 2 ชนิดรวมกันคือ ทั้งการนำความร้อนและการพาความร้อน ในช่วงแรกจะเป็นการถ่ายโอนความร้อนแบบพา และเมื่อให้ความร้อนต่อไปอาหารมีความชื้นเหน็ดมากขึ้น การถ่ายโอนความร้อนจะเปลี่ยนเป็นแบบการนำ จุดร้อนซ้ำอยู่ระหว่างจุดร้อนซ้ำของอาหารที่มีการถ่ายโอนความร้อนแบบการนำและการพา มักเป็นอาหารที่มีลักษณะชื้นเหน็ด ได้แก่ อาหารที่ผสมสารที่ทำให้ชื้นเหน็ด

2.2.3.3 การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์

ในการกำหนดอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้ออาหารนั้น จำเป็นต้องทราบความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ (Heat resistance) ซึ่งหมายถึงปริมาณความร้อนสูงสุดคิดเป็นเวลาที่จุลินทรีย์นั้นจะทนอยู่ได้ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญที่สุดที่นำมาใช้เป็นมาตรฐานขั้นต่ำที่ทำให้อาหารที่มีความเป็นกรดต่ำมีความปลอดภัยคือ *C. botulinum* นอกจากนี้ หากต้องการเก็บรักษาอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อได้นานที่อุณหภูมิสูง จำเป็นต้องทราบความต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงและทนความร้อนสูง เช่น *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียแบบ flat sour

ค่า D ของ *C. botulinum* มีค่าอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.2 นาที แต่อย่างไรก็ตามการใช้ค่า D ของสปอร์ *C. botulinum* ในการกำหนดภาวะการฆ่าเชื้อต้องใช้อย่างระมัดระวัง เนื่องจากค่า D ของสปอร์ *C. botulinum* ที่อยู่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์และในอาหารแต่ละชนิดอาจแตกต่างกันไป จึงจำเป็นต้องศึกษาค่า D ของแต่ละผลิตภัณฑ์ Ocio และคณะ (1994) รายงานว่าความสามารถในการทนความร้อนของสปอร์ *C. botulinum* ในอาหารที่มีลักษณะทางกายภาพและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารแตกต่างกัน เช่น องค์ประกอบในอาหาร โดยเฉพาะปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และตัวทำละลาย โดยจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะทนต่อความร้อนได้มากขึ้นเมื่ออาหารมีปริมาณองค์ประกอบดังกล่าวอยู่สูงเนื่องจากองค์ประกอบเหล่านี้จะมีผลช่วยป้องกันจุลินทรีย์จากความร้อน ความทนความร้อนของจุลินทรีย์จะลดลงเมื่ออาหารมีความชื้นหรือ water activity (a_w) สูง เนื่องจากน้ำในอาหารสามารถแพร่ผ่าน membrane ของสปอร์เข้าไปยังส่วน core ของสปอร์ได้ หากปริมาณน้ำภายในสปอร์เพิ่มขึ้นน้ำจะจับกับ small acid soluble protein แทน DNA ของสปอร์ ทำให้ DNA ของสปอร์ถูกทำลายด้วยความร้อนได้ง่ายขึ้น ความเป็นกรดของอาหาร (pH) จุลินทรีย์จะทนความร้อนได้มากที่สุดเมื่ออาหารมี pH ที่เหมาะสม (โดยทั่วไปประมาณ 7) แต่เมื่อลดหรือเพิ่ม pH จะทำให้จุลินทรีย์ไวต่อความร้อนมากขึ้น เพราะถ้ามีสภาพเป็นกรด จะมีประจุบวกมาก ประจุที่เหมือนกันของ diaminopimelic acid ก็จะทำให้

โครงสร้างของ spore cortex ผลักกัน จึงส่งผลให้ความทนต่อความร้อนของสปอร์ลดลง ซึ่งเป็นผลดีต่อกระบวนการให้ความร้อนของอาหารที่มีความเป็นกรดสูงจะทำให้ลดเวลาการให้ความร้อนลงได้ และ antimicrobial ซึ่งไม่ถูกยับยั้งด้วยความร้อนจะส่งผลให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลงอย่างรวดเร็ว

เนื่องจาก *C. botulinum* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารพิษได้และสารพิษมีอันตรายมาก ในงานวิจัยส่วนมากจึงนิยมศึกษาการทำลาย *C. sporogenes* ด้วยความร้อนแทน *C. botulinum* เนื่องจาก *C. sporogenes* มีลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเหมือนกับ Proteolytic *C. botulinum* ยกเว้นการสร้างสารพิษ จึงปลอดภัยต่อผู้ทดลอง (O' Leary, 1989) รวมถึงจลนศาสตร์การทำลายสปอร์ของ *C. sporogenes* ด้วยความร้อนเพื่อใช้กำหนดเวลาในการให้ความร้อนแก่อาหารใกล้เคียงกับ *C. botulinum* โดยสปอร์ของ *C. sporogenes* ในเนื้อสัตว์ มีค่า $D_{121^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 0.8 ถึง 1.5 นาที และค่า Z เท่ากับ 8.8 ถึง 11.1 °C ซึ่งสูงกว่าค่าที่พบสำหรับสปอร์ของ *C. botulinum* ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำที่มีค่า $D_{121^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 0.1 ถึง 1.3 นาทีและค่า Z เท่ากับ 5.5 °C (Fellows, 1993) ดังนั้น ถ้าสามารถทำลายสปอร์ของ *C. sporogenes* ได้ก็เท่ากับสามารถทำลายสปอร์ของ *C. botulinum* ได้เช่นเดียวกัน สายพันธุ์ของ *C. sporogenes* ที่นิยมใช้ได้แก่ PA 3679 ซึ่งมีค่า D ระหว่าง 0.5 ถึง 1.5 นาที *C. sporogenes* สายพันธุ์ PA 3679 เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญกับอุตสาหกรรมอาหารในภาชนะบรรจุแบบปิดสนิทมาก เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ตรวจสอบความพอเพียงของการฆ่าเชื้อเพราะ *C. sporogenes* จะทนความร้อนได้มากกว่า แต่ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารพิษและสะดวกที่จะเลี้ยงในอาหาร นอกจากนี้จุลินทรีย์ชนิดนี้ยังสร้างก๊าซจึงสะดวกต่อการตรวจสอบการเสื่อมเสียที่เกิดขึ้น (Jay, Loessner และ Golden, 2005)

2.3 ค่าต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน

ในกระบวนการผลิตอาหารในภาชนะบรรจุแบบปิดสนิท ค่าที่ต้องใช้ในการคำนวณเวลาในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (Thermal destruction) ได้แก่ ค่า D ค่า Z และค่า F โดยค่า D และค่า Z แสดงถึงความทนทานต่อความร้อนของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์แต่ละชนิดในอาหารและค่า F บ่งชี้ว่าการให้ความร้อนในการฆ่าเชื่อนั้น มีผลในการฆ่าหรือทำลายจุลินทรีย์มากน้อยเท่าใด

2.3.1 ค่า D (D-value)

ค่า D หรือค่าคงที่อัตราการตาย คือ เวลาเป็นนาทีที่อุณหภูมิคงที่จะทำลาย จุลินทรีย์ร้อยละ 90 การหาค่า D ทำได้โดยใส่สเปิร์มของจุลินทรีย์ที่ทราบจำนวนแน่นอนลงใน ภาชนะบรรจุและนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ กัน สร้างกราฟความอยู่รอด (Survivor curve) บนกระดาษซิมิล็อก ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่รอด บน แกนล็อก (แกน Y) และเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิหนึ่งๆ บนแกนธรรมดา (แกน X) กราฟที่ได้จะมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง (Madigan และคณะ, 2003) ดังรูปที่ 2.2 สามารถหาค่า D จากสมการที่ 2.1 ดังนี้

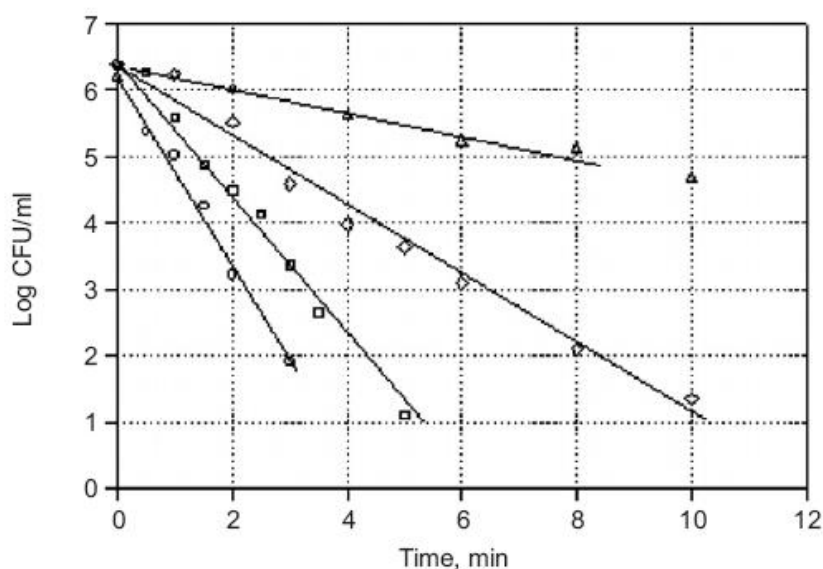
$$D = \frac{t}{\text{Log}(N_0 / N)} \quad (2.1)$$

D คือ เวลา (นาที)

t คือ เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)

N_0 คือ ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น

N คือ ปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป t นาที



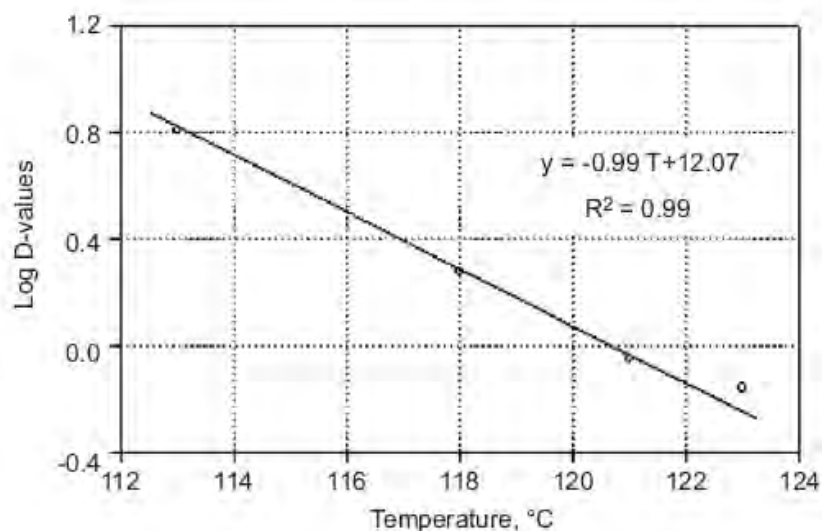
รูปที่ 2.2 การอยู่รอดของ สเปิร์ม *C. sporogenes* PA 3679 ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 113°C (□), 118°C (◇), 121°C (△) และ 123°C (○)

ที่มา: Chung และคณะ (2008)

ค่า D เป็นระยะเวลาที่ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตลดลง 1 วงจรล็อก ค่า D จะลดลงตามลำดับเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น นั่นคืออัตราการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อนมีค่าสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการฆ่าเชื้อ โดยสามารถทำนายความเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์จะเหลือเพียง 1 เซลล์จากอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อน โดยการฆ่าเชื้ออาหารที่จำหน่ายนิยมใช้กระบวนการ 12D หรือเรียกว่า “12D cook” หรือ “bot cook” การใช้ค่า D จากตารางที่ผู้อื่นรายงานไว้ต้องใช้อย่างระมัดระวัง เนื่องจากค่า D ของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงตามองค์ประกอบของอาหารที่จุลินทรีย์นั้นอยู่ขณะให้ความร้อน การคำนวณสภาวะการฆ่าเชื้อที่ถูกต้องจึงจำเป็นต้องศึกษาค่า D ของจุลินทรีย์ในแต่ละผลิตภัณฑ์

2.3.2 ค่า Z (Z-value)

ค่า Z คือ จำนวนองศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) หรือ องศาฟาเรนไฮต์ ($^{\circ}\text{F}$) ที่ทำให้ค่า D ลดลง 1 วงจรล็อก ค่า Z ได้จากการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า D ของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งๆ (บนแกนตั้ง) กับอุณหภูมิที่ฆ่าเชื้อ (บนแกนนอน) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ค่า Z ของสปอร์ *C. botulinum* โดยทั่วไปมีค่าเท่ากับ 10°C ค่า Z มีประโยชน์ในการคำนวณกระบวนการให้ความร้อนที่ให้ผลเท่ากันที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 2.3 thermal death time curve ของสปอร์ *C. sporogenes*

ที่มา: Chung และคณะ (2008)

2.3.3 ค่า F (F-value)

ค่า F คือ ระยะเวลาเป็นนาทีที่อุณหภูมิหนึ่งซึ่งใช้ทำลายจุลินทรีย์ที่ทราบจำนวนในอาหารภายใต้สภาวะที่กำหนด การใช้ค่า F จำเป็นต้องระบุอุณหภูมิ (process temperature) ที่ใช้ และค่า Z ของจุลินทรีย์เป้าหมายด้วย ถ้าการทดลองทำที่อุณหภูมิ 121.1 °C หรือ 250 °F โดยใช้ค่า Z ของสปอร์ *C. botulinum* ($Z = 10$ °C) ค่า F ที่คำนวณจะเรียกค่า F_0 การกำหนดค่า F_0 ขึ้นอยู่กับการทดลองเพราะต้องมีปัจจัยอื่นๆ เกี่ยวข้องด้วย ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ในวัตถุดิบ เริ่มต้น จำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นระหว่างการเตรียมอาหาร คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการฆ่าเชื้อและอุณหภูมิในการเก็บรักษา (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาศิก, 2532)

ตารางที่ 2.2 ค่า F_0 ของผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด

ผลิตภัณฑ์	ขนาดกระป๋อง	ค่า F_0 (นาที)
อาหารเด็กอ่อน	202 x 308	3 – 5
ถั่วในซอสมะเขือเทศ	ทุกขนาด	4 – 6
ถั่วลันเตาในน้ำเกลือ	307 x 409 หรือเล็กกว่า	6
	307 x 409 ถึง 603 x700	6 – 8
แครอท	ทุกขนาด	3 – 4
ถั่วแขกในน้ำเกลือ	307 x 409 หรือเล็กกว่า	4 – 6
เห็ดในน้ำเกลือ	300 x 410	8 – 10
เนื้อในน้ำเกรวี่	ทุกขนาด	12 – 15
ไส้กรอกในน้ำมัน	300 x 410 และเล็กกว่า	4 – 6
ไส้กรอกในน้ำเกลือ	300 x 410 และเล็กกว่า	3 – 4
แกงเนื้อใส่ผัก	300 x 410 และเล็กกว่า	8 – 12
ไก่ทั้งชิ้นในน้ำเกลือ	401 x 411 ถึง 603 x700	15 – 18
ปลาในซอสมะเขือเทศ	300 x 410 และเล็กกว่า	10
ซूपมะเขือเทศ	ทุกขนาด	3
อาหารเลี้ยงสัตว์	300 x 410	15 – 18
ซूपข้าวโพด	307 x 409	5 – 6
หน่อไม้ฝรั่ง	ทุกขนาด	2 – 4
ข้าวโพดอ่อนในน้ำเกลือ	307 x 409	9

ที่มา : ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วารสิิก (2532)

กุลวดี ตรวงพาณิชย์, กาญจนกิจ วาจนะวินิจ และอุไร เผ่าสังข์ทอง (2533) ศึกษาความต้านทานของจุลินทรีย์ที่สามารถทนความร้อนได้สูงสุดที่แยกได้จากน้ำพริกแกงและน้ำพริกแกงเขียวหวาน พบว่าแบคทีเรียที่สามารถทนความร้อนได้สูงสุดในน้ำพริกแกงบรรจุกระป๋องคือ *Corynebacterium sp.* โดยมีค่า D ที่อุณหภูมิ 230 °F (D_{230}) เท่ากับ 3.3 ถึง 3.8 นาที ค่า Z เท่ากับ 37.5 ถึง 40 °F และผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงมีค่า F_{250} เท่ากับ 1.59 ถึง 1.83 นาที แบคทีเรียที่สามารถทนความร้อนได้สูงสุดในน้ำพริกแกงเขียวหวานบรรจุกระป๋องคือ *Bacillus firmus* โดยมีค่า D_{230} เท่ากับ 2.5 ถึง 3.0 นาที ค่า Z เท่ากับ 25 ถึง 29 °F และผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงมีค่า F_{250} เท่ากับ 0.83 ถึง 0.95 นาที ในการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงและแกงเขียวหวานบรรจุ

กระป๋องด้วยความร้อนที่อุณหภูมิหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ 230 °F ถ้าน้ำพริกแกงมีอุณหภูมิเริ่มต้น (T_{in}) ไม่ต่ำกว่า 131.7 °F และค่าความชันของกราฟการแทรกผ่านของความร้อน (f_h) ไม่มากกว่า 26 นาที จะต้องใช้เวลาในการฆ่าเชื้อ (B_B) ไม่ต่ำกว่า 50 นาที ขณะที่น้ำพริกแกงเขียวหวานมีค่า T_{in} ไม่ต่ำกว่า 128.6 °F และค่า f_h ไม่มากกว่า 26 นาที จะต้องใช้เวลาในการฆ่าเชื้อไม่ต่ำกว่า 40 นาที

อรอง จันทรประสาทสุข (2545) พัฒนาวิธีการแปรรูปน้ำพริกแกงบรรจุกระป๋อง โดยใช้เทคโนโลยีเฮอร์ดีล เพื่อช่วยลดปริมาณความร้อนที่ต้องการในการทำลายจุลินทรีย์ พบว่า น้ำพริกแกงที่มี pH เท่ากับ 4.0 และ a_w เท่ากับ 0.83, 0.88 และ 0.93 มีการลดลงของปริมาณ จุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุดและไม่พบ viable *C. botulinum* ในน้ำพริกแกงทุกสภาวะ และจากการ วิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถมีชีวิตรอดในน้ำพริกแกงที่มีค่า pH เท่ากับ 4.0 และ a_w เท่ากับ 0.93 โดยการจัดจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิด

B. stearothermophilus จากการศึกษากการแทรกผ่านของความร้อนของน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 110 °C เพื่อคำนวณหาเวลาที่ต้องการในการทำลาย *B. stearothermophilus* พบว่าเวลาในการ ฆ่าเชื้อสำหรับ 3D และ 5D-process มีค่าเท่ากับ 61 และ 87 นาที ตามลำดับ โดยไม่พบการ เจริญของ *B. stearothermophilus* ในน้ำพริกแกงกระป๋องดังกล่าวหลังการบ่มที่ 3 อุณหภูมิ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง, 35 °C และ 55 °C นาน 1 เดือน

2.4 *Clostridium botulinum*

2.4.1 ลักษณะทั่วไป

Clostridium botulinum เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ มีรูปร่างเป็นท่อน และสามารถสร้างสปอร์ได้โดยสปอร์เป็นรูปไข่อยู่ปลายหรือค่อนข้างปลาย เซลล์ (subterminal spore) สามารถเคลื่อนที่ได้โดยแสที่มีอยู่รอบตัว (peritrichous flagella) (Jay และคณะ, 2005) สามารถจัดจำแนกกลุ่ม *C. botulinum* ตามการสร้างสารพิษ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การจัดกลุ่มของ *C. botulinum* ตามชนิดของการสร้างสารพิษ

ลักษณะ	Group I	Group II	Group III	Group IV
ชนิดของสารพิษ	A,B,F	B,E,F	C,D	G
ความสามารถในการย่อยโปรตีน	ย่อยโปรตีน	ไม่ย่อยโปรตีน	ไม่ย่อยโปรตีน	ย่อยโปรตีน
อุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญ (°C)	10	3.3	15	ND
อุณหภูมิที่เหมาะสมที่เจริญ (°C)	35-40	18-25	40	37
pH ต่ำสุดที่เจริญได้	4.7	5.0	ND	ND
a _w ต่ำสุดที่เจริญได้	0.94	0.97	ND	ND
D _{100°C} ของสปอร์ (นาที)	25	<0.1	0.1-0.9	0.8-1.1
D _{121°C} ของสปอร์ (นาที)	0.1-0.2	<0.001	ND	ND

หมายเหตุ ND= not determined

ที่มา: Paul (2002)

2.4.2 แหล่งที่พบ

สามารถพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ ปุ๋ยคอก และตะกอนทะเล พบได้ในพื้นดินในส่วนที่มีการระบายน้ำจากแม่น้ำและในที่ที่มีการเคลื่อนที่ของน้ำน้อย และมักพบการปนเปื้อนในอาหารที่เพาะเลี้ยงติดกับดิน (Jay และคณะ, 2005)

2.4.3 การจัดจำแนกประเภท

การจัดจำแนกตามการสร้างสารพิษโดยอาศัยเทคนิคทางซีโรวิทยาแบ่งได้ 8 ชนิด คือ A, B, C1, C2, D, E, F และ G ซึ่งจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษเหล่านี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ประเภทที่ย่อยโปรตีน (Proteolytic type) เป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยเคซีน ให้ก๊าซไข่เน่า และประเภทที่ไม่ย่อยโปรตีน (Non-proteolytic type) เป็นสายพันธุ์ที่สามารถใช้น้ำตาลแมนโนสในการหมัก (Jay และคณะ, 2005)

2.4.4 การระบาดของโรค

จากการสรุปรายงานเฝ้าระวังโรคประจำปี 2549 ของกระทรวงสาธารณสุขพบการระบาดของโรคอาหารพิษจากการรับประทานหน่อไม้อัดเปียบ ซึ่งเกิดจาก *C. botulinum* มีผู้ป่วยจำนวน 148 ราย ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่มีผู้ป่วยมากที่สุดเท่าที่เคยมีรายงานในประเทศไทย รวมถึงมีผู้ป่วยหนักที่ต้องใช้ท่อช่วยหายใจกว่า 40 ราย (กระทรวงสาธารณสุข, สำนักโรคพิษวิทยา, 2549)

Ozlem และคณะ (2006) ได้ตรวจหาสปอร์ของ *C. botulinum* ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ขายในตลาด Ankara ประเทศตุรกีพบสปอร์ของ *C. botulinum* ในตัวอย่างน้ำผึ้ง 6 ตัวอย่างจากทั้งหมด 48 ตัวอย่าง

Maria, Laura และ Fernandez (2008) ได้สำรวจพบสปอร์ของ *C. botulinum* 7.5% จากตัวอย่างทั้งสิ้น 200 ตัวอย่างในผลิตภัณฑ์ชา Chamomile ในประเทศอาร์เจนตินา และจากการจัดจำแนกพบว่า เป็นสปอร์ของ *C. botulinum* ชนิด A 53.3%, ชนิด B 6.7% และชนิด F 13.3% ซึ่งเป็นตัวอย่างชาที่ไม่มีการบรรจุในถุงปิดสนิท มีความเสี่ยงในการก่อโรค Infant botulism

2.4.5 อาการของโรค

โรค Botulism ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิษที่จุลินทรีย์ชนิดนี้สร้างขึ้นนั่นคือ Botulinum toxin ซึ่งปะปนอยู่กับอาหาร โดยผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจะมีอาการหลังจากรับประทานอาหารประมาณ 12 ถึง 72 ชั่วโมง สารพิษจะส่งผลต่อระบบประสาท ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ มึนงง ผิวน้ำ ปาก และคอแห้ง ไม่มีไข้ มองเห็นภาพซ้อน หายใจติดขัดและหากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องและทันเวลาอาจทำให้เสียชีวิตได้

2.5 *Clostridium sporogenes*

2.5.1 ลักษณะทั่วไปและการเจริญ

Clostridium sporogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนตรง มีขนาดกว้าง 0.3 ถึง 0.4 ไมโครเมตร และยาว 1.4 ถึง 6.6 ไมโครเมตร สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้ peritrichous flagella สร้างสปอร์ได้โดยสปอร์มีรูปไข่อยู่ค่อนข้างปลายเซลล์ (Subterminal spore) ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง มีขนาด 2 ถึง 6 มิลลิเมตร ตรงกลางโคโลนีมี

ลักษณะฆูนสีขาวเหลืองและมีไรซอยด์สีเทา อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30 ถึง 40 °C สามารถพบได้ในดิน อาหาร และในลำไส้ (Buchanan และ Gibbons, 1974)

เนื่องจากสารพิษที่เกิดจาก *C. botulinum* นั้นมีอันตรายมากและสามารถสร้างสารพิษได้ จึงนิยมใช้ *C. sporogenes* ในการวิจัยแทนเนื่องจากลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ *C. sporogenes* นั้นเหมือนกับสายพันธุ์ Proteolytic *C. botulinum* ยกเว้นการสร้างสารพิษ ดังแสดงในตารางที่ 2.4 จึงทำให้เกิดความปลอดภัยในการทดลอง

ตารางที่ 2.4 ลักษณะทางชีวเคมีของ Proteolytic *C. botulinum* และ *C. sporogenes*

ลักษณะทางชีวเคมี	Proteolytic <i>C. botulinum</i>	<i>C. sporogenes</i>
Gelatin digestion	+	+
Milk digestion	+	+
Lecitinase production	-	-
Lipase production	+	+
Indol production	-	-
Glucose fermentation	+	+
Lactose fermentation	-	-
Maltose fermentation	v	v
Mannitol fermentation	-	-
Mannose fermentation	-	-
Salicin fermentation	-	-
Sucrose fermentation	-	-
Toxin production	+	-

ที่มา: O' Leary (1989)

2.6 ปริพันธ์เวลาอุณหภูมิ (Time Temperature Integrator, TTI)

การวัดผลของกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนในเชิงปริมาณให้ค่าที่สำคัญที่แสดงถึงความปลอดภัยและคุณภาพด้านอื่นที่สำคัญเช่น อายุการเก็บ และการยอมรับของผลิตภัณฑ์ ในปัจจุบันวิธีที่ใช้ประเมินผลของความร้อนต่อสัมฤทธิ์ผลของกระบวนการฆ่าเชื้อที่ตำแหน่งเป้าหมาย

(จุดร้อนซ้ำ) มี 2 วิธีได้แก่ วิธีที่ 1 in situ method เป็นวิธีที่ใช้การ inoculate สปอร์ของจุลินทรีย์ลงในตัวอย่างและนับจำนวนที่เหลือหลังการฆ่าเชื้อ วิธีนี้ใช้เวลาและมีข้อจำกัดในเรื่องจำนวนสปอร์ต่ำสุดที่สามารถตรวจนับได้หลังการฆ่าเชื้อ และวิธีที่ 2 physical-mathematic method ที่ต้องบันทึกข้อมูลอุณหภูมิและเวลา มักเกิดปัญหาในกระบวนการฆ่าเชื้อที่มีการหมุนและเทคโนโลยีการให้ความร้อนแบบใหม่ๆ เช่น ohmic heating และ microwave heating ซึ่งมีความยากลำบากในการติดตามอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการฆ่าเชื้อ

เพื่อแก้ไขข้อจำกัดดังกล่าว ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนา Time-Temperature Integrator (TTI) เพื่อใช้เป็นเครื่องมือที่สามารถแสดงการเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิและเวลา ใช้งาน มีความถูกต้อง และสามารถวัดการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนที่ผันกลับไม่ได้ เช่น การเสียสภาพของเอนไซม์ตามปริมาณความร้อนที่ได้รับ โดยพัฒนา TTI จากเอนไซม์ให้มีจลนศาสตร์การถูกทำลายด้วยความร้อนคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ และใช้เอนไซม์ดังกล่าวติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลาเพื่อยืนยันสถานะในระหว่างการฆ่าเชื้อแทนการใช้จุลินทรีย์เพื่อยืนยันสถานะฆ่าเชื้อ การยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อทำได้โดยการหาค่าการฆ่าเชื้อ (process value, F) ตามสมการที่ 2.2 และ 2.3 แสดงการคำนวณค่าการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการทาง physical-mathematic method และวิธีที่ใช้ TTI ตามลำดับ

$$F_{t-T} = \int_0^t 10^{((T-T_{ref})/Z_{target})} \times dt \quad (2.2)$$

$$F_{TTI} = D_{T_{ref}} \log \frac{A_0}{A} \quad (2.3)$$

เมื่อ	F_{t-T}	คือ	ค่าการฆ่าเชื้อที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาตามวิธี method (นาที่)	General
	F_{TTI}	คือ	ค่าการฆ่าเชื้อที่คำนวณได้จาก TTI (นาที่)	
	T	คือ	อุณหภูมิที่ตำแหน่งร้อนซ้ำของอาหารทุกๆ t นาที่	
	T_{ref}	คือ	อุณหภูมิอ้างอิง (121.1 °C)	
	t	คือ	เวลาในการฆ่าเชื้อ (นาที่)	
	$D_{T_{ref}}$	คือ	ค่า $D_{121.1\text{ °C}}$ ของเอนไซม์ที่ใช้เป็น TTI (นาที่)	
	A_0	คือ	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนได้รับความร้อน	
	A	คือ	ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือหลังจากได้รับความร้อนเมื่อเวลาผ่านไป t นาที่	
	Z_{target}	คือ	ค่า thermal resistance ของจุลินทรีย์เป้าหมาย (°C)	

Haentjens และคณะ (1998) ศึกษาการใช้ เอนไซม์ α -amylase ทางการค้า 3 ชนิด ได้แก่ Ban[®], Thermozyme[®] และ Termamyl[®] ซึ่งเป็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์ *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* เป็น TTI โดยการนำเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมาปรับค่า water content เพื่อให้เอนไซม์มีความคงทนต่อความร้อน (ค่า k) และความไวต่อความร้อน (ค่าพลังงานกระตุ้น, E_a) ใกล้เคียงกับสปอร์ของ *C. botulinum* พบว่าเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะทนความร้อนมากขึ้นเมื่อ water content ลดลง และเอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* ที่มีความชื้น 81% มีค่า E_a เท่ากับ 261 kJ/mole ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับสปอร์ของ *C. botulinum* ที่มีค่า E_a เท่ากับ 280 kJ/mole มากที่สุด

Guiavarch และคณะ (2002) ศึกษาจลนศาสตร์การเสถียรภาพของเอนไซม์ α -amylase จาก *B. licheniformis* ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 81% (BLA81) ด้วยความร้อน หลังการให้ความร้อนเอนไซม์ด้วยเครื่อง DSC และให้ความร้อนเอนไซม์ในอ่างน้ำมัน พบว่าสามารถติดตามการเสถียรภาพของเอนไซม์ได้จากค่าเอนทัลปีที่ลดลงตามอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อน และสามารถหาค่าการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิอ้างอิง 121.1 °C เพื่อยืนยันสภาวะการฆ่าเชื้อได้ โดยเอนไซม์ α -amylase เสถียรภาพตามอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนภายใต้สภาวะการให้ความร้อนแบบอุณหภูมิคงที่ตาม first order reaction kinetics ซึ่งสามารถเขียนสมการได้ดังสมการที่ 2.4 หรือเขียนในเทอม Thermal death time ได้ดังสมการที่ 2.5

$$\ln \frac{A}{A_0} = -kt \quad (2.4)$$

$$\log \frac{A}{A_0} = -\frac{1}{D} t \quad (2.5)$$

เมื่อ k คือ ค่าคงที่ของปฏิกิริยา

นอกจากนี้ Guiavarch และคณะ (2002) ยังพบว่าการใช้ BLA81 เป็น TTI สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการยืนยันลักษณะการถ่ายเทความร้อนบริเวณจุดร้อนซ้ำของอาหารที่มีชิ้นอาหารในระหว่างการฆ่าเชื้อ โดยพบว่า กระบวนการฆ่าเชื้ออาหารที่มีชิ้นอาหารที่จุดร้อนซ้ำหรือมีชิ้นอาหารที่เคลื่อนที่ได้ อย่างอิสระมีค่าการฆ่าเชื้อต่ำกว่ากระบวนการที่ชิ้นอาหารไม่มีการเคลื่อนที่ 5.6 % และ 19.7 % เมื่อฆ่าเชื้อในกระบวนการฆ่าเชื้อแบบหมุนด้วยความเร็ว 4 และ 8 rpm ตามลำดับ

Guiavarch และคณะ (2004) พัฒนา TTI จากเอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* ด้วยการตรึงสารผสมระหว่างเอนไซม์ น้ำตาลกลูโคส และเกลือที่ผิวของเม็ดแก้ว และปรับสภาวะให้มีความชื้นต่ำ (ค่า a_w อยู่ในช่วง 0 ถึง 0.63) พบว่า TTI ที่ศึกษามีความทนต่อ

ความร้อนในช่วง 100 ถึง 132 °C ที่มีการให้ความร้อนแบบอุณหภูมิคงที่ (isothermal) โดย TTI ที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.48 สามารถใช้ติดตามกระบวนการฆ่าเชื้อจริงที่มีการให้ความร้อนแบบ อุณหภูมิไม่คงที่ (non-isothermal) และยังพบว่า การติดตามการฆ่าเชื้อด้วย TTI ที่มีค่า Z เท่ากับ 9.4 °C สามารถหาค่าการฆ่าเชื้อของกระบวนการ ($F_{121.1^{\circ}\text{C}}$) ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 30 นาที โดยมีค่าความคลาดเคลื่อน เฉลี่ยเท่ากับ 14% สามารถสรุปได้ว่า TTI ที่มีค่า Z เท่ากับ 9.4 °C เหมาะสำหรับการใช้ยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อเพื่อทำลาย *C. botulinum* ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ

Tucker และคณะ (2006) ศึกษาการใช้ TTI ที่เหมาะสำหรับการยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อ โดยเลือกใช้เอนไซม์อะไมเลสที่ทนความร้อนสูงที่ผลิตจากการหมักของจุลินทรีย์ *Pyrococcus furiosus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงถึง 100 °C พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีความคงทนต่อความร้อนเหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็น TTI ในกระบวนการฆ่าเชื้อ โดยในการทดสอบภายใต้สภาวะที่มีการให้ความร้อนแบบอุณหภูมิคงที่ที่อุณหภูมิ 121 °C พบว่ามีค่า D อยู่ใน ช่วง 18.1 ถึง 23.9 นาที ค่า Z เท่ากับ 10 °C ซึ่งค่า F ที่คำนวณได้จาก TTI มีค่าใกล้เคียงกับค่า F_0 ของการทำลายสปอร์ของ *C. botulinum*

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ

วัตถุดิบสำหรับทำน้ำพริกแกง (ตลาดสามย่าน กรุงเทพมหานคร)

พริกชี้ฟ้าแห้ง

พริกชี้หนูแห้ง

หอมแดง

กระเทียม

ตะไคร้

ผิวมะกรูด

ข่า

รากผักชี

ลูกผักชี

เกลือ

จุลินทรีย์

Clostridium sporogenes ATCC 7955 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

เอนไซม์

เอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* (Novozyme, Denmark)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

(A.R. Grade)

Reinforced clostridial agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)

Tryptic soy agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)

Tryptic soy broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)
 Cooked meat broth (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)
 Bacteriological peptone (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)
 Tryptone (Bacton Dickinson and company, France)
 Beef extract (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India)
 Yeast extract (Merck, Darmstadt, Germany)
 Bacteriological agar (Univa, Ajax Finechem, Australia)
 น้ำตาลกลูโคส (Merck, Darmstadt, Germany)
 Gas pak (Merck, Darmstadt, Germany)

3.1.2 อุปกรณ์

เครื่องบดน้ำพริก

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Scientific Promotion, Thailand)

อ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิ (Scientific Promotion, Thailand)

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น BP3100s, Ireland)

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo รุ่น AB204, USA)

กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast (E of L International, Thailand)

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Thermo ICE รุ่น ICE multi RF, USA)

Anaerobic jar (Mitsubishi Gas Chemical, Japan)

ตู้อบเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, Germany)

ถุงรีทอร์ทเพอร์ PET(12)/NYLON(15)/AL-Foil(7)/CPP(60) ขนาดกว้าง 120

มิลลิเมตร สูง 180 มิลลิเมตร

เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ (Huggenmeller GmbH, Germany)

เครื่องฆ่าเชื้อ (HISAKA simulator retort รุ่น RCS-40RTGN, Japan)

Texture analyzer (Stable Micro System รุ่น TA-XT2, England)

Chroma meter (Minolta Co., LTD รุ่น CR-300, Japan)

Water activity meter (Decagon, รุ่น AquaLab series 3 TE, USA.)

pH meter (Eutech, รุ่น Cyberscan pH 100 Bench, Singapore)

E-nose (สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ)

3.1.3 สารเคมี

(A.R. Grade)

แคลเซียมคลอไรด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia)
 แมกนีเซียมซัลเฟต (Univa, Ajax Finechem, Australia)
 Tris base (USB Corporation, USA)
 ไอโอดีน (Fluka Biochemika, USA)
 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia)
 โซเดียมคลอไรด์ (Univa, Ajax Finechem, Australia)
 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Univa, Ajax Finechem, Australia)
 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Univa, Ajax Finechem, Australia)
 สตาร์ช (Merck, Darmstadt, Germany)
 กรดไฮโดรคลอริก (J.T. Baker, USA)
 กลีเซอรอล
 เอทานอล 95%

3.2 ศึกษา Thermal Death Time ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง

3.2.1 ผลิตน้ำพริกแกง

นำเครื่องเทศที่เป็นส่วนประกอบของน้ำพริกแกง ได้แก่ พริกชี้ฟ้าแห้ง พริกชี้หนูแห้ง หอมแดง กระเทียม ตะไคร้ ผิวมะกรูด ข่า และรากผักชี มาผลิตน้ำพริกแกง โดยใช้สูตรน้ำพริกแกงที่ดัดแปลงจากสูตรน้ำพริกแกงจากรายงานของอรอน จันทร์ประสาทสุข (2545) และเพิ่มสัดส่วนของพริกชี้หนูแห้ง เพื่อเพิ่มความเผ็ดให้มากขึ้น ได้สูตรน้ำพริกแกงที่ดัดแปลงขึ้นใหม่ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 มาผลิตน้ำพริกแกง โดยนำเครื่องเทศที่เป็นส่วนประกอบของน้ำพริกแกงมาล้างทำความสะอาด 2 ครั้งและตัดแต่ง นำเข้าเครื่องบดน้ำพริกแกง โดยบดหยาบ 2 ครั้งและบดละเอียด 2 ครั้ง บรรจุน้ำพริกแกงในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ปิดสนิทและเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งนำมาใช้งานในขั้นตอนต่อไปโดยใช้เวลาเก็บไม่เกิน 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบน้ำพริกแกงที่ใช้ในการทดลอง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
พริกชี้ฟ้าแห้ง	15.48
หอมแดง	19.58
กระเทียม	24.52
ตะไคร้	14.92
ผิวมะกรูด	3.22
ข่า	3.16
ลูกผักชีป่น	2.0
เกลือ	5.15
รากผักชี	6.03
พริกชี้หนูแห้ง	5.94

ที่มา: ดัดแปลงจากสูตรน้ำพริกแกงจากรายงานของอรอง จันทรประสาทสุข (2545)

3.2.2 เตรียมสปอร์ของ *C. sporogenes*

เตรียมอาหารแข็งสำหรับการเตรียมสปอร์ *C. sporogenes* (sporulating medium) ซึ่งประกอบด้วย tryptone (5 กรัม) bacteriological peptone (5 กรัม) beef extract (1 กรัม) yeast extract (2 กรัม) แคลเซียมคลอไรด์ (0.06 กรัม) แมกนีเซียมซัลเฟต (0.06 กรัม) กลูโคส (1 กรัม) และ bacteriological agar (15 กรัม) เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน จากนั้นกระจาย *C. sporogenes* ATCC 7955 ในหลอดเก็บเชื้อด้วยอาหารเหลว tryptic soy broth ปิเปตซัสเฟนชั้นทั้งหมดใส่หลอดทดลอง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะไร้อากาศ ใน anaerobic jar ที่มี gaspak เป็นเวลา 2 วันเพื่อกระตุ้นจุลินทรีย์ จากนั้นนำซัสเฟนชั้นของ *C. sporogenes* ดังกล่าวปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา spread บน plate อาหาร sporulating medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะไร้อากาศนาน 14 วัน หลังจากนั้นตรวจการสร้างสปอร์โดยการย้อม เอนโดสปอร์ด้วยสี safranin-o และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบว่ามี การสร้างสปอร์ประมาณ 90% แล้วจึงเก็บสปอร์ซัสเฟนชั้นตามวิธีของ Naim และคณะ (2008) โดยปิเปตน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตรใส่ในจานอาหารแข็ง sporulating medium ใช้แท่งแก้วขูดลากเอาสปอร์ออกจากผิวหน้าอาหารและเก็บซัสเฟนชั้นสปอร์ใน หลอด centrifuge ปลอดเชื้อ เก็บสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที

จากนั้นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงซ้ำ 2 ถึง 3 ครั้ง เก็บสปอร์ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 หาจำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ในซัสเฟนชั้นเริ่มต้น

นำซัสเฟนชั้นของสปอร์ในน้ำกลั่นที่เก็บไว้ในข้อ 3.2 .2 มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 15 นาทีเพื่อทำลาย vegetative cell จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมและ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ และตรวจนับจำนวนสปอร์เริ่มต้น

3.2.4 หาค่า Thermal Death Time (TDT) ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง

inoculate ซัสเฟนชั้นของสปอร์ *C. sporogenes* ที่เก็บไว้จากขั้นตอนที่ 3.2.2 ลงในน้ำพริกแกงปริมาณ 2 กรัมที่เตรียมไว้ตามข้อที่ 3.2.1 และบรรจุในถุงรีทอร์ทเพาซ์ขนาดกว้าง 60 มิลลิเมตร ยาว 90 มิลลิเมตร โดยให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นประมาณ 10^6 spores/g ให้ความร้อนในอ่างน้ำมันควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิคงที่ (5 ระดับ) เป็นระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 93.0 °C เป็นเวลา 3, 6, 12, 24 และ 36 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98.0 °C เป็นเวลา 3, 6, 9, 12 และ 24 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105.7 °C เป็นเวลา 2, 4, 6, 8 และ 10 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 113.4 °C เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121.1 °C เป็นเวลา 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 นาที

เมื่อให้ความร้อนตามเวลาที่กำหนดแล้วนำมาทำให้เย็นทันที โดยการจุ่มถุงลงในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิตหลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ โดยเติมเปปโตเนอเข้มข้น 0.10% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ต่อน้ำพริกแกง 1 กรัม และเจือจางต่อด้วยสารละลายเปปโตเนอเข้มข้น 0.10% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม 5 ระดับๆ ละ 2 ซ้ำ นำมา pour plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นตรวจนับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิตนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) กับจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) เพื่อหาค่า D และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ (°C) เพื่อหาค่า Z ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.3 พัฒนา Time Temperature Integrator (TTI)

3.3.1 ทดสอบความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์ α -amylase (*B. licheniformis*)

บรรจุเอนไซม์ในหลอด capillary ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่ (4 ระดับ) เป็นระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98.0 °C เป็นเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105.7 °C เป็นเวลา 4, 8, 12, 16, และ 20 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 113.4 °C เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121.1 °C เป็นเวลา 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 นาที

วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นและกิจกรรมของเอนไซม์หลังจากได้รับความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ตามวิธีการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในหน่วย KNU ของบริษัท Novozymes ดังแสดงในภาคผนวก ค

3.3.2 ศึกษาผลของปริมาณแคลเซียมและค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity; a_w) ต่อความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์ α -amylase (*B. licheniformis*)

ทดสอบความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์ α -amylase ภายใต้ภาวะที่มีการปรับปริมาณแคลเซียมไอออนเป็น 3 ระดับได้แก่ 20, 70 และ 120 ส่วนในล้านส่วน (ppm) โดยใช้เกลือแคลเซียมคลอไรด์และปรับค่า a_w เป็น 5 ระดับได้แก่ 0.826, 0.782, 0.760, 0.716 และ 0.686 โดยใช้กลีเซอรอล จากนั้นบรรจุเอนไซม์ในหลอด capillary ปริมาณ 50 ไมโครลิตร กอนนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (4 ระดับ) เป็นระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98.0 °C เป็นเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105.7 °C เป็นเวลา 4, 8, 12, 16 และ 20 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 113.4 °C เป็นเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 นาที

ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121.1 °C เป็นเวลา 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 นาที

วิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นและค่ากิจกรรมของเอนไซม์หลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ ด้วยวิธีเดียวกับข้อ 3.3.1 จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ากิจกรรมชาติของอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์หลังจากได้รับความร้อนต่อกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ($\ln A/A_0$) และเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) เพื่อหาค่า D และสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log D$ กับอุณหภูมิ (°C) เพื่อหาค่า Z ดังแสดงในภาคผนวก ง

วางแผนการทดลองทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT)

3.4 ศึกษาการใช้ TTI ที่พัฒนาจากเอนไซม์เพื่อยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงในรีทอร์ทเพาซ์

3.4.1 ผลิตน้ำพริกแกง

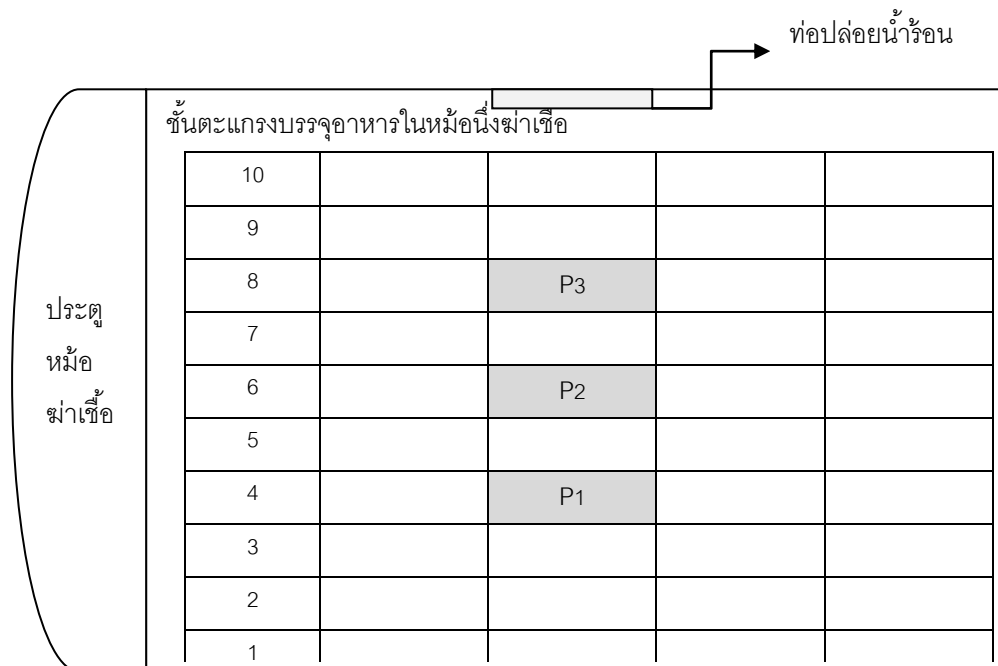
ผลิตน้ำพริกแกงด้วยวิธีตามข้อ 3.2.1 บรรจุน้ำพริกแกงในถุงพลาสติกชนิด polypropylene ปิดสนิทและเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

3.4.2 ใช้ TTI ติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและเวลาระหว่างการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ

เลือกเอนไซม์ α -amylase ในสถานะที่ปรับปริมาณแคลเซียมและค่า a_w แล้วมี จลนศาสตร์การถูกทำลายด้วยความร้อนใกล้เคียงกับสปอร์ของ *C. sporogenes* มากที่สุดมาใช้ เป็น TTI โดยบรรจุ TTI ที่ปรับปริมาณแคลเซียมและค่า a_w ในหลอดแคปิลลารี ปริมาณ 50 ไมโครลิตร และตรึงหลอดแคปิลลารีไว้บริเวณกึ่งกลางของถุงรีทอร์ทเพาซ์ที่ติดตั้งเข็มวัดอุณหภูมิคู่ควบ (thermocouple) บรรจุน้ำพริกแกง 150 กรัม ปิดผนึกโดยใช้เครื่องปิดผนึกสุญญากาศที่ 0.05 bar จำนวน 3 ถุง โดยวางถุงรีทอร์ทเพาซ์ที่ติดตั้ง เข็มวัดอุณหภูมิคู่ควบบนตะแกรงของหม้อหนึ่ง ฆ่าเชื้อในตำแหน่งที่ P1, P2 และ P3 ดังแสดงในรูปที่ 3.1 โดยให้ตะแกรงของหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อมี น้ำพริกแกงชั้นละ 5 ถุง จำนวน 10 ชั้น จากนั้นนำเข้าหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ บันทึกอุณหภูมิของหม้อหนึ่ง ฆ่าเชื้อและอาหารทุก 5 วินาที จนถึงสุดกระบวนการให้ความร้อนและทำให้เย็น โดยแปรอุณหภูมิ ในการฆ่าเชื้อเป็น 3 ระดับได้แก่ 111.1, 115.1 และ 121.1 °C และหยุดการฆ่าเชื้อที่เวลาที่ให้ค่า การฆ่าเชื้อ (F_0) เท่ากับ 1 นาที

ยืนยันประสิทธิภาพผลของการใช้ TTI ด้วยการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้เป็น TTI บริเวณกึ่งกลางของถุงรีทอร์ทเพาซ์หลังจากการให้ความ ร้อนในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ ตามวิธีการวิเคราะห์ของบริษัท Novozyme ดังแสดงใน ภาคผนวก ค จากนั้นคำนวณหาค่า F จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงหลังจากได้รับความร้อน ในระหว่างการฆ่าเชื้อ และคำนวณค่า F จากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาระหว่างการฆ่าเชื้อที่ติดตาม

ด้วยเข็มวัดอุณหภูมิคู่ควบด้วยวิธี General method เปรียบเทียบค่า F_0 ที่คำนวณได้จากข้อมูลอุณหภูมิและเวลา กับค่า F ที่คำนวณจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงหลังจากได้รับความร้อนในระหว่างการฆ่าเชื้อเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของการใช้ TTI



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งที่วัดอุณหภูมิน้ำพริกแกงที่บรรจุภายในถังรีทอร์ทเพาซ์ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

3.5 ศึกษาสมบัติทางกายภาพและตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ภาวะที่เหมาะสม

3.5.1 ศึกษาตำแหน่งร้อนซ้ำและการแทรกผ่านความร้อนของน้ำพริกแกงบรรจุรีทอร์ทเพาซ์ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

ศึกษารูปแบบการถ่ายโอนความร้อน ณ จุดร้อนซ้ำภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อตามภาคผนวก ข โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอาหารระหว่างการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ $121.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ บรรจุน้ำพริกแกง 150 กรัม ในรีทอร์ทเพาซ์ที่ติดตั้งเข็มวัดอุณหภูมิคู่ควบและวางในตำแหน่งที่คาดว่าจะเป็จุดร้อนซ้ำของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ โดยตะแกรงของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อวางน้ำพริกแกงบรรจุรีทอร์ทเพาซ์ชั้นละ 5 ถุง จำนวน 10 ชั้น นำเข้าหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ บันทึกอุณหภูมิของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อและอาหารทุก 5 วินาที จนสิ้นสุดกระบวนการให้ความร้อนและทำให้เย็น ทำการทดลอง 2 ครั้ง จุดที่ร้อนซ้ำที่สุดคือจุดที่อุณหภูมิของน้ำพริกแกงเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิที่ต้องการซ้ำที่สุด หรือน้ำพริกแกงที่มีค่า F_0 เท่ากับ 3 นาทีซ้ำที่สุด จากนั้นนำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

และการเปลี่ยนแปลงเวลาของผลิตภัณฑ์ที่จุดร้อนเข้ามาสร้าง heat penetration curve และคำนวณหา heat penetration parameters เพื่อใช้หาเวลาในการฆ่าเชื้อ (process time) และค่าการฆ่าเชื้อ (sterilizing value; F) โดยวิธี formula method (Stumbo, 1973) ดังแสดงในภาคผนวก ฉ

3.5.2 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำพริกแกงสด

ผลิตน้ำพริกแกงด้วยวิธีตามข้อ 3.2.1 วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพของน้ำพริกแกงและตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ในน้ำพริกแกงตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมของน้ำพริกแกงสด ได้แก่

3.5.2.1 ค่า pH โดยใช้ pH meter (วิเคราะห์ 2 ซ้ำ)

3.5.2.2 ค่า water activity (a_w) โดยใช้ Water activity meter (วิเคราะห์ 2 ซ้ำ)

3.5.2.3 สี โดยเครื่อง Chroma meter Minolta CR-300 series (วิเคราะห์ 5 ซ้ำ)

3.5.2.4 ลักษณะเนื้อสัมผัส โดยเครื่อง Texture analyzer (วิเคราะห์ 5 ซ้ำ)

3.5.2.5 กลิ่นด้วยเครื่อง E-nose (วิเคราะห์ 30 ซ้ำ)

3.5.2.6 การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำพริกแกง (มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548)

- จุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) ตามวิธี TIS 335 Part 1
- รา ตามวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM, USFDA (January 2001))
- *E. coli* ตามวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM, USFDA (September 2002))
- *Clostridium perfringens* ตามวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM, USFDA (January 2001))
- *Staphylococcus aureus* ตามวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM, USFDA (January 2001))
- *Salmonella* ตามวิธีของ ISO – 6579, 2002
- *Bacillus cereus* ตามวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM, USFDA (January 2001))

3.5.3 ศึกษาสมบัติทางกายภาพและจุลินทรีย์ของน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอายุการเก็บผลิตภัณฑ์

ผลิตน้ำพริกแกง ด้วยวิธีตามข้อ 3.2.1 จากนั้นฆ่าเชื่อน้ำพริกแกงในรีโตร์ทเพาซ์ที่อุณหภูมิ 121.1 °C โดยใช้เวลาในการฆ่าเชื้อตามเวลาที่คำนวณได้ตามข้อที่ 3.5.1

ศึกษาสมบัติทางกายภาพ และจุลินทรีย์ของน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ ทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 5 เดือน โดยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง (28-30°C) ตรวจสอบสมบัติทางกายภาพของน้ำพริกแกง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อตามทีระบุในข้อ 3.5.2.1 - 3.5.2.5 และตรวจสอบวิเคราะห์จุลินทรีย์ตามมาตรฐานของอาหารที่เป็นกรดต่ำตามวิธีของ Bacteriological Analytical Manual (BAM, USDA (January 2001)) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- จุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)
- Flat sour mesophiles
- Flat sour thermophiles
- Mesophilic anaerobes
- Thermophilic anaerobes

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางสถิติด้วยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีDuncan's New Multiple Range Test (DNMRT)

หมายเหตุ วิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ข และ ซ

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การผลิตน้ำพริกแกง

การทดลองนี้ได้ใช้สูตรน้ำพริกแกงที่ดัดแปลงจากสูตรน้ำพริกแกงของอรอง จันท์ประสาธสุข (2545) โดยเพิ่มสัดส่วนของพริกชี้ฟ้าแห้งเพื่อเพิ่มความเผ็ดให้มากขึ้น ได้สูตรน้ำพริกแกงขึ้นมาใหม่โดยประกอบด้วย พริกชี้ฟ้าแห้ง หอมแดง กระเทียม ตะไคร้ ผิวมะกรูด ข่า ลูกผักชีป่น เกลือ รากผักชี และพริกชี้ฟ้าแห้ง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ขั้นตอนการเตรียมน้ำพริกแกงจำเป็นต้องล้างเครื่องเทศที่เป็นส่วนประกอบของน้ำพริกแกงอย่างน้อย 2 ครั้ง จากการทดลองเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นโดยการล้างทำความสะอาดเครื่องเทศที่ใช้ผลิตน้ำพริกแกงของอรอง จันท์ประสาธสุข (2545) พบว่าการล้างเครื่องเทศที่เป็นส่วนประกอบ จำนวน 2 ครั้งขึ้นไป และล้างตะไคร้ จำนวน 3 ครั้งขึ้นไป ช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเมื่อพิจารณาผลการตรวจสอบ *viable C. botulinum* ในเครื่องเทศหลังผ่านการล้างทำความสะอาดเครื่องเทศทุกชนิดจำนวน 2 ครั้งขึ้นไปจะตรวจไม่พบ *C. botulinum* จึงถือว่าการล้างเครื่องเทศเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากการล้างวัตถุดิบเป็นการลดปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น หากมีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นมากจะต้องใช้เวลาในการทำลายหรือให้ความร้อนนานกว่าจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นน้อย เนื่องจากมีกลไกการป้องกันความร้อนจากจำนวนจุลินทรีย์ซึ่งจะผลิตหรือหลั่งสารเช่น โปรตีนออกมาปกป้องตัวเอง ดังนั้นจึงควรกำจัดสิ่งสกปรกออกจากวัตถุดิบให้มากที่สุดก่อนนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเพื่อช่วยลดระยะเวลาในการให้ความร้อนลง (Jay และคณะ, 2005)

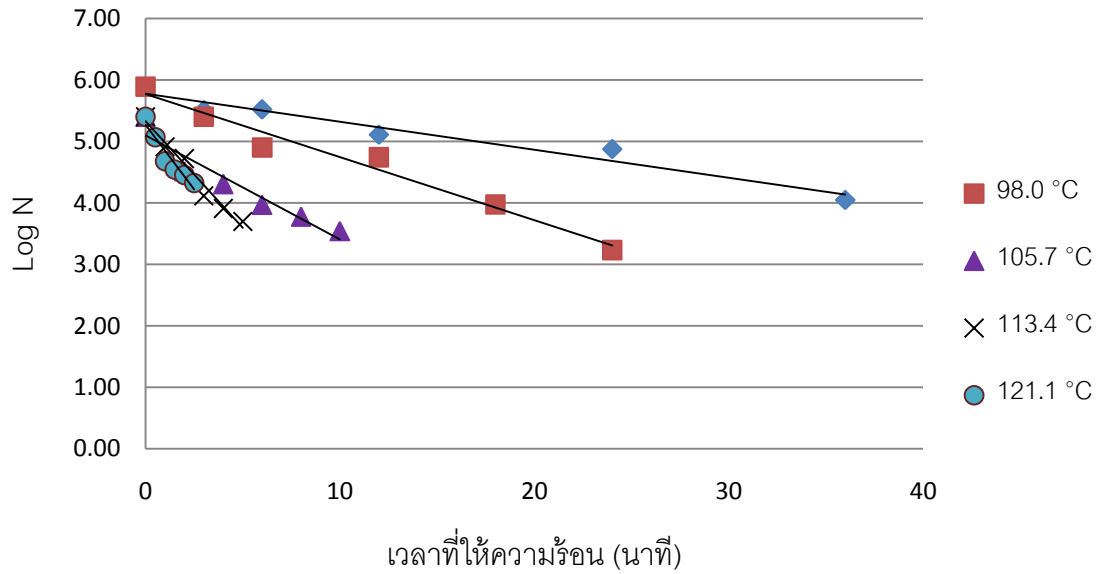
4.2 Thermal Death Time ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง

การทดลองเพื่อศึกษา thermal death time ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงจากขั้นตอนการใส่สปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 6 log CFU/g พบว่าจำนวนสปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงลดลงเหลือ 5.85 ± 0.07 log CFU/g

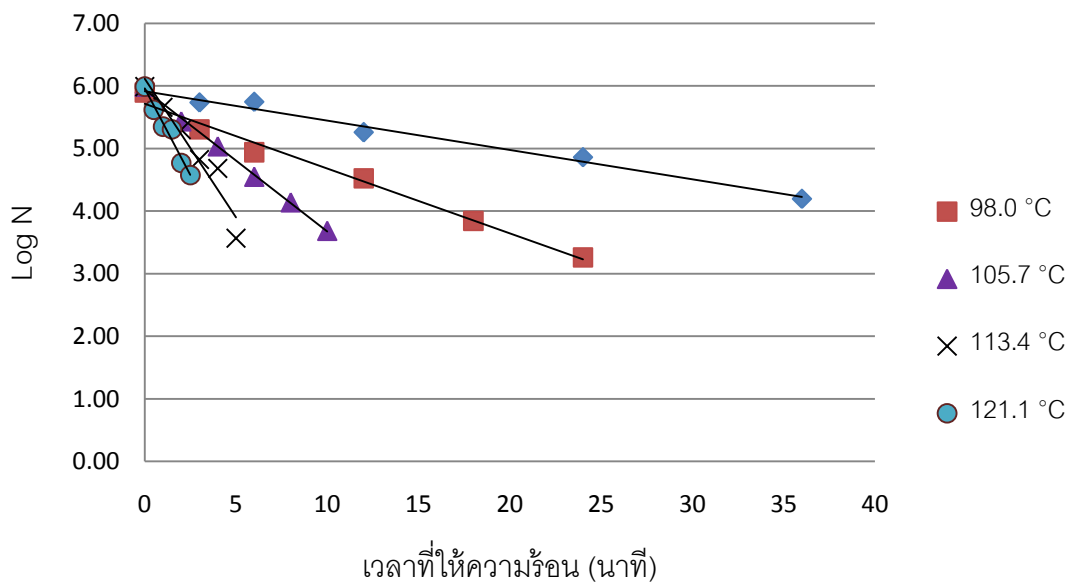
การใส่สปอร์ของจุลินทรีย์ลงในน้ำพริกแกง ทำให้ทราบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ของน้ำพริกแกง โดยสมบัติการยับยั้งหรือลดปริมาณแบคทีเรียของน้ำพริกแกงมาจากน้ำมันหอม

ระเหยในเครื่องเทศที่เป็นส่วนผสม (สมศรี เจริญเกียรติกุล, 2545) แต่สำหรับการทดลองนี้พบว่าจำนวนสปอร์ของ *C. sporogenes* ลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากในการทดลองใส่สปอร์ลงในน้ำพริกแกงและนำไปให้ความร้อนทันที ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยที่มีสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์อาจจะออกฤทธิ์ได้เพียงเล็กน้อย การทดลองของ ชัยรัตน์ วิลาสมงคลชัย (2546) ทดลองเติมเชื้อบริสุทธิ์ลงในน้ำพริกแกงที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยผ่านการฉายรังสี เพื่อให้ทราบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดที่เป็นข้อกำหนดตามเกณฑ์ของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ของน้ำพริกแกง พบว่า น้ำพริกแกงมีฤทธิ์ลด *C. perfringens* ที่มีจำนวนเริ่มต้น 6.8×10^6 CFU/g จนตรวจไม่พบ ภายใน 2 วัน *Salmonella* sp. ที่มีจำนวนเริ่มต้น 3.62×10^7 CFU/g จนตรวจไม่พบ ภายใน 2 วัน *E. coli* มีจำนวนเริ่มต้น 6.5×10^7 CFU/g ให้ลดลง 2 log cycle ภายใน 7 วัน *S. aureus* ที่มีจำนวนเริ่มต้น 7.84×10^6 CFU/g จนตรวจไม่พบ ภายใน 4 วัน ซึ่งน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดจะออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแต่ละชนิดไม่เท่ากัน และเครื่องเทศแต่ละชนิดก็มีน้ำมันหอมระเหยชนิดหลักต่างกัน

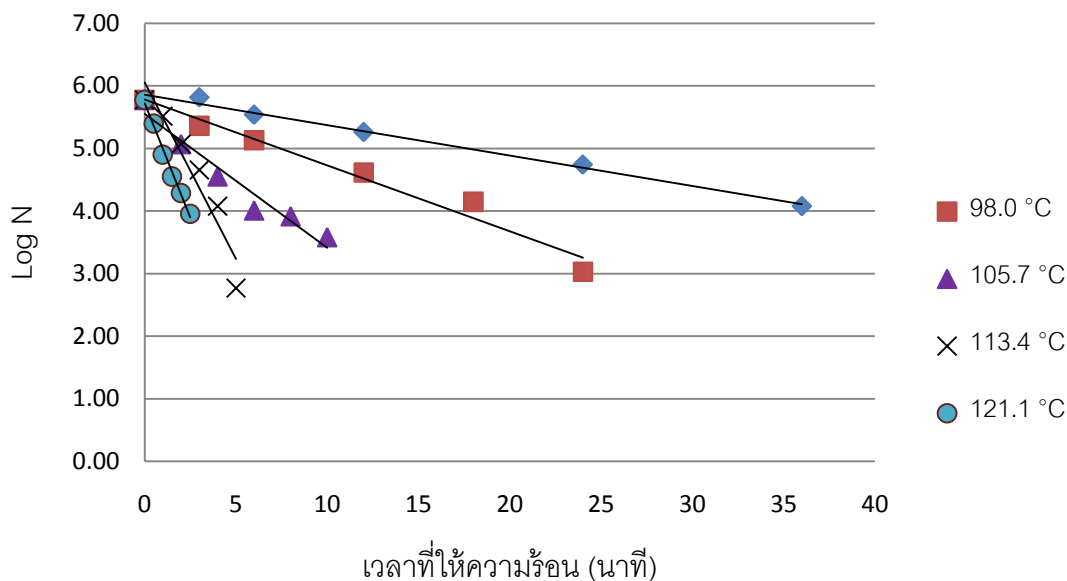
หลังการให้ความร้อนสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 93.0, 98.0, 105.7, 113.4 และ 121.1 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่า สปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมีจำนวนลดลงตามเวลาในการให้ความร้อน และเมื่ออุณหภูมิที่ให้ความร้อนสูงขึ้นสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงจะลดลงตามเวลาในการให้ความร้อนอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ถึง 4.3 ตัวอย่างเช่น เมื่อให้ความร้อนสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 121.1 °C เป็นเวลานาน 2.5 นาที พบว่ามีจำนวนสปอร์ที่เหลือรอดหลังได้รับความร้อนเพียง 4.28 ± 0.31 log CFU/g กล่าวคือ ที่อุณหภูมิสูงสปอร์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในตารางที่ ข.2 ภาคผนวก ข



รูปที่ 4.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (นาที), การทดลองซ้ำที่ 1



รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (นาที), การทดลองซ้ำที่ 2



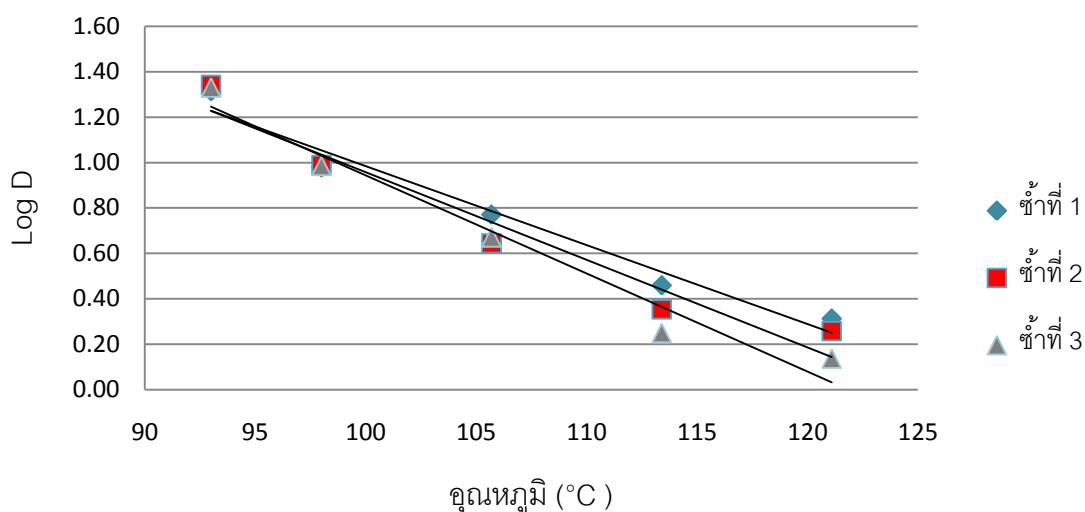
รูปที่ 4.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (นาที), การทดลองซ้ำที่ 3

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ที่รอดชีวิตและเวลาในการให้ความร้อน ดังแสดงในรูปที่ 4.1 ถึง 4.3 สามารถหาค่า D ได้จากเส้นตรงของกราฟตามสมการที่ 2.1 โดยสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมีค่า D ที่อุณหภูมิ 93.0, 98.0, 105.7, 113.4 และ 121.1 °C เท่ากับ 21.31, 9.63, 5.00, 2.30 และ 1.75 นาทีตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ค่า D เป็นระยะเวลาที่ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตลดลง 1 วงจรล็อก ค่า D จะลดลงตามลำดับเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น นั่นคืออัตราการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อนมีค่าสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการฆ่าเชื้อ จากนั้นหาค่า Z ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ (°C) และค่า log D (นาที) ดังแสดงในรูปที่ 4.4 ได้ค่า Z ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงเท่ากับ 25.93 °C ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่า D และ Z ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง

อุณหภูมิ (°C)	D value (นาที)*	Z value (°C)*
93.0	21.31±0.66	
98.0	9.63±0.11	
105.7	5.00±0.80	25.93±2.79
113.4	2.30±0.56	
121.1	1.75±0.35	

* ตัวเลขในตารางแสดงค่า D และค่า Z เฉลี่ย ± ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงกับ อุณหภูมิ (°C), การทดลองซ้ำที่ 1-3

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่า D ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง มีค่าสูงกว่าค่า D ของสปอร์ *C. sporogenes* ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ใกล้เคียงกัน นอกจากนั้น สปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงนั้นมีความทนความร้อนสูงกว่า ($D_{121.1^{\circ}\text{C}} = 1.75$ นาที) และมีความไวต่อความร้อนต่ำกว่า ($Z = 25.93^{\circ}\text{C}$) สปอร์ *C. sporogenes* ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำชนิดอื่นๆ ซึ่งมีค่า $D_{121.1^{\circ}\text{C}}$ อยู่ในช่วง 0.1 ถึง 1.5 นาที และค่า Z เท่ากับ 7.8 ถึง 10 °C (Stumbo, 1973) สอดคล้องกับการทดลองอื่นที่พบว่าสปอร์ของจุลินทรีย์มีความทนความร้อนมากขึ้นเมื่ออยู่ในอาหาร ตัวอย่างเช่น ค่า $D_{121.1^{\circ}\text{C}}$ ของ สปอร์ *C. sporogenes* ในมันฝรั่งบด

(mashed potato) มีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 0.98 นาที ซึ่งทนความร้อนสูงกว่า สปอร์ *C. sporogenes* ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 0.88 นาที และค่า Z เท่ากับ $10.04\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Chung และคณะ, 2008) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Naim และคณะ, (2008) ที่รายงานว่าสปอร์ *C. sporogenes* ในชิ้นเจลแครอท (carrot alginate particles) ทนความร้อนสูงกว่าสปอร์ *C. sporogenes* ในสารละลายบัฟเฟอร์เมื่อค่า pH เท่ากันโดยสปอร์ *C. sporogenes* ในชิ้นเจลแครอทมีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ สูงกว่าในสารละลายบัฟเฟอร์ 3.9 ถึง 6.3 เท่า นอกจากนี้สปอร์ *C. sporogenes* ในซูปัถั่วขึ้น (pea puree) มีค่า D ที่อุณหภูมิ 115 และ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ สูงถึง 23.86 และ 6.32 นาทีตามลำดับ และค่า Z เท่ากับ $10.41\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Kormendy และ Farkas, 2000) ความทนความร้อนของสปอร์ของจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันเนื่องจากลักษณะทางกายภาพและลักษณะทางเคมีของอาหาร เช่น pH ปริมาณของแข็ง และค่า a_w น้ำพริกแกงมีองค์ประกอบที่เป็น pectinous substance ในปริมาณมากเนื่องจากมีส่วนประกอบจากเครื่องเทศชนิดต่างๆ ซึ่งอาจส่งผลในการปกป้องสปอร์ของจุลินทรีย์จากการทำลายด้วยความร้อนส่งผลให้ค่าความคงทนต่อความร้อนเพิ่มสูงขึ้นที่อุณหภูมิมาตรฐาน ($121.1\text{ }^{\circ}\text{C}$) แต่จากการที่สปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมีค่า Z ($25.93\text{ }^{\circ}\text{C}$) สูงกว่าค่า Z ของสปอร์ *C. sporogenes* ในอาหารทั่วไป แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิมาตรฐาน จุลินทรีย์ดังกล่าวจะมีค่า D หรือความทนความร้อนต่ำกว่าสปอร์ *C. sporogenes* ในอาหารทั่วไป แสดงให้เห็นว่าโดยรวมแล้ว ส่วนประกอบที่เป็นเครื่องเทศในน้ำพริกแกงส่งผลให้จุลินทรีย์ถูกทำลายด้วยความร้อนได้มากขึ้น

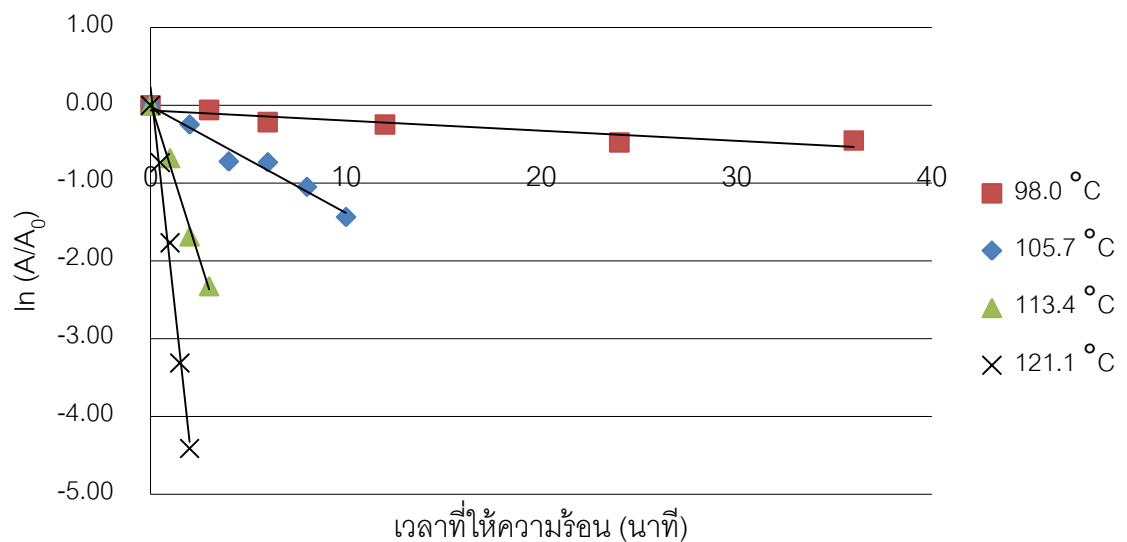
4.3 Thermal Death Time ของเอนไซม์ α -amylase

4.3.1 ผลของปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อความทนความร้อนของเอนไซม์ α -amylase ที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.826

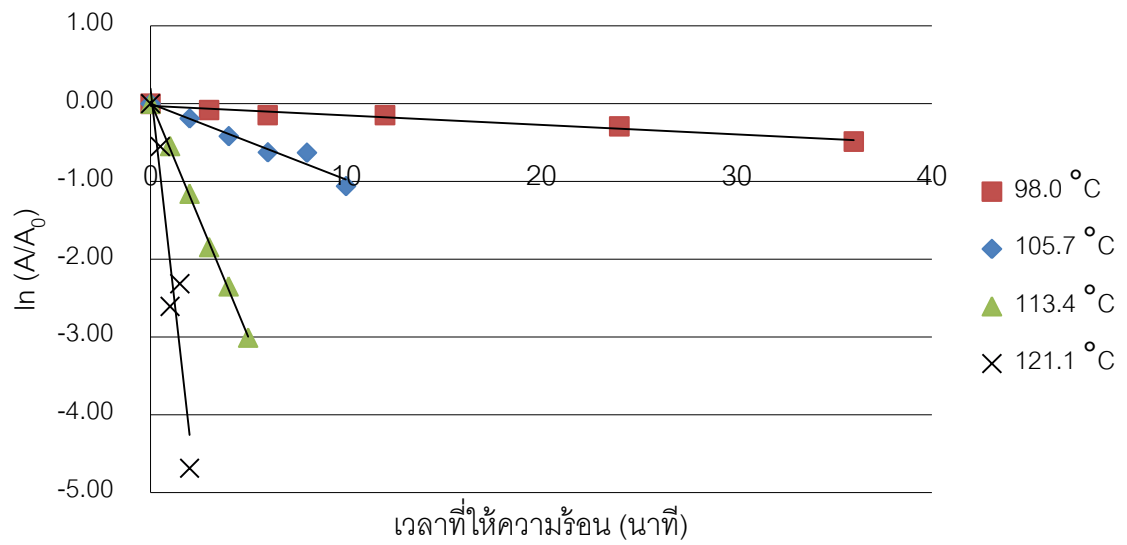
เอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* เป็นเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้สูงแตกต่างจากเอนไซม์ α -amylase ชนิดอื่นๆ (Haentjens และคณะ, 1998) จึงเลือกสำหรับใช้ในการทดลองนี้ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีความทนความร้อนต่ำกว่าความทนความร้อนของสปอร์ *C. sporogenes* จึงทดลองปรับปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์และค่า a_w เพื่อเพิ่มความทนความร้อนของเอนไซม์

การให้ความร้อนเอนไซม์ α -amylase ที่อุณหภูมิ 98.0, 105.7, 113.4 และ $121.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ลดลงตามเวลาในการให้ความร้อน โดยในช่วงแรกของการให้ความร้อนกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วและจะช้าลง

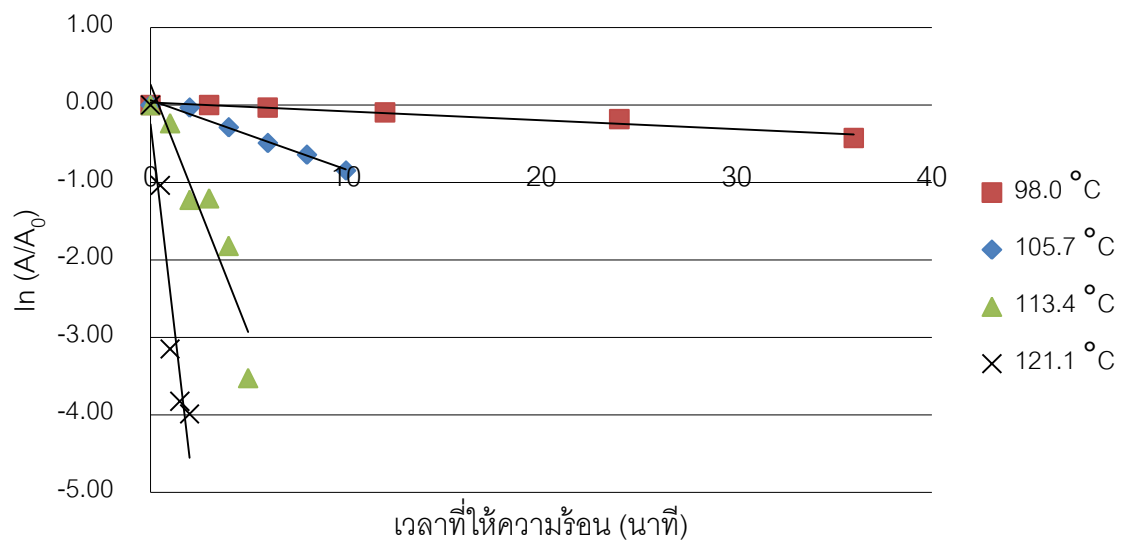
เมื่อระยะเวลาในการให้ความร้อนนานขึ้น และเมื่ออุณหภูมิที่ให้ความร้อนสูงขึ้น กิจกรรมของ เอนไซม์จะลดลงตามเวลาในการให้ความร้อนอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนที่ อุณหภูมิต่ำกว่า ซึ่งต้องใช้เวลานานกิจกรรมของเอนไซม์จึงจะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.5 ถึง 4.13 ตัวอย่างเช่น เมื่อให้ความร้อนเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826 ที่อุณหภูมิ 98.0 °C ให้ความร้อนเอนไซม์เป็นเวลานาน 36 นาที ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ลดลงจาก 117.11 เป็น 74.46 KNU/g คิดเป็นร้อยละ 36.41 เมื่อให้ความร้อนเอนไซม์ที่ อุณหภูมิ 121.1 °C เป็นเวลานาน 2.0 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์หลังได้รับความร้อนลดลง จาก 117.11 เป็น 1.42 KNU/g คิดเป็นร้อยละ 98.79 กล่าวคือ ที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์จะถูกทำลาย ด้วยความร้อนได้อย่างรวดเร็ว ดังแสดงในตารางที่ ง.2 ถึง ง.4 ภาคผนวก ง



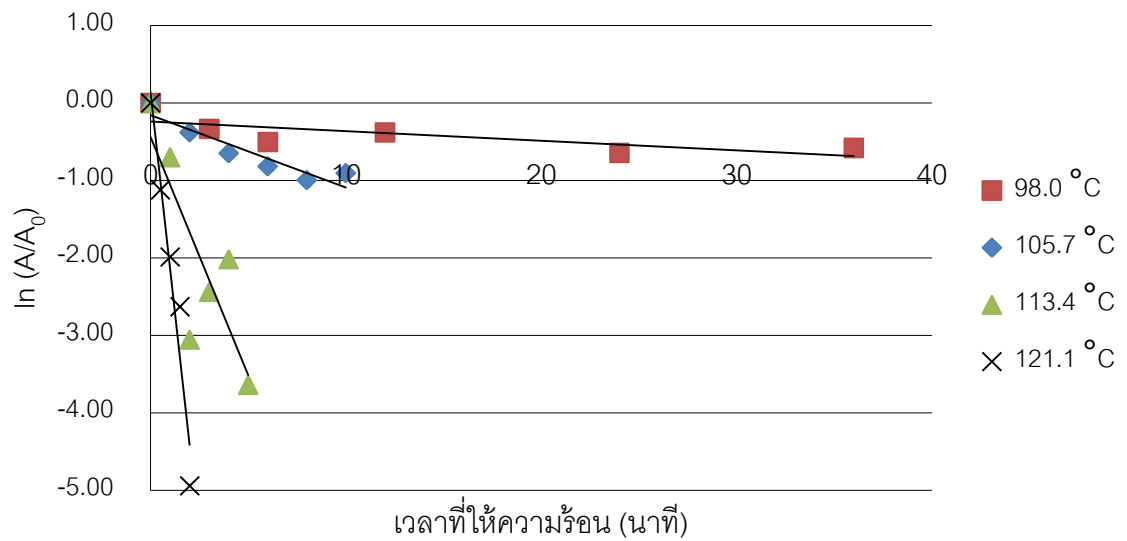
รูปที่ 4.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\ln A/A_0$ และเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 1



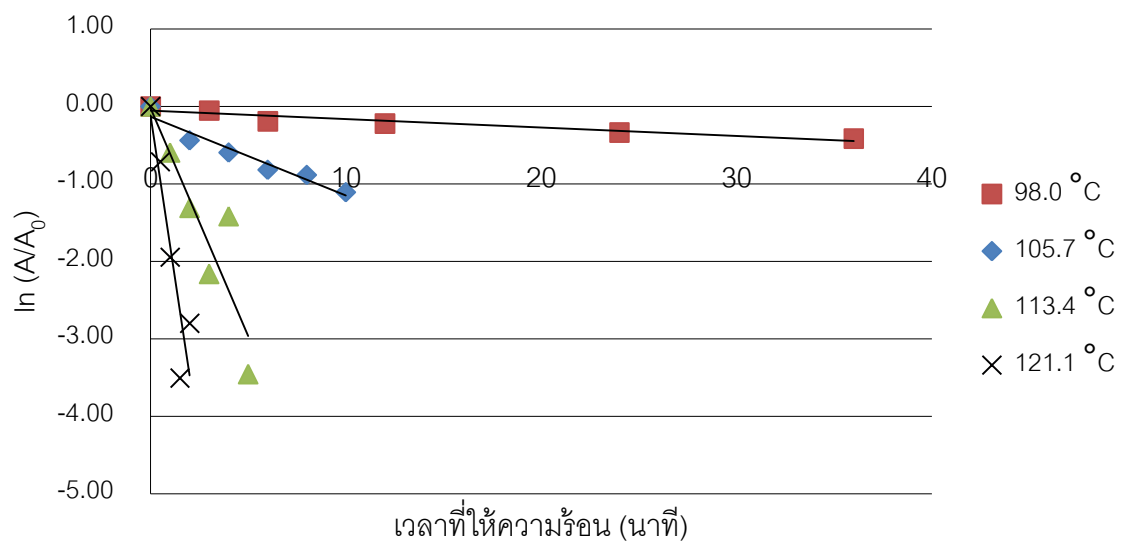
รูปที่ 4.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาทีก) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 2



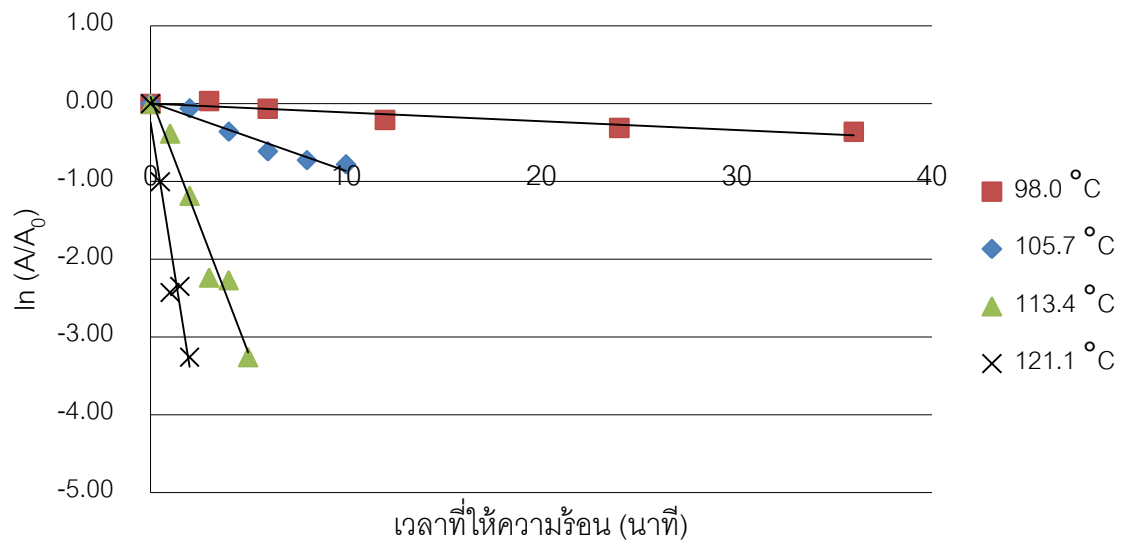
รูปที่ 4.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาทีก) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 3



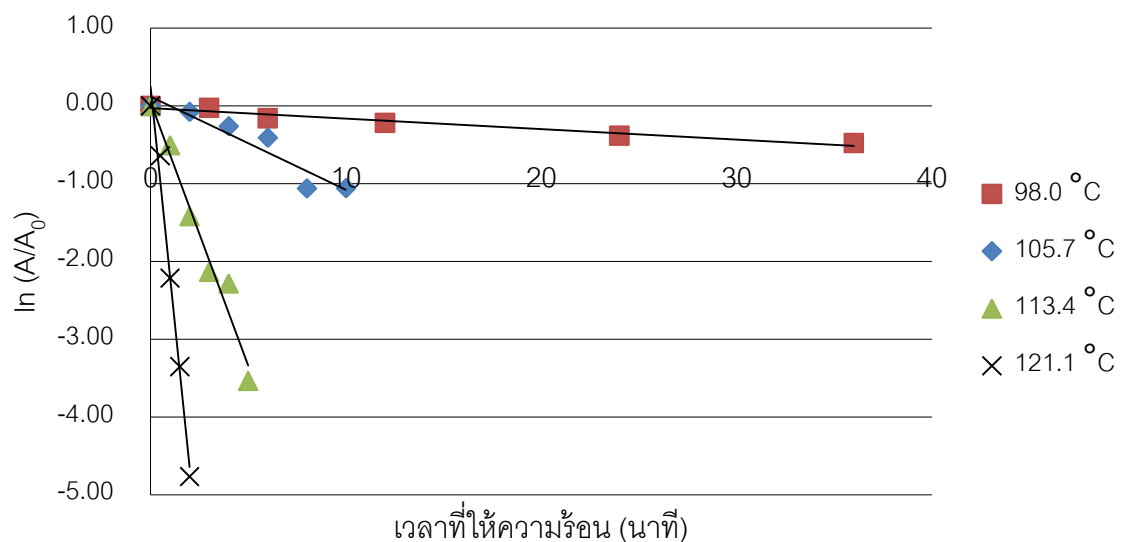
รูปที่ 4.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 1



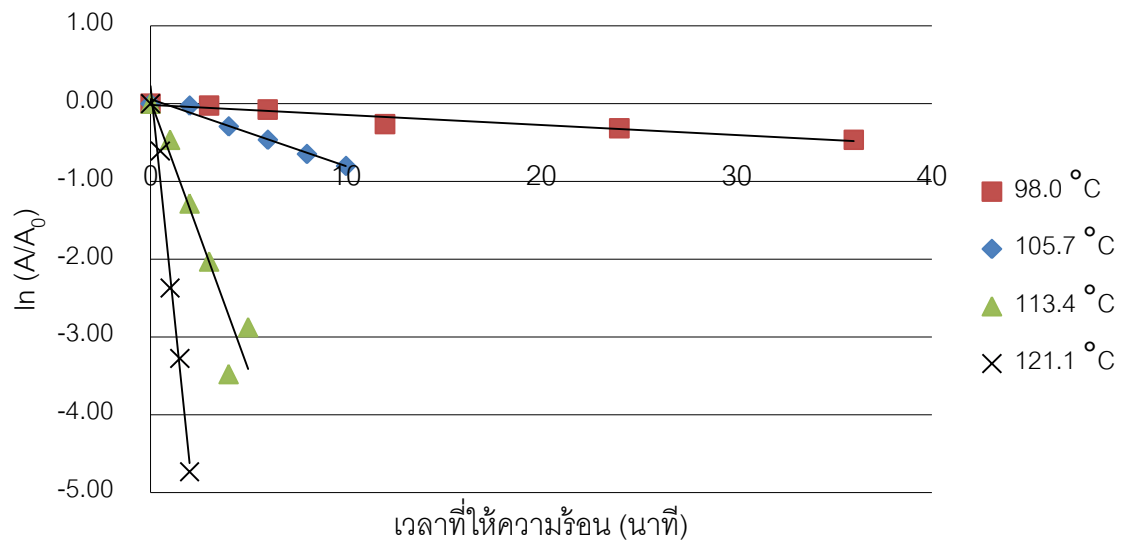
รูปที่ 4.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 2



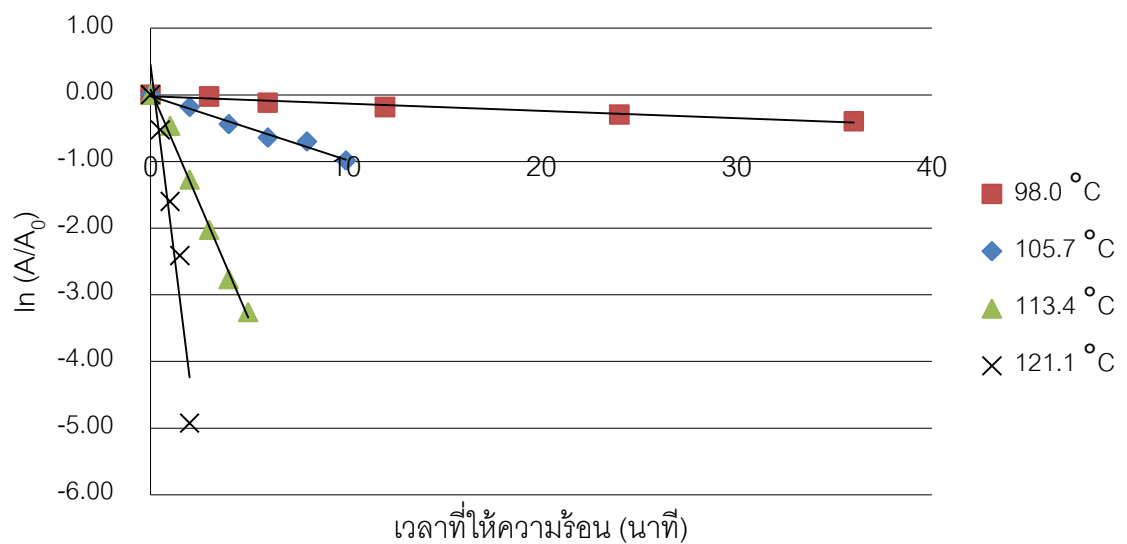
รูปที่ 4.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาที่ให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 3



รูปที่ 4.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาที่ให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 1



รูปที่ 4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 2



รูปที่ 4.13 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 3

การทดลองของ Guiavarch และคณะ (2002) ศึกษาการเสียดสภาพของเอนไซม์ด้วยความร้อนที่ได้รับ พบว่าเอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* เสียดสภาพตามอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนภายใต้สภาวะการให้ความร้อนแบบอุณหภูมิคงที่ตาม first order reaction kinetics ซึ่งสามารถเขียนสมการได้ดังสมการที่ 2.4 หรือเขียนในเทอม Thermal death time ได้ดังสมการที่ 2.5 และสามารถหาค่า D ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าล็อกธรรมชาติของอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์หลังจากได้รับความร้อนต่อกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ($\ln A/A_0$) และเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) ดังแสดงในภาคผนวก ง

จากการปรับปริมาณแคลเซียมไอออนของเอนไซม์เป็น 3 ระดับได้แก่ 20, 70 และ 120 ppm พบว่าปริมาณแคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อความทนความร้อนหรือค่า D ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 98.0, 105.7 และ 113.4 °C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.1 ภาคผนวก ฉ ยกเว้นที่ค่า D ที่อุณหภูมิ 121.1 °C ที่การปรับปริมาณแคลเซียมมีผลต่อค่า D ของเอนไซม์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.1 ภาคผนวก ฉ โดยเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียม 20, 70 และ 120 ppm มีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 1.04, 1.36 และ 0.96 นาทีตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

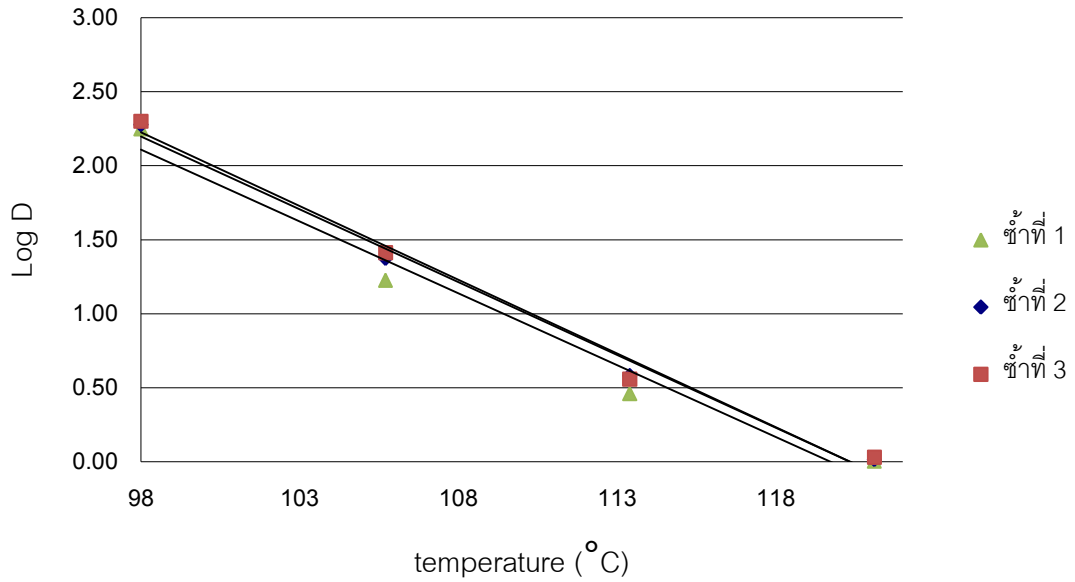
ตารางที่ 4.2 ผลของปริมาณแคลเซียมไอออนต่อความทนความร้อนของเอนไซม์ α -amylase ที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.826

ปริมาณ แคลเซียมไอออน (ppm)	ค่า D (นาที)*				ค่า Z (°C)*
	98.0 °C ^{ns}	105.7 °C ^{ns}	113.4 °C ^{ns}	121.1 °C	
20	188.73 ±11.55	22.06 ±4.67	3.44 ±0.48	1.04 ^a ±0.03	10.17 ^a ±0.13
70	200.27 ±13.14	24.53 ±1.75	3.72 ±0.20	1.36 ^b ±0.12	10.51 ^b ±0.03
120	186.77 ±21.40	23.34 ±3.80	3.37 ±0.03	0.96 ^a ±0.02	10.00 ^a ±0.21

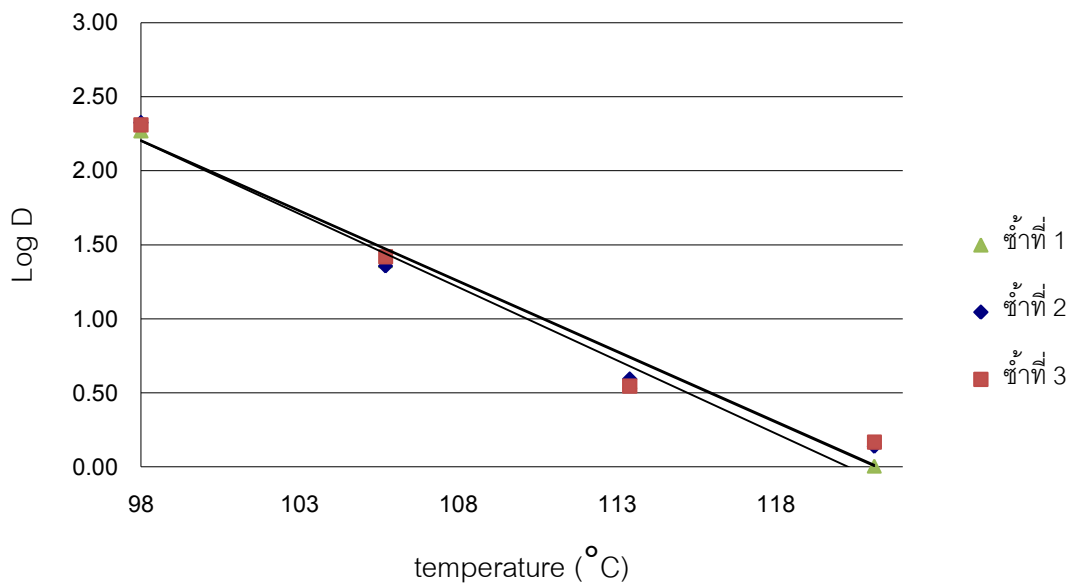
* ตัวเลขในตารางแสดงค่า D และค่า Z เฉลี่ย \pm ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ a, b, c, ... ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

การทำงานของเอนไซม์ต้องการแคลเซียมไอออนเพื่อให้เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 5.5 ถึง 9 และที่อุณหภูมิสูงกว่า 115 °C ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ จะเห็นได้ว่าปริมาณแคลเซียมมีผลทำให้ความทนความร้อนของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่

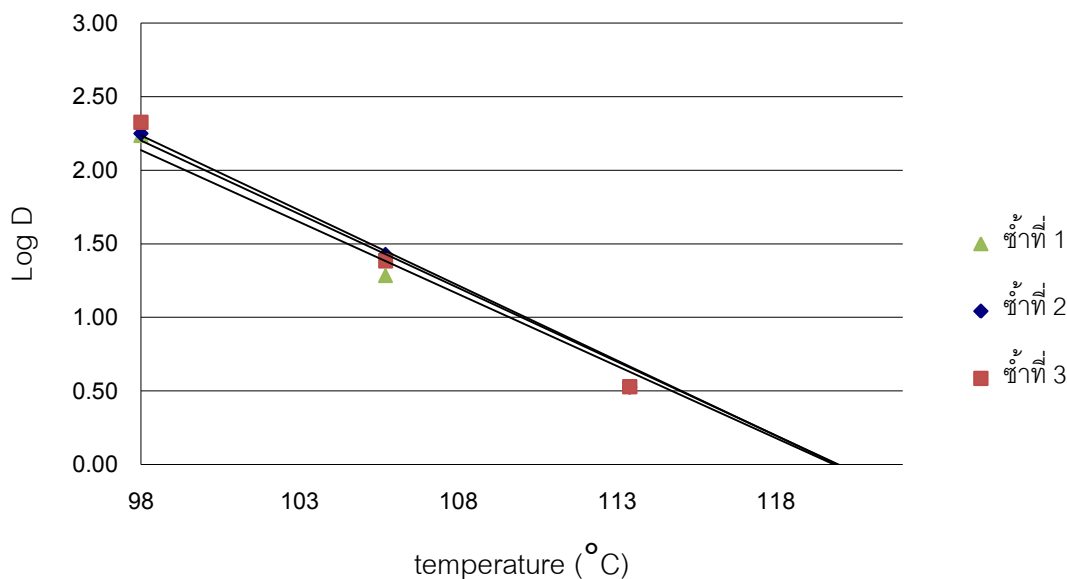
อุณหภูมิสูง (121.1 °C) เท่านั้น สังเกตได้จากค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่านั้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.14 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ (°C) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณคลอรีนไดออกไซด์เท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้้าที่ 1-3



รูปที่ 4.15 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ (°C) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณคลอรีนไดออกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้้าที่ 1-3



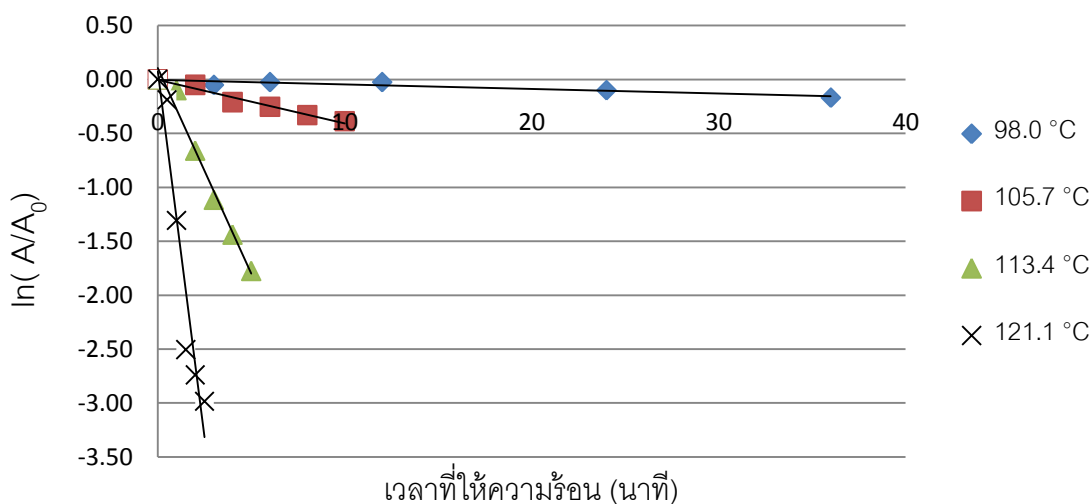
รูปที่ 4.16 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ (°C) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826, การทดลองซ้ำที่ 1-3

จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ (°C) ดังแสดงในรูปที่ 4.14 ถึง 4.16 เพื่อหาค่า Z พบว่าเอนไซม์ α -amylase ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 20, 70 และ 120 ppm มีค่า Z เท่ากับ 10.17, 10.51 และ 10.00 °C ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยปริมาณแคลเซียมไอออนมีผลต่อความไวต่อความร้อนหรือค่า Z ของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อปรับปริมาณแคลเซียมของเอนไซม์เป็น 20 และ 120 ppm เอนไซม์มีค่า Z เท่ากับ 10.17 และ 10.00 °C ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากเอนไซม์ที่ปรับปริมาณแคลเซียม 70 ppm ที่มีค่า Z เท่ากับ 10.51 °C ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงในภาคผนวก ฉ

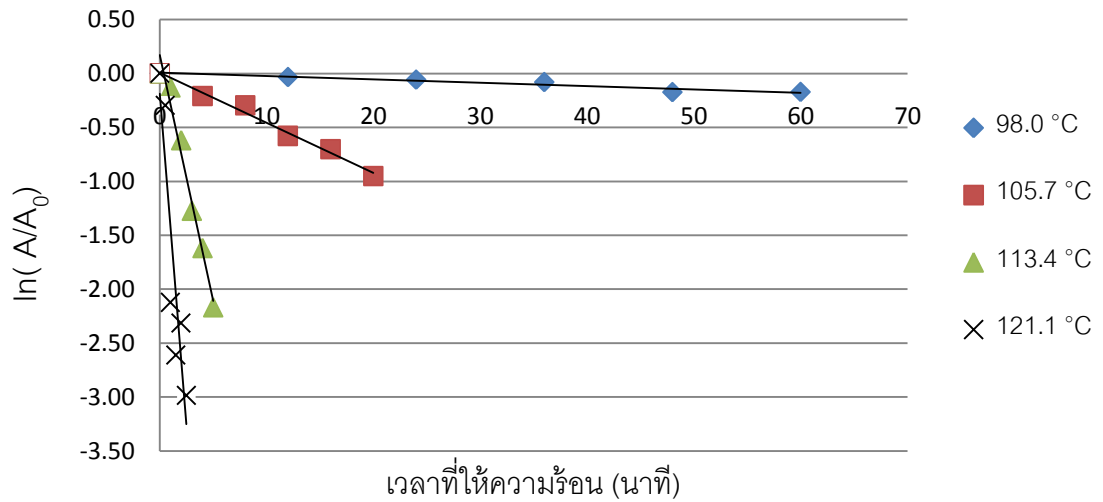
จากผลการทดลองเมื่อต้องการเปรียบเทียบความทนความร้อนของเอนไซม์ที่มีการปรับปริมาณแคลเซียมไอออนกับความทนความร้อนของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง พบว่าเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 70 ppm สามารถทนความร้อนได้ใกล้เคียงกับความทนความร้อนของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมากกว่าเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 20 และ 120 ppm โดยค่า $D_{121.1^\circ\text{C}}$ ของเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 70 ppm มีค่า 1.36 นาที แต่ทั้งนี้ก็ยังต่ำกว่าความทนความร้อนของ สปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง ($D_{121.1^\circ\text{C}} = 1.75$ นาที) นอกจากนั้นเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 70 ppm นั้นกลับมีความไวต่อความร้อน ($Z = 10.51^\circ\text{C}$) สูงกว่าของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง ($Z = 25.93^\circ\text{C}$)

4.3.2 ผลของค่า water activity ต่อความทนความร้อนของเอนไซม์ α -amylase ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm

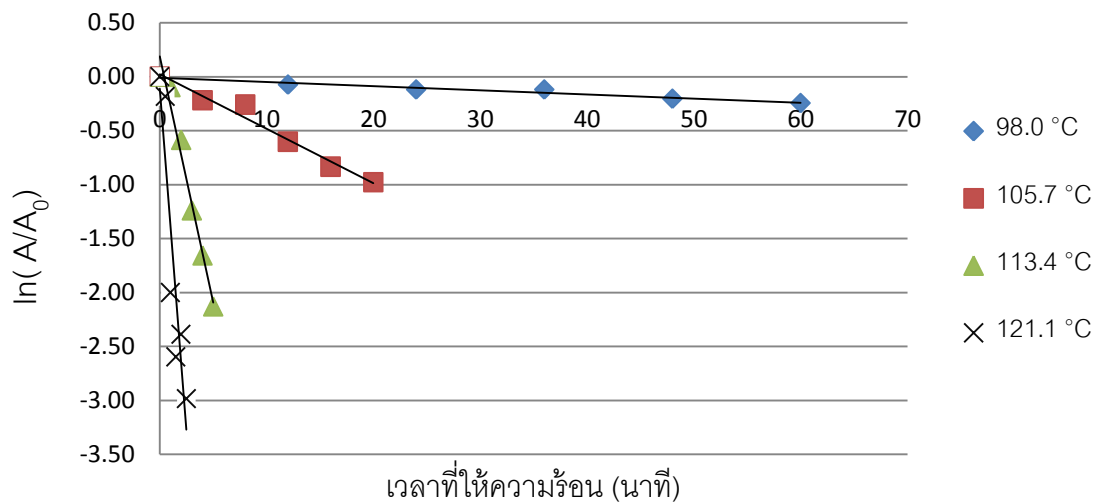
เมื่อเลือกเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 70 ppm มาทดลองปรับค่า a_w ของเอนไซม์เพื่อเพิ่มความทนความร้อนให้ใกล้เคียงกับความทนความร้อนของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงให้มากขึ้น ผลการทดลองพบว่า การให้ความร้อนเอนไซม์ α -amylase ที่อุณหภูมิ 98.0, 105.7, 113.4 และ 121.1 °C เป็นระยะเวลาต่างๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ลดลงตามเวลาที่รับความร้อน ดังแสดงในรูปที่ 4.17 ถึง 4.28



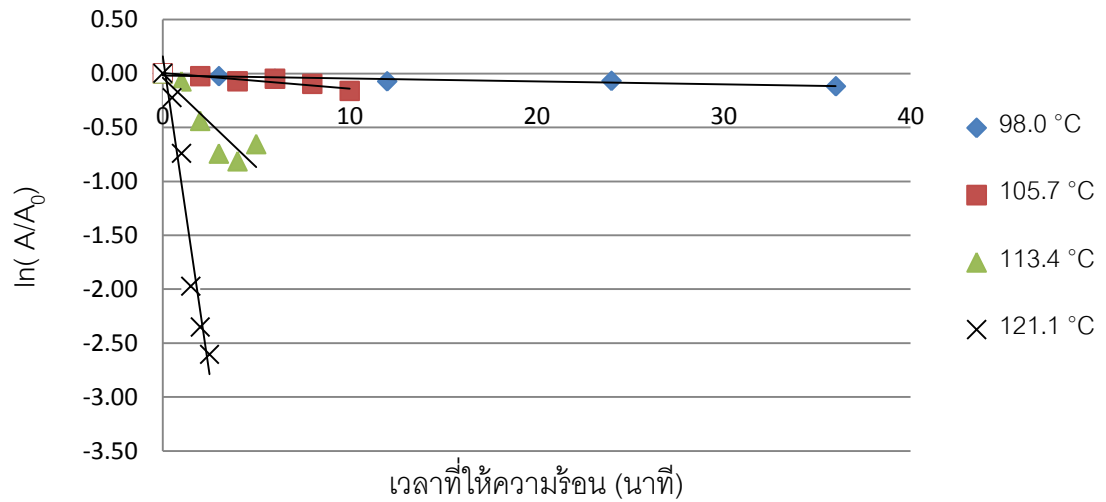
รูปที่ 4.17 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782, การทดลองซ้ำที่ 1



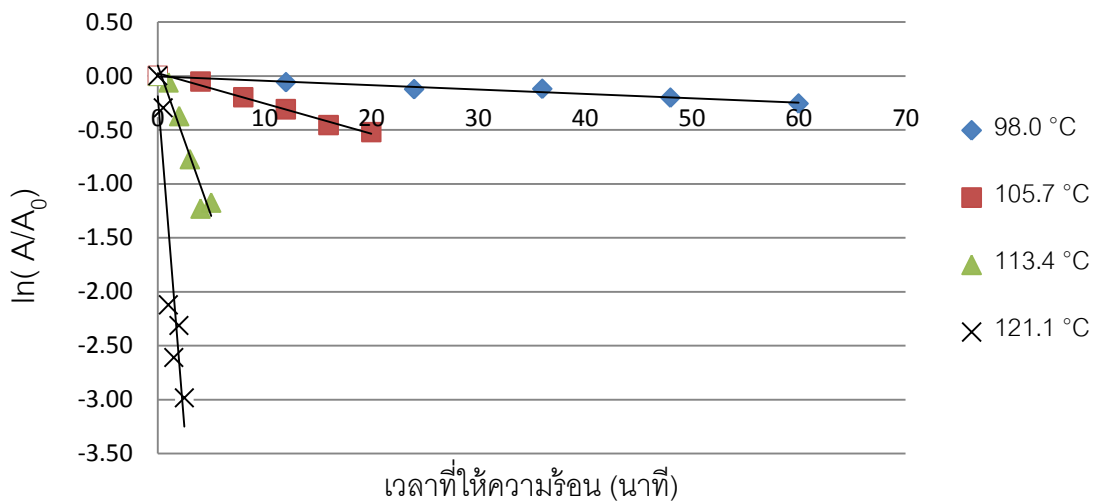
รูปที่ 4.18 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782, การทดลองซ้ำที่ 2



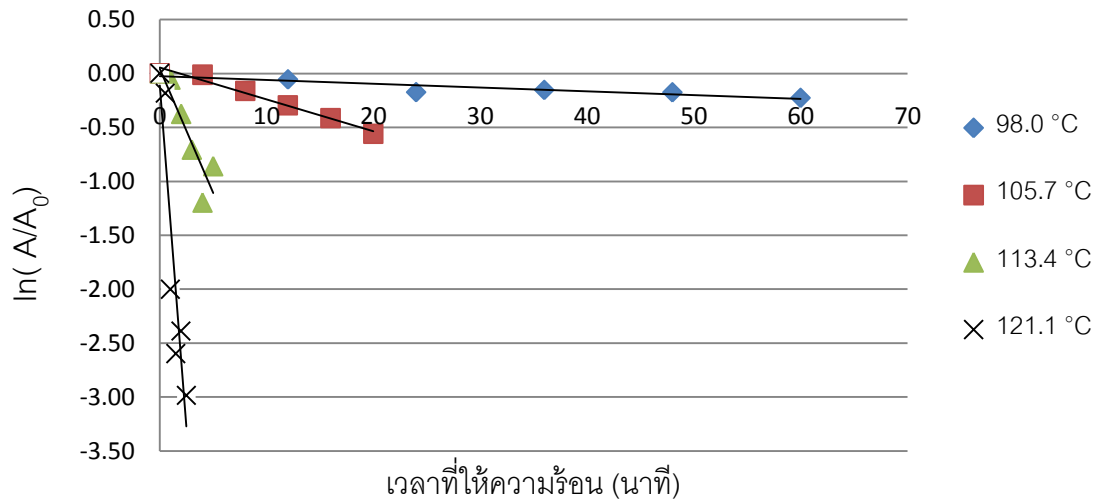
รูปที่ 4.19 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782, การทดลองซ้ำที่ 3



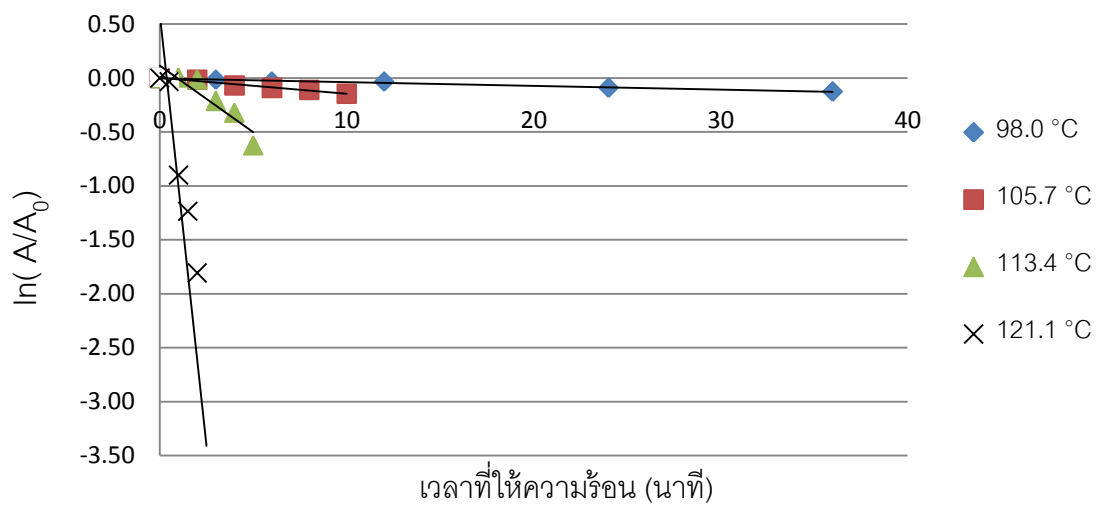
รูปที่ 4.20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาที่ให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760, การทดลองซ้ำที่ 1



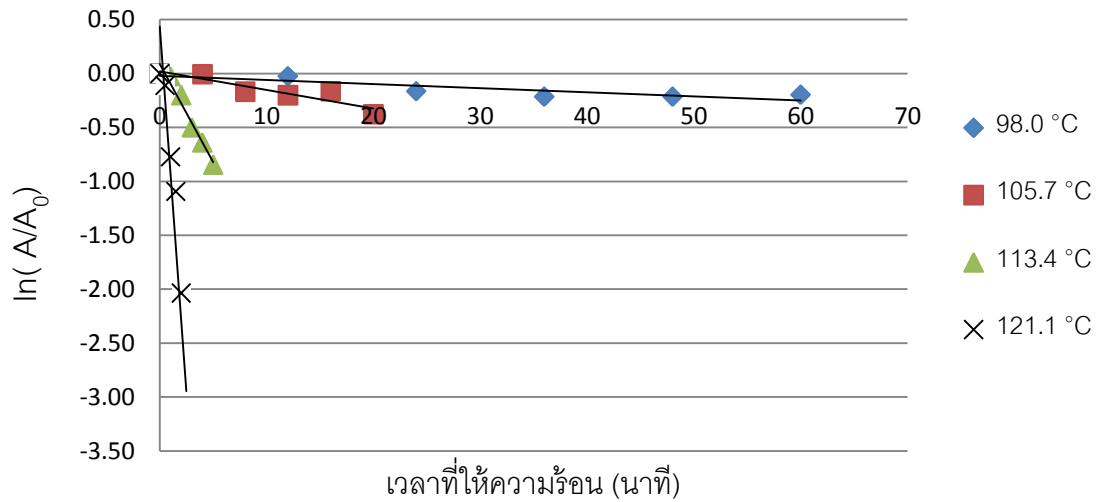
รูปที่ 4.21 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาที่ให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760, การทดลองซ้ำที่ 2



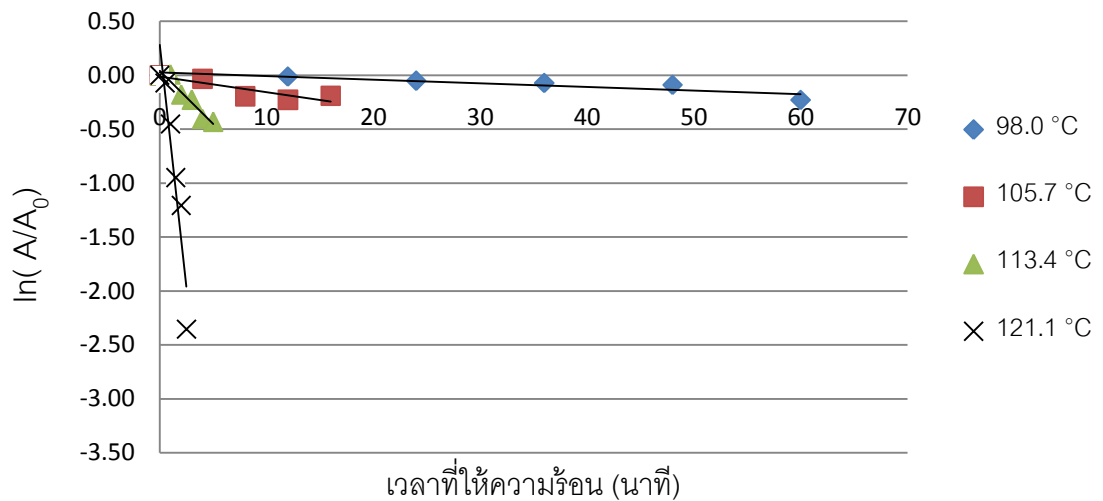
รูปที่ 4.22 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาที) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760, การทดลองซ้ำที่ 3



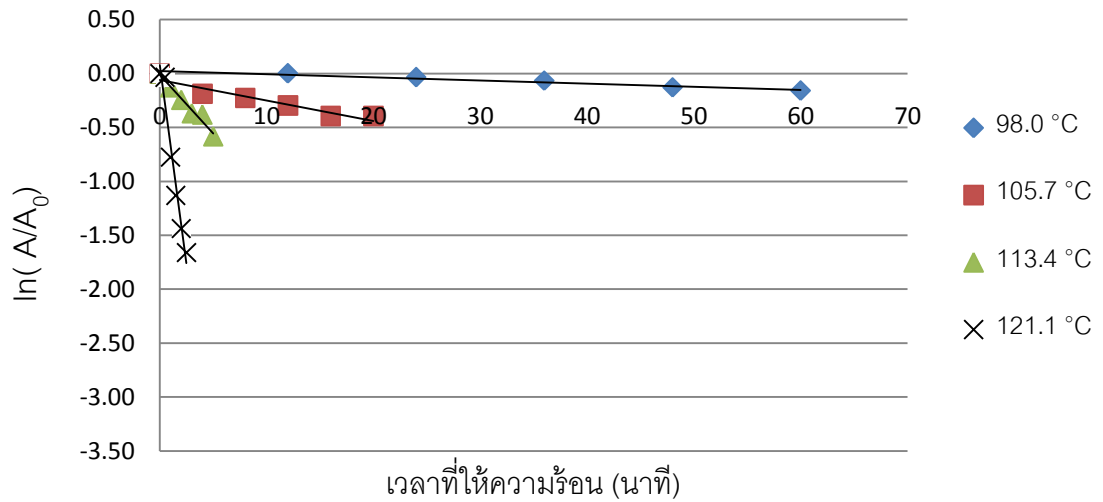
รูปที่ 4.23 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาที) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716, การทดลองซ้ำที่ 1



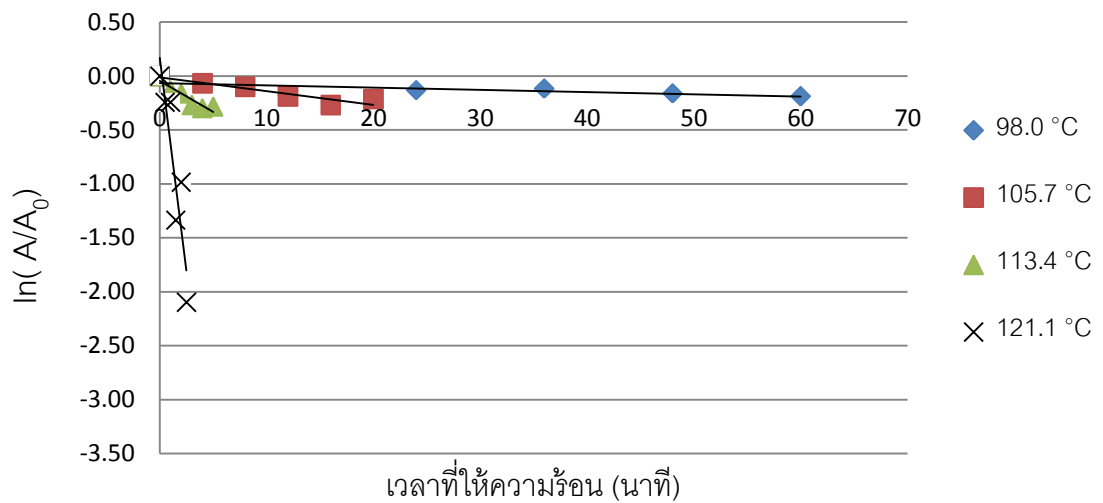
รูปที่ 4.24 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716, การทดลองซ้ำที่ 2



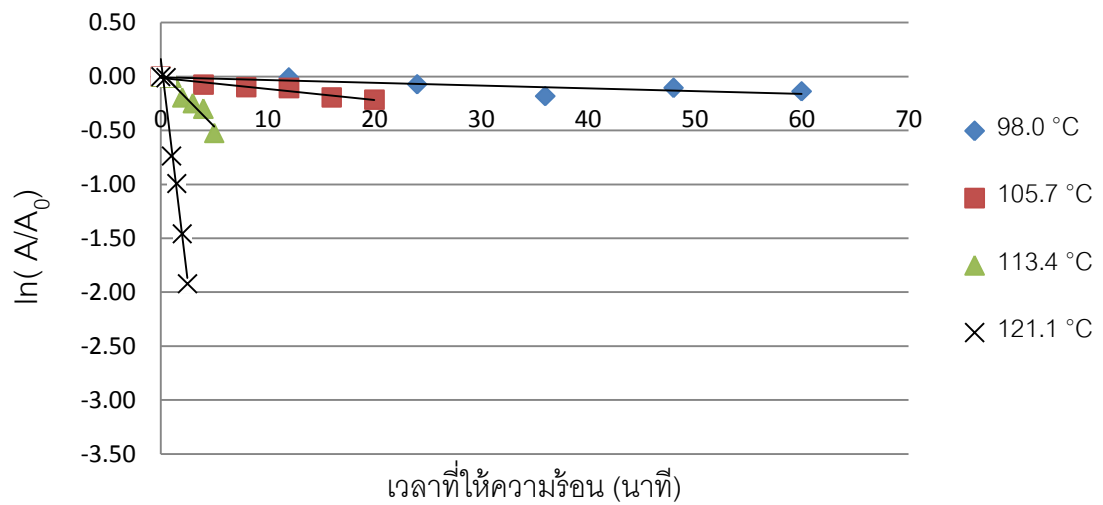
รูปที่ 4.25 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716, การทดลองซ้ำที่ 3



รูปที่ 4.26 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686, การทดลองซ้ำที่ 1

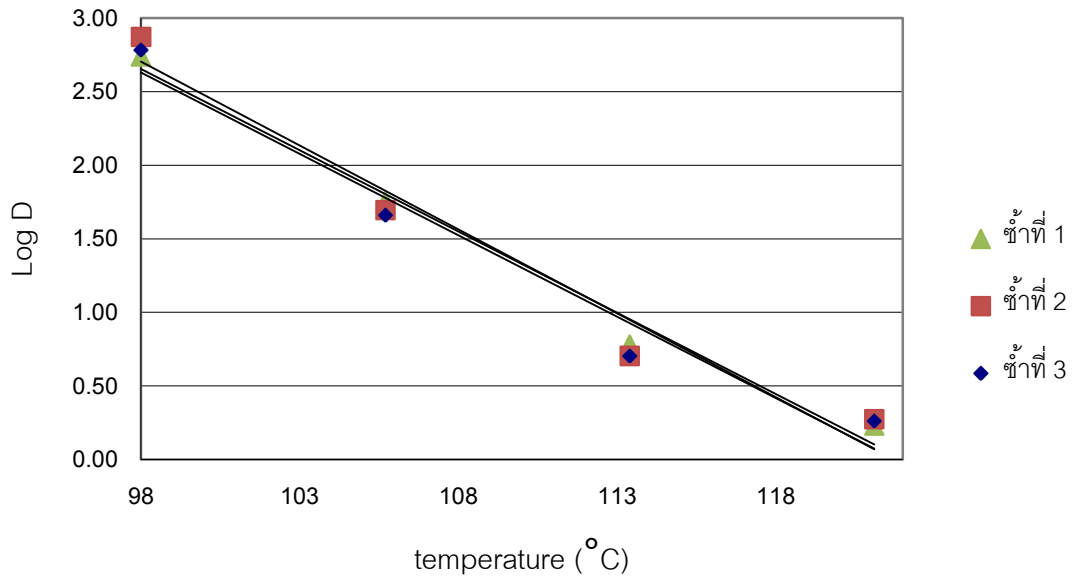


รูปที่ 4.27 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มี ปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686, การทดลองซ้ำที่ 2

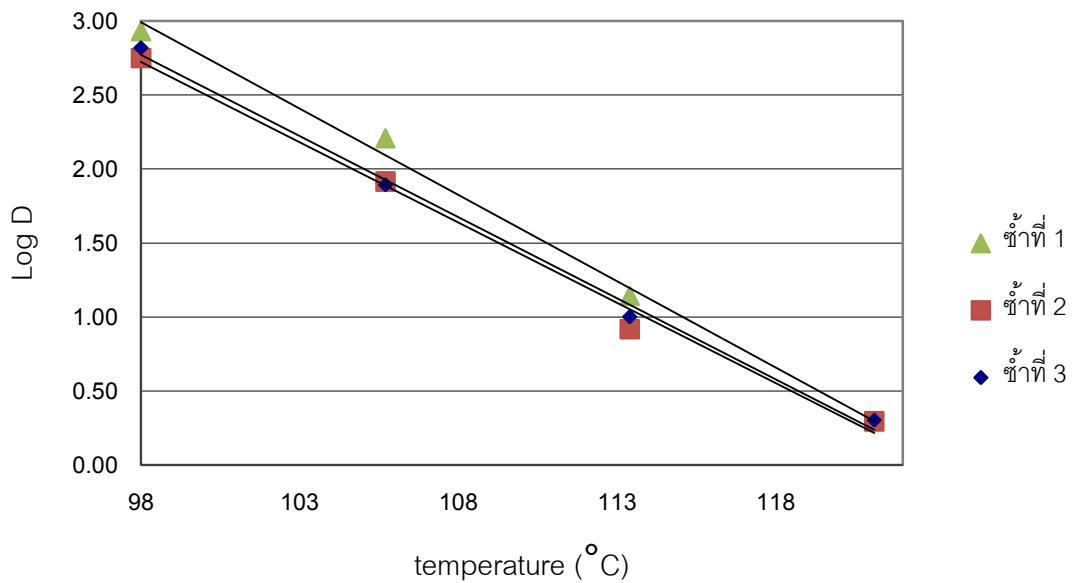


รูปที่ 4.28 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(A/A_0)$ และเวลาให้ความร้อน (นาท) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686, การทดลองซ้ำที่ 3

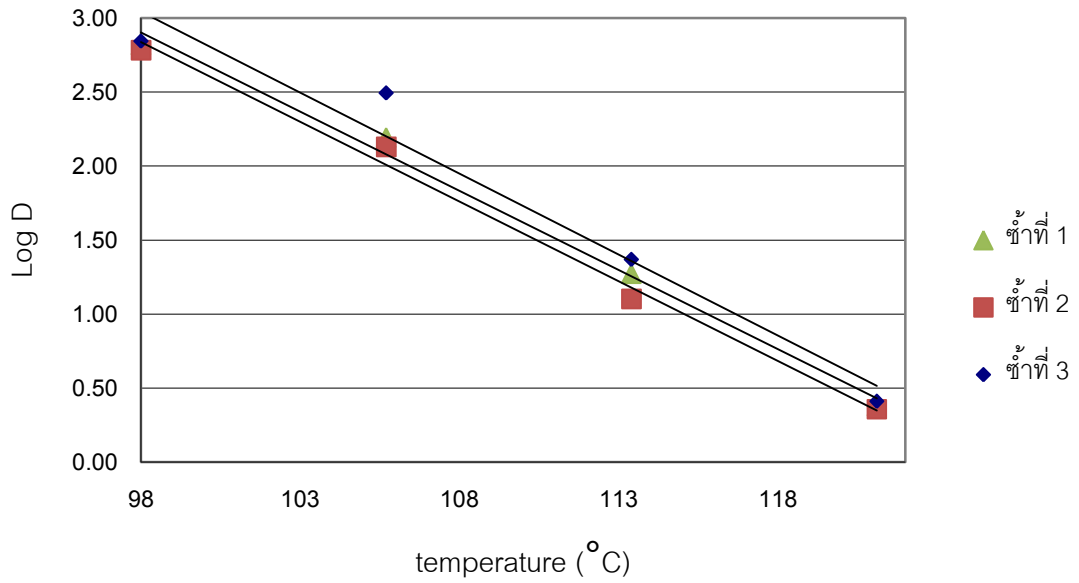
จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\log D$ กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) ดังแสดงในรูปที่ 4.29 ถึง 4.32 พบว่าเอนไซม์ α -amylase มีค่า D ลดลงเมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนเพิ่มสูงขึ้น โดยสามารถหาค่า Z ได้จากสมการเส้นตรง พบว่าเอนไซม์ α -amylase ที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.782, 0.760, 0.716 และ 0.686 มีค่า Z เท่ากับ 8.95, 8.97, 9.25 และ 9.30 $^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ



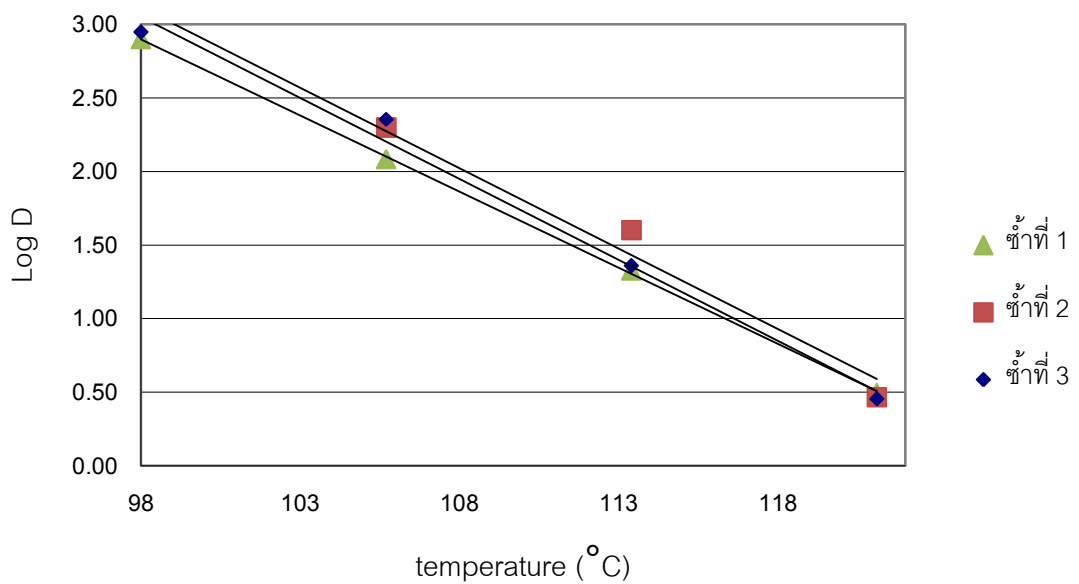
รูปที่ 4.29 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ (°C)เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782, การทดลองซ้ําที่ 1-3



รูปที่ 4.30 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ (°C)เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760, การทดลองซ้ําที่ 1-3



รูปที่ 4.31 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ (°C) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716, การทดลองซ้ําที่ 1-3



รูปที่ 4.32 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D ของเอนไซม์กับอุณหภูมิ (°C) เมื่อเอนไซม์มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686, การทดลองซ้ําที่ 1-3

จากตารางที่ 4.3 พบว่าค่า a_w มีผลต่อความทนความร้อน (ค่า D) และความไวต่อความร้อน (ค่า Z) ของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.2 ภาคผนวก ๓ เมื่อค่า a_w ของเอนไซม์ลดลงจาก 0.826 เป็น 0.686 พบว่าทำให้ค่า D ที่ทุกอุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ที่ปรับค่า a_w เท่ากับ 0.826, 0.782, 0.760, 0.716 และ 0.686 มีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 1.36, 1.80, 1.98, 2.41 และ 2.96 นาทีตามลำดับ ส่วนค่า Z มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเอนไซม์ที่ปรับค่า a_w เท่ากับ 0.826 มีค่า Z เท่ากับ 10.51 $^{\circ}\text{C}$ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับเอนไซม์ที่ปรับค่า a_w เท่ากับ 0.782, 0.760, 0.716 และ 0.686 ที่มีค่า Z เท่ากับ 8.95, 8.97, 9.25 และ 9.30 $^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลของค่า water activity ต่อความทนความร้อนของเอนไซม์ α -amylase ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 70 ppm

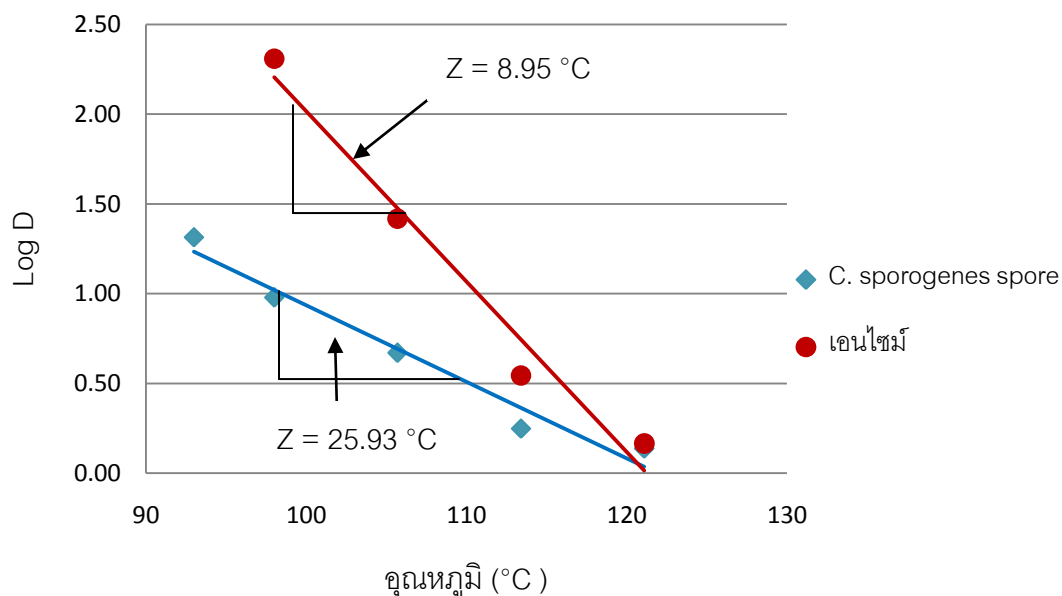
Water activity	ค่า D (นาที)*				ค่า Z (°C)*
	98.0 °C	105.7 °C	113.4 °C	121.1 °C	
0.826	200.27 ^a ±13.14	24.53 ^a ±1.75	3.72 ^a ±0.20	1.36 ^a ±0.12	10.51 ^b ±0.03
0.782	632.43 ^b ±99.93	50.76 ^a ±5.87	5.38 ^a ±0.58	1.80 ^{ab} ±0.09	8.95 ^a ±0.16
0.760	690.89 ^b ±148.39	107.12 ^{ab} ±46.75	10.73 ^{ab} ±2.90	1.98 ^{bc} ±0.03	8.97 ^a ±0.35
0.716	653.98 ^b ±46.05	200.50 ^b ±96.45	18.25 ^{bc} ±5.38	2.41 ^c ±0.15	9.25 ^a ±0.10
0.686	925.52 ^c ±155.13	181.84 ^b ±54.25	28.00 ^c ±10.35	2.96 ^d ±0.15	9.30 ^a ±0.32

* ตัวเลขในตารางแสดงค่า D และค่า Z เฉลี่ย ± ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c, ... ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากข้อมูลข้างต้นกล่าวได้ว่าการปรับลด a_w ของเอนไซม์ส่งผลให้เอนไซม์ทนความร้อนมากขึ้นเนื่องจากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยความร้อน น้ำทำหน้าที่เป็นตัวหล่อลื่นทำให้โครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์มีความยืดหยุ่น การดึงน้ำออกจากโมเลกุลของเอนไซม์จึงส่งผลให้เอนไซม์มีความแข็ง โครงสร้างไม่ยืดหยุ่น จึงถูกทำลายด้วยความร้อนได้ยากขึ้น (Haentjens และคณะ 1998) สอดคล้องกับการทดลองของ Haentjens และคณะ (1998) ที่ได้ศึกษาการใช้ เอนไซม์ α -amylase ทางการค้า 3 ชนิด Ban[®] Thermozyyme[®] และ Termamyl[®] ซึ่งเป็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์ *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* เป็น TTI โดยการปรับค่า water content พบว่าเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะทนความร้อนมากขึ้นเมื่อ water content ลดลง โดยเอนไซม์ α -amylase ที่มีความชื้น 81% มีค่า E_a ที่แสดงถึงความไวต่อความร้อน เท่ากับ 261 kJ/mole มีค่าใกล้เคียงกับสปอร์ของ *C. botulinum* ที่มีค่า E_a เท่ากับ 280 kJ/mole มากที่สุด

จากผลการทดลองเมื่อต้องการเปรียบเทียบความทนความร้อนของเอนไซม์ที่มีการปรับ a_w กับความทนความร้อนของ สปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง พบว่าเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 70 ppm และปรับค่า a_w ของเอนไซม์ให้มีค่าเท่ากับ 0.782 มีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 1.80 นาที ซึ่งใกล้เคียงกับ สปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง ($D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1.75$) มากที่สุด แต่เอนไซม์ดังกล่าวยังมีความไวต่อความร้อน สูงกว่าความไวต่อความร้อนของ สปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมาก สังเกตได้จากค่า Z ของเอนไซม์ที่มีค่า 8.95 $^{\circ}\text{C}$ ต่ำกว่าค่า Z ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง ($Z = 25.93\text{ }^{\circ}\text{C}$) ดังแสดงในรูปที่ 4.33 ผู้ทดลองจึงเลือกเอนไซม์ที่สภาวะดังกล่าวในการพัฒนาใช้เป็น TTI เนื่องจากเอนไซม์ α -amylase ที่มีการปรับปริมาณแคลเซียม 70 ppm และปรับค่า a_w เท่ากับ 0.782 มีจลนศาสตร์การถูกทำลายด้วยความร้อนใกล้เคียงกับ สปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมากที่สุด โดยการที่เอนไซม์มีค่า Z ต่ำกว่า ขณะที่ค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ ใกล้เคียงกัน ทำให้ค่าการถูกทำลายด้วยความร้อน - เวลา (Temperature – time destruction) ของเอนไซม์ มีค่าน้อยกว่าของสปอร์จุลินทรีย์ จึงสามารถใช้ในการคำนวณหรือทำนายการฆ่าเชื้อได้อย่างปลอดภัย



รูปที่ 4.33 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ (°C) ของเอนไซม์ α -amylase ที่มี การปรับปริมาณแคลเซียม 70 ppm และปรับค่า a_w เท่ากับ 0.782 และสปอร์ *C.sporogenes* ในน้ำพริกแกง

4.4 ประสิทธิภาพของการใช้ Time Temperature Integrator (TTI) ที่พัฒนาจากเอนไซม์เพื่อยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงในรีทอร์ทแพคเกจ

4.4.1 ค่า F ที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี General method

การยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อสามารถคำนวณได้จากค่าการฆ่าเชื้อ (F) ค่า F คือระยะเวลาเป็นนาทีที่อุณหภูมิหนึ่งซึ่งใช้ทำลายจุลินทรีย์ในอาหารภายใต้สภาวะที่กำหนด ซึ่งการใช้ค่า F จำเป็นต้องระบุอุณหภูมิ (process temperature) ที่ใช้ และค่า Z ของจุลินทรีย์เป้าหมายด้วย มาตรฐานความปลอดภัยขั้นต่ำของการผลิตอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำจะต้องคำนวณค่า F โดยใช้ค่า Z ของสปอร์ของ *C. botulinum* ($Z = 10.00$ °C) เพื่อความปลอดภัย (Fellows, 1993) ดังนั้นหากต้องการประเมินความปลอดภัยของกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้ TTI ที่พัฒนาขึ้น จึงสามารถเปรียบเทียบค่า F ที่คำนวณได้จากเอนไซม์ที่เลือกใช้เป็น TTI (เอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียม 70 ppm

และปรับค่า a_w เท่ากับ 0.782) ซึ่งมีค่า Z เท่ากับ 8.95 °C กับค่า F ที่คำนวณได้โดยใช้ค่า Z ของสปอร์ของ *C. botulinum* หรือสปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงและ ซึ่งมีค่า Z เท่ากับ 10.00 และ 25.93 °C ตามลำดับ

จากการทดลองฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 111.1, 115.1 และ 121.1 °C จากนั้นคำนวณค่า F จากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาตามวิธี General method (F_{t-T}) ตามสมการที่ 4.1 โดยใช้ค่า Z ของเอนไซม์ที่เลือกใช้เป็น TTI ($Z = 8.95$ °C) พบว่ามีค่า F เท่ากับ 0.75, 1.00 และ 1.09 นาทีเมื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 111.1, 115.1 และ 121.1 °C ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างกับค่า F_{t-T} ที่คำนวณโดยใช้ค่า Z ของสปอร์ของ *C. botulinum* ($Z = 10.00$ °C) ซึ่งมีค่า F_{t-T} เท่ากับ 1.00, 1.24 และ 1.27 นาทีตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) กับค่า F_{t-T} ที่คำนวณจากค่า Z ของสปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง ($Z = 25.93$ °C) ที่มีค่า F_{t-T} เท่ากับ 4.01, 3.62 และ 2.98 นาที เมื่อทดลองฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 111.1, 115.1 และ 121.1 °C ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

$$F_{t-T}^{Z_{t \text{ ang et}}} = \int_0^t 10^{((T-T_{ref})/Z_{t \text{ ang et}})} \times dt \quad (4.1)$$

เมื่อ F_{t-T} คือ ค่าการฆ่าเชื้อที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาตามวิธี General method (นาที)
 T คือ อุณหภูมิที่ตำแหน่งร้อนซ้ำของอาหารทุกๆ t นาที
 T_{ref} คือ อุณหภูมิอ้างอิง (121.1 °C)

ตารางที่ 4.4 ค่า F ที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี General method (F_{t-T})

	ค่า F_{t-T} ที่อุณหภูมิฆ่าเชื้อต่างๆ (นาที) *		
	111.1 (°C)	115.1 (°C)	121.1 (°C)
<i>C. botulinum</i> ($Z = 10.00$ °C)	1.00 ^a ±0.16	1.24 ^a ±0.34	1.27 ^a ±0.28
<i>C. sporogenes</i> ($Z = 25.93$ °C)	4.01 ^b ±0.35	3.62 ^b ±0.70	2.98 ^b ±0.33
เอนไซม์ ($Z = 8.95$ °C)	0.75 ^a ±0.13	1.00 ^a ±0.29	1.09 ^a ±0.26

* ตัวเลขในตารางแสดงค่า F_{t-T} เฉลี่ย ± ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 2 ซ้ำ

a, b, c, ... ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในสดมภ์เดียวกันที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าค่า F_{t-T} ที่คำนวณได้จากค่า Z ของ TTI ใกล้เคียงกับค่า F ที่คำนวณจากสปอร์ของ *C. botulinum* แต่แตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบค่า F ที่คำนวณได้จากสปอร์ของ *C. sporogenes* เนื่องจากค่า D ที่อุณหภูมิต่างๆ และค่า Z ของเอนไซม์ที่เลือกใช้เป็น TTI ($Z = 8.95$ °C) นั้นมีค่าใกล้เคียงกับสปอร์ของ *C. botulinum* ที่มีในรายงานอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำอื่นๆ ($Z = 10.00$ °C) การที่ค่า F_{t-T} ของสปอร์ของ *C. sporogenes* มีค่ามากกว่าค่า F_{t-T} ของสปอร์ของ *C. botulinum* และ TTI เนื่องจากเครื่องเทศที่เป็นส่วนประกอบในน้ำพริกแกงส่งผลให้สปอร์ของ *C. sporogenes* ทนต่อความร้อนสูงที่อุณหภูมิสูง สืบเนื่องจากค่า $D_{121.1}$ °C ของสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า $D_{121.1}$ °C ของ TTI แต่เนื่องจากสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมีค่า Z เท่ากับ 25.93 °C ซึ่งสูงกว่า TTI และ สปอร์ของ *C. botulinum* ที่มีค่า Z เท่ากับ 8.95 และ 10.00 °C ตามลำดับ แสดงว่าสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมีความไวต่อความร้อนสูงกว่า หรือกล่าวได้ว่าที่อุณหภูมิต่ำสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงทนความร้อนได้น้อย จึงส่งผลให้ค่า F หรือค่าการถูกทำลายด้วยความร้อนมีค่าสูงกว่า

4.4.2 ประสิทธิภาพผลของการใช้ TTI ในการยืนยันสภาวะการฆ่าเชื้อ

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพผลของการใช้ TTI ในการยืนยันสภาวะการฆ่าเชื้อ โดยการเปรียบเทียบค่า F ของเอนไซม์ที่คำนวณได้จาก 2 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี General method (F_{t-T}) ตามสมการที่ 4.1 กับวิธีที่ 2 คำนวณจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงระหว่างการให้ความร้อนตามสมการ first order reaction kinetics ในเทอม thermal death time ของเอนไซม์ (F_{TTI}) ตามสมการที่ 4.2 เมื่อคำนวณร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยตามสมการที่ 4.3 พบว่าค่า F ที่คำนวณได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลง (F_{TTI}) มีค่าใกล้เคียงกับค่า F ที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี General method (F_{t-T}) โดยมีร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย เท่ากับ -4.88 , -7.37 และ -9.58 เมื่อทดลองใช้ในกระบวนการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 111.1 , 115.1 และ 121.1 °C ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4.5

$$F_{TTI} = D_{T_{ref}} \log \frac{A_0}{A} \quad (4.2)$$

- เมื่อ F_{TTI} คือ ค่าการฆ่าเชื้อที่คำนวณได้จาก TTI (นาที)
 $D_{T_{ref}}$ คือ ค่า $D_{121.1^{\circ}\text{C}}$ ของเอนไซม์ที่ใช้เป็น TTI (นาที)
 A_0 คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนได้รับความร้อน
 A คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือหลังจากได้รับความร้อนเมื่อเวลาผ่านไป t นาที

$$\text{ร้อยละ ความคลาดเคลื่อน} = \frac{F_{TTI} - F_{t-T}}{F_{t-T}} \times 100 \quad (4.3)$$

ตารางที่ 4.5 ค่า F ของเอนไซม์ที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี
General method และที่คำนวณจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงระหว่างการให้ความ
ร้อนเอนไซม์

อุณหภูมิ (°C)	หัววัด อุณหภูมิ	ซ้ำ	ค่า F_{T-T}^* (General method)	ค่า F_{TT} (กิจกรรมของเอนไซม์)	ร้อยละ ความคลาด เคลื่อน
111.1	1	1	0.67	0.68	0.93
111.1	2	1	0.69	0.61	-11.32
111.1	3	1	0.60	0.57	-5.68
111.1	1	2	0.81	0.77	-5.09
111.1	2	2	0.84	0.79	-5.93
111.1	3	2	0.87	0.85	-2.16
ร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย					-4.88
115.1	1	1	1.46	1.35	-7.52
115.1	2	1	0.83	0.75	-9.11
115.1	3	1	1.32	1.17	-11.55
115.1	1	2	1.01	0.95	-5.58
115.1	2	2	0.71	0.69	-3.31
115.1	3	2	0.64	0.59	-7.13
ร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย					-7.37
121.1	1	1	0.66	0.60	-8.98
121.1	2	1	1.16	1.03	-10.92
121.1	3	1	0.89	0.81	-9.17
121.1	1	2	1.17	1.07	-8.70
121.1	2	2	1.35	1.20	-11.20
121.1	3	2	1.31	1.20	-8.49
ร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ย					-9.58

* คำนวณโดยใช้ค่า Z ของ TTI มีค่าเท่ากับ 8.95 °C

จากผลการทดลองที่ร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยมีค่าติดลบ หรือค่า F_{TTI} มีค่าต่ำกว่าค่า F_{CT} เป็นส่วนใหญ่ นั่น แสดงให้เห็นว่าหากยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อด้วยการใช้ TTI และคิดค่า F จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงนั้น จะสามารถยืนยันความปลอดภัยของกระบวนการฆ่าเชื้อได้ เนื่องจากค่าที่คำนวณได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงมีค่าน้อยกว่าค่า F จริงของกระบวนการ หากการคำนวณค่า F จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงได้เท่ากับ 3 นาทีจะทำให้มั่นใจได้ว่ากระบวนการฆ่าเชื้อดังกล่าวมีค่า F มากกว่า 3 นาทีจริง ผ่านมาตรฐานความปลอดภัยขั้นต่ำของการผลิตอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ สอดคล้องกับการทดลองของ Guivarch และคณะ (2002) ศึกษาจุลนศาสตร์การเสียดสภาพของเอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 81% ด้วยความร้อน มาพัฒนาเป็น TTI พบว่าเอนไซม์เสียดสภาพตามความร้อนที่ได้รับ โดยสามารถติดตามการเสียดสภาพของเอนไซม์ได้จากการลดลงของเอนทาลปีทั้งที่มีการให้ความร้อนเอนไซม์แบบ DSC heating และ oil bath heating โดย TTI ที่พัฒนาขึ้นซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการยืนยันลักษณะการถ่ายเทความร้อน (heat transfer mode) บริเวณจุดร้อนซ้ำของอาหารที่มีชั้นอาหารในระหว่างการฆ่าเชื้อได้ Guivarch และคณะ (2004) พัฒนา TTI จากเอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* ด้วยการตรึงสารผสมระหว่างเอนไซม์ น้ำตาลซูโครส และเกลือบนผิวของเม็ดแก้ว และปรับสภาวะให้มีความชื้นต่ำ (ค่า a_w อยู่ในช่วง 0 ถึง 0.63) เมื่อให้ความร้อนภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิคงที่ (isothermal) พบว่า TTI ที่พัฒนาขึ้นมีความทนความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 100 ถึง 132 °C โดย TTI ที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.48 สามารถใช้ติดตามค่าการฆ่าเชื้อระหว่างการฆ่าเชื้อซึ่งเป็นสภาวะการให้ความร้อนแบบอุณหภูมิไม่คงที่ (non isothermal) ในการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิการฆ่าเชื้อที่ 121.1 °C โดยใช้ TTI ที่มีค่า Z เท่ากับ 9.4 °C พบว่าค่าการฆ่าเชื้ออยู่ในช่วง 0 ถึง 30 นาทีนั้นมีร้อยละความคลาดเคลื่อนจากค่า F_{CT} เฉลี่ย เท่ากับ 14% ดังนั้น TTI ที่มีค่า Z เท่ากับ 9.4 °C จึงเหมาะสมสำหรับติดตามผลของความร้อนที่มีต่อสปอร์ของ *C. botulinum* ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ Tucker และคณะ (2007) ศึกษาการใช้ TTI ที่เหมาะสำหรับการยืนยันสถานะการฆ่าเชื้อ โดยเลือกใช้เอนไซม์อะไมเลสที่ทนความร้อนสูง และสร้างจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ *Pyrococcus furiosus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงถึง 100 °C พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีสมบัติทนทานต่อความร้อนได้ดีเหมาะสำหรับการนำไปใช้เป็น TTI ในกระบวนการฆ่าเชื้อ โดยการทดสอบภายใต้สภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่ 121 °C พบว่า TTI ที่พัฒนาขึ้นมีค่า $D_{121.1^\circ C}$ เท่ากับ 24 นาที และสภาวะการให้ความร้อนแบบอุณหภูมิไม่คงที่ในช่วงอุณหภูมิ 121 ถึง 131 °C TTI ที่พัฒนาขึ้นมีค่า D อยู่ในช่วง 18.1 ถึง 23.9 นาที และมีค่า Z เท่ากับ 10 °C ซึ่งค่าการฆ่าเชื้อที่คำนวณได้จาก TTI มีค่าใกล้เคียงกับค่า F_0 ของการทำลายสปอร์ของ *C. botulinum*

4.5 สภาวะที่เหมาะสมในการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงและสมบัติของน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

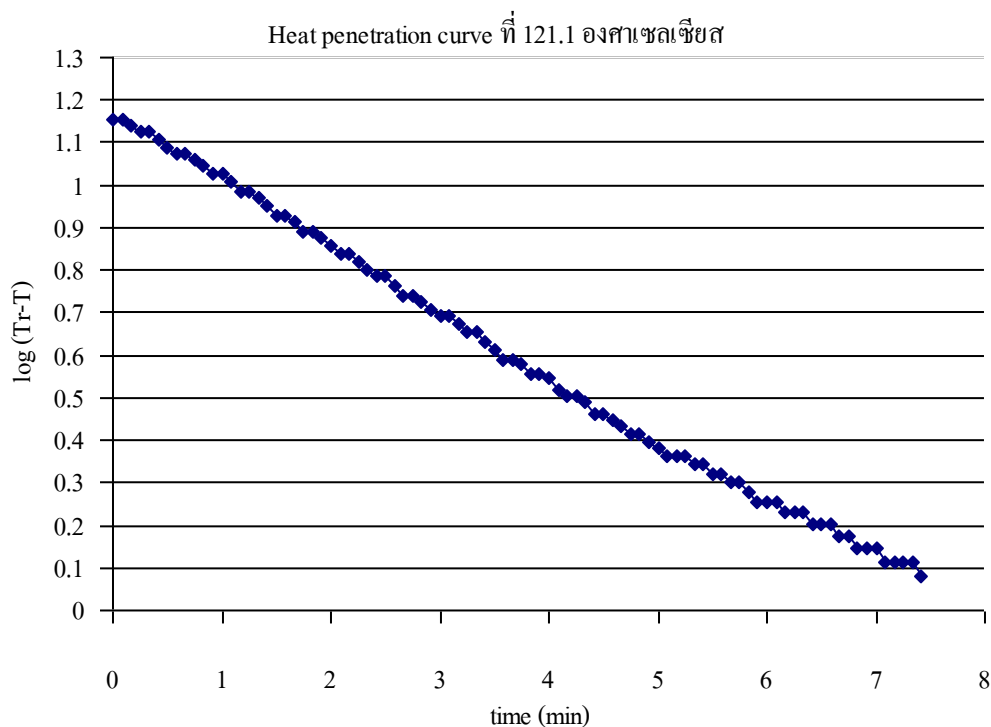
4.5.1 ตำแหน่งร้อนซ้ำในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ

การหาตำแหน่งร้อนซ้ำในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อทำโดยการนำรีทอร์ทเพาซ์ที่บรรจุน้ำพริกแกง มาวางบนตะแกรงของหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ ชั้นละ 5 ถัง จำนวน 10 ชั้น ติดตั้ง thermocouple ในรีทอร์ทเพาซ์ ณ จุดกึ่งกลางของเพาซ์เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอาหารในระหว่างการให้ความร้อน ทำให้ทราบข้อมูลอุณหภูมิของน้ำพริกแกงที่วางในแต่ละตำแหน่งภายในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อ และสามารถหาจุดร้อนซ้ำภายในหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อได้ พบว่าจุดที่อุณหภูมิร้อนซ้ำที่สุด (อุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึง F_0 ที่ต้องการซ้ำที่สุด) คือที่ตำแหน่งที่ 3 ในรูปที่ 3.1 ซึ่งเป็นจุดกึ่งกลางของหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อก่อนมาทางด้านบน เนื่องจาก ตำแหน่งกึ่งกลางถูกล้อมรอบด้วยรีทอร์ทเพาซ์ข้างเคียงทั้งสองด้าน ทำให้น้ำร้อนที่แทรกผ่านเข้ามาเพื่อให้ความร้อนถูกถ่ายเทความร้อนให้กับรีทอร์ทเพาซ์ข้างเคียงเป็นผลให้ตำแหน่งที่ 3 ได้รับความร้อนจากตัวกลางให้ความร้อนน้อย และหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อมีการให้ความร้อนด้วยน้ำร้อน ซึ่งน้ำร้อนจะเพิ่มขึ้นจากด้านล่างของหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อจึงทำให้ตำแหน่งที่ 3 มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นช้ากว่าตำแหน่งที่ 2 ทั้งที่เป็นกึ่งกลางของหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อเช่นกัน ด้วยเหตุผลข้างต้นจึงทำให้น้ำพริกแกงตำแหน่งที่ 3 มีอุณหภูมิถึงจุดที่ต้องการได้ช้าและได้ค่า F_0 เท่ากับ 3 นาทีซ้ำที่สุด

4.5.2 การแทรกผ่านของความร้อนและการคำนวณหาเวลาที่ต้องการใช้ในการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงโดยใช้ formula method

จากการศึกษาการแทรกผ่านของความร้อนของผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงบรรจุรีทอร์ทเพาซ์ น้ำหนักสุทธิ 150 กรัม โดยอุณหภูมิเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิฆ่าเชื้อ $121.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ เมื่อนำข้อมูลอุณหภูมิ ณ จุดร้อนซ้ำในช่วงฆ่าเชื้อ ที่ $121.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ มาพลอตกราฟ heat penetration curve (รูปที่ 4.34) ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการฆ่าเชื้อและ $\log(T_r - T)$ เมื่อ T_r และ T คืออุณหภูมิของหม้อหนึ่งฆ่าเชื้อและอุณหภูมิของอาหารที่จุดร้อนซ้ำตามลำดับ จากกราฟจะได้ค่า f_0 เท่ากับ 6.22 นาที ค่า j เท่ากับ 1.00 และค่า IT เท่ากับ $106.14\text{ }^{\circ}\text{C}$ ซึ่งสามารถนำไปทำนายเวลาที่ต้องการในการฆ่าเชื้อได้ พบว่าสำหรับการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ $121.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ จะต้องใช้เวลาในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 12.03 นาที น้ำพริกแกงจึงจะมีค่า F_0 เท่ากับ 3 นาที เมื่อทดลองฆ่าเชื้อโดย

ใช้สภาวะที่คำนวณได้ พบว่าการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 121.1 °C เพื่อให้ได้ค่า F_0 เท่ากับ 3 นาที ใช้เวลาให้ความร้อนจริงเป็นเวลา 8 นาที และใช้เวลาในขั้นตอนการทำให้เย็นเพื่อให้อุณหภูมิภายในอาหารมีค่าเท่ากับ 55 °C เท่ากับ 42 นาทีดังแสดงในตารางที่ 4.6



รูปที่ 4.34 กราฟ Heat penetration curve ที่ 121.1 °C

ตารางที่ 4.6 เวลาในการฆ่าเชื้อของน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 121.1 °C

f_h (นาที)	IT (°C)	j	U (นาที)	f_h/U	g (°C)	Predicted sterilization time (นาที)	Actual sterilization time (นาที)	Cooling * (นาที)
6.22	106.14	1.00	3.00	2.07	1.13	12.03	8	42

*sterilize ถึง F_0 เท่ากับ 3 นาที ณ จุดร้อนช้า

*ทำการลดอุณหภูมิลงถึง 55 °C

จากการคำนวณเวลาการฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงเพื่อให้มีค่า F_0 เท่ากับ 3 นาที ตามวิธี Formula จะเห็นว่าเวลาการฆ่าเชื้อที่คำนวณได้มีค่ามากกว่าสภาวะการผลิตจริง จึงถือว่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการทดลองและนำมาคำนวณนี้สามารถนำมาใช้ในการคำนวณเวลาการฆ่าเชื้อของผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ได้อย่างปลอดภัยในกรณีที่ต้องการเปลี่ยนสภาวะการผลิต แต่ก่อนที่จะนำสภาวะการผลิตที่คำนวณได้ไปใช้ในการผลิตจริงควรมีการยืนยัน โดยการหาค่าการฆ่าเชื้อของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อภายใต้ภาชนะนั้นอีกครั้ง

สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่หรือเปลี่ยนแปลงสูตรต่างออกไปจากเดิม จำเป็นต้องศึกษาระดับอุณหภูมิและปริมาณความร้อนที่ต้องการทำลายจุลินทรีย์ที่มีในวัตถุดิบหรือมีเฉพาะในบริเวณนั้น แม้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจไม่เป็นอันตรายแต่อาจเป็นสาเหตุของการเน่าเสียได้ โดยปกติแล้วจะใช้จุลินทรีย์ที่มีความทนทานต่อความร้อนมากกว่า *C. botulinum* เพื่อให้แน่ใจในความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ (ทิพาพร อยุธยา, 2535) เช่น *B. stearothermophilus* แต่จากการสำรวจเอกสารการตรวจจุลินทรีย์ในเครื่องเทศที่เป็นส่วนประกอบของน้ำพริกแกงและน้ำพริกแกงที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่พบการเจริญของ *B. stearothermophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนสูงชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดการเน่าเสียแบบ flat sour ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ นอกจากนี้ *B. stearothermophilus* เป็น thermophile ซึ่งน้ำพริกแกงจะเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40°C จึงไม่เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าว ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องมุ่งทำลายหรือทดสอบ thermal inactivation kinetics ของจุลินทรีย์นั้น

กุลวดี ครอบพาณิชย์ กาญจนิจ วาจนะวินิจ และ อูไร เผ่าสังข์ทอง (2533) วิเคราะห์และแยกจุลินทรีย์ที่สามารถทนความร้อนได้สูงสุดในน้ำพริกแกงบรรจุกระป๋อง เพื่อนำมาศึกษาความทนทานต่อความร้อนของจุลินทรีย์ชนิดนี้ๆ พบว่ามีแบคทีเรียชนิด *Corybacterium sp.* ซึ่งแบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงและเป็นพวกที่ใช้อากาศ จึงไม่น่าจะเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของน้ำพริกแกงบรรจุกระป๋อง แต่เนื่องจากน้ำพริกแกงเป็นลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลวอาจเกิดโพรงอากาศขึ้นบางจุดในกระป๋อง จึงทดลองศึกษาความทนความร้อนของจุลินทรีย์ดังกล่าว พบว่ามีค่า D_{230} เท่ากับ 3.3 ถึง 8.5 นาที ค่า Z เท่ากับ 37.5°F และค่า F_{250} เท่ากับ 1.59 ถึง 1.83 นาที ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อนน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิฆ่าเชื้อ 230°F ถ้าน้ำพริกแกงมีอุณหภูมิเริ่มต้นไม่ต่ำกว่า 131.7°F และอัตราการถ่ายเทความร้อนไม่มากกว่า 26 นาที จะต้องใช้เวลาในการฆ่าเชื้อไม่ต่ำกว่า 50 นาที

ชัยรัตน์ วิลาสมงคลชัย (2546) ตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของวัตถุดิบที่เป็นส่วนผสมของน้ำพริกแกง พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.3 ถึง 7.92 log CFU/g ตรวจ

พบ *C. perfringens* ในตัวอย่างกระเทียม ตะไคร้ พริกชี้ฟ้าแห้ง รากผักชี และหอมแดง ปริมาณ 0.001 กรัม ไม่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* sp. ในทุกตัวอย่างเมื่อใช้ตัวอย่างปริมาณ 25 กรัม และพบการปนเปื้อนของ *S. aureus* 78 CFU ในตัวอย่างตะไคร้ปริมาณ 1 กรัม สอดคล้องกับการทดลองของ สิริพร สธนเสาวภาคย์ และคณะ (2539) ที่ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำพริกสำเร็จรูปได้แก่ หัวหอม กระเทียม กุ้งแห้ง พริกแห้ง และกะปิ พบว่า วัตถุดิบเหล่านี้มีการปนเปื้อนด้วยราและแบคทีเรียในปริมาณสูง ซึ่งสาเหตุมาจากการเก็บรักษาที่ไม่ถูกสุขลักษณะ โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีค่าอยู่ระหว่าง 4.279 ถึง 7.778 log CFU/g และตรวจพบ *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* และ *C. perfringens* ซึ่งในพริกแห้งมีจุลินทรีย์ดังกล่าวปนเปื้อนมากที่สุด โดยเฉพาะ *C. perfringens* เป็นจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ ทนความร้อนได้ดี และการปนเปื้อนส่วนใหญ่มาจากฝุ่นละอองและดิน และเมื่อนำวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำพริกแกงมาอบที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ลดลง

4.5.3 ผลการ วิเคราะห์สมบัติของน้ำพริกแกงสด น้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอายุการเก็บผลิตภัณฑ์

น้ำพริกแกงสดมีค่า pH และ ค่า a_w เท่ากับ 4.81 และ 0.97 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 จึงจัดเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำเนื่องจากมีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.6 ถึง 6.8 (อัญชดีศิริโชติ, 2531) และมีค่า a_w สูงกว่า 0.90 (Hocking และ Christian, 1995) น้ำพริกแกงมีสีแดงสด โดยมีค่า L^* a^* และ b^* เท่ากับ 32.78, 21.49 และ 17.68 และมีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.038 N/mm เมื่อนำผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงในรีโอร์ทเพาซ์มาผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.1 °C เป็นเวลา 8 นาที พบว่า ผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงในรีโอร์ทเพาซ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่า pH และค่า a_w เท่ากับ 4.89 และ 0.97 ตามลำดับ สี ลักษณะสีแสดงโดยค่า L^* a^* และ b^* เท่ากับ 34.65, 17.57 และ 16.54 และลักษณะเนื้อสัมผัส พบว่าค่า Young's modulus เท่ากับ 0.020 N/mm ดังแสดงในตารางที่ 4.7

โดยค่า pH ของน้ำพริกแกงสดนั้นไม่มีแตกต่างจากน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้ออย่างมีนัยสำคัญสถิติ ($p > 0.05$) แต่แตกต่างกับน้ำพริกแกงที่เก็บรักษานาน 1 และ 2 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.3 ภาคผนวก ๓ ค่า a_w ของน้ำพริกแกงสด น้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และน้ำพริกแกงเก็บรักษานานทุกๆ เดือน เป็นเวลา 5 เดือน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.3 ภาคผนวก ๓ เนื่องจากน้ำพริกแกง

บรรจุอยู่ในรีโอร์ทเพาซ์ซึ่งมีคุณสมบัติป้องกันการผ่านเข้าออกของอากาศและน้ำได้เป็นอย่างดี ดังนั้น การฆ่าเชื้อและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีผลทำให้ค่า a_w ของน้ำพริกแกงเปลี่ยนแปลง สำหรับค่าสี ที่วัดได้จากเครื่องวัดสี นั้นพบว่าน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่า L^* (ความสว่าง) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.3 ภาคผนวก ๓ เมื่อเทียบกับน้ำพริกแกงที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ เมื่อพิจารณาค่า a^* (สีแดง) ของน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่า a^* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำพริกแกงที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.3 ภาคผนวก ๓ ซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารพวกแคโรทีน อันเป็นรงควัตถุหลักในพริกที่ให้สีแดงในน้ำพริกแกง เมื่อรงควัตถุเหล่านี้สลายไปจะทำให้สีแดงในผลิตภัณฑ์อาหารมีสีซีดจางลง (ศิริมา สุขพันธ์, 2540) แต่หลังจากเก็บรักษาน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อนาน 5 เดือน พบว่าค่า L^* และค่า b^* (สีเหลือง) ของน้ำพริกแกงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.3 ภาคผนวก ๓ น้ำพริกแกงสดมีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.038 N/mm ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีค่า Young's modulus เท่ากับ 0.020 N/mm ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ ๓.3 ภาคผนวก ๓

น้ำพริกแกงสดมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด 5 log CFU/g และไม่พบ *E.coli* *C. perfringens* *S. aureus* *Salmonella* sp. และ *B. cereus* จึงจัดว่ามีความปลอดภัยตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (ภาคผนวก ก) หลังฆ่าเชื้อน้ำพริกแกงที่สภาวะ 121.1°C นาน 8 นาทีเพื่อให้ได้ค่า F_0 เท่ากับ 3 นาที พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญ การเพิ่มจำนวนของสปอร์และเซลล์แบคทีเรียได้ทุกชนิด ทำให้ผลการตรวจจุลินทรีย์ในน้ำพริกหลังผ่านการฆ่าเชื้อและน้ำพริกแกงที่เก็บเป็นระยะเวลา 5 เดือน ไม่พบจุลินทรีย์ที่มีโอกาสเจริญและก่อโรคในน้ำพริกแกง ทั้งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียในกลุ่ม Thermophilic flatsour bacteria, Mesophilic flatsour bacteria, Mesophilic anaerobes และ Thermophilic anaerobes ตามมาตรฐานอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำในภาชนะบรรจุปิดสนิทของ Bacteriological Analytical Manual (BAM, USFDA (January 2001)) ดังแสดงในตารางที่ 4.8 ซึ่งเหตุที่ต้องทำการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์เหล่านี้เนื่องจากน้ำพริกแกงจัดอยู่ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำและบรรจุในรีโอร์ทเพาซ์เพื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสภาวะแวดล้อมที่เก็บรักษาน้ำพริกแกงเหล่านี้เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประเภทดังกล่าว

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์สมบัติของน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121.1 °C และผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 5 เดือน

สมบัติของน้ำพริกแกง	น้ำพริกแกง ก่อนฆ่าเชื้อ	น้ำพริกแกงฆ่า เชื้อ*	อายุการเก็บน้ำพริกแกงผ่านการฆ่าเชื้อ**				
			1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน
pH	4.81±0.02 ^{ab}	4.89±0.13 ^{abc}	4.95±0.01 ^c	4.94±0.01 ^c	4.78±0.01 ^{bc}	4.78±0.04 ^a	4.81±0.01 ^{ab}
a _w ^{ns}	0.97±0.004	0.97±0.004	0.96±0.008	0.94±0.009	0.94±0.024	0.97±0.01	0.92±0.01
L*	32.78±0.68 ^a	34.65±1.01 ^b	36.30±0.72 ^c	36.08±1.30 ^{bc}	36.39±0.29 ^c	36.36±0.10 ^c	36.85±0.74 ^c
สี a*	21.49±0.75 ^a	17.57±0.68 ^b	23.52±1.09 ^{cd}	22.60±0.79 ^{bc}	24.95±0.51 ^d	24.95±0.39 ^d	26.60±0.74 ^e
b*	17.68±0.69 ^a	16.54±1.19 ^a	22.54±0.79 ^b	22.94±1.39 ^b	21.43±0.58 ^b	21.43±0.37 ^b	22.62±0.71 ^b
ลักษณะเนื้อสัมผัส							
Young's modulus ^{ns} (N/mm)	0.038±0.014	0.020±0.008	-	-	0.026±0.008	-	0.030±0.017

* น้ำพริกแกงฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.1 °C เป็นเวลา 8 นาที (ค่า F₀ เท่ากับ 3 นาที)

** ตัวเลขในตารางแสดงค่าเฉลี่ย ± ด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน, จำนวนซ้ำของการทดลองตามแสดงในวิธีการทดลอง

a, b, c, ... ตัวอักษรที่กำกับตัวเลขในแถวเดียวกันที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

- หมายความว่า ไม่ได้ทำการวิเคราะห์เนื่องจากเครื่องมือเสีย

ตารางที่ 4.8 การวิเคราะห์จุลินทรีย์ของน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121.1 °C และผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 5 เดือน

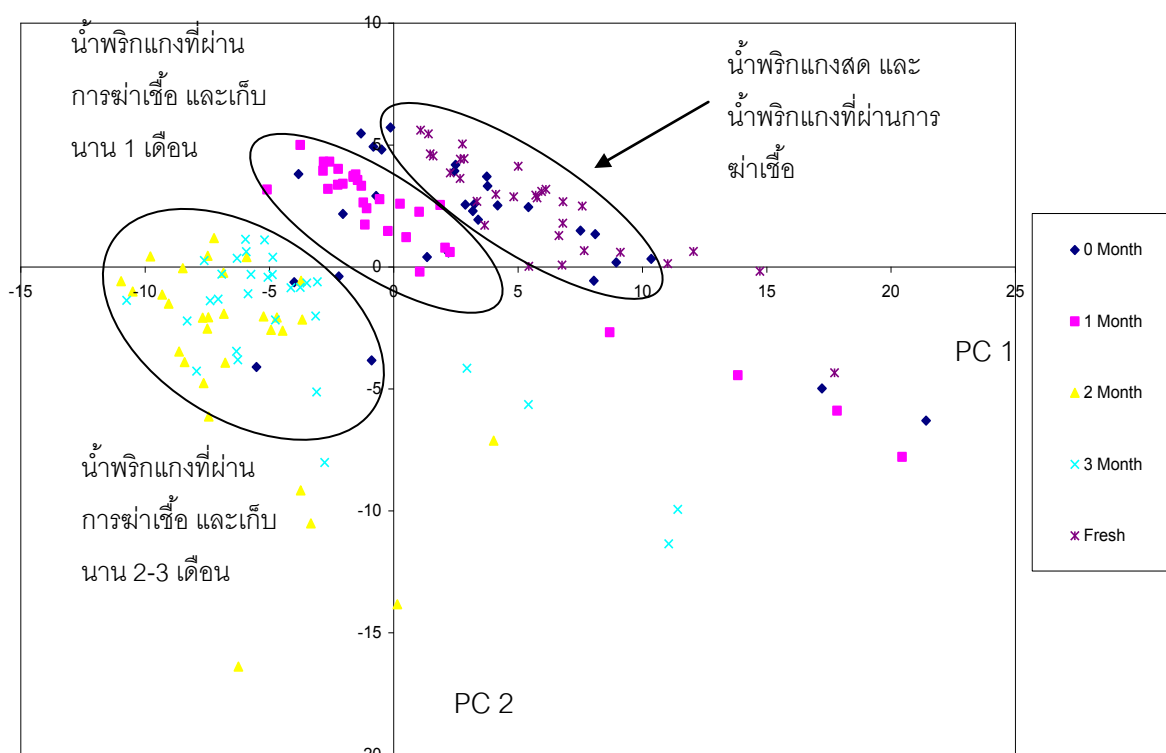
สมบัติของน้ำพริกแกง	น้ำพริกแกงสด	น้ำพริกแกง ฆ่าเชื้อ	อายุการเก็บน้ำพริกแกงผ่านการฆ่าเชื้อ**				
			1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน
รา, CFU/g	2.51 log CFU/g	-	-	-	-	-	-
<i>E.coli</i> , MPN/g	น้อยกว่า 3	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i> / 0.1g	ไม่พบ	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> / g	ไม่พบ	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> sp. / 25g	ไม่พบ	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> / g	ไม่พบ	-	-	-	-	-	-
Total plate count, CFU/g	5.00 log CFU/g	None	55 CFU/g	None	None	None	None
Thermophilic flatsour bacteria/2g	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Mesophilic flatsour bacteria/2g	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Mesophilic anaerobes/2g	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
Thermophilic anaerobes/2g	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative

* น้ำพริกแกงฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121.1 °C เป็นเวลา 8 นาที (ค่า F₀ เท่ากับ 3 นาที)

** ผลิตภัณฑ์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28-30 °C

- หมายถึง ไม่ได้วิเคราะห์ เนื่องจากเป็นกรณีวิเคราะห์น้ำพริกแกงในภาชนะบรรจุแบบปิดสนิท

รูปที่ 4.35 แสดงการจัดกลุ่มของข้อมูลกลิ่น โดยใช้จมูกอิเล็กทรอนิกส์ (E-nose) พบว่า น้ำพริกแกงสดและน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีจุดบนกราฟบนแกนสำคัญลำดับที่ 1 และ 2 กระจายตัวซ้อนทับกัน แสดงว่ากลิ่นของน้ำพริกแกงสดและเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อใกล้เคียงกัน แต่หลังจากเก็บรักษาน้ำพริกแกงนาน 1 2 และ 3 เดือนพบว่าจุดบนกราฟมีการกระจายตัวออกจาก น้ำพริกแกงสดและน้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อมากขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บรักษา แสดงว่ากลิ่นมีแนวโน้มต่างกันมากขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บรักษา



รูปที่ 4.35 กราฟแสดงการจัดกลุ่มของข้อมูล (Principal component analysis, PCA) ระหว่าง น้ำพริกแกงสด น้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อและหลังจากเก็บรักษานานทุก 1 เดือน โดยใช้จมูกอิเล็กทรอนิกส์ (E-nose)

มาตรฐานอุตสาหกรรมว่าด้วยเรื่องของน้ำพริกแกง กำหนดว่าน้ำพริกแกงต้อง มีลักษณะทั่วไปคือ มีสี กลิ่น รส ตามชนิดของน้ำพริกแกงชนิดนั้นๆ (มาตรฐานอุตสาหกรรม, 254 8) ดังนั้นในการประเมินผลของน้ำพริกแกงจึงจำเป็นสำหรับใช้ในการประเมินอายุการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อ สุเมธนา วัฒนสินธุ์ และคณะ (2543) ได้พบว่า ผลการประเมินด้านกลิ่นทางประสาทสัมผัส เป็นดัชนีชี้วัดการเสียของอาหารจำพวกเครื่องเทศ และ น้ำพริกแกงได้อย่างเหมาะสมที่สุด สำหรับการประเมินกลิ่นรสทางประสาทสัมผัสใช้วิธีดูสี และดม

กลิ่นของน้ำพริกแกง หากผิดปกติไปจากเดิมมากจะไม่นำมาปรุงอาหารเพราะจะได้แกงที่มีคุณสมบัติยอมรับไม่ได้

ชัยรัตน์ วิลาสมงคลชัย (2546) รายงานว่าออกซิเจนในอากาศมีผลต่อการเสียของน้ำพริกแกงสดที่ไม่ได้มาจากจุลินทรีย์ นั่นคือ ปัจจัยทางเคมี โดยปกติพืชจะมีการสร้างเอนไซม์ภายในเซลล์เพื่อใช้ในกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีพ ซึ่งสับสเตรทส่วนใหญ่ก็อยู่ภายในเซลล์เช่นเดียวกัน แต่จะอยู่ต่างตำแหน่งภายในเซลล์ กระทั่งเซลล์เกิดความผิดปกติ เช่นเกิดการกระแทกจากแรงภายนอกจนเซลล์แตก เอนไซม์ก็จะมาทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ ซึ่งเอนไซม์จำพวกออกซิโดรีดักเทส เช่น พอลิฟีนอลออกซิเดส ไลพอกซิเจเนส และไลเปส ก็เป็นเอนไซม์ที่พืชสร้างขึ้นตามปกติ ในสัดส่วนที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด เมื่อนำสมุนไพรเครื่องเทศมาบดให้เป็นน้ำพริกแกงเซลล์จะแตก ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเกิดขึ้นโดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนหรือปฏิกิริยาออกซิเดชัน เกิดเป็นสารที่มีสี และกลิ่นเฉพาะตัว (ปราณี อานเป็รื่อง , 2543) จึงมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นน้ำพริกแกงเกิดขึ้น และน้ำมันหอมระเหยยังถูกทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ ทำให้โครงสร้างเปลี่ยนไปซึ่งเป็นสาเหตุของกลิ่นที่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการนำน้ำพริกแกงไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน จึงสามารถทำลายเอนไซม์ที่พืชสร้างขึ้นได้ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยความร้อน น้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อจึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน แต่สาเหตุที่น้ำพริกแกงมีกลิ่นเปลี่ยนแปลงไปหลังจากเก็บรักษานาน 2 และ 3 เดือนนั้น อาจเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาตัวเองของสารจำพวก volatile compound เกิดเป็นสารประกอบที่มีกลิ่นเปลี่ยนแปลงไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

สปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 1.75 นาที และค่า Z เท่ากับ $25.93\text{ }^{\circ}\text{C}$ ขณะที่การปรับปริมาณแคลเซียมและลดค่า a_w ของเอนไซม์ α -amylase ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมทำให้เอนไซม์มีความทนความร้อนใกล้เคียงกับสปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงมากที่สุด โดยเอนไซม์ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 70 ppm และมีค่า a_w เท่ากับ 0.786 มีค่า $D_{121.1\text{ }^{\circ}\text{C}}$ เท่ากับ 1.80 นาที และค่า Z เท่ากับ $8.95\text{ }^{\circ}\text{C}$

จากการศึกษาการใช้ TTI ที่มีจลนศาสตร์การถูกทำลายด้วยความร้อนใกล้เคียงกับสปอร์ *C. sporogenes* มากที่สุดมาใช้ยืนยันสภาวะการฆ่าเชื้อพบว่า ค่า F ที่คำนวณได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลง (F_{TTI}) มีค่าใกล้เคียงกับค่า F ที่คำนวณจากข้อมูลอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนด้วยวิธี General method (F_{LT}) โดยมีร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยเท่ากับ -4.88, -7.37 และ -9.58 เมื่อทดลองใช้ในกระบวนการฆ่าเชื่อน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 111.1, 115.1 และ 121.1 $^{\circ}\text{C}$ ตามลำดับ จากร้อยละความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยมีค่าติดลบ หรือค่า F_{TTI} มีค่าต่ำกว่าค่า F_{LT} แสดงให้เห็นว่าหากใช้การยืนยันสภาวะการฆ่าเชื้อด้วยการใช้ TTI และคิดค่า F_{TTI} นั้น จะสามารถยืนยันความปลอดภัยของกระบวนการฆ่าเชื้อได้

จากการศึกษาการแทรกผ่านของความร้อนของน้ำพริกแกงในรีโพรทเพอร์ช เมื่อกำหนดค่าการฆ่าเชื้อด้วยค่า F_0 เท่ากับ 3 นาที พบว่าการฆ่าเชื่อน้ำพริกแกงที่อุณหภูมิ 121.1 $^{\circ}\text{C}$ ทำนายเวลาในการฆ่าเชื้อได้เท่ากับ 12.03 นาที เมื่อทดลองฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 121.1 $^{\circ}\text{C}$ พบว่าใช้เวลาให้ความร้อนในช่วงฆ่าเชื้อเป็นเวลา 8 นาที และเวลาในขั้นตอนการทำให้เย็นนาน 42 นาที หลังการฆ่าเชื่อน้ำพริกแกงที่สภาวะดังกล่าว พบว่าน้ำพริกแกงมีค่าสี L^* เพิ่มขึ้นและค่าสี a^* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับพริกแกงที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ และการฆ่าเชื้อที่สภาวะดังกล่าวทำให้ผลการตรวจจุลินทรีย์ในน้ำพริกหลังผ่านการฆ่าเชื้อและพริกแกงที่เก็บเป็นระยะเวลา 5 เดือน ไม่พบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียในกลุ่ม Thermophilic flatsour bacteria, Mesophilic flatsour bacteria, Mesophilic anaerobes และ Thermophilic anaerobes ผลการวัดกลิ่นโดยใช้จมูกอิเล็กทรอนิกส์ (E-nose) พบว่าพริกแกงสดและพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีกลิ่นเฉพาะของพริกแกงใกล้เคียงกัน แต่หลังจากเก็บรักษาพริกแกงพบว่ากลิ่นแตกต่างจากพริกแกงสดมากขึ้นตามระยะเวลาที่เก็บรักษา

5.2 ข้อเสนอแนะ

แอนติบอดีในสภาวะที่เลือกใช้เป็น TTI ยังมีค่า Z ต่างจากสปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง ควรมีการพัฒนาให้มีความใกล้เคียงกันมากขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กวรรณิการ์ พรหมเสาร์ และนันทา เบญจศิลารักษ์. 2542. แกะรอยสำรับไทย. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์วรรณรักษ์
- กุลวดี ตรองพาณิชย์, กาญจนกิจ วาจนะวินิจ และ อุไร เผ่าสังข์ทอง. 2533. การศึกษากรรมวิธี การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนของน้ำพริกแกงบรรจุกระป๋อง. การประชุมเสนอผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ครั้งที่ 2 สาขาสังคมศาสตร์ มนุษยศาสตร์และวิทยาศาสตร์, 302-314. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ชัยรัตน์ วิชาสมคงชัย. 2546. การใช้โคไตซาน พีเอช และวอเตอร์แอคทีวิตี เป็นเฮลธ์ดีไลในการยืดอายุการเก็บน้ำพริกแกง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ทิพาพร อยู่วิทยา. 2535. การกำหนดกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน. อาหาร 22(4): 39-50.
- บัญญัติ ศรีสุขงาม. 2527. เครื่องเทศที่ใช้เป็นสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อมรการพิมพ์.
- ปราณี อ่านเป็รื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ไพบูลย์ ธรรมรัตน์वासिक. 2532. กรรมวิธีการแปรรูปอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.
- มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม , สำนักงาน. 2548. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำพริกแกง. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม
- สมศรี เจริญเกียรติกุล. 2545. คุณค่าอาหารไทยเพื่อสุขภาพ. วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 35: 1-59.
- สาธารณสุข, กระทรวง. กองควบคุมโรค. สำนักระบาดวิทยา. 2549. โรคอาหารเป็นพิษ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://epid.moph.go.th/> [22 พฤศจิกายน 2550]
- สิริพร สธนเสาวภาคย์, ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และกาญจนิจ วาจนะวินิจ. 2539. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในวัตถุดิบสำหรับผลิตน้ำพริกสำเร็จรูปและการศึกษาระยะเวลาในการอบเพื่อลดปริมาณ. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ 30: 193-199.

- สิริมา สุขพรรณ. 2541. ผลของการทำแห้งโดยใช้ลมร้อนต่อปริมาณบีตา-แคโรทีนในแครอท.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทาง
อาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุมนทนา วัฒนสินธุ์, สมโภช พจนพิมล, วรางคณา สมพงษ์, ศิริพร พิพัฒน์สัตยานุวงศ์ และ สาย
สนม ประดิษฐ์ ดวง. 2543. รายงานวิจัยเรื่องการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษา
เครื่องแกงเผ็ดและอาหารเครื่องปรุงแต่งกลิ่น-รสของไทย. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- สุมนทนา วัฒนสินธุ์, สายศิริ ศิลปวุฒิ และ มยุรา วงษ์ยี่หวา. 2543. สมบัติยับยั้งแบคทีเรียบาง
ชนิดของเครื่องเทศสดในสูตรเครื่องแกงเผ็ด. รายงานประชุมสัมมนาวิชาการโครงการ
สมองไหลกลับ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 2 คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- อรอง จันท์ประสาทสุข. 2545. กระบวนการผลิตน้ำพริกแกงกระป๋องโดยเทคโนโลยีเฮอริเดิล.
วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาคเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย.
- อัญชลี ศิริโชติ. 2531. กรรมวิธีการแปรรูปอาหารโดยใช้ความร้อนสูง. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.

ภาษาอังกฤษ

- A.O.A.C. 1990. Official method of analysis. 15th ed. Washington DC: The Association of
official analytical chemists.
- Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E. 1974. Burgey's Manual of Determinative
Bacteriology. 18th ed. Waverly press.
- Cellini, L., Campi, E. D., Masulli, M., Bartolomeo, S. D., and Allocati, N. 1996. Inhibition
of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). FEM Immunology and
medical Microbiology 13: 273-277.
- Chung, H. J., Birla, S. L., and Tang, J. 2008. Performance evaluation of aluminium test
cell designed for determining the heat resistance of bacterial spores in foods.
Food Science and Technology 41: 1351-1359.
- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., and Montville, T. J. 1997. Food Microbiology
Fundamentals and Frontiers. Washington, D.C.: ASM Press.

- Fellows, P. 1993. Food processing technology: principles and practice. Newyork: Ellis Horwood Limited.
- Guiavarch, Y., Dintwa, E., Loey, A. V., Zuber, F. T., and Hendickx, M. E. 2002. Validation and use of an enzymic time-temperature integrator to monitor thermal impacts inside a solid/liquid model food. Biotechnology Progress 18: 1087-1094.
- Guiavarch, Y., Loey, A. V., Zuber, F., and Hendickx, M. 2004. *Bacillus licheniformis* α -amylase immobilized on glass beads and equilibrated at low moisture content: potentials as a time-temperature integrator for sterilization processes. Innovative Food Science and Emerging Technologies 5: 317-325.
- Haentjens, T. H., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E., and Tobback, P. P. 1998. The use of amylase at reduced water content to develop time temperature integrators for sterilization processes. Food Research International 31: 467-472
- Hardman, R. 1972. Spices and herbs: their families, secretory tissues and pharmaceutical ascects. Proceedings of the conference on spices. Tropical Products Institute, London School of Pharmacy, U.K.
- Hocking, A. D., and Christian, J. H. B. 1995. Microbial ecology interactions in the processing of foods. In G.V. Barbosa-Canovas and J. Welti-chanes (ed.). Food preservation by moisture control: Fundamentals and application, pp.553-574. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing.
- Jay, M. J., Loessner, M. J., and Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology. 17th ed. New York: Springer Science Business Media, Inc.
- Jones, N.L., Shabib, S., and Sherman, P. M. 1997. Capsaicin as an inhibitor of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. FEMS Microbiology Letters 146: 223–227.
- Kim J., Marshall, M. R., and Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal Agricultural and Food Chemistry 43: 2839–2845.
- Kormendy, I., and Farkas, C. M. 2000. Heat treatment and the defective units' ratio: surviving active spores in pea puree. Journal of Food Engineering 45: 225-300.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. 2003. Brock Biology of Microorganisms. 10th ed. Pearson Education, Inc.
- Maria, I. B., Laura, I. T., and Fernandez, R. A. 2008. Presence of *Clostridium botulinum* spores in Matricaria chamomilla (chamomile) and its relationship with infant botulism. International Journal of Food Microbiology 121: 357-360.
- Naim, F., Zareifard, M. R., Zhu, S., Huizing, R. H., Grabowski, S., and Marcotte, M. 2008. Combined effects of heat, nisin and acidification on the inactivation of *Clostridium sporogenes* spores in carrot-alginate particles: From kinetics to process validation. Food Microbiology 25: 936-941.
- Ocio, M. J., Sanchez, T., Fernandez, P. S., Rodrigo, M., and Martinez, A. 1994. Thermal resistance characteristics of PA 3679 in the temperature range of 110–121 °C as affected by pH, type of acidulant and substrate. International Journal of Food Microbiology 22 : 239-247.
- O’Leary, W. M. 1989. Practical Handbook of Microbiology. 2nd ed. NewYork : CRC Press, Inc.
- Ozlem, K., Muammer, G., Haydar, O., and Ahmet, K. 2006. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in turkey. Food Control 17: 222-224.
- Paul, G. L. 2002. Foodborne Pathogens. CRC PRESS, LLC.
- Ray, B. 2001. Fundamental food microbiology. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC.
- Stumbo, C. R. 1973. Thermobacteriology in Food Processing. 2nd ed. New York: Academic Press.
- Tucker, G. S., Cox, P. W., Brown, H. M., Bakalis, S., Fryer, P. J., and Adams, M. W. 2006. Application of a novel enzymatic sterilization Time Temperature Integrator. IUFoST 1283-1292.
- US Food and Drug Administration (FDA). 2001. Bacteriological Analytical Manual [Online]. Available from:
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109398.html>. [2009, November 9]

US Food and Drug Administration (FDA). 2002. Bacteriological Analytical Manual
[Online]. Available from: [http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/Laboratory
Methods/ Bacteriological AnalyticalManualBAM/ucm064948.html](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm064948.html). [2009,
November 9]

US Food and Drug Administration (FDA). 2007. Bacteriological Analytical Manual
[Online]. Available from: [http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/
LaboratoryMethods/ Bacteriological AnalyticalManualBAM/ucm070149.html](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070149.html).
[2009, November 9]

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมพริกแกง
(มอก. 429-2525)

ก.1 ขอบข่าย

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้กำหนด ประเภท ส่วนประกอบ คุณลักษณะที่ต้องการ วัตถุดิบอาหาร สุขลักษณะ ภาชนะบรรจุ ปริมาณ เครื่องหมายและฉลาก การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน และการตรวจสอบและการวิเคราะห์น้ำพริกสำหรับนำไปแกง

ก.2 บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนี้ มีดังต่อไปนี้
น้ำพริกแกง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากส่วนผสมที่บดแล้วอาจผสมกับกะทิหรือน้ำมันบริโภคชนิดอื่นก็ได้ แล้วนำไปให้ความร้อนจนแห้ง หรือไม่แห้งก็ได้แล้วแต่ประเภทของน้ำพริกแกงโดยรักษาคุณภาพและกลิ่นรสของน้ำพริกแกงนั้นๆไว้ นำไปใช้ได้ทันที

ก.3 ประเภท

น้ำพริกแกงแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

- 1 ประเภทเปียก (curry paste)
- 2 ประเภทแห้ง (dried curry paste)

ก.4 ส่วนประกอบ

ส่วนประกอบที่ใช้ทำน้ำพริกแกงต้องมีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการบริโภคและไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ

1 ส่วนประกอบที่สำคัญ

1.1 เครื่องแกงและเครื่องเทศต่างๆ เช่น พริกสด พริกแห้ง ตะไคร้ ผิวมะกรูด หัวหอม กระเทียม ข่า รากผักชี ลูกผักชี ยี่ห่วย พริกไทย

1.2 เกลือบริโภค

2 ส่วนประกอบที่อาจมีได้

2.1 กะปิ

2.2 กะทิหรือน้ำมันบริโภค

2.3 อื่นๆ (ถ้ามี)

3 เครื่องปรุงแต่งกลิ่นรส ได้แก่

- 3.1 น้ำปลา
- 3.2 น้ำตาล
- 3.3 มะขามเปียก
- 3.4 อื่นๆ (ถ้ามี)

ก.5 คุณลักษณะที่ต้องการ

1 ลักษณะทั่วไป

1.1 น้ำพริกแกงต้องมีสี กลิ่นรสตามชนิดของน้ำพริกแกงและกลิ่นต้องไม่เปลี่ยนแปลงไปจากกลิ่นปกติของน้ำพริกแกงชนิดนั้นๆ จนรู้สึกได้ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นหืน

1.2 เมื่อนำมาปรุงตามส่วนและวิธีทำที่แจ้งไว้ที่ฉลากแล้ว จะต้องสุกรับประทานได้ภายในเวลา 10 นาที สำหรับแกงที่ใช้เนื้อหรือกะทิ 2 ถ้วยตวง (ประมาณ 500 ลูกบาศก์ เซนติเมตร)

เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ 12.1 แล้วต้องได้คะแนนรวมเฉลี่ยไม่น้อย

กว่า 2.8 คะแนน และแต่ละคุณลักษณะต้องไม่มีระดับคะแนน 1 คะแนน

2 ความชื้น

- 2.1 ประเภทเปียก ไม่เกินร้อยละ 40 โดยน้ำหนัก
- 2.2 ประเภทแห้ง ไม่เกินร้อยละ 9 โดยน้ำหนัก

3 เกลือ

- 3.1 ประเภทไม่แห้ง ไม่เกินร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก
- 3.2 ประเภทแห้ง ไม่เกินร้อยละ 15 โดยน้ำหนัก

4 อะฟลาทอกซิน ต้องไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ก.6 วัตถุเจือปนอาหาร

1 ห้ามใช้วัตถุเจือปนอาหารต่อไปนี้

- 1.1 สีสังเคราะห์

2 ให้ใช้วัตถุเจือปนอาหารได้ตามชนิดและปริมาณที่กำหนดดังนี้

- 2.1 วัตถุกันหืน และวัตถุกันเสีย ให้เป็นไปตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่า

ด้วยเรื่องวัตถุเจือปนอาหาร

ก.7 สุขลักษณะ

1 สุขลักษณะในการทำน้ำพริกแกงให้เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กำหนดสุขลักษณะของอาหาร มาตรฐานเลขที่ มอก.34

2 ในการทำน้ำพริกแกงผู้ทำต้องใช่วิธีปฏิบัติที่ดีที่สุดเพื่อจะไม่ให้มีสิ่งแปลกปลอมอันไม่พึงประสงค์ปรากฏอยู่ในผลิตภัณฑ์

3 น้ำพริกแกงยอมให้มีจุลินทรีย์ได้ตามเกณฑ์ที่กำหนดดังนี้

จำนวนรา (mold) ต่อกรัมของตัวอย่าง ไม่เกิน 10 โคโลนี

จำนวน อี โคไล (*E.coli*) โดยวิธี MPN ต่อกรัมของตัวอย่าง น้อยกว่า 3 โคโลนี

คลอสทริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (*Clostridium perfringens*)

ใน 0.01 กรัมของตัวอย่าง ต้องไม่พบ

สตาฟีโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*)

ใน 0.01 กรัมของตัวอย่าง ต้องไม่พบ

ซาลโมเนลลา (*Salmonella*) ใน 25 กรัม ของตัวอย่าง ต้องไม่พบ

ก.8 ภาชนะบรรจุ

ภาชนะที่ใช้บรรจุต้องสะอาดแห้ง ปิดได้สนิท ป้องกันความชื้นได้ และผิวภายในต้องไม่มีปฏิกิริยากับอาหารที่บรรจุ

ก.9 ปริมาณ

น้ำหนักสุทธิของน้ำพริกแกงในแต่ละภาชนะบรรจุต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

ก.10 เครื่องหมายและฉลาก

1 ฉลากให้เป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม คำแนะนำทั่วไปเกี่ยวกับฉลาก สำหรับผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มาตรฐานเลขที่ มอก.31

2 ที่ภาชนะบรรจุน้ำพริกแกงทุกหน่วยอย่างน้อยต้องมี เลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้อย่างชัดเจน

(1) คำว่า “น้ำพริกแกง” พร้อมทั้งชื่อแกง เช่น น้ำพริกแกงเขียวหวาน

(2) ประเภท

(3) ส่วนประกอบสำคัญ

(4) ข้อความว่า “ใช้วัตถุดิบเหิน” และ/หรือ “ใช้วัตถุดิบเสียบ”

(5) น้ำหนักสุทธิ เป็น กรัม

- (6) เดือน ปี ที่ทำ
- (7) วิธีทำเพื่อรับประทาน
- (8) ชื่อผู้ทำหรือโรงงานที่ทำ และสถานที่ตั้ง
- (9) ชื่อประเทศที่ทำ

3 ที่กล่องภาชนะบรรจุพริกแกงทุกกล่อง อย่างน้อยต้องมีเลขอักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดตามข้อ ก10 /2(1) (6) (8) และ (9) และจำนวนหน่วยภาชนะบรรจุในแต่ละกล่องให้เห็นได้ง่ายและชัดเจน

4 การทำเครื่องหมายในข้อ ก10 /2 และ ก10/3 ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศด้วย ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทย

5 ผู้ทำผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมที่เป็นไปตามมาตรฐานนี้ จะแสดงเครื่องหมายมาตรฐานกับผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมนั้นได้ ต่อเมื่อได้รับใบอนุญาตจากคณะกรรมการมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแล้ว

ภาคผนวก ข
จลนศาสตร์การทำลายสปอร์ *Clostridium sporogenes* ในน้ำพริกแกง
ด้วยความร้อน

ข.1 วิธีการคำนวณค่า D และค่า Z จากกราฟความอยู่รอด

กราฟความอยู่รอดเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่ (นาทีก) ดังแสดงในรูปที่ ข.1 เพื่อหาค่า D ได้จากสมการที่ ข. 1 หรือกล่าวได้ว่าค่า D เท่ากับ $-1/\text{slope}$ ของกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวดังแสดงในตารางที่ ข. 1 จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) เพื่อหาค่า Z ดังแสดงในรูปที่ ข.2

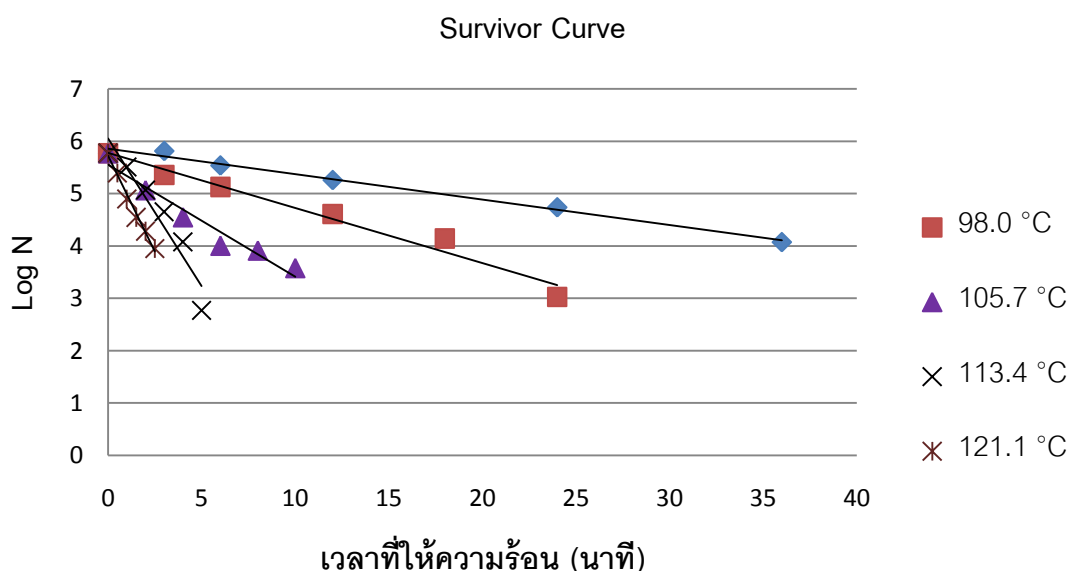
$$D = \frac{t}{\text{Log}(N/N_0)} \quad \text{ข.1}$$

เมื่อ D คือค่าคงที่อัตราการตาย (นาทีก)

t คือเวลาที่ให้ความร้อน (นาทีก)

N_0 คือปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น

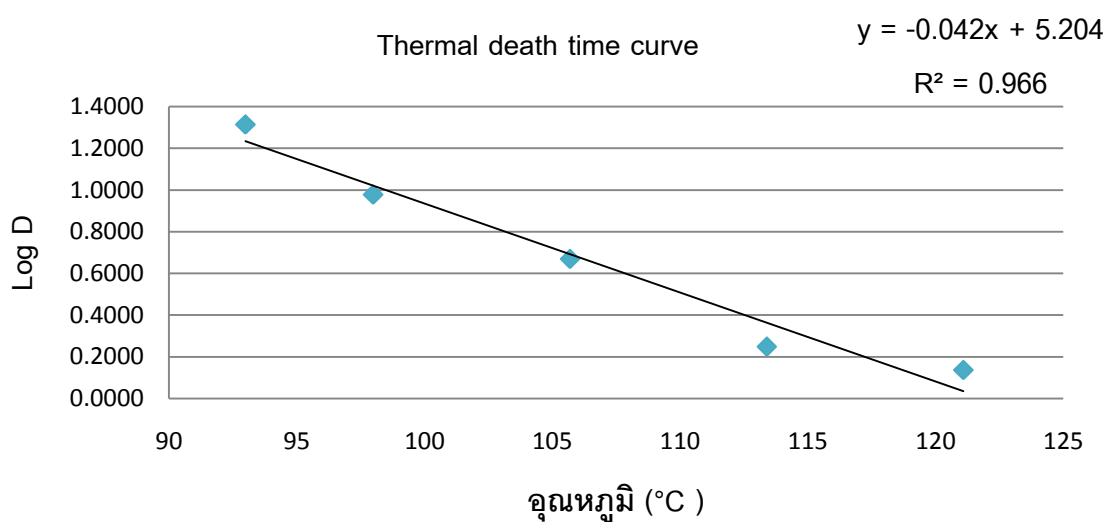
N คือปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่เมื่อเวลาผ่านไป t นาทีก



รูปที่ ข.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ที่รอดชีวิต (Log CFU/g) กับเวลาที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ (นาทีก)

ตารางที่ ข.1 ตารางแสดงความชันจากกราฟความอยู่รอดและค่า D ที่แต่ละอุณหภูมิ

อุณหภูมิ (°C)	ความชันของเส้นกราฟ	D (นาที)	Log D
93	-0.0485	20.6186	1.3143
98	-0.1051	9.5147	0.9784
105.7	-0.2138	4.6773	0.6700
113.4	-0.5636	1.7743	0.2490
121.1	-0.7295	1.3708	0.1370



รูปที่ ข.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ (°C)

ข.2 จำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงหลังให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลา
ต่างๆ, ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ ข.2 จำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงเริ่มต้น (N_0) และจำนวนสปอร์
C. sporogenes ในน้ำพริกแกงที่เหลือ (N) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลา
ต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	จำนวนสปอร์ <i>C. sporogenes</i> (N) หลังให้ความร้อน (log CFU/g)		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
93.0	0	5.89	5.89	5.77
	3	5.51	5.74	5.82
	6	5.52	5.74	5.54
	12	5.11	5.26	5.26
	24	4.88	4.86	4.74
	36	4.05	4.2	4.08
98.0	0	5.89	5.89	5.77
	3	5.4	5.3	5.36
	6	4.9	4.94	5.13
	12	4.74	4.52	4.61
	18	3.98	3.84	4.15
	24	3.23	3.26	3.03
105.7	0	5.41	5.99	5.77
	2	4.52	5.43	5.07
	4	4.31	5.03	4.55
	6	3.97	4.55	4.01
	8	3.78	4.14	3.91
	10	3.54	3.69	3.58

ตารางที่ ข.2 (ต่อ) จำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงเริ่มต้น (N_0) และจำนวนสปอร์ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกงที่เหลือ (N) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ และเวลาต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	จำนวนสปอร์ <i>C. sporogenes</i> (N) หลังให้ความร้อน (log CFU/g)		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
113.4	0	5.41	5.99	5.77
	1	4.91	5.66	5.51
	2	4.72	5.3	5.07
	3	4.12	4.83	4.65
	4	3.91	4.68	4.08
	5	3.7	3.57	2.77
121.1	0	5.41	5.99	5.77
	0.5	5.07	5.62	5.39
	1.0	4.68	5.35	4.9
	1.5	4.54	5.31	4.55
	2.0	4.45	4.77	4.29
	2.5	4.33	4.57	3.95

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis*ค.1 เอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis*

1. ลักษณะผลิตภัณฑ์

ชื่อทางการค้า Termamyl® 120L. Type L

ประเภทเอนไซม์ α -amylase

กิจกรรมของเอนไซม์ 120 KNU-T/g

สี น้ำตาลสว่างถึงน้ำตาลเข้ม

ลักษณะทางกายภาพ ของเหลว

ความหนาแน่น 1.26 กรัมต่อมิลลิลิตร

ความหนืด 1-25 cPs

สารเพิ่มความคงตัว เมทไทโอนีน

โซเดียมคลอไรด์

ซูโครส

จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ *Bacillus licheniformis*

2. รายละเอียดผลิตภัณฑ์

ตารางที่ ค.1 รายละเอียดเอนไซม์ α -amylase

	Lower Limit	Upper Limit	Unit
Alpha Amylase Units KNU-T	120	138	/g
ค่า pH ที่อุณหภูมิ 25 °C	5.5	7.0	
ความหนาแน่น	-	-	g/ml
Total Viable Count	-	50000	/g
Coliform Bacteria	-	30	/g
Enteropathogenic <i>E.Coli</i>		None Detected	/25g
<i>Salmonella</i>		None Detected	/25g

3. สภาวะการเก็บรักษา

ควรใช้ก่อน ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพดีนาน 3 เดือน นับจากวันขนส่งเมื่อเก็บรักษาใน สภาวะที่แนะนำ

อุณหภูมิในการเก็บรักษา 0-25 °C (32-77 °F)

สภาวะในการเก็บรักษา ในภาชนะปิดสนิท แห้ง ไม่โดนแสงแดด ความชื้นและอุณหภูมิสูงมีผลทำให้อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สั้นลง

4. ความปลอดภัย

เอนไซม์คือโปรตีน อาจเกิดอาการแพ้ในเฉพาะบุคคล เอนไซม์บางชนิดทำให้เกิดการระคายเคืองผิวหนัง ตา และระบบเนื้อเยื่อทางเดินหายใจ เมื่อสัมผัสเป็นระยะเวลานาน

ค.2 วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis* ในหน่วย KNU/g

1. หลักการ

วิธีดังกล่าวอาศัยหลักการที่เอนไซม์ตัดสายสตาร์ช และการเกิดสีน้ำเงินของสตาร์ชกับ สารละลายไอโอดีน ถ้าสตาร์ชถูกตัดสายโดยการทำงานของเอนไซม์จะส่งผลให้สีน้ำเงินลดลงจนกระทั่งกลายเป็นสีน้ำตาลแดง

สภาวะการเกิดปฏิกิริยา

อุณหภูมิ 37 °C \pm 0.5 °C

pH 5.6

Ca²⁺ content ประมาณ 0.0003 M

2. คำจำกัดความของหน่วย KNU

1 KNU (Kilo Novo Unit) คือปริมาณเอนไซม์ที่ตัดสายสตาร์ช 4870 g น้ำหนักแห้ง ต่อ ชั่วโมงภายใต้สภาวะมาตรฐาน

3. สารเคมีและสารตั้งต้น

3.1 สารละลาย CaCl₂, 0.43 M, pH 7.0

ซึ่ง CaCl₂·2H₂O 63.22 กรัม และ Tris 1.10 กรัม เทใส่ขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 900 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl ให้มีค่า pH เท่ากับ 7.0 \pm 0.1 และปรับปริมาตรจนได้ 1000 มิลลิลิตร

3.2 สารละลายไอโอดีน A (stock solution)

ซึ่ง KI 22.00 กรัม ละลายในในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร เทใส่ขวดปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ละลาย I_2 ในขวดปริมาตร และใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 500 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายไอโอดีน B

ซึ่ง KI 80.00 กรัม เทใส่ขวดปริมาตรขนาด 2000 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายไอโอดีน A ปริมาตร 8.0 มิลลิลิตร และใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 500 มิลลิลิตร

3.4 สารละลายเกลือ (Salt stock solution)

ซึ่ง NaCl 9.36 กรัม KH_2PO_4 69.00 กรัม และ $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 4.80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ใส่ขวดปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH ให้มีค่า pH เท่ากับ 5.2 ± 0.1 และใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 1000 มิลลิลิตร

3.5 สารละลายสตาร์ช

ละลายสตาร์ชในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเทซัสเพนชันดังกล่าวในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นเดือด ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งอยู่บน hot stirring plate ปล่อยให้เดือดนาน 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและเทใส่ขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เติมสารละลายเกลือที่เตรียมในข้อที่ 3.4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 1000 มิลลิลิตร

4. วิธีการ

เตรียมสารละลายสตาร์ชในข้อ 3.5 ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร วางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ $37.0^\circ C$ นานประมาณ 10 นาที

เตรียมสารละลายเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยละลายในน้ำกลั่น เช่น น้ำกลั่น 8.0 มิลลิลิตร เอนไซม์ 2.0 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 5.0 มิลลิลิตร เอนไซม์ 5.0 มิลลิลิตร หรือ น้ำกลั่น 0 มิลลิลิตร เอนไซม์ 10.0 มิลลิลิตร ตามกิจกรรมของเอนไซม์และตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมไว้ข้างต้นใส่ในสารละลายสตาร์ชที่เตรียมไว้ กวนสารผสมให้เข้ากัน จับเวลาในการเริ่มปฏิกิริยา

ปิเปตสารผสมที่ทำปฏิกิริยาอยู่ใส่ปริมาตร 1 มิลลิลิตรในสารละลายไอโอดีน B ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร เขย่าเพื่อสังเกตสีของสารผสมจนกลายเป็นสีน้ำตาลแดง อ่านเวลาในการทำปฏิกิริยา (เวลาที่ทำปฏิกิริยาควรอยู่ในช่วง 7 ถึง 20 นาที)

$$\text{Activity / g} = \frac{F \times V \times f_2}{t \times a \times 2 \times 1000} = \text{KNU/g}$$

ค.1

$$F = F [\text{min} \times \text{NU}] = \frac{60\text{min}/\text{hour} \times 20\text{ml} \times 6.95\text{mg}/\text{ml}}{X\text{mg} \cdot \text{starch} \cdot \text{degraded}/[\text{hour} \times \text{NU}]}$$

ค.2

20 ~ สารละลายสตาร์ช 20 มิลลิลิตร

6.95 ~ สตาร์ช 6.95 มิลลิกรัมต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร

X ~ สตาร์ชที่ย่อย X มิลลิกรัมต่อชั่วโมงต่อ NU

2 ~ สารละลายเอนไซม์ 2 มิลลิลิตร (ขึ้นกับปริมาตรที่ใช้ทดลองจริง)

a = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

V = ปริมาตรน้ำกลั่นที่ละลายตัวอย่างเอนไซม์ a กรัม

t = เวลาที่ทำปฏิกิริยา (นาที)

f₂ = dilution factor

ภาคผนวก ง

ความคงทนต่อความร้อนของเอนไซม์ α -amylase ที่สร้างจาก *B. licheniformis*

- ง.1 วิธีการคำนวณค่า D และค่า Z จากกราฟการเสียดสภาพตามอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนภายใต้สภาวะการให้ความร้อนแบบอุณหภูมิคงที่ของเอนไซม์ α -amylase

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าล็กอกรธรรมชาติของอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากได้รับความร้อนต่อกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ($\ln A/A_0$) และเวลาที่ให้ความร้อน (นาที) ดังแสดงในรูปที่ ง. 1 เพื่อหาค่า D ได้จากสมการที่ ง.1 และ ง.2 หรือกล่าวได้ว่าค่า D เท่ากับ $-2.303/\text{slope}$ ของกราฟความสัมพันธ์ดังกล่าวดังแสดงในตารางที่ ง. 1 จากนั้นสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) เพื่อหาค่า Z ดังแสดงในรูปที่ ง.2

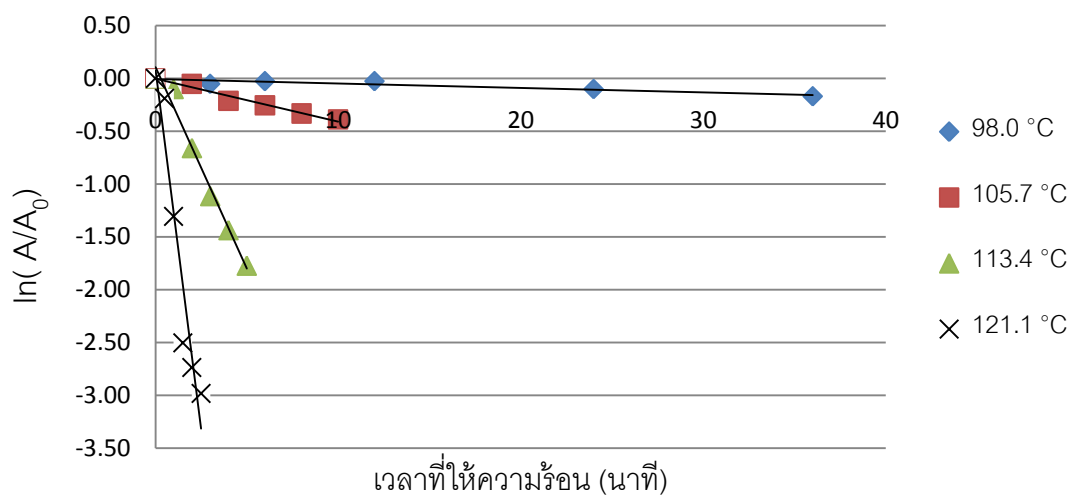
$$\ln \frac{A}{A_0} = -kt \quad \text{ง.1}$$

$$\log \frac{A}{A_0} = -\frac{1}{D} t \quad \text{ง.2}$$

เมื่อ k คือค่าคงที่ของปฏิกิริยา

A_0 คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ก่อนได้รับความร้อน

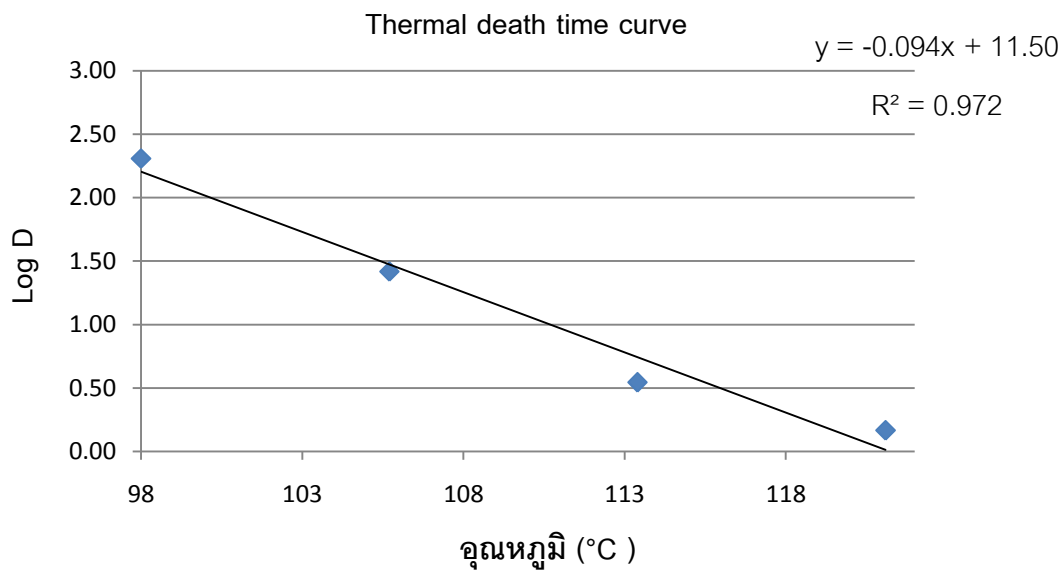
A คือค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือหลังจากได้รับความร้อนเมื่อเวลาผ่านไป t นาที



รูปที่ ง.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของอัตราส่วนระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากได้รับความร้อนต่อกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้น ($\ln A/A_0$) และเวลาให้ความร้อน (นาที)

ตารางที่ ง.1 ความชันจากกราฟและค่า D ที่แต่ละอุณหภูมิ

อุณหภูมิ (°C)	ความชัน (k)	D (นาที)	Log D
98	-0.0113	203.81	2.3092
105.7	-0.0879	26.20	1.4183
113.4	-0.6568	3.51	0.5449
121.1	-1.5724	1.46	0.1657



รูปที่ ง.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log D กับอุณหภูมิ (°C)

ง.2 การเสียดสภาพตามอุณหภูมิและเวลาที่ได้รับความร้อนภายใต้สภาวะการให้ความร้อนแบบอุณหภูมิคงที่ของเอนไซม์ α -amylase ที่มีการปรับสภาวะต่างกัน

ตารางที่ ง.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 20 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อน		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
98.0	0	117.11	115.7	106.67
	3	110.34	106.67	106.67
	6	94.44	100.00	103.33
	12	91.50	100.00	97.06
	24	72.73	86.55	88.89
	36	74.46	71.15	69.70
	105.7	2	91.5	95.71
4		56.92	76.19	80.00
6		56.30	61.90	65.33
8		41.05	61.63	56.16
10		27.88	40.10	45.75
113.4		1	59.57	67.13
	2	21.76	36.36	31.38
	3	11.49	18.30	32.00
	4	ND	11.05	17.31
	5	ND	5.71	3.14
	121.1	0.5	56.16	66.78
1.0		20.00	8.53	4.57
1.5		4.27	11.43	2.32
2.0		1.42	1.07	1.98
2.5		ND	ND	ND

หมายเหตุ ND= not detected

ตารางที่ ง.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อน		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
98.0	0	117.11	121.03	106.67
	3	83.81	114.87	110.48
	6	70.77	100.00	100.00
	12	80.20	97.06	86.55
	24	61.54	86.55	78.10
	36	65.55	80.00	74.46
105.7	2	80.05	78.1	100.39
	4	61.25	66.78	74.46
	6	51.67	53.39	57.81
	8	43.27	50.00	51.61
	10	47.47	40.00	48.89
113.4	1	58.2	66.78	72.73
	2	5.52	32.67	32.67
	3	10.22	13.91	11.43
	4	15.62	29.33	11.05
	5	3.08	3.82	4.11
121.1	0.5	38.18	59.34	39.11
	1.0	16.04	17.31	9.41
	1.5	8.44	3.64	10.18
	2.0	0.84	7.37	4.10
	2.5	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND= not detected

ตารางที่ ง.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไอออนเท่ากับ 120 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.826

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อน		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
98.0	0	117.11	113.16	113.16
	3	114.29	110.34	110.34
	6	100.00	104.95	100.39
	12	94.12	87.06	94.12
	24	80.00	82.54	84.17
	36	72.73	71.15	76.19
105.7	2	108.51	110.34	94.2
	4	90.16	84.44	72.88
	6	77.78	71.15	59.59
	8	40.51	59.26	56.16
	10	40.63	50.81	42.22
113.4	1	70.77	71.15	71.15
	2	28.46	31.38	31.78
	3	13.91	14.89	14.96
	4	11.99	3.50	7.14
	5	3.43	6.40	4.36
121.1	0.5	61.63	61.63	66.78
	1.0	12.82	10.60	22.86
	1.5	4.11	4.29	10.16
	2.0	1.00	1.00	0.83
	2.5	ND	ND	ND

หมายเหตุ ND= not detected

ตารางที่ ง.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.782

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อน		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
98.0	0	84.21	82.81	80.13
	12	80.00	80.00	74.46
	24	82.11	78.10	71.15
	36	82.11	76.36	71.15
	48	76.19	69.57	65.33
	60	71.15	69.70	62.77
105.7	4	80.00	67.13	64.41
	8	68.12	61.63	61.9
	12	65.33	46.46	43.91
	16	60.4	41.05	34.85
	20	57.14	32.05	30.2
113.4	1	76.19	72.73	72.73
	2	43.53	44.58	44.58
	3	27.62	23.19	23.19
	4	20.00	16.42	15.27
	5	14.29	9.49	9.52
121.1	0.5	69.70	61.54	66.67
	1.0	22.8	9.93	10.84
	1.5	6.89	6.10	5.98
	2.0	5.45	8.21	7.37
	2.5	4.27	4.20	4.06

ตารางที่ ง.6 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.760

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อน		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
98.0	0	80.13	73.88	70.62
	12	78.10	69.7	66.78
	24	76.19	65.33	59.34
	36	74.46	65.55	60.57
	48	74.78	60.40	59.26
	60	71.15	57.22	56.30
105.7	4	78.10	70.10	69.70
	8	74.46	60.57	60.00
	12	76.19	54.25	52.59
	16	72.73	46.86	46.67
	20	68.12	43.91	40.4
113.4	1	74.46	69.57	66.67
	2	51.67	50.91	48.53
	3	38.18	34.18	34.85
	4	35.56	21.62	21.34
	5	41.68	22.86	29.89
121.1	0.5	63.95	54.38	56.30
	1.0	38.18	27.35	26.85
	1.5	11.15	20.84	9.33
	2.0	7.64	7.45	7.64
	2.5	5.93	4.40	5.24

ตารางที่ ง.7 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์เท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.716

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อน		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
98.0	0	64.96	63.18	64.89
	12	64.00	61.63	64.10
	24	62.77	53.63	61.54
	36	62.77	50.91	60.40
	48	59.26	50.91	59.26
	60	57.22	51.83	51.61
105.7	4	64.00	62.77	62.77
	8	60.57	53.39	53.39
	12	59.26	51.67	51.67
	16	58.20	53.57	53.57
	20	56.16	43.27	86.55
113.4	1	65.33	61.63	65.33
	2	64.10	51.67	54.25
	3	52.47	38.34	51.67
	4	47.06	33.33	43.27
	5	34.78	27.13	42.11
121.1	0.5	62.77	56.58	60.40
	1.0	26.41	29.17	41.27
	1.5	18.89	21.20	25.11
	2.0	10.67	8.25	19.41
	2.5	0.74	1.88	6.16

ตารางที่ ง.8 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ตั้งต้น (A_0) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อมีปริมาณแคลเซียมไออนเท่ากับ 70 ppm และค่า a_w เท่ากับ 0.686

อุณหภูมิ (°C)	เวลาที่ให้ความ ร้อน (นาที)	กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (A) หลังการให้ความร้อน		
		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3
98.0	0	55.22	55.30	53.95
	12	55.24	46.05	53.33
	24	53.33	48.53	50.20
	36	51.67	49.24	45.00
	48	48.53	47.06	48.53
	60	47.06	45.75	47.06
105.7	4	45.75	51.67	50.00
	8	44.05	50.00	48.89
	12	41.05	45.75	48.53
	16	37.23	42.22	44.44
	20	37.23	44.58	43.53
113.4	1	48.53	48.53	53.33
	2	43.27	47.06	44.44
	3	38.18	42.22	42.11
	4	37.72	41.05	40.00
	5	30.81	41.71	32.00
121.1	0.5	53.33	43.27	53.33
	1.0	25.40	43.27	25.81
	1.5	17.83	14.55	20.00
	2.0	13.11	20.67	12.55
	2.5	10.49	6.79	7.90

ภาคผนวก จ

การศึกษาการแทรกผ่านความร้อนของผลิตภัณฑ์ภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

จ.1 การหาจุดร้อนซ้ำของผลิตภัณฑ์ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

วางผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงบรรจุรีทอร์ทเพาซ์ที่เสียบเข็มวัดอุณหภูมิคู่วบบริเวณด้านข้าง และปลายเข็มเสียบตรงตำแหน่งล็อกบริเวณกึ่งกลางรีทอร์ทเพาซ์ ไว้ในตำแหน่งต่าง ๆ ภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (HISAKA simulator retort รุ่น RCS-40RTGN) จำนวน 3 ตำแหน่งดังรูปที่ จ. 1 และบันทึกการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในรีทอร์ทเพาซ์แต่ละตำแหน่งทุก 1 นาที เมื่อฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 121.1 °C แสดงในตารางที่ จ.1)

ประตู หม้อนึ่ง ฆ่าเชื้อ	ชั้นตะแกรงบรรจุอาหารในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ			
	10			
	9			
	8		3	
	7			
	6		2	
	5			
	4		1	
	3			
	2			
	1			

รูปที่ จ.1 ตำแหน่งการวางเข็มวัดอุณหภูมิคู่วบเพื่อหาจุดร้อนซ้ำที่สุดในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

จากข้อมูลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในรีทอร์ทเพาซ์ (ตารางที่ จ. 1) จะเห็นว่าจุดร้อนซ้ำที่สุดของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อนี้อยู่บริเวณตอนกลางของตะแกรงบรรจุอาหารชั้นที่ 8 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ที่วางไว้ในตำแหน่ง P1, P2 และ P3 มีค่าการฆ่าเชื้อ (F_0) เท่ากับ 3.53 5.21 และ 4.53 นาที ตามลำดับ โดยใช้เวลาการฆ่าเชื้อในช่วงการฆ่าเชื้อนาน 8 นาที ดังนั้นจึงเลือกตำแหน่ง P3 เป็นจุดร้อนซ้ำที่สุด และใช้เป็นตำแหน่งที่ใช้ติดตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอาหารที่จุดร้อนซ้ำที่สุดระหว่างกระบวนการฆ่าเชื้อต่อไป

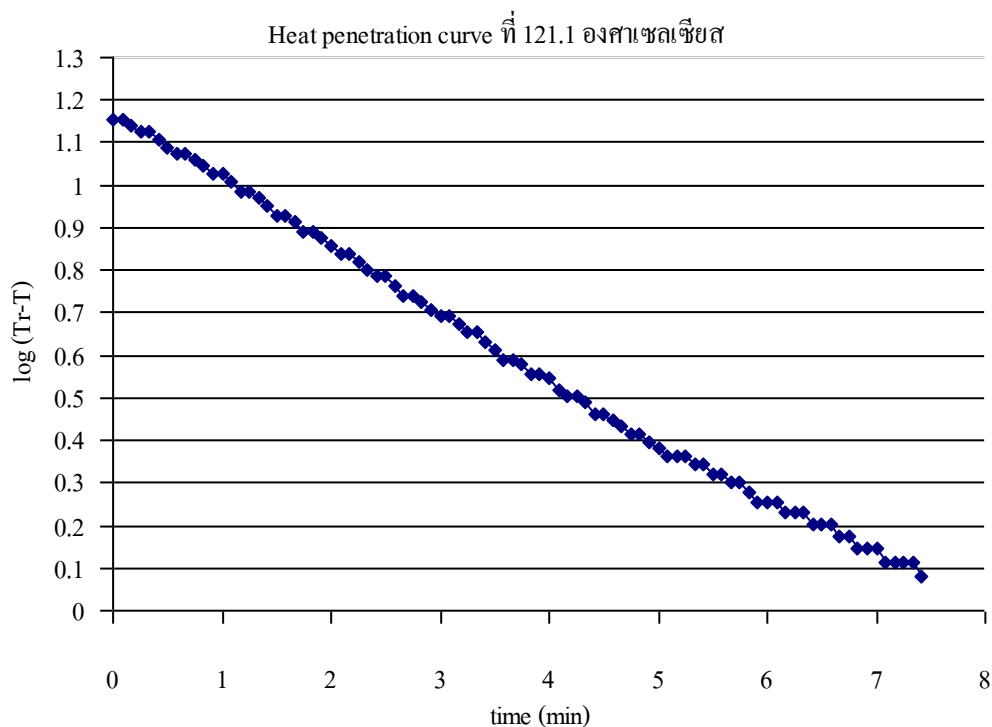
ตารางที่ ๑.1 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของอาหารภายในรีทอร์ตแพคเกจที่วางไว้ในตำแหน่งต่างๆ
ภายในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°C)			ค่าการฆ่าเชื้อ (นาที)		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3
0	27.9	27.7	28.1	0.00	0.00	0.00
1	29.5	28.2	45.6	0.00	0.00	0.00
2	44.9	40.4	72.1	0.00	0.00	0.00
3	61.4	58.1	79.7	0.00	0.00	0.00
4	73.8	72.1	86.6	0.00	0.00	0.00
5	83.2	82.7	92.8	0.00	0.00	0.00
6	89.8	90.2	98.7	0.00	0.00	0.00
7	96.2	97	103.8	0.02	0.00	0.00
8	101.1	102.4	108.2	0.05	0.01	0.01
9	105.7	107.2	111.1	0.13	0.04	0.03
10	109.2	110.9	113.2	0.26	0.11	0.08
11	111.9	113.8	114.9	0.46	0.25	0.17
12	113.9	115.9	116.4	0.75	0.49	0.32
13	115.5	117.4	117.4	1.13	0.86	0.56
14	116.8	118.5	118.2	1.60	1.34	0.88
15	117.7	119.2	118.7	2.15	1.94	1.29
16	118.5	119.8	119.2	2.76	2.64	1.80
17	119.1	120.2	119.6	3.43	3.41	2.39
18	119.4	120.5	119.6	4.14	4.25	3.04
19	112.9	118.1	106.2	4.51	4.94	3.45
20	97.2	103.1	89.8	4.53	5.20	3.53
21	85.4	89.1	80.7	4.53	5.21	3.53
22	78.3	79.6	74.5	4.53	5.21	3.53
23	73.5	73.0	69.9	4.53	5.21	3.53

ภาคผนวก จ

วิธีคำนวณ heat penetration parameter และเวลาในการฆ่าเชื้อ

จ.1 การคำนวณ heat penetration parameters



รูปที่ จ.1 Heat penetration curve ของผลิตภัณฑ์น้ำพริกแกงที่วางไว้ในตำแหน่งที่จุดร้อนช้า

Heat penetration parameters ที่ใช้ในการคำนวณ

- F_0 Sterilization value (นาที) ที่อุณหภูมิ 121.1 °C ค่า Z เท่ากับ 10 °C
- F_i เวลาในการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ T_i ที่มีค่าการฆ่าเชื้อเทียบเท่ากับการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิมาตรฐาน (121.1 °C หรือ 250 °F) เป็นเวลา 1 นาที
- f_h Heating rate index มีค่าเท่ากับเวลา (นาที) ที่ทำให้ค่า (T_r-T) ลดลง 1 log cycle
- g T_r-T (°C หรือ °F) ที่เวลาใดๆ
- I_h T_r-T_{in} (°C หรือ °F)
- J_{ch} Heating rate lag factor มีค่าเท่ากับ $(T_r-T_{ph})/(T_r-T_{in})$
- T_{in} อุณหภูมิของอาหารเมื่อเริ่มต้นให้ความร้อน (°C หรือ °F)

T_{pih}	Pseudo-initial temperature ในช่วงที่เริ่มให้ความร้อน ($^{\circ}\text{C}$ หรือ $^{\circ}\text{F}$) มีค่าเท่ากับจุดตัดของเส้นที่ลากผ่าน heat penetration curve ในส่วนที่เป็นเส้นตรงกับเวลาศูนย์ที่แก้ไขแล้ว (Corrected zero time = $0.58 \times \text{CUT}$)
T_r	อุณหภูมิของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ($^{\circ}\text{C}$ หรือ $^{\circ}\text{F}$)
t_B	Thermal process time คำนวณโดย Ball 's formula method (นาที) มีค่าเท่ากับเวลานับตั้งแต่เปิดจนปิดไอน้ำด้วย $0.58 \times \text{CUT}$ หรือ $t_B = t_p + 0.42 \text{CUT}$
t_p	Operator's process time เท่ากับเวลานับตั้งแต่จุดที่หม้อนึ่งฆ่าเชื้อมีอุณหภูมิตามที่กำหนดจนถึงเวลาปิดไอน้ำ (นาที)
CUT	เวลา (นาที) ที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อจากจุดที่เปิดไอน้ำจนกระทั่งหม้อนึ่งฆ่าเชื้อมีอุณหภูมิตามที่กำหนด

จ.2 การทำนายเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อโดยใช้ Ball-Formula Method

1. นำอุณหภูมิในช่วง sterilize ณ จุดร้อนเข้ามาพลอตกราฟเพื่อสร้าง heat penetration curve โดยกำหนดแกน x คือเวลาในการฆ่าเชื้อ (นาที) และแกน y คือ $\log(T_r - T)$ เมื่อ T_r และ T คืออุณหภูมิของหม้อนึ่งฆ่าเชื้อและอุณหภูมิของอาหารที่จุดร้อนเข้าตามลำดับ

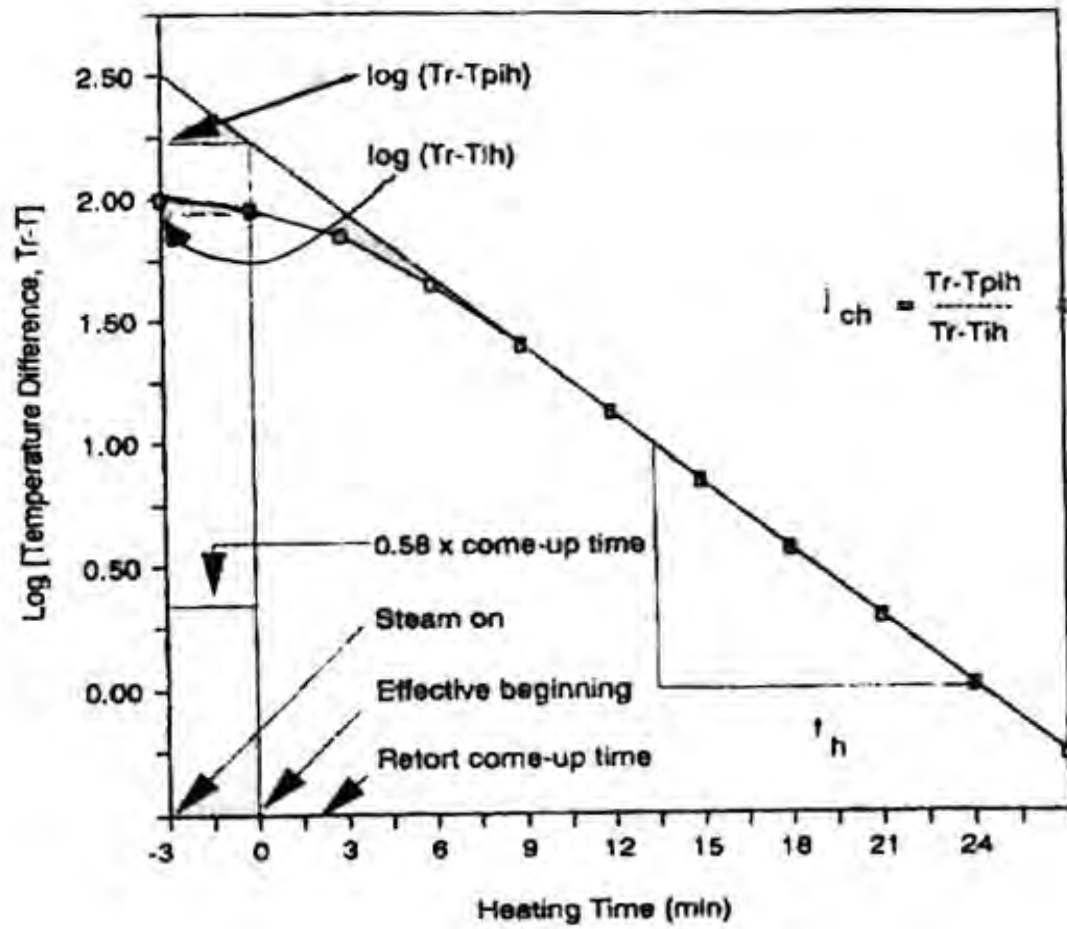
2. หาความชัน (ทำให้ทราบค่า f_h) และจุดตัดแกน y ของส่วนที่เป็นเส้นตรงของ heat penetration curve (ทำให้ทราบค่า T_{pih} และ T_{ih})

3. คำนวณค่า U เมื่อ $U = F_0 F_1$ โดยกำหนด $F_0 = 3$ นาที และ F_1 คำนวณจากสูตร

$$F_1 = 10^{\frac{(121.1^{\circ}\text{C} - T_r)}{Z}}$$

4. หาค่า $\log g$ จากตารางหรือกราฟระหว่าง f_h/U กับ $\log g$

5. เมื่อทราบค่า f_h, j_{ch}, I_h เมื่อ $I_h = (T_r - T_{ih})$ จะสามารถคำนวณหาเวลาที่ต้องการที่ต้องใช้ในกระบวนการ (t_B) ได้ โดย $t_B = f_h(\log(j_{ch} I_h) - \log g_c)$



รูปที่ ๑.2 Come-up time correction

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ

ข.1 การวัดสี

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. เครื่อง Chroma meter Minolta CR-300 series (Minolta Co.,LTD., Japan)
2. หัววัด CR-300

วิธีใช้

1. เลื่อนสวิตช์ POWER ON พร้อมกดปุ่ม ALL DATA CLEAR
2. กดปุ่ม INDEX SET
3. กดปุ่มลูกศรชี้ไปทางซ้ายหรือขวา เพื่อเลือกแหล่งแสง C หรือ D₆₅ แล้วกดปุ่ม ENTER
4. กดปุ่ม CALIBRATE เพื่อนำป้อนค่า Y, x, y ซึ่งทราบได้จากแผ่น CALIBRATE
5. นำหัววัดวางบนแผ่น CALIBRATE
6. กดปุ่ม MEASURE รอจนเกิดการสะท้อนแสงครบ 3 ครั้ง
7. กดปุ่ม COLOR SPACE SELECT เพื่อเลือกระบบสีที่ต้องการใช้งาน เช่น L, a, b
8. วัดสีของตัวอย่างโดยใช้หัววัด CR-300
9. ถ้าต้องการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ให้กดปุ่ม STAT เครื่องจะแสดงค่า Max, Min, Mean และ SD

ข. 2 การวัดปริมาณน้ำอิสระ (Water Activity)

อุปกรณ์/เครื่องมือ

Water activity meter AquaLab series 3 TE (Decagon, USA)

วิธีใช้

1. ก่อนนำตัวอย่างมาวัดค่า ควรเปิดเครื่องรอประมาณ 30 นาที เพื่อให้เครื่องปรับอุณหภูมิเข้าสู่สมดุลก่อนการใช้งาน
2. กดปุ่มไปที่ OPEN/LOAD
3. เปิดลิ้นชักใส่ตัวอย่างออก และเอาถ้วยใส่ตัวอย่างวางลงในลิ้นชัก
4. กดปุ่มจับลิ้นชักไปที่ READ
5. เมื่อการวัดค่าเสร็จสิ้น เครื่องจะแสดงสัญญาณไฟกะพริบสีเขียว (อยู่ด้านหน้าตัวเครื่อง) และมีเสียงเตือน

ซ.3 การวัด Young's modulus

อุปกรณ์/เครื่องมือ

1. Texture analyzer TA-XT2 (Stable Micro System, England)
2. หัววัด Conical probes สำหรับกดตัวอย่าง 30 องศา (P/30C)

วิธีใช้

1. เตรียม probe สำหรับกดตัวอย่างรูปกรวย 30 องศา (P/30C)
2. วางพริกแกงที่บรรจุใส่ถ้วยที่มีความลึกอย่างน้อย 10 เซนติเมตรในตำแหน่งกึ่งกลางของ platform ที่ probe จะกดลงมาที่กึ่งกลางของตัวอย่าง

3. โปรแกรมเครื่อง Texture analyzer TA-XT2 ให้ทำงานดังนี้

Mode	: Measure Force in Compression
Option	: Return to Start
Pre-test speed	: 1.0 mm/s
Test speed	: 2.0 mm/s
Post-test speed	: 2.0 mm/s
Rupture Test Dist	: 1.0 mm
Distance	: 30.0 mm
Force	: 0.100 kg
Time	: 30.0 sec
Count	: 5
Trigger type	: Auto

4. เมื่อเริ่มการทำงานให้ติดตามค่าแรง (force) ที่กดลงบนตัวอย่างที่เวลาต่างๆ และบันทึกค่าแรงสูงสุดและระยะทาง

5. พล็อตกราฟระหว่างระยะทาง (มิลลิเมตร) กับค่าแรง (force) สูงสุดที่กดลงบนตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ความชันที่ได้จากกราฟแสดงค่า Young's modulus

ภาคผนวก ซ

วิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์

ซ.1 การตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) ตามวิธี TIS 335 Part 1

วิธีการวิเคราะห์

1. เขียนหมายเลขตัวอย่าง ระดับการเจือจาง วัน เดือน ปี ลงบนฝา plate หลอด ขวด ทุกใบ โดยบริเวณโต๊ะที่ทำการวิเคราะห์ต้องสะอาด เช็ดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ
2. เตรียมตัวอย่างอาหาร ให้มีระดับความเจือจางต่างๆ
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้คือ plate count agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มาหลอมเหลวในน้ำร้อนและอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 44-46 °C แล้วเทลงใน plate รกกระทิงอาหารแข็งตัว
4. เปิดฝาภาชนะนำตัวอย่างอาหาร ที่เตรียมไว้ในอนุกรม 1:10 1:100 ฯลฯ โดยใช้ sterile normal saline 0.85% เจือจางปิเปตลง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน plate โดยค่อยๆ แฉกฝาจานเพาะเชื้อ
5. Spread ด้วย sterile spreader (ทำ 2 ซ้ำ)
6. พลิกคว่ำจานเพาะเชื้อลง นำเข้าบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. นับจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญในจานเพาะเชื้อใน plate ที่มีปริมาณเชื้อ 30-300 โคโลนี

และนำมาคำนวณตามสูตร

$$\text{จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด} = \text{จำนวนโคโลนีที่นับได้} \times 1/\text{dilution}$$

โดยรายงานผลเป็น CFU/g หรือมิลลิลิตรของอาหาร

ซ.2 การวิเคราะห์หาปริมาณยีสต์และรา FDA-BAM, 2001 (chapter 18)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลองปริมาตร 9 มิลลิลิตรและในขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกทึบร้อน เติมเปปโตนร้อยละ 0.1 จากขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตัวอย่างอาหารที่ได้จะมีระดับความเจือจาง 10^{-1}
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีระดับความเจือจาง 10^{-2} - 10^{-4}
3. ปิเปตตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ

4. spread เชื้อบน plate อาหาร PDA ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร
5. บ่มจานเพาะที่อุณหภูมิ 25 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 5 วัน
6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อและรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัม ตัวอย่าง

ซ.3 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Bacillus cereus* โดยวิธีของ FDA-BAM, 2002 (chapter 14) อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Mannitol-egg yolk-polymyxin (MYP) agar plates (M95)
2. Egg yolk emulsion, 50% (M51)
3. Polymyxin B solutions for MYP agar (0.1%) and trypticase soy-polymyxin broth (0.15%) (see M95 and M158)
4. Tyrosine agar (M170)
5. Voges-Proskauer medium (M177)
6. Nitrate broth (M108)
7. Nutrient agar for *B. cereus* (M113)
8. Phenol red glucose broth (M122)
9. Nitrite detection reagents (R48)
10. Butterfield's phosphate-buffered dilution water (R11) sterilized in bottles to yield final volumes of 450 ± 5 ml and 90 ± 2 ml
11. Voges-Proskauer test reagents (R89)
12. Creatine crystals
13. Gram stain reagents (R32)
14. Basic fuchsin staining solution (R3)
15. Methanol

วิธีการวิเคราะห์

Plate count of *B. cereus*

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 50 กรัมใส่ใน sterile blender jar เติม Butterfield's phosphate-buffered dilution water ร้อยละ 0.1 จากขวดฝาเกลียวปริมาตร 450 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตัวอย่างอาหารที่ได้จะมีระดับความเจือจาง 10^{-1}

2. เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางเป็น 10^{-2} - 10^{-6} โดยใช้ dilution water ร้อยละ 0.1
3. ปิเปตตัวอย่างอาหารจากระดับความเจือจางต่างๆ จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MYP ใช้แท่งแก้ว spread อาหารให้ทั่วจานเพาะเชื้อ
4. บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
5. ตรวจนับเชื้อโคโลนีที่มีลักษณะเป็นสีชมพู รอบๆโคโลนีมีความชุ่มเนื่องจากมีการผลิตเอนไซม์ lecithinase

Confirmation of *B. cereus*

1. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *Bacillus cereus* จาก MYP agar plates ใส่ลงใน nutrient agar slants โดย streak ลงบนผิวหน้าของอาหาร (slant) และ stab จนถึงก้นหลอดทดลอง (butt)
 2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
 3. ทำการย้อมแกรม จะได้โคโลนีแกรมบวก มีลักษณะกลม สายสั้นถึงสายยาว สปอร์มีลักษณะเป็นรูปวงรี
 4. ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Bacillus cereus* ดังนี้
 - 4.1 Phenol red glucose broth : อาหารเลี้ยงเชื้อมีความชุ่มและเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีส้มหรือสีเหลือง เนื่องจากมีการสร้าง acid
 - 4.2 Nitrate broth : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีส้มภายใน 10 นาที เนื่องจาก nitrate ถูกเปลี่ยนเป็น nitrite
 - 4.3 Modified VP medium : อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีชมพูหรือสีม่วง
 - 4.4 Tyrosine agar : อาหารเลี้ยงเชื้อมี clear zone เกิดขึ้นบริเวณที่แทง loop เนื่องจากมีการย่อย tyrosine ขึ้น ส่วน slant ที่ให้ผล negative บ่มต่ออีก 7 วันเพื่อยืนยันผลว่าไม่มี
- การเจริญของ *Bacillus cereus*

ซ.4 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Clostridium perfringens* โดยวิธีของ FDA-BAM, 2002 (chapter 16)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptose sulfite cycloserine agar (TSC)
2. *Clostridium welchii* egg york agar (CWEY)
3. เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลองปริมาตร 9 มิลลิลิตร และในขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกทึบร้อน เต็มเปปโตเนร้อยละ 0.1 จากขวด
ฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตัวอย่างอาหารที่ได้จะมีระดับความเจือจาง 10^{-1}
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางเป็น 10^{-2} - 10^{-4} โดยใช้เปปโตเนร้อย
ละ 0.1
3. ปิเปตตัวอย่างจากระดับความเจือจางต่างๆ จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนจานเพาะ
เชื้อที่มีอาหาร TSC
4. ใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน
5. อบเพาะเชื้อในสภาพที่ไม่มีอากาศที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็น
ระยะเวลา 24 ชั่วโมง
6. ตรวจสอบเชื้อโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีสีดำ แสดงว่ามีปฏิกิริยาของ Lecithinase เลือกที่
มีเชื้อเจริญ 30-300 โคโลนี
7. เปลี่ยน antitoxin type A ของ *C.perfringens* 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี
อาหาร CWEY ประมาณครึ่งจานเพาะเชื้อ
8. เชี่ยเชื้อที่คาดว่าเป็น *C.perfringens* ลากเชื้อผ่านจานเพาะเชื้อทั้งสองด้าน อบเพาะเชื้อ
ในสภาพที่ไม่มีอากาศที่อุณหภูมิ 35°C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
9. อาหาร CWEY ด้านที่มี antitoxin จะไม่เกิดปฏิกิริยาของ Lecithinase (positive)
10. คำนวณจำนวน *C.perfringens* ต่อกรัม

ซ.5 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Escherichia coli* โดยวิธีของ FDA-BAM, 2002 (chapter 4)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

luaryl tryptose broth (LTB)

วิธีการวิเคราะห์

Presumption test

1. เตรียมหลอดหมัก ซึ่งบรรจุ luaryl tryptose broth (LTB) จำนวน 9 หลอด หลอดละ 10
มิลลิลิตร ทำเครื่องหมายข้างหลอด เพื่อบอกระดับการเจือจาง ดังนี้ 10^{-1} จำนวน 3 หลอด 10^{-2}
จำนวน 3 หลอดและ 10^{-3} จำนวน 3 หลอด
2. เขย่าตัวอย่างแรงๆ ประมาณ 25 ครั้ง แล้วซึ่ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูตัวอย่างอาหาร มี
ความเข้มข้น $1:10$, $1:10^2$ และ $1:10^3$ ตามลำดับ หลอดละ 1 มิลลิลิตร
3. นำหลอดทั้งหมดไปหมักที่อุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

4. ตรวจสอบการสร้างก๊าซในหลอดหมักแต่ละหลอด โดยดูจากหลอดเก็บก๊าซที่คว่ำอยู่ในหลอดหมัก ถ้าหลอดใดเกิดก๊าซมากกว่า 10% ให้ทำ coliform test ต่อไปเลย แต่ถ้าหลอดใดไม่เกิด ให้บ่มต่อไปอีก 48 ชั่วโมง

5. ตรวจสอบการสร้างก๊าซในหลอดหมักแต่ละหลอด ถ้าหลอดใดเกิดก๊าซมากกว่า 10% ให้ทำ coliform test ต่อไป

Confirm test

- นำหลอดหมัก LTB ที่ให้ผลบวกมาทดสอบต่อ โดยเขย่าเบาๆ แล้วใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายของเหลวจากหลอดหมักเหล่านี้ ลงในหลอดหมักที่บรรจุ EC medium ทำเครื่องหมายข้างหลอดบอกระดับการเจือจาง
- นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 44.5 ± 0.2 °C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
- การคำนวณและการรายงานผล โดยการนับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซ (หลอดที่ให้ผลบวก) ในแต่ละระดับความเจือจางนำไปอ่านค่าจากตาราง MPN รายงานผลเป็น "MPN/กรัมอาหาร หรือ MPN/มิลลิลิตร"

ซ.6 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Salmonella* sp. โดยวิธีของ ISO – 6579, 2002

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Lactose broth (LB) เข้มข้นร้อยละ 0.5
- Selenite cysteine broth (SCB)
- Salmonella shigella* agar (SSA)
- Bismuth sulfite agar (BSA)
- Xylose lysine desoxycholate (XLD) agar
- Triple sugar iron (TSI) agar
- Lysine ion agar (LIA)

วิธีการวิเคราะห์

Pre-enrichment

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกทึบร้อน เต็ม Lactose broth เข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำของผสมที่ได้มาเทใส่ในขวดดูแวนที่ปลอดเชื้อ

2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Selective enrichment

1. ปิเปตตัวอย่างอาหารมา 1 มิลลิลิตร จากชั้นต้นตอน Pre-enrichment ลงในอาหาร SCB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง การเพาะเชื้อใน Selective agar

1. Streak เชื้อจากชั้นต้นตอน selective enrichment มาเพาะ SSA BSA และ XLD agar

2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้นดังนี้

SSA: โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* sp. จะไม่มีสี หรือสีชมพูอ่อน บางโคโลนีมีสีดำ ตรงกลาง

BSA: โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* sp. จะมีสีน้ำตาลเข้ม หรือสีดำ บางครั้งอาจมี โคโลนีที่สะท้อนแสง อาหารรอบๆ โคโลนีมีสีน้ำตาล

XLD agar: โคโลนีของเชื้อ *Salmonella* sp. จะมีสีชมพู บางโคโลนีมีสีดำตรง กลาง

การจำแนกและการทดสอบทางชีวเคมี

1. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะของ *Salmonella* sp. จาก SSA BSA และ XLD agar ถ่ายลงใน TSI agar และ LIA โดย steak ลงบนผิวหน้าของอาหาร (slant) และ stab จนถึงก้นหลอด ทดลอง (butt)

2. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

3. ตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Salmonella* sp. ดังนี้

TSI agar: จะมีสีแดงที่ slant และมีสีเหลืองที่ butt อาจมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจน ซัลไฟด์ โดยอาหารจะมีสีดำที่ butt

LIA: อาหารจะมีสีม่วงทั่วหลอด และหากมีการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ อาหาร จะมีสีดำ

ซ.7 การวิเคราะห์หาเชื้อ *Staphylococcus aureus* โดยวิธีของ FDA-BAM, 2001 (chapter 12)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird parker agar (BPA)

2. Nutrient broth (NB)

3. เปปโตเน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลองปริมาตร 9 มิลลิลิตร และในขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกทึบร้อน เติมเปปโตเนร้อยละ 0.1 จากขวด ฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตัวอย่างอาหารที่ได้จะมีระดับความเจือจาง 10^{-1}
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางเป็น 10^{-2} โดยใช้เปปโตเนร้อยละ 0.1
3. ปิเปตตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงในจานอาหาร

BPA

4. จุ่มแท่งแก้วสำหรับ spread ลงในแอลกอฮอล์ แล้วนำแท่งแก้วมาผ่านเปลวไฟ ถือให้เย็นลง เปิดฝาจานอาหาร ทำการspread ตัวอย่างอาหารให้กระจายตัวทั่วทั้ง plate
5. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที กลับจานเพาะเชื้อและนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
6. ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* จะเรียบ นูน สีดำ และมี clear zone รอบโคโลนี
7. เลือกโคโลนีที่คาดว่าจะเป็น *Staphylococcus aureus* มาทดลองโดยเขี่ยเชื้อลงในอาหาร NB นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
8. ปิเปตเชื้อจากข้อ 7 ใส่หลอดทดลองปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมพลาสมาของกระต่าย (rabbit plasma) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
9. นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ถ้าไม่เกิดการแข็งตัวของพลาสมา ทำการบ่มต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง ถ้าพลาสมาแข็งตัวแสดงว่าผลเป็นบวก

ซ.8 การวิเคราะห์หาเชื้อ Flat sour spoilage โดยวิธีของ FDA-BAM, 2001 (chapter 21A)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Dextrose tryptone bromcresol purple broth
2. Dextrose tryptone bromcresol purple plate

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างอาหาร 2 กรัม หรือ 2 มิลลิลิตร เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dextrose tryptone bromcresol purple broth จำนวน 4 หลอด และในอาหารเลี้ยงเชื้อ Dextrose tryptone bromcresol purple อีก 4 จาน
2. บ่มเพาะเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 35-37 °C และ 55 °C อย่างละ 2 หลอด และ 2 จาน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ถ้ามีเชื้อพวก Flat sour จะทำให้เกิดกรดขึ้น ซึ่งจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

๗.9 การวิเคราะห์หาเชื้อ Putrefactive anaerobes โดยวิธีของ FDA-BAM, 2001 (chapter 21A)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Cooked meat media

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างอาหารประมาณ 2 กรัมหรือ 2 มิลลิลิตร เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked meat media ซึ่งได้ต้มไล่อากาศออกและทำให้เย็นแล้วจำนวน 4 หลอด

2. แบ่ง 2 หลอดไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 20 นาที ทำให้เย็นแล้ว เทพาราฟินหรือ agar ที่ปราศจากเชื้อทับบริเวณผิวหน้าของอาหารในหลอดทั้ง 4 หลอด หรือจะเก็บไว้ใน anaerobic jar ก็ได้

3. บ่มเพาะเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 35 °C เพื่อตรวจสอบจุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic และบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เพื่อตรวจสอบจุลินทรีย์กลุ่ม thermophilic เป็นระยะเวลา 72-96 ชั่วโมง

4. ถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นให้นำไปย้อมแกรม เพื่อดูเชื่อว่าเป็นแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง มีสปอร์ อยู่ปลายหรือค่อนไปทางปลาย แสดงว่าเป็นเชื้อพวก putrefactive anaerobe

ภาคผนวก ฅ
ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน

ตารางที่ ฅ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า D และค่า Z ของเอนไซม์ α -amylase ที่มีปริมาณแคลเซียมไอออน 20 70 และ 120 ppm

ค่า	SOV	df	Mean Square	F	Sig.
D _{98°C}	ปริมาณแคลเซียมไอออน	2	159.799	.628	.566
	Error	6	254.583		
	total	8			
D _{105.7°C}	ปริมาณแคลเซียมไอออน	2	4.565	.348	.719
	Error	6	13.116		
	total	8			
D _{113.4°C}	ปริมาณแคลเซียมไอออน	2	.106	1.166	.373
	Error	6	.091		
	total	8			
D _{121.1°C}	ปริมาณแคลเซียมไอออน	2	.132	26.759*	.001
	Error	6	.005		
	total	8			
Z	ปริมาณแคลเซียมไอออน	2	.164	14.278*	.005
	Error	6	.011		
	total	8			

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ ๓.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า D และค่า Z ของเอนไซม์ α -amylase ที่มีค่า a_w เท่ากับ 0.826 0.782 0.760 0.716 และ 0.686

ค่า	SOV	df	Mean Square	F	Sig.
D _{98°C}	ค่า a_w	4	206887.000	17.724*	.000
	Error	10	11672.715		
	total	14			
D _{105.7°C}	ค่า a_w	4	18098.296	6.254*	.009
	Error	10	2893.754		
	total	14			
D _{113.4°C}	ค่า a_w	4	301.141	10.396*	.001
	Error	10	28.966		
	total	14			
D _{121.1°C}	ค่า a_w	4	1.626	22.804*	.000
	Error	10	.071		
	total	14			
Z	ค่า a_w	4	1.239	23.433*	.000
	Error	10	.053		
	total	14			

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ ๓.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า a_w pH ค่าสี (L^* a^* b^*) และ Young's modulus ของน้ำพริกแกงสด น้ำพริกแกงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121.1 °C และผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 5 เดือน

ค่า	SOV	df	Mean Square	F	Sig.
a_w	Trt	6	.000	.918	.533
	Error	7	.000		
	total	13			
pH	Trt	6	.014	4.689*	.031
	Error	7	.003		
	total	13			
L^*	Trt	6	4.853	6.071*	.000
	Error	28	.799		
	total	34			
a^*	Trt	6	48.903	90.257*	.000
	Error	28	.542		
	total	34			
b^*	Trt	6	61.921	79.664*	.000
	Error	28	.777		
	total	34			
Young's modulus (N/mm)	Trt	3	.000	.076	.972
	Error	12	.000		
	total	15			

*แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพรศิริ ศรีณรงค์ เกิดวันที่ 11 พฤษภาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดตราด สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2550 และศึกษาต่อในระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2551

ผลงานทางวิชาการ

พรศิริ ศรีณรงค์ และจิราวัฒน์ ทัดติยกุล. การพัฒนาปริพันธ์เวลาอุณหภูมิทางชีวภาพจาก เอนไซม์ *B. licheniformis* α -amylase ที่มีจลนศาสตร์การถูกทำลายด้วยความร้อน คล้ายคลึงกับสปอร์ของ *C. sporogenes* ในน้ำพริกแกง. การเสนอผลงานวิชาการแบบ บรรยาย. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 6. 29-31 กรกฎาคม 2553. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัย นเรศวร.