รหัสโครงการ SUT3-305-44-12-48

รายงานการวิจัย

การใช้ไนซินในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกมาจากชิ้นปลาที่บรรจุในสภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

(The Use of Nisin for Inhibiting Germination of *Clostridium* spp. Spores Isolated from Modified Atmosphere Packaged Fresh Tilapia fillets)

ผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปิยะวรรณ กาสลัก

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2550

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณที่เป็นค่าใช้จ่าย พร้อมทั้งเครื่องมือและห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย โครงการวิจัยนี้ขอขอบคุณ คุณเนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน ผู้ช่วยวิจัย นายอธิคุณ แรงสุข และนางสาวณัฐธิดา จันทร์ประเสริฐ ผู้ทำการวิเคราะห์และรวบรวมข้อมูลต่างๆ และทุกคนที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ธันวาคม 2550

บทคัดย่อ

ปลาสดเป็นอาหารประเภทที่เน่าเปื่อยได้ง่ายและมีความไวต่อการเน่าเสียที่เกิดจากจุลินทรีย์และการเสื่อมคุณภาพทางเคมี เมื่อมีการเจริญของจุลินทรีย์จะทำให้ปลาสดสูญเสียคุณภาพทางด้านกลิ่นและรส มีผลทำให้อายุในการเก็บรักษาสั้นลงและเกิดการสูญเสียมูลค่าทางด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากคงเหลือปริมาณปลาสดที่วางขายตามท้องตลาดน้อยลง ผู้วิจัยจึงมีความสนใจในการใช้การบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศเพื่อใช้เพิ่มอายุการเก็บรักษาของปลานิล ซึ่งเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงเพื่อการส่งออกมากที่สุดในจังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย โดยศึกษาผลของการบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศเพื่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Clostridium* spp. โดยใช้อัตราส่วนของบรรยากาศ 75 % CO_2 : 25 % N_2 , 50 % CO_2 : 50 % N_2, 25 % CO_2 : 75 % N_2, 100 % CO_2 และสภาวะการบรรจุอากาศแบบปกติที่มีผลต่ออายุในการเก็บรักษาของปลานิลสดที่อุณหภูมิ 0 4 และ10 °ซ ที่บรรจุปลาสดด้วยถุงพลาสติกซึ่งเป็นฟิล์มลามิเนท (laminated film) ระหว่างพอลิเอไมด์ (polyamide, PA) ร่วมกับโพลิเอทิลีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (Low density polyethylene, LDPE) ประเมินการเน่าเสียและอายุการเก็บรักษาของปลาสดโดยพิจารณาจากระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ของการสูญเสียน้ำหนัก สารประกอบด่างที่ระเหยได้ ไตรเมทธิลเอมีน ค่า K และปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและก่อโรค อายุการเก็บรักษาจะเพิ่มขึ้น ($p<0.01$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ และลดอุณหภูมิในการเก็บรักษา พบว่าความเข้มข้น 75% CO_2 : 25% N_2 ที่อุณหภูมิ 0 °ซ เป็นสภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถยืดอายุในการเก็บรักษาได้ถึง 37 วัน และยังคงมีความปลอดภัยจากการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ในขณะที่การเก็บรักษาที่สภาวะอากาศปกติเก็บรักษาปลาได้เพียง 10 วัน การทดสอบประสิทธิภาพของไนซินในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ *Clostridium perfringens* ของปลาที่บรรจุภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ 75% CO_2 : 25% N_2 ที่อุณหภูมิ 0 °ซ โดยการวัดขนาดของบริเวณที่ถูกยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) พบว่า ไนซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ที่ระดับของจำนวนสปอร์เริ่มต้น 3 ระดับ คือ 10^2 10^3 และ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่สภาวะความเป็นกรดด่าง 6 ความเข้มข้นของไนซิน 30 ส่วนในล้านส่วน

คำสำคัญ : ปลานิล การบรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ ไนซิน *Clostridium perfringens*

Abstract

Fresh water fish is easily perishable and susceptible to spoil due to microbial growth and chemical deterioration. The effects of microbial activities on fish components are the production of off-flavor and odor resulting in short shelf life and heavy economic loss since only a small percentage of fishery products were purchased in the market. Researcher was interested in the use of Modified Atmosphere Packaging (MAP) to inhibit germination in order to increase shelf life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) which is the most popular feeding in Nakhon Ratchasima, Thailand. The effect of modified atmosphere at the ratio of 75% CO_2 : 25% N_2, 50% CO_2 : 50% N_2, 25% CO_2 : 75% N_2, 100% CO_2 and normal air on shelf life fresh tilapia in polyamide laminate with low density polyethylene (PA/LDPE) bag was evaluated at 0, 4 and 10 °C. The spoilage and shelf life criteria of fillets were the rejection limit of % exudation loss, Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N), Trimethylamine (TMA), %K-value, number of spoilage and pathogenic microorganisms. Shelf life of fillets was significantly increased ($p<0.01$) with increase of CO_2 and decrease storage temperature. It was found that at 75% CO_2 : 25% N_2 and 0 °C was the best condition, to extent shelf life for 37 days and safe from the growth of pathogenic microorganisms, while that of normal air condition was 10 days. The efficiency of nisin used in the fresh tilapia fillets were packed in PA/LDPE bag at 75% CO_2 : 25% N_2 and 0 °C condition which can inhibit growth and spore germination of *Clostridium perfringens* was determined by measuring the diameter of the inhibition zone around the wells. It was found that the efficiency of nisin at degree of initial spore 3 degrees are 10^2, 10^3 and 10^4 spores/ml is at pH 6 and concentration of nisin 30 ppm.

Keywords: Tilapia, Modified Atmosphere Packaging, nisin, *Clostridium perfringens*

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค
สารบัญ..... ง
สารบัญตาราง..... จ
สารบัญภาพ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 6
ขอบเขตของการวิจัย..... 7
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 7
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลานิลเมื่อเติมไนซินและเก็บรักษา
ที่สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการบรรจุภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยน
บรรยากาศ..... 8
การศึกษาความสามารถของไนซินในการยับยั้งการเจริญและการงอก
ของสปอร..... 10
บทที่ 3 ผลการวิจัย
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการบรรจุภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ..... 12
การศึกษาความสามารถของไนซินในการยับยั้งการงอกและการเจริญของสปอร์..... 22
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัย..... 25
ข้อเสนอแนะ..... 26
บรรณานุกรม..... 27
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์..... 33
ประวัติผู้วิจัย..... 38

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ชนิดของสารพิษที่ *C. perfringens* ผลิตขึ้น..... 3

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสูงสุดของครรชนีที่บ่งบอกถึงการเน่าเสียของเนื้อปลานิล ซึ่งบ่มภายใต้อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 16 ชั่วโมง..... 13

ตารางที่ 3 ระยะเวลาการเก็บรักษาปลาภายใต้สภาวะปรับเปลี่ยนบรรยากาศ (MAP) ที่มีความเข้มข้นของแก๊ส CO_2 N_2 และ O_2 และที่สภาวะอากาศปกติ ณ อุณหภูมิ 0 4 และ 10 °ซ โดยใช้แบคทีเรียเป็นตัวบ่งชี้..... 14

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ปริมาณ TVB-N ของชิ้นปลา (tilapia fillets) ของการบรรจุแบบใช้อากาศปกติและแบบ MAP ที่อุณหภูมิ 10 °ซ..... 15
รูปที่ 2 การสูญเสียน้ำหนักของชิ้นปลา (tilapia fillets) ของการบรรจุแบบใช้อากาศปกติ และแบบ MAP ที่อุณหภูมิ 0 °ซ..... 16
รูปที่ 3 ปริมาณ TMA ของชิ้นปลา (tilapia fillets) ที่บรรจุแบบใช้อากาศปกติและ MAP ที่อุณหภูมิ 0 °ซ..... 17
รูปที่ 4 ค่า K ของชิ้นปลา (tilapia fillets) ที่บรรจุแบบใช้อากาศปกติและแบบ MAP ที่อุณหภูมิ 0 °ซ..... 18
รูปที่ 5 ค่าความเป็นกรดด่างของชิ้นปลา (tilapia fillets) ที่บรรจุแบบใช้อากาศปกติ (◆) และแบบ MAP ที่อุณหภูมิ 0 °ซ..... 19
รูปที่ 6 จำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนและกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกของชิ้นปลา (tilapia fillets) ที่บรรจุแบบใช้อากาศปกติและแบบ MAP ที่อุณหภูมิ 0 °ซ..... 21
รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Inhibition zone ความเข้มข้นของไนซินและ pH ที่ระดับจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^2 spores/ml..... 23
รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Inhibition zone ความเข้มข้นของไนซินและ pH ที่ระดับจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^3 spores/ml..... 23
รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Inhibition zone ความเข้มข้นของไนซินและ pH ที่ระดับจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^4 spores/ml..... 24
รูปที่ 10 Surface plot ของชิ้นปลานิลสดที่เก็บไว้ที่ความเข้มข้นของแก๊สและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน..... 25

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การจำหน่ายปลาสดที่มีอยู่ส่วนใหญ่แล้วมักอยู่ในรูปปลาสดทั้งตัว หรือถ้าเป็นปลาขนาดใหญ่ก็จะอยู่ในรูปตัดแต่งเป็นชิ้น เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปประกอบอาหาร ด้วยเหตุผลที่ผู้บริโภคต้องการความสดและราคาที่ไม่สูงมากนัก ปลานิล (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Oreochromis niloticus*, ชื่อสามัญ: Tilapia) เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (23.20%) ส่วนใหญ่นิยมบริโภคสดโดยราคาขึ้นอยู่กับฤดูกาล ขนาดและความสดของปลา (วิทย์ ธารชลานุกิจ, 2538) อย่างไรก็ตามยังมีความต้องการปลาในรูปแบบอื่นที่สามารถเก็บรักษาได้นาน เพื่อใช้ประโยชน์ในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ปลาประเภทต่างๆ ตามความต้องการของผู้บริโภค หรือมีความจำเป็นในเรื่องการขนส่งผลิตภัณฑ์ปลาสดที่เน่าเสียง่ายไปยังสถานที่อื่นเพื่อการส่งออกไปสู่แหล่งรับซื้ออื่นๆ ซึ่งสภาวะการการขนส่งและเก็บรักษาที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ส่งผลทำให้อายุการเก็บรักษาปลานิลสั้นลง ปลาเป็นอาหารที่เน่าเสียได้เร็วมาก (Perishable food) ภายหลังจากการจับพบว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสและคุณภาพทางเคมี เนื่องจากการสลายตัวของโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (autolysis) การรวมตัวกับออกซิเจนของไขมันเกิดการสลายตัวของไขมัน และกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย (Ashie, Smith, and Simpson, 1996) ดังนั้นจึงได้มีการถนอมรักษาปลาสดในหลายรูปแบบ เช่น การแช่แข็ง การดองเกลือ การตากแห้ง และรวมถึงการพัฒนานำเอาเทคนิคการบรรจุแบบปรับบรรยากาศ (Modified Atmosphere Packaging: MAP) มาประยุกต์ใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและควบคุมคุณภาพของเนื้อปลานิลสด ซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อให้มีคุณภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคตรงตามมาตรฐานที่กำหนดตลอดช่วงเวลาการเก็บรักษา มีความปลอดภัยจากการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และเป็นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ ซึ่งเป็นการเพิ่มความหลากหลายและมูลค่าของผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังช่วยส่งเสริมอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิล และช่วยเพิ่มรายได้แก่เกษตรกร อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาไปใช้ในปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆ ที่มีองค์ประกอบและลักษณะที่ใกล้เคียงกับปลานิล ซึ่งอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาสดที่บรรจุแบบ MAP เป็นเรื่องที่ควรพิจารณาอย่างยิ่ง เนื่องจากเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูปประเภทอื่นแล้ว อายุการเก็บจะสั้นกว่า แต่เป็นสิ่งที่น่าให้ความสนใจในการพัฒนาการยืดอายุการเก็บรักษา เนื่องจากข้อได้เปรียบของผลิตภัณฑ์ในเรื่องของความสดและการรักษาองค์ประกอบที่สำคัญในเนื้อปลาที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคไว้ได้ เพราะไม่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนหรือกระบวนการอื่นๆ ที่มีผลต่อการสูญเสียลักษณะหรือคุณค่าทางโภชนาการไป นอกจากนี้ผู้บริโภคสามารถใช้ในการประกอบอาหารได้หลากหลายประเภทตามความต้องการ ภายใต้สภาวะการเก็บแบบ MAP สามารถเลือกใช้ชนิดและปริมาณของก๊าซตามความเหมาะสม

ของผลิตภัณฑ์และสอดคล้องกับการทำลายจุลินทรีย์ที่ต้องการ เพื่อความปลอดภัยระหว่างการเก็บรักษา (Baker and Genigeorgis, 1990; Church and Parsons, 1995) ลักษณะการใช้ก๊าซสามารถใช้ได้ทั้งในรูปก๊าซเดี่ยวหรือก๊าซผสมในอัตราส่วนที่แตกต่างกันไป ก๊าซที่นิยมใช้ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide, CO_2) ออกซิเจน (oxygen, O_2) และไนโตรเจน (nitrogen, N_2) สัดส่วนของก๊าซที่เหมาะสมขึ้นกับพารามิเตอร์ของผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ความเป็นกรดด่าง (pH) ปริมาณน้ำอิสระที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ (water activity, a_w) ปริมาณและชนิดของไขมัน และอัตราส่วนปริมาตรของผลิตภัณฑ์กับก๊าซในชนิดของภาชนะบรรจุที่เลือกใช้ พบว่ากรณีการใช้ก๊าซ CO_2 ในปริมาณความเข้มข้นสูงมากกว่า 40% สามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นาน 2-3 เท่า โดยรักษาความสดและคุณภาพของปลาในระหว่างการเก็บรักษา ช่วยเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ปลา ลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ (Church, 1994) ผลิตภัณฑ์ที่เน่าเสียง่ายมักเกิดจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ ดังนั้นการบรรจุโดยใช้ก๊าซ CO_2 ในบรรยากาศ สามารถทำให้การเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ลดลง แต่วิธีการนี้ยังมีข้อจำกัดซึ่งอาจส่งผลต่อการเสริมเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobes) ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร (food-borne pathogens) เช่น สายพันธุ์ *Clostridium botulinum* (ICMSF, 1996; Lalitha and Gopakumar, 2000) มีรายงานวิจัยพบการปนเปื้อน *Clostridium* spp. ในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุแบบ MAP ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ผักสดและผลไม้สด (Larson, Johnson, Barmore, and Hughes 1997; Larsons and Johnson, 1999; Lilly, Solomon, and Rhodehamel, 1996) และในผลิตภัณฑ์ปลาที่บรรจุแบบสุญญากาศ (vacuum) หรือแบบ MAP ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 °ซ พบการสร้างสารพิษได้ภายในระยะเวลา 6-8 วัน (NACMCF, 1992) รายงานการแพร่ระบาดของโรคนี้ในประเทศไทยยังมีการศึกษาและบันทึกข้อมูลไว้ไม่มากนัก สำหรับหน่อไม้อัดปี๊บที่พบการปนเปื้อนของสารพิษโบทูลินัม (Botulinum Toxin) คาดว่าสาเหตุมาจากหน่อไม้ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ อาจมีการปนเปื้อนด้วยสปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* ซึ่งในขั้นตอนการผลิตอาจให้ความร้อนที่ไม่ทั่วถึง ทำให้ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* ได้ เนื่องจากการต้มในขณะผลิตจะช่วยไล่ออกซิเจนออกจากปี๊บ หลังจากทำการปิดปี๊บจะทำให้สภาวะภายในปี๊บ อยู่ในสภาพไร้ออกซิเจนจึงเหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ สปอร์เกิดการงอก (Germinate) และเจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น กลายเป็นเซลล์ที่มีชีวิตสร้างสารพิษโบทูลินัมซึ่งจัดเป็นสารพิษที่ทำอันตรายระบบประสาท (Neurotoxin) มีฤทธิ์ร้ายแรงมากและเป็นพวกที่ออกฤทธิ์ช้าปนเปื้อนในหน่อไม้นั่นเอง (นริศรา อ่อนศรี, www, 2549) ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาและการป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างสารพิษจากจุลินทรีย์โดยการบรรจุภัณฑ์ดังกล่าวมาแล้ว ยังคงต้องพิจารณาปัจจัยที่เข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมด้วย เช่น อุณหภูมิในการเก็บรักษา หรือการใช้สารถนอมอาหารร่วมด้วย จึงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์มากขึ้น

เนื่องจาก *Clostridium perfringens* จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคในตระกูล *Clostridium* spp. อีกสายพันธุ์หนึ่งที่เป็นพิษต่อผู้บริโภคโดยเมื่อบริโภคเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ของ *C. perfringens* เข้าไปในปริมาณที่

มากกว่า 10^8 cfu/g (Johnson, 1990) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสุขภาพของผู้บริโภคซึ่งพบว่าจะไม่มีอาการผิดปกติเกิดขึ้น อาการของโรคจะเกิดขึ้นเมื่อ *C. perfringens* ที่บริโภคเข้าไป สร้างสปอร์ และมีการปล่อยสารพิษออกมาในลำไส้เล็ก สามารถทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ หรืออาจก่อโรคได้เนื่องจากผลของสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นเมื่อเจริญอยู่ในทางเดินอาหารทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงอย่างรุนแรง และเป็นตะคริวที่ท้อง อาหารที่พบว่ามักจะเป็นสาเหตุของการระบาดได้แก่ เนื้อ ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลา ไก่ และผลิตภัณฑ์ไก่ ที่มีการปนเปื้อนจากเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ สปอร์ของเชื้อชนิดนี้จะพบในผักชนิดต่าง ๆ และเครื่องเทศ โดยการปนเปื้อนมาจากฝุ่นผง ดิน มูลสัตว์ อุปกรณ์เครื่องมือที่ไม่สะอาด หรือพนักงานที่มีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดี โดยทั่วไป *C. perfringens* เป็นปรสิต (obligate parasite) ในทางเดินอาหารของสัตว์และคน *C. perfringens* ที่พบ และมีการศึกษาแล้วมี 5 type คือ type A B C D และ E โดยแต่ละ type จะสร้างสารพิษที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งทั้ง 5 type นี้สามารถสร้างสารพิษได้ 4 ชนิด คือ alpha (α), beta (β), epsilon (ε) และ iota (ι) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของสารพิษที่ *C. perfringens* ผลิตขึ้น

Types of *C. perfringens*	ชนิดของสารพิษที่ผลิตขึ้น			
	α	β	ε	ι
A	+	-	-	-
B	+	+	+	-
C	+	+	-	-
D	+	-	+	-
E	+	-	-	+

ที่มา : ดัดแปลงจาก Johnson (1990)

จากการศึกษาพบว่ามีเพียง type A เท่านั้น ที่พบในดิน ทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ส่วนชนิดอื่น ๆ เป็นปรสิตถาวร (obligate parasite) type B, C และ D จะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคในสัตว์ ส่วน type C นั้นทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในคน และ type A นั้น เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารขึ้นมากที่สุด (ศิวาพร ศิวเวชช, 2542) เซลล์และสปอร์ของ *C. perfringens* สามารถเจริญและสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิช่วงกว้าง คือ ประมาณ 3.3-52 °ซ (Bryan and Bartleson, 1985) และในอาหารที่มีโปรตีนสูง เช่น เนื้อ ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์ไก่ ปลา และถั่ว อาหารที่มีโปรตีนสูงเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5-49 °ซ จะทำให้เกิดการเจ็บป่วยด้วยการติดเชื้อ และเกิดโรคจาก *C. perfringens* มากที่สุดโดยที่สปอร์สามารถงอกได้เมื่อผ่านการให้ความร้อน และมีการเจริญสูงขึ้นทำให้เกิดอันตราย อุณหภูมิช่วงอันตรายนี้ยังคงอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 21-49 °ซ อาหารจึงควรทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้

ผ่านอุณหภูมิช่วงอันตรายนี้ และให้อาหารมีอุณหภูมิต่ำกว่า 5 °ซ ซึ่งอาหารไม่ควรอยู่ในอุณหภูมิช่วงอันตรายนี้นานเกิน 2 ชั่วโมง แต่ส่วนมากแล้วกรณีที่ผ่านมาอาหารเหล่านี้มักถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิช่วงดังกล่าวนานเกินไป จึงเป็นสาเหตุของการเกิดอาหารเป็นพิษ (Perfringens food poisoning) ปลาที่ถูกจับมาเพื่อการบริโภค มักถูกปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิด การแช่เย็นหรือการใช้ความเย็นเพียงวิธีเดียวอาจไม่มีความเหมาะสมเพียงพอในการป้องกันการทำงานของจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ประมงเกิดการเน่าเสีย (Gram and Huss, 1996) ดังนั้นจึงมีการหาวิธีป้องกันปัญหาการเสื่อมคุณภาพของปลาจากการเสียเวลาในกระบวนการจับปลาและในการส่งออกสู่ตลาด มีการรวบรวมผลงานวิจัยการศึกษาถึงเทคนิคต่างๆ ในการใช้ถนอมอาหารเข้ากับการแช่เย็น (Leistner and Gorris, 1995) เพื่อเพิ่มประโยชน์ในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (spoilage microflora) ในปลา การใช้วิธีการและเทคนิคอื่นๆ ร่วมกันจะสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาของปลาได้ อย่างไรก็ตามผู้บริโภคต้องการอาหารที่เป็นธรรมชาติ ที่ไม่ได้ใช้สารเติมแต่งจำพวกสารเคมี จึงเป็นเหตุให้มีผู้สนใจศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้ชีวสารถนอมอาหารที่ผลิตจากธรรมชาติ (antimicrobial biopreservatives) มากมาย (Gould, 1996; Elotmani and Assobhei, 2003) ซึ่งมีการใช้เป็นชีวสารถนอมอาหาร (biopreservatives) สำหรับปลาและผลิตภัณฑ์ปลา โดยยังคงรักษาความเป็นธรรมชาติ (natural) ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยและมีคุณภาพสูง การประยุกต์ใช้วิธีการหรือเทคนิคอื่นๆ ร่วมด้วย เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้กันมาก เช่น การศึกษาการเลือกใช้วิธีการบรรจุภัณฑ์แบบ MAP ร่วมกับการใช้สารถนอมอาหารหรือวิธีการต่างๆ กัน เช่น การใช้เกลือ กรดอ่อน หรือการใช้สารไตรโซเดียมฟอตเฟต (Trisodium Phosphate, TSP) หรือ ซิทิลไพริดิเนียม คลอไรด์ (cetylpyridinium chloride, CPC) ในความเข้มข้นต่างๆ กัน (Moyls, Sholberg, and Gaunce, 1996; Epling, Carpenter, and Blackenship, 1993; Somers, Schoeni, and Wong, 1994; Vannetten, Mossel, and Tveld, 1995; Hwang and Beuchat, 1995) หรือการควบคุมอุณหภูมิ (Dhananjaya and Stroud, 1994)

การปนเปื้อน *Clostridium* spp. ในผลิตภัณฑ์อาหาร

C. botulinum พบมากในดิน มหาสมุทรและทะเลสาบที่มีความขุ่น โดยพบ *C. botulinum* type E ในสารละลายที่เป็นน้ำ ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับ *C. botulinum* type E ซึ่งพบว่ามีการปนเปื้อนมาสู่ปลาและอาหารทะเลอื่นๆ โอกาสในการปนเปื้อนเชื้อ *C. botulinum* หรือสารพิษในผลิตภัณฑ์อาหารจะมีมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับประเภทของอาหารและวิธีในการถนอมอาหาร รวมถึงวัฒนธรรมการบริโภคของแต่ละภูมิภาค อาหารที่มีสปอร์ของ *C. botulinum* ที่ไม่มีกระบวนการให้ความร้อนก่อนการบริโภค โดยเฉพาะอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำซึ่งมีค่า pH มากกว่า 4.6 จะมีโอกาสเสี่ยงต่อการเสริมการเจริญของ *C. botulinum* สูง ซึ่งจะมีการผลิตสารพิษต่อมาในภายหลังได้ สารพิษมักตรวจพบในปริมาณมากในอาหาร จำพวกข้าวโพดกระป๋อง พริกไทย ถั่วเขียว ซุป เห็ด ไก่ แฮม ไส้กรอก กุ้ง ปลาทูน่า ปลาแช่เกลือ เป็นต้น

Larson et al. (1997) พบว่า ผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่จะแสดงลักษณะการเน่าเสียปรากฏให้เห็นอย่างชัดเจน ก่อนที่จะพบระดับการปนเปื้อนสารพิษโบทูลินัม ผลิตภัณฑ์อาหารที่บรรจุแบบ MAP มีโอกาสปนเปื้อนสารพิษได้เช่นเดียวกัน การพัฒนาวิธีการควบคุมไม่ให้เกิดการปนเปื้อนหรือการเจริญของเชื้อ *Clostridium* spp. มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น กรณีผลิตอาหารที่ไม่จำเป็นต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็น จะใช้ความร้อนในการควบคุม เช่น ปลากระป๋อง หรือวิธีปรับสภาพให้มีความเป็นกรดมากขึ้น (pH น้อยกว่า 4.6) หรือควบคุมความชื้น หรือให้มีส่วนผสมของเกลือสูงๆ ถึง 20% หรือมากกว่า เป็นต้น กรณีที่ผลิตภัณฑ์อาหารเก็บรักษาที่อุณหภูมิเย็น วิธีการควบคุมจะคล้ายคลึงกัน ไม่ว่าจะเป็นการใช้ความร้อน การปรับสภาพ pH หรืออุณหภูมิเย็น เพียงต้องปรับความเหมาะสมของแต่ละสภาวะให้สอดคล้องกับประเภทของจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมายและลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์นั้นๆ และที่เป็นปัญหาที่พบมากได้แก่ ผลิตภัณฑ์ปลาสดบรรจุแบบ MAP ซึ่งไม่สามารถใช้ความร้อนในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อนบรรจุได้ จึงต้องอาศัยวิธีอื่นๆ ควบคู่ไปด้วย

อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาสดที่บรรจุแบบ MAP เป็นเรื่องที่ควรพิจารณาอย่างยิ่ง เนื่องจากเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ปลาแปรรูปประเภทอื่นแล้ว อายุการเก็บจะสั้นกว่า แต่หากมีวิธีการพัฒนาการยืดอายุการเก็บรักษา จะเป็นข้อได้เปรียบของผลิตภัณฑ์ในเรื่องของความสดและการรักษาองค์ประกอบสำคัญในเนื้อปลาที่เป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคไว้ได้ เพราะไม่ได้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนหรือกระบวนการอื่นๆ ที่มีผลต่อการสูญเสียลักษณะหรือคุณค่าทางโภชนาการไป นอกจากนี้ผู้บริโภคสามารถใช้ในการประกอบอาหารได้หลากหลายประเภทตามต้องการ

การใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์ปลาที่บรรจุแบบ MAP

จากการศึกษาการใช้สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มาจากธรรมชาติอยู่ในความสนใจของนักวิจัยทางด้านอาหารอยู่มาก สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวมากมายพบในพืช สัตว์ รวมถึงจุลินทรีย์ ซึ่งสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกสร้างโดยกลไกการต้านทานของโฮสท์ (host) การประยุกต์ใช้สารประกอบจากธรรมชาติ ควรต้องพิจารณาในเรื่องการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านรสชาด (organoleptic) และคุณสมบัติทางด้านเนื้อสัมผัสของอาหาร และอันตรกิริยาของสารประกอบกับส่วนผสมของอาหาร อิทธิพลของอันตรกิริยาเหล่านี้ที่มีต่อประสิทธิภาพการทำงาน (efficacy) เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่และมีความหลากหลายของการสังเคราะห์โปรตีนหรือเปปไทด์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ แบคเทอริโอซินจะส่งผลต่อเซลล์เมมเบรน ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโปรตอนผ่านรูในส่วนไบเลเยอร์ของฟอสโฟลิพิด (phospholipid) เกิดการสูญเสียหน้าที่ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์ที่สมบูรณ์ ทำให้เซลล์ถูกทำลายหรือตายในที่สุด แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นขณะที่มีการเจริญเติบโต ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (antimicrobial agent) ไนซินจัดเป็นสารประกอบชนิดหนึ่งในกลุ่มแบคเทอริโอซินที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งปัจจุบันหลายประเทศอนุญาตให้ใช้ไนซินได้ เนื่องจากไนซินจัดเป็นสารที่สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างปลอดภัย GRAS (Gernerally Recognised as Safe) โดยนำมาใช้

เป็นสารถนอมอาหาร (biopreservative) ในอาหารหลายชนิด เช่น อาหารกระป๋อง เนยแข็ง นม และเนื้อสัตว์ ซึ่งปริมาณมาตรฐานที่กำหนดใช้ 12-200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ (Jiang, 2000) ไนซินเป็นสารประกอบโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ผลิตจาก LAB โดยเฉพาะสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* (Mazzotta, Crandall, and Montville, 1997) ไนซินที่ได้เป็นโพลีเปปไทด์ของกรดอะมิโน 34 ชนิด (Delves-Broughton, 1990) มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus, Streptococcus, Micrococcus* และ *Listeria monocytogenes* โดยเฉพาะพวกที่สร้างสปอร์ เช่น *Clostridium* spp. และ *Bacillus* spp. (Hoover, 1993) เนื่องจากไนซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ และยังเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ จึงถูกนำมาใช้ในการถนอมรักษาอาหารพวกเนื้อ ผลิตภัณฑ์นม อาหารที่ทำจากโปรตีนจากพืช และอาหารกระป๋อง ไนซินมีผลยับยั้งการงอกของสปอร์มากกว่าผลการทำลายสปอร์ เมื่อสปอร์ได้รับอันตรายจากความร้อน ไนซินสามารถจับกับกลุ่มซัลไฮดริลที่อยู่บนพื้นผิวของสปอร์ได้ จะทำให้สปอร์มีความไวต่อไนซินมากขึ้น ได้มีการศึกษาการเติมสปอร์ของ *Clostridium* spp. ปริมาณ 200 สปอร์ต่อกรัม ลงไปในกระบวนการผลิตชีส พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 °ซ การเติมไนซิน 6.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถช่วยป้องกันการเน่าเสียของชีสได้ ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ได้เติมไนซินจะเกิดการเน่าเสียอย่างรวดเร็ว (Delves-Broughton, 2005) การใช้เทคโนโลยีหลายอย่างร่วมกัน (Hurdle technology) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการถนอมอาหารเพื่อให้เกิดการถนอมอาหารที่เป็นลำดับต่อเนื่อง มีผลทำให้จุลินทรีย์ที่เราไม่ต้องการไม่สามารถเจริญได้ ตัวอย่างเช่น การใช้อุณหภูมิในการเก็บ ค่า a_w ค่า pH ศักย์รีดอกซ์ (redox potential) สารถนอมอาหาร (preservatives) และเทคโนโลยีสมัยใหม่ เช่น MAP แบคเทอริโอซิน และการใช้ความดัน (ultrahigh pressure treatment) (Leistner and Gorris, 1995) อย่างไรก็ตามข้อมูลในส่วนของการใช้ไนซิน ซึ่งเป็นสารถนอมอาหารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกร่วมกับวิธีการบรรจุแบบ MAP ในปลาสดและผลิตภัณฑ์ปลา เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและลดการปนเปื้อนของ *Clostridium* spp. ยังมีน้อย ซึ่งผู้วิจัยสนใจที่จะประยุกต์ใช้ไนซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ *C. perfringens* ในเนื้อปลาที่บรรจุแบบ MAP โดยมุ่งเน้นศึกษาความเป็นไปได้และสภาวะที่เหมาะสมในการเลือกใช้วิธีนี้ เพื่อยืดอายุในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาสด และทำให้เกิดความมั่นใจในด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดของก๊าซ CO_2 และก๊าซ N_2 และอุณหภูมิในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลานิลสดที่บรรจุแบบ MAP

1.2.2 เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของไนซินที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ (germination) ของ *C. perfringens* ที่คัดแยกจากปลาที่บรรจุแบบ MAP

3. ขอบเขตของการวิจัย

ทำการแยกเชื้อ *Clostridium* spp. จากปลานิลบรรจุแบบ MAP ในสัดส่วนของก๊าซผสมของก๊าซ CO_2 และก๊าซ N_2 แตกต่างกัน เพื่อนำมาทดสอบความสามารถของไนซินในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์โดยใช้ *C. perfringens* ที่ทราบสายพันธุ์เป็นตัวควบคุมตลอดการทดลอง ใช้สัดส่วนของก๊าซผสมที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้ไนซินที่มีปริมาณความเข้มข้นแตกต่างกัน

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้ไนซินในปริมาณที่เหมาะสม ร่วมกับเทคนิคการบรรจุแบบ MAP โดยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาสดที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์และลดอัตราเสี่ยงต่อการเจริญและสร้างสารพิษจาก *C. perfringens* ที่อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค นอกจากนี้สามารถใช้ไนซินแทนสารถนอมอาหารที่เป็นสารเคมีได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นฉลากเขียว (green label) สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีรูปแบบใหม่ เพื่อเพิ่มปริมาณการขาย ส่งผลให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดในอนาคตได้

บทที่ 2
วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลานิลเมื่อเติมไนซินและเก็บรักษาที่สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

1.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการบรรจุภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

1.1.1 การเตรียมตัวอย่างและการบรรจุ

ปลานิลสด (*Oreochromis niloticus*) อายุประมาณ 5-6 เดือน ซื้อจากตลาดย่าโม จังหวัดนครราชสีมา โดยปลาจะถูกส่งมาจากฟาร์มปักธงชัย จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย การขนส่งใช้เวลา 30 นาที ทำการขอดเกล็ด ควักไส้ ลอกหนัง และแล่เนื้อปลา ชิ้นปลา (fillets) มีน้ำหนักประมาณ 100 กรัมต่อชิ้น บรรจุใส่ในถุงพลาสติกซึ่งเป็นฟิล์มลามิเนท (laminated film) ระหว่างพอลิเอไมด์ (polyamide, PA) และ โพลิเอทิลีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (Low density polyethylene, LDPE) พร้อมกับปล่อย CO_2 ด้วยอัตรา 32 มิลลิลิตรต่อตารางเมตรต่อ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ถุงฟิล์มในแต่ละใบที่บรรจุชิ้นปลา นำมาบรรจุภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศดังนี้ 75 % CO_2 : 25 % N_2 , 50 % CO_2 : 50 % N_2, 25 % CO_2 : 75 % N_2, 100 % CO_2 และสภาวะการบรรจุอากาศแบบปกติ (ตัวอย่างควบคุม) โดยใช้เครื่องการบรรจุแบบสุญญากาศ (Multivac Model S225, Vacuum Packaging Machine) และปิดผนึกด้วยความร้อน ถุงที่บรรจุปลาสดแล้วจะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 °ซ ในช่วงสัปดาห์แรกของการทดลองถุงที่บรรจุปลานิลสดจะถูกนำมาตรวจวัดความเข้มข้นของก๊าซแต่ละชนิดคือ CO_2, N_2 และ O_2 วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ทุกวัน หลังจากนั้นตรวจวิเคราะห์ทุก 3 วัน

1.1.2 ก๊าซบริเวณพื้นที่ว่างในภาชนะ (headspace gas)

หาปริมาณ (%) ของก๊าซ O_2 CO_2 และ N_2 ภายในถุงบรรจุตัวอย่างก่อนที่จะเปิดถุงเพื่อนำเอาตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟฟี (Model 6890, Perkin Elmer, Gas Chromatography) ซึ่งต่อกับ Thermal Conductivity Detector (TCD) ด้วยคอลัมน์ 20′×18″ O.D. SS pack ด้วย Carbosieve II ขนาด 80/100 mesh โดยใช้ฮีเลียม (Helium) เป็น carrier gas (EPA Method 3C, 1991)

1.1.3 การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

ตรวจวัดการเยิ้มน้ำของเนื้อปลา (exudation loss) คำนวณค่าน้ำหนักปลาที่สูญเสียไปในรูป % ความแตกต่างระหว่างน้ำหนักของชิ้นปลาสดในแต่ละชิ้นตอนก่อนบรรจุ (วันแรกของการเก็บรักษา) และน้ำหนักของชิ้นปลาหลังจากเก็บรักษาไว้ตามระยะเวลาที่กำหนด (วันที่ทำการสุ่มตัวอย่าง)

1.1.4 ค่า pH

วัดค่า pH ของตัวอย่างปลาด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (500 series, cole Parmer)

1.1.5 ไตรเมทธิลเอมีน (Trimethylamine, TMA)

ใช้วิธีทางสเปกโทโฟโตเมตรี (spectrophotometric method) สำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ TMA ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร (Ultraspec 2000, UV/Visible Spectrophotometer Pharmacia Biotech, England) โดยใช้วิธีของ AOAC (1995) แสดงค่า TMA ในหน่วย มิลลิกรัม ไตรเมทธิลเอมีนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

1.1.6 สารประกอบด่างที่ระเหยได้ (Total volatile base nitrogen, TVB-N)

ตรวจวัดค่า TVB-N โดยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) และไทเทรตด้วย 0.1 N กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid) คำนวนหา TVB-N ในตัวอย่างตามวิธีของ Malle (1986) แสดงค่า TVB-N ในหน่วย มิลลิกรัม TVB-N ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

1.1.7 ค่า K (K-value)

ตรวจวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแตกสลายตัวของอะดีโนซีน ไตรฟอตเฟส (Adenosine triphosphate, ATP) และอนุพันธ์ โดยใช้วิธีของ Ryder (1985) และแสดงค่าในรูปค่า % K โดยนำชิ้นปลา 5 กรัม มาปั่นกับ 25 มิลลิลิตรของ 0.6 M กรดเปอร์คลอริก ด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 3000 ×g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใส (supernatant) ที่ได้มา 10 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นกลางทันทีด้วย 1 M โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ให้ได้ค่า pH ประมาณ 6.5-6.8 หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 มิลลิเมตร Whatman No. 4, England) เก็บรักษาส่วนที่กรองได้ที่อุณหภูมิ –70 °ซ สำหรับการวิเคราะห์ขั้นต่อไป วัดปริมาณ ATP และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการแตกสลายตัวของ ATP โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดเหลวแบบมีสมรรถนะสูง (High – Performance Liquid Chromatography, HPLC) ด้วย Bio-sil C18 HL 90-5s (256×4.6 มิลลิเมตร) ตรวจวัดตัวชะ (eluant) โดยใช้ยูวี ดีเทคเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

1.1.8 การเปลี่ยนแปลงทางด้านจุลินทรีย์

สุ่มตัวอย่างชิ้นปลาจากส่วนต่างๆจากภาชนะบรรจุเดียวกันมาวมกัน ชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ในเปปโทน 0.1 % 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องตีผสม (stomacher) นำตัวอย่างที่ผสมเข้ากันดีแล้วมาทำการเจือจางด้วยเปปโทน 0.1 % เลือกระดับความเจือจางที่เหมาะสม ทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี spread plate บน Plate Count Agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable cell count) (cfu/g)

ใช้ pour plate method (ยกเว้นกรณี *Escherichia coli*) ในการหา LAB, *Vibrio* spp., *Staphylococcus aureus, Salmonella* spp., *Clostridium perfringens, Clostridium botulinum* และ *Escherichia coli* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Mann Rogosa Sharpe (MRS) agar, Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS), Baird-Parker Agar, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, Tryptose

Sulfite Cycloserine (TSC) agar, Trypticase Peptone Glucose Yeast Extract Broth และวิธี MPN ในระบบ 3 หลอด ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีคำนวณจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิด (AOAC, 1993)

1.1.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical analysis)

เปรียบเทียบระยะเวลาที่ทำการเก็บรักษาปลาในแต่ละสภาวะด้วย Duncan's multiple range test, ANOVA และหาสภาวะความเข้มข้นก๊าซในการบรรจุที่ดีที่สุดโดยใช้การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (response surface with statistical program)

1.2 การศึกษาความสามารถของไนซินในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์

1.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซื้อมาจากตลาดย่าโม จังหวัดนครราชสีมา มีน้ำหนักประมาณ 0.5 กิโลกรัม/ตัว ขึ้นไป อายุประมาณ 5-6 เดือน นำมาขอดเกร็ด ตัดหัว ลอกหนัง และแล่เป็นชิ้น น้ำหนักประมาณ 100 กรัมต่อชิ้น บรรจุลงในถุง PA/LDPE ขนาด 15×25 เซนติเมตร ความหนา 80 ไมครอน ภายใต้สภาวะ MAP คือ 75% CO_2 : 25% N_2 เก็บภายใต้อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

จากนั้นทำการคัดแยก *C. perfringens* ด้วย Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar บ่มภายใต้ anaerobic jar เป็นเวลา 3-5 วัน เก็บรักษา stock culture ของ vegetative cell ของโคโลนีที่คาดว่าน่าจะเป็น *C. perfringens* ที่ 4 °ซ ใน cooked meat medium ตรวจสอบยืนยันสายพันธุ์ด้วย API 20 STREP (Biomerieux, Marcy l'Etoile France)

1.2.2 การเตรียมตัวอย่างสปอร์

ก. เลี้ยงเชื้อ *C. perfringens* ที่คัดแยกจากตัวอย่างปลา และ *C. perfringens* มาตรฐานบน nutrient agar เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อมากๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ anaerobic jar เป็นเวลา 7 วัน

ข. นำมาทำการปั่นแยกสปอร์โดยนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifugation) 3 ครั้งต่อเนื่องกัน แล้วทำเป็น spore suspension อีกครั้งด้วยสารละลาย 0.2 M Sodium phosphate buffer pH 7.0 ที่ 2520×g เป็นเวลา 20 นาที (Anellis, Berkowitz, Kemper, and Rowley, 1972. quoted in Mazzotta, Crandall, and Montville, 1997) จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บ spore suspension ที่ 4 °ซ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ครั้งต่อไป (สามารถเก็บได้เป็นเวลา 6 เดือน)

1.2.3 ทดสอบความสามารถของไนซินในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์

ทดสอบความสามารถในการเจริญของตัวเซลล์ (vegetative cell) และสปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TPYG medium ที่ผสมด้วยไนซิน (Sigma Chemical Co., At. Louis, MO) ความเข้มข้น 0, 10, 10^2, 10^3 และ 10^4 International Unit (IU)/ml (1 IU ของกิจกรรมของไนซิน (nisin activity) มีค่าเท่ากับ 0.025 ไมโครกรัมของไนซิน) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ตรวจนับจำนวน *C. perfringens* ที่ 48, 72, 96, และ 168

ชั่วโมง แสดงจำนวนจุลินทรีย์ที่อยู่รอดทั้งของตัวเซลล์และสปอร์เป็น log N/N_0 (เมื่อ N คือ cfu/ml จากสภาวะที่เติมไนซินที่ความเข้มข้นต่างๆ และ N_0 คือ cfu/ml จากสภาวะที่ไม่เติมไนซิน)

1.2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม STATISTICA for Windows Release 5.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA)

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการหาสัดส่วนของก๊าซ CO_2 และก๊าซ N_2 ที่เหมาะสมที่สุด ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลานิลสดที่บรรจุแบบ MAP มีดังนี้

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการบรรจุภายใต้สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ

1.1 องค์ประกอบของก๊าซ

ตัวอย่างควบคุมซึ่งบรรจุภายใต้สภาวะอากาศปกติมีสัดส่วนของก๊าซเริ่มต้น ดังนี้ CO_2 0.02% N_2 77.96% และ O_2 20.02% และภายใต้สภาวะ MAP มีปริมาณ CO_2 23.78 48.93 74.67 และ 96.44% ตามลำดับ ปริมาณ N_2 74.06 49.08 23.44 และ 1.03% ตามลำดับ และ ปริมาณ O_2 1.69 1.54 1.66 และ 1.45% ตามลำดับ หลังจากเก็บไว้ในสภาวะ MAP เป็นเวลา 1 วัน CO_2 จะละลายเข้าไปในชิ้นปลา (fillets) ทำให้ความเข้มข้นของ CO_2 บริเวณ headspace ลดลง ซึ่งทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลองเบื้องต้นให้ผลเป็นเช่นเดียวกัน ทั้งนี้การละลายของ CO_2 ขึ้นอยู่กับตัวแปรหลายตัวประกอบด้วย อุณหภูมิ ปริมาณความชื้น และความเข้มข้น (Church and Parsons, 1995) ในการเก็บรักษาภายใต้แบบ MAP ร่วมกับการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษา มีผลทำให้ความเข้มข้นของ CO_2 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ที่อุณหภูมิในการเก็บรักษาทุกอุณหภูมิที่ทำการทดลอง ในช่วงแรกของการเก็บรักษาความเข้มข้นของ CO_2 จะลดลง แต่ต่อมาจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีกิจกรรมของจุลินทรีย์เกิดขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 0 °ซ มีความเข้มข้นของ CO_2 เท่ากับ 18.06 42.18 66.76 และ 90.09% ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงผล) ซึ่งผลการทดลองที่ได้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยการเก็บปลาแซลมอน rockfish fillets และอาหารทะเลที่อุณหภูมิแช่เย็นที่ระดับต่างๆ (Lundstrom and Racicot, 1983; Garcia, Genigeorgis, and Lindroth, 1987; Lindroth and Genegeorigs, 1986) จากผลการทดลอง (ตารางที่ 3) เมื่อมีการใช้ CO_2 มากกว่า 25% มีผลในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อปลานิล ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ashie et al. (1996) ได้ทำการทดลองศึกษาผลของก๊าซ CO_2 เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาปลาทะเลและหอย พบว่า CO_2 ตั้งแต่ 25% สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ 2-3 เท่า แต่เมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2 เกินกว่า 75% ความสามารถในการยืดอายุการเก็บรักษาก็ไม่ได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Church, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ คือ ที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้นานที่สุด ส่วนที่ 100% CO_2 ให้ผลไม่แตกต่างกับสภาวะ 50% CO_2 : 50% N_2 และเมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิพบว่าการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงร่วมกับการเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2 จะเพิ่มความสามารถในการยืดอายุการเก็บรักษา เนื่องจากเพิ่มความสามารถในการละลายของ CO_2 ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษาก๊าซ CO_2 ลดลง และที่อุณหภูมิ 0 °ซ มีความเข้มข้นของ CO_2 เหลือน้อยที่สุดเท่ากับ 5.99 21.78 46.77 72.31 และ

97.06% ตามลำดับ ส่วนปริมาณก๊าซ O_2 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือ 2.89 2.67 2.71 2.53 และ 2.65 ส่วนปริมาณ N_2 มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยและการเก็บรักษาแบบ MAP ทุกอุณหภูมิในการเก็บรักษา มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณ N_2 เพียงเล็กน้อย ($p>0.05$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบ จำนวนวันในการยืดอายุในการเก็บรักษาด้วย Duncan Multiple Range Test พบว่า ที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 สามารถยืดระยะการสูญเสียน้ำหนักได้มากที่สุด รองลงมาคือ 100% CO_2, 50% CO_2: 50% N_2 และ 25% CO_2: 75% N_2 ตามลำดับและที่อุณหภูมิ 0 °ซ สามารถยืดอายุการเก็บรักษามากกว่า 4 และ 10 °ซ ตามลำดับ

ในเชิงทฤษฎีการบรรจุแบบ MAP ควรไม่มีก๊าซ O_2 ในบริเวณ headspace ของภาชนะบรรจุ อย่างไรก็ตามหลังจากการเก็บตัวอย่างไว้ 16 วัน กรณีที่มีองค์ประกอบของก๊าซ 25% CO_2 : 75% N_2 ที่อุณหภูมิ 0 °ซ มีระดับของก๊าซ O_2 2.4% ซึ่งมาจากบรรยากาศด้านนอกภาชนะ หลังจากนั้นเมื่อเก็บตัวอย่างจนกระทั่งถึงวันที่ทำให้เกิดการเน่าเสียที่ทุกอุณหภูมิ ความเข้มข้นของ O_2 บริเวณ headspace จะค่อยๆ ลดลงจนไม่มีก๊าซ O_2 เหลืออยู่ การลดลงอย่างรวดเร็วภายใต้อุณหภูมิสูงมีผลทำให้เพิ่มกิจกรรมของจุลินทรีย์ และกิจกรรมภายหลังการตาย (postmortem activity) (Gram and Huss, 1996)

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณสูงสุดของดรรชนีที่บ่งบอกถึงการเน่าเสียของเนื้อปลานิล ซึ่งบ่มภายใต้อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 16 ชั่วโมง

ดรรชนีที่ทำการตรวจวัด	ค่าที่วัดได้
%weight loss	7.5
pH	8.3
TMA (มิลลิกรัม/100 กรัมของตัวอย่าง)	3.5
TVB-N (มิลลิกรัม/100 กรัมของตัวอย่าง)	25
K-value (%)	85

ตารางที่ 3 ระยะเวลาการเก็บรักษาปลาภายใต้สภาวะปรับเปลี่ยนบรรยากาศที่มีความเข้มข้นของก๊าซ CO_2 N_2 และ O_2 และที่สภาวะอากาศปกติ ณ อุณหภูมิ 0 4 และ 10 °ซ โดยใช้แบคทีเรียเป็นตัวบ่งชี้

สภาวะการเก็บรักษาปลา	อายุการเก็บรักษา (วัน)	ความเข้มข้นของก๊าซ (%)		
		CO_2	N_2	O_2
Normal air[a]	10^{A}	5.99	77.21	10.59
25% CO_2: 75%N_2[a]	19^{B}	21.78	72.87	2.89
50% CO_2: 50%N_2[a]	25^{C}	46.77	57.21	2.71
75% CO_2: 25%N_2[a]	37^{D}	72.31	33.01	2.5
100% CO_2[a]	28^{CE}	97.06	5.43	2.65
Normal air[b]	5^{F}	2.50	75.46	13.25
25% CO_2: 75%N_2[b]	7^{G}	23.26	71.43	2.35
50% CO_2: 50%N_2[b]	10^{H}	47.19	55.67	2.46
75% CO_2: 25%N_2[b]	16^{I}	73.08	30.87	2.38
100% CO_2[b]	13^{HJ}	93.50	4.30	2.37
Normal air[c]	3^{K}	2.23	74.53	11.45
25% CO_2: 75%N_2[c]	4^{L}	23.32	71.23	2.16
50% CO_2: 50%N_2[c]	6^{M}	48.48	57.32	2.32
75% CO_2: 25%N_2[c]	10^{N}	74.23	32.43	2.27
100% CO_2[c]	7^{OM}	95.26	4.01	2.53

หมายเหตุ : [a,b,c] คือ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0, 4 และ 10 °ซ ตามลำดับ

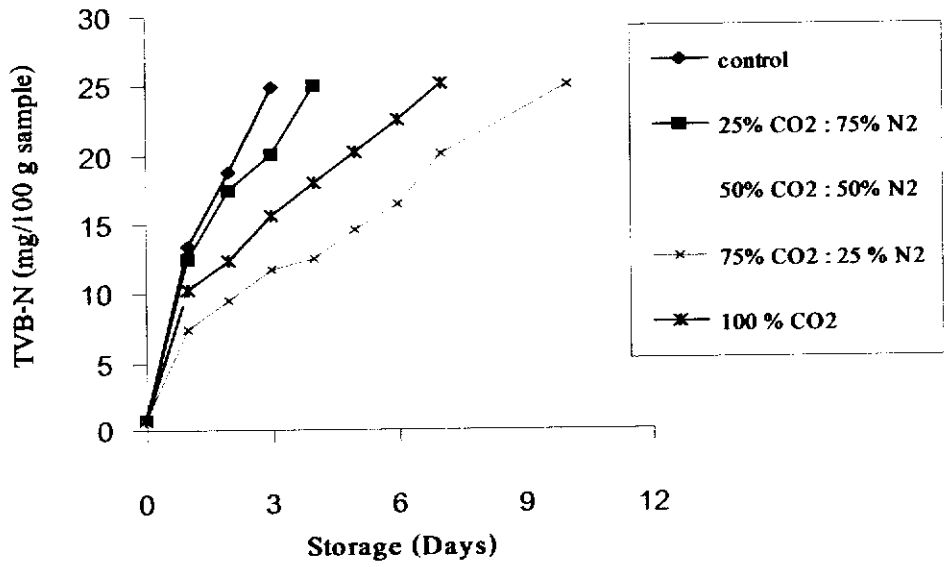
ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้ง คือ มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

1.2 สารประกอบด่างที่ระเหยได้ (Total volatile base nitrogen, TVB-N)

TVB-N เป็นสารประกอบด่างที่สามารถระเหยได้ ประกอบด้วย ไตรเมทธิลเอมีน (trimethyl-amine) แอมโมเนีย (ammonia) ไดเมทธิลเอมีน (dimethylamine) และ เอมีน (amine) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะถูกผลิตโดยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (bacterial spoilage) และเอนไซม์ (endogenous enzyme) TVB-N เป็นค่าที่บ่งชี้ทางด้านคุณภาพเพื่อใช้ในการประเมินความสดของปลา โดยปกติแล้วปริมาณ TVB-N ที่สามารถยอมรับได้ของปลา (lean fish) คือ 25 มิลลิกรัม TVB-N / 100 กรัม ตัวอย่าง (Malle and Poumeyrol, 1989) จากการทดลองพบว่า ค่า TVB-N ซึ่งบ่งบอกการเน่าเสียของชิ้นปลา มีค่า

เท่ากับ 25 มิลลิกรัม TVB-N / 100 กรัม เมื่อเก็บชิ้นปลานิลภายใต้อุณหภูมิ 35 ° ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (ตารางที่ 2)

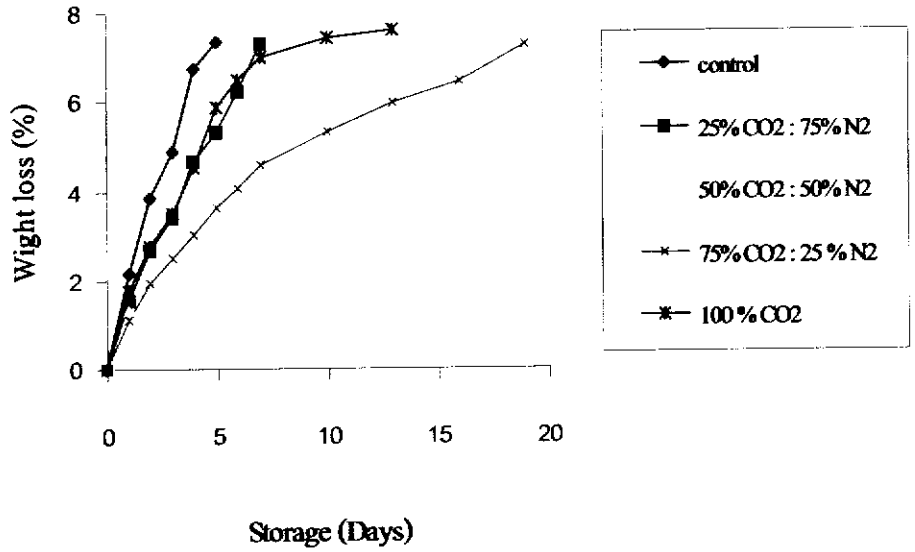
ระดับ TVB-N เริ่มต้นและสุดท้าย มีค่าเท่ากับ 0.84 และ 25.23 มิลลิกรัม TVB-N / 100 กรัม (ตัวอย่าง) ตามลำดับ ปริมาณ TVB-N แสดงผลดังรูปที่ 1 ที่สภาวะอากาศปกติระดับ TVB-N มีการสะสมอย่างรวดเร็วและถึงระดับที่ไม่ยอมรับภายในเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 10 °ซ ในสภาวะแบบ MAP และเก็บที่อุณหภูมิต่ำมีระดับ TVB-N เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) แต่เกิดช้ากว่าการเก็บในสภาวะอากาศปกติ ซึ่งแสดงว่าการบรรจุปลาในสภาวะแบบ MAP สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ สำหรับการบรรจุแบบ MAP ความเข้มข้น CO_2 ระหว่าง 50 และ 100% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น CO_2 75% อุณหภูมิ 0 °ซ ทำให้เกิด TVB-N ในระดับที่ยอมรับไม่ได้ในวันที่ 37 การพบค่า TVB-N ในปลาอยู่ในระดับต่ำภายใต้การบรรจุแบบ MAP อาจบ่งชี้ได้ว่ามีจำนวนจุลินทรีย์และ/หรือการที่ไม่มีออกซิเจนทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบไนโตรเจน (deamination) (Banks, Nickelson, and Finne, 1980) ซึ่งผลที่ได้เป็นไปตามการศึกษาของ Debevere and Boskou (1996) คือการบรรจุ cod fillets ในสภาวะ MAP ที่มีความเข้มข้น CO_2 และ O_2 เท่ากับ 60 และ 40% ตามลำดับ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 6 °ซ มีผลในการยับยั้งการเกิด TVB-N/TMA และการผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide, H_2S) ของจุลินทรีย์ (*Shewanella putrefaciens*)



รูปที่ 1 ปริมาณ TVB-N ของชิ้นปลา (Tilapia fillets) ของการบรรจุแบบอากาศปกติและ MAP (75% CO_2 : 25% N_2) ที่อุณหภูมิ 0 °ซ

1.3 การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

โดยปกติปริมาณน้ำที่ถูกปล่อยออกจากเนื้อปลามีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งไม่ใช่ปัญหาสำคัญที่มีผลต่อคุณภาพปลาแต่เมื่อมีการใช้ความเข้มข้น CO_2 ระดับสูง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง (Freeze temperature) จะเกิดการสูญเสียน้ำหนักน้ำหนักขึ้นทันที (Parry, 1993) weight loss เริ่มต้นของเนื้อปลามีค่า 0 % (รูปที่ 2)



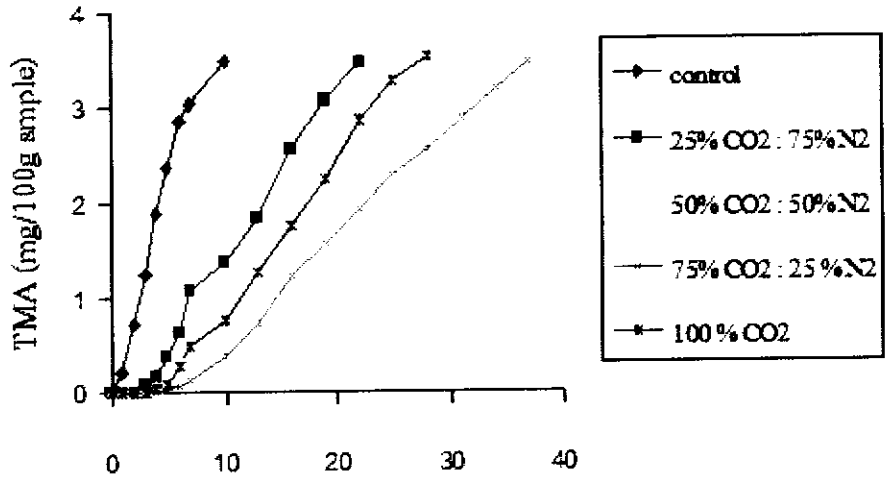
รูปที่ 2 การสูญเสียน้ำหนักของชิ้นปลา (Tilapia fillets) ของการบรรจุแบบใช้อากาศปกติ และแบบ MAP (75% CO_2 : 25% N_2) ที่อุณหภูมิ 0 °ซ

เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการเน่าเสียที่อุณหภูมิ 0 °ซ พบว่า การบรรจุแบบ MAP มีการสูญเสียน้ำหนักมากที่สุด เมื่อใช้ความเข้มข้นของก๊าซ 25% CO_2 : 75% N_2 มีค่าเท่ากับ 7.36% ส่วนที่ 100% CO_2 มีค่าเท่ากับ 7.51% และในสภาวะอากาศปกติมีค่าเท่ากับ 7.17% ในการบรรจุแบบ MAP การสูญเสียน้ำหนักมีสาเหตุมาจากการละลายของ CO_2 เข้าไปในพื้นที่ผิวของกล้ามเนื้อปลา (fresh muscle foods) และยังมีผลในการลดค่า pH มีผลทำให้ความสามารถในการจับกับน้ำ (water holding capacity) ของโปรตีนลดลง (Villemure, Simard, and Picard, 1986; Daniels, Krishnamurthl, and Rizvi, 1986)

1.4 ไตรเมทธิลเอมีน (Trimethylamine, TMA)

เมื่อปลาเริ่มเกิดการเน่าเสีย ความเข้มข้นของ TMA จะเพิ่มขึ้นซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณจุลินทรีย์ แบคทีเรียในปลาจะเปลี่ยนไตรเมทธิลเอมีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide, TMAO) ไปเป็น TMA ซึ่ง TMA เป็นสาเหตุของการเกิดกลิ่นคาวปลาและการเน่าเสีย ปริมาณ TMA ที่เกิดขึ้นสามารถใช้เป็นดัชนีในการประเมินอายุการเก็บและคุณภาพของปลาและอาหารทะเลได้ (Wang and Brown, 1983) ผลของ TMA แสดงได้ดังรูปที่ 3 ในวันแรกปลาสดยังไม่เกิด TMA และเมื่อถึงวันที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย

พบว่ามีปริมาณ TMA 3.53 มิลลิกรัม / 100 กรัม (ตัวอย่าง) ซึ่งปริมาณ TMA ที่บ่งบอกการเน่าเสียสอดคล้องกับข้อมูลในตารางที่ 2 ซึ่งปริมาณปริมาณ TMA ที่บ่งบอกการเน่าเสียจะอยู่ในช่วง 5 ถึงมากกว่า 26 มิลลิกรัม / 100 กรัมของตัวอย่าง จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (Dalgaard, Gram, and Huss, 1993)



รูปที่ 3 ปริมาณ TMA ของชิ้นปลา (Tilapia fillets) ที่บรรจุแบบใช้อากาศปกติและ MAP (75% CO_2 : 25% N_2) ที่อุณหภูมิ 0 °ซ

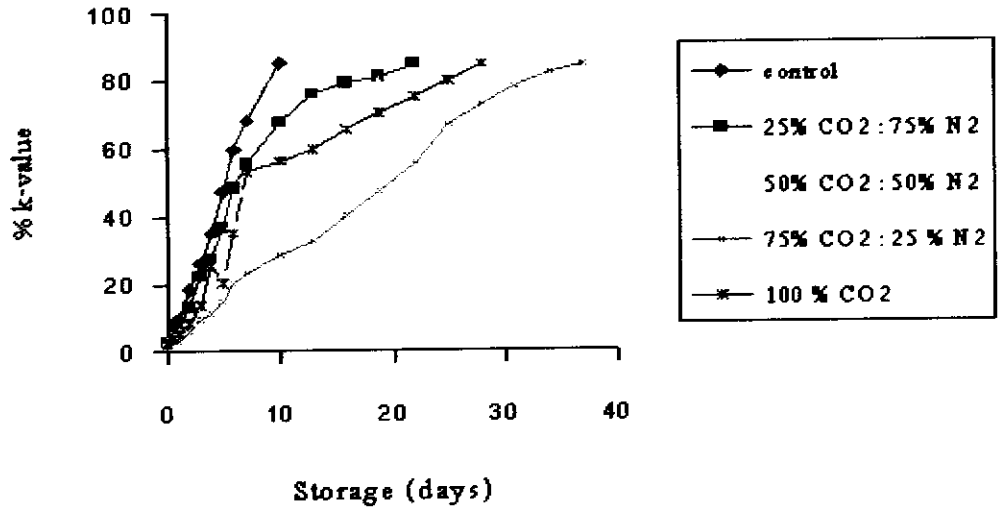
จากรูปที่ 3 สามารถสรุปได้ว่าเมื่อเวลาในการเก็บรักษานานขึ้นจะมีการสร้าง TMA จนมีปริมาณเกินระดับที่ยอมรับได้ ซึ่งการเก็บที่สภาวะอากาศปกติและ MAP มีปริมาณ TMA แตกต่างกัน โดยถ้าเก็บในสภาวะ MAP แล้วเพิ่มความเข้มข้น CO_2 การเกิด TMA จะเกิดได้ช้ากว่า ($p<0.01$) และการลดอุณหภูมิในการเก็บลงก็ทำให้เกิด TMA ได้ช้ากว่า ($p<0.01$) เช่นเดียวกัน ซึ่งการชะลอการเกิด TMA มีความสัมพันธ์กับการยืดอายุในการเก็บรักษา

ในการเก็บรักษาที่สภาวะอากาศปกติที่อุณหภูมิ 0 4 และ 10 °ซ จะเกิด TMA อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณเกินระดับที่ยอมรับได้คือ 3.53 มิลลิกรัม / 100 กรัม (ตัวอย่าง) (ตารางที่ 2) ภายในเวลา 10 วัน (รูปที่ 3) 5 และ 3 วัน (ไม่ได้แสดงผล) ตามลำดับ ในขณะที่การเก็บที่ 75% CO_2 : 25% N_2 ที่อุณหภูมิ 0 °ซ สามารถเก็บรักษาได้ถึง 37 วันถึงจะมีปริมาณ TMA เกินระดับที่ยอมรับได้ ที่สภาวะนี้จึงเป็นสภาวะในการเก็บรักษาที่ดีที่สุด สามารถยับยั้งการเจริญของพวกจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้รองลงมาคือ 100% CO_2 50% CO_2 : 50% N_2 และ 25% CO_2 : 75% N_2 ความเข้มข้นของ CO_2 และระดับของอุณหภูมิมีผลต่อการชะลอการเกิด TMA ซึ่งน่าจะมีผลจากการที่จุลินทรีย์สามารถทำให้เกิดการรีดิวส์ TMAO เปลี่ยนเป็น TMA ได้น้อยลง (Boskou and Debevere, 1997) อย่างไรก็ตามจากการทดลอง

ของ Davis (1990) พบว่า CO_2 มีผลทางอ้อมต่อการลดกิจกรรมของเอนไซม์ไตรเมทธิลเอมีนออกไซด์รีดักเทส (trimethylamineoxide reductase) ซึ่งผลิตโดยจุลินทรีย์

1.5 ค่า K (K-value)

ค่า K ใช้เป็นเกณฑ์ในการตรวจวัดคุณภาพความสดของปลาซึ่งจะบ่งบอกความสดของปลา (freshness) คำนวณจากการสลายตัวของ ATP และแสดงในรูป % (Reddy et al., 1997) การสลายตัวของ ATP จะเกิดขึ้นทันทีหลังจากที่ปลาตายแล้วซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ภายในกล้ามเนื้อปลา (Surette, Gill, and Lablanc, 1988) และกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Gill, Thomson, Gould, and Sherwood, 1987) ค่า K ของชิ้นปลาสด (fresh tilapia fillets) มีค่าเท่ากับ 2.54% และเพิ่มขึ้นเป็น 85.04% เมื่อตรวจวัดในวันที่เกิดการเน่าเสียแล้วที่ทุกสภาวะในการเก็บรักษา ค่า K ที่ตรวจวัดได้สอดคล้องกับค่า K ที่บ่งบอกการเน่าเสียของชิ้นปลาซึ่งบ่มภายใต้อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อเพิ่มเวลาในการเก็บรักษาให้นานขึ้นค่า K จะมีค่าเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4)



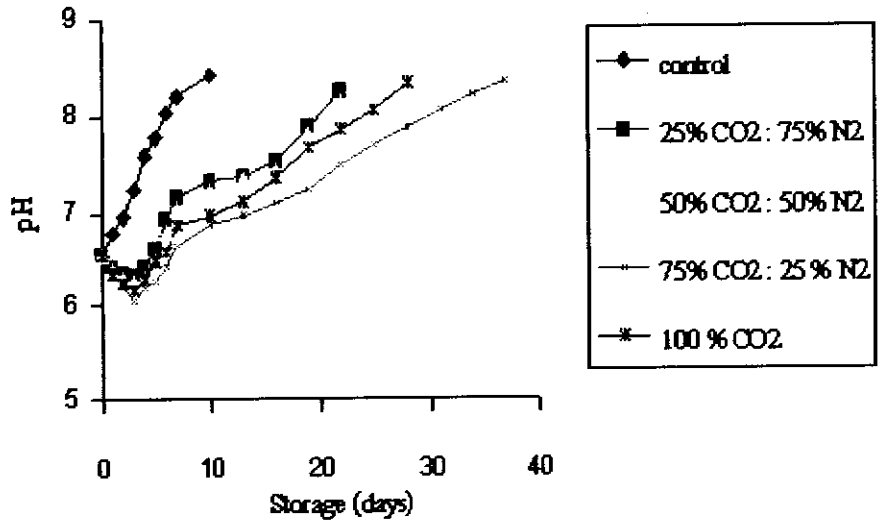
รูปที่ 4 ค่า K ของชิ้นปลา (Tilapia fillets) ที่บรรจุแบบใช้อากาศปกติและแบบ MAP (75% CO_2 : 25% N_2) ที่อุณหภูมิ 0 °ซ

อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการเก็บรักษาเพื่อให้ ค่า K มีค่าอยู่ในระดับที่ไม่ยอมรับของการเก็บรักษาที่สภาวะอากาศปกติมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) จากการเก็บที่สภาวะแบบ MAP จากข้อมูลพื้นฐานของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากจุลินทรีย์ ชิ้นปลาที่ถูกเก็บที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 ที่อุณหภูมิ 0 °ซ จะพบการเน่าเสียเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 37 วัน แต่อย่างไรก็ตามชิ้นปลาที่เก็บไว้เป็นเวลา 37 วันนี้มีค่า K ในปริมาณสูงถึง 85.11% จากการศึกษาของ Fujii et al. (1989) พบว่าการบรรจุปลาซาร์ดีนในสภาวะ MAP เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °ซ จะมีค่า K สูงและค่า K

มีความสัมพันธ์เพียงเล็กน้อยกับคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส (sensory quality) Handumrongkul and Silva (1994) พบว่าค่า K (traditional K value, K) ซึ่งคำนวณมาจากการรวมปริมาณไอโนซีน (inosine, Ino) นั้นเป็นค่าที่ไม่เหมาะสมในการใช้ทำนายอายุการเก็บ เพราะความเข้มข้นของ Ino มีค่าไม่คงที่จะมีค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงตลอดการเก็บรักษา จึงแนะนำให้ใช้การคำนวณหาค่า K ที่ดัดแปลงแล้ว (modified K value, K^*) ซึ่งค่า K^* จะไม่นำปริมาณ Ino มาใช้ในการคำนวณ ดังนั้น ค่า K^* จึงเป็นตัวบ่งชี้ (index) คุณภาพความสดของปลา (freshness) ที่ดีกว่าค่า K แบบเก่า

1.6 ค่า pH

ผลการเปลี่ยนแปลงค่า pH แสดงดังรูปที่ 5 ค่า pH เริ่มต้นของปลาสดคือ 6.54 และค่า pH สุดท้ายของปลาที่เน่าเสียแล้วมีค่าประมาณ 8.4 เป็นค่า pH ที่บ่งบอกการเน่าเสียของเนื้อปลาซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า pH ที่แสดงดังตารางที่ 2 การเก็บรักษาที่สภาวะอากาศปกติมีการเปลี่ยนแปลงค่า pH แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเก็บที่สภาวะ MAP ($p<0.05$) เมื่อเก็บที่สภาวะอากาศปกติ ค่า pH มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์และการเน่าเสียที่เกิดขึ้น (Manzano-mazorra, Aguilar, Rojas, and Sanchez, 2000) อุณหภูมิในการเก็บมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มค่า pH โดยการเก็บที่สภาวะอากาศปกติที่อุณหภูมิ 10 °ซ เป็นเวลา 2 วัน ค่า pH ของชิ้นปลามีค่าสูงมากกว่า 7.89 ในขณะที่การเก็บที่สภาวะ MAP ค่า pH จะลดลงจากค่า pH ตอนเริ่มต้นและจะเพิ่มขึ้นในเวลาต่อมา การเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2 และการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาลงมีผลทำให้ค่า pH ของชิ้นปลาลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

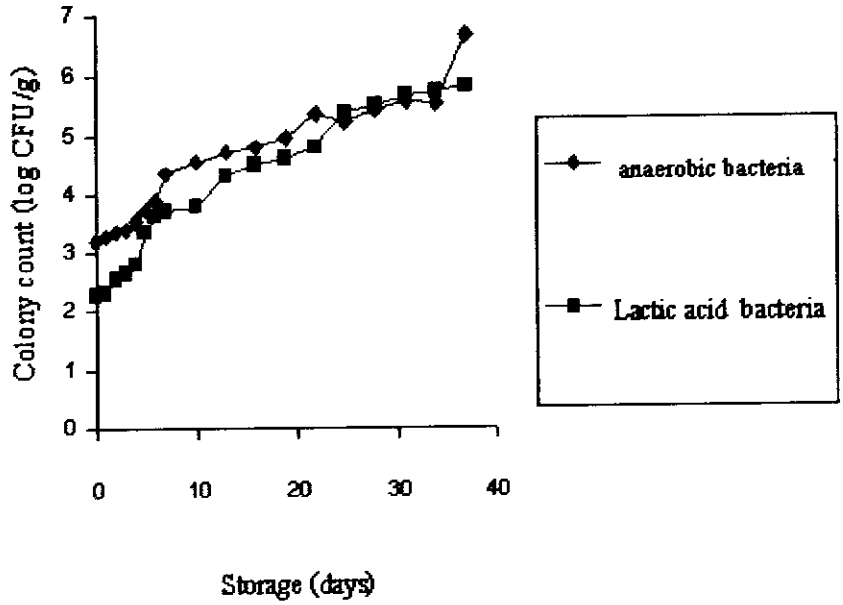


รูปที่ 5 ค่า pH ของชิ้นปลา (Tilapia fillets) ที่บรรจุแบบใช้อากาศปกติ (◆) และแบบ MAP (75% CO_2 : 25% N_2) ที่อุณหภูมิ 0 °ซ

ชิ้นปลาที่ถูกเก็บที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 ที่อุณหภูมิ 0 °ซ เป็นเวลา 4 วัน ค่า pH ลดลงเหลือ 6.19 การลดลงของค่า pH นี้อาจมีผลมาจาก CO_2 มีการละลายเข้าไปยังส่วนที่เป็นน้ำและไขมันของปลา (fish flesh) หลังจากนั้นค่า pH จะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการผลิตสารประกอบที่เป็นด่าง (alkaline compounds) เช่น แอมโมเนีย โดยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (spoilage bacteria) มีความไวต่อค่า pH ที่ลดลงและยังมีผลกระตุ้นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อกรดได้ โดยเฉพาะพวก LAB (Banks et al., 1980)

1.7 การเปลี่ยนแปลงเนื้อปลาสดเนื่องจากจุลินทรีย์ (Changes of flesh by microorganisms)

การเน่าเสียจะต้องใช้ระยะเวลาช่วงหนึ่งซึ่งสามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้มากกว่า 10^6 ถึง 10^7 cfu/g และสามารถแสดง off-odor อย่างชัดเจนและระดับที่ไม่สามารถยอมรับได้ของลักษณะที่บ่งชี้ทางเคมี (chemical indicator) (Cai, Harrison, Huang, and Silva, 1997) ชิ้นปลาที่เก็บรักษาที่สภาวะอากาศปกติและสภาวะ MAP ที่อุณหภูมิในการเก็บรักษาต่างๆ มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญแสดงดังรูปที่ 6 โดยปลาสด (fresh tilapia) มีจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเริ่มต้นเท่ากับ 2.1×10^3 และ 1.5×10^3 cfu/g ตามลำดับ ที่ทุกสภาวะในการเก็บจำนวนจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการเก็บ ภายใต้การเก็บที่สภาวะอากาศปกติเป็นเวลา 3 วัน จำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญทั้งหมดมีมากกว่า 10^7 cfu/g ซึ่งเป็นระดับที่ไม่ยอมรับ ในขณะที่สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2, 50% CO_2 : 50% N_2, 25% CO_2 : 75% N_2 และ 100% CO_2 จะถึงระดับที่ไม่ยอมรับภายในเวลา 4 6 10 และ 7 วัน ตามลำดับ (อุณหภูมิ 10 °ซ) จากผลการทดลองพบว่า LAB เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และเมื่อทำการเก็บตัวอย่างไว้ที่สภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศเป็นแบบสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จุลินทรีย์ที่ตรวจพบเปลี่ยนแปลงจาก aerobic count เป็น anaerobic count คือ LAB จากผลการทดลองนี้พบว่า CO_2 สามารถยับยั้งและทำให้การเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญช้าลง ความเข้มข้นของ CO_2 และอุณหภูมิในการเก็บมีผลโดยตรงต่อการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Reddy et al. (1997; Gray, Hoover, and Mur, 1983; Farber, Warburton, Gour, and Milling, 1990)



รูปที่ 6 จำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนและกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกชิ้นปลา (Tilapia fillets) ที่บรรจุแบบใช้อากาศปกติและแบบ MAP (75% CO_2 : 25% N_2) ที่อุณหภูมิ 0 °ซ

เมื่อใช้ความเข้มข้นของ CO_2 สูง (20 – 100%) ร่วมกับ N_2 และ/หรือ O_2 การเก็บรักษาอาหารแบบ MAP จะทำให้อายุการเก็บรักษาอาหารนานขึ้น CO_2 จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (psychotropic microorganism) โดยจะเพิ่มระยะเวลาในช่วงระยะเตรียมตัว (lag phase) และ จะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ต่อหนึ่งรอบ (generation time) ในช่วงระยะเพิ่มจำนวน (exponential phase) เพิ่มขึ้น หรืออาจเป็นเพราะเกิดการแพร่ของ CO_2 เข้าเซลล์อย่างรวดเร็วและมีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการซึมผ่านของเซลล์ (cell permeability) และเกิดการขยายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจาก CO_2 ไปรบกวนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ การละลายของกรดคาร์บอนิก (carbonic acid, H_2CO_3) นอกจากนี้ CO_2 ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ มีผลทำให้ค่า pH ภายในเซลล์มีค่าลดลง เกิดความไม่เสถียรของ pH ภายในเซลล์ และจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดจะถูกยับยั้งการเจริญและ CO_2 มีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์และวิถีของชีวเคมี (biochemical pathways) ซึ่งมีผลทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ช้าลง เนื่องจากไปลดความสามารถในการซึมผ่านของผนังเซลล์สปอร์ (Gould, 1989) ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของ CO_2 จะเกิดขึ้นเมื่อมี CO_2 10% และผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นอีกเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2 และลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาลง (Ray, 1996) เมื่อสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียได้ ดังนั้นจึงสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านอื่นๆ ได้ด้วย (Debevere and Boskou, 1996)

เมื่อมีการเติม CO_2 เข้าไปแทนที่ O_2 ทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ซึ่งในสภาวะนี้จะสามารถกระตุ้นการเจริญของ (facultative anaerobes, microaerophiles) หรือ (strict anaerobes) โดยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของบรรยากาศ (Bank et al., 1980) LAB มีผลทำให้เกิดการเน่าเสียภายใต้สภาวะ 75% CO_2 : 25% N_2 อุณหภูมิ 10 °ซ เมื่อนับจำนวน LAB ในวันที่ 4 ซึ่งเป็นวันที่เกิดการเน่าเสีย มีปริมาณสูงถึง 4.4×10^3 cfu/g

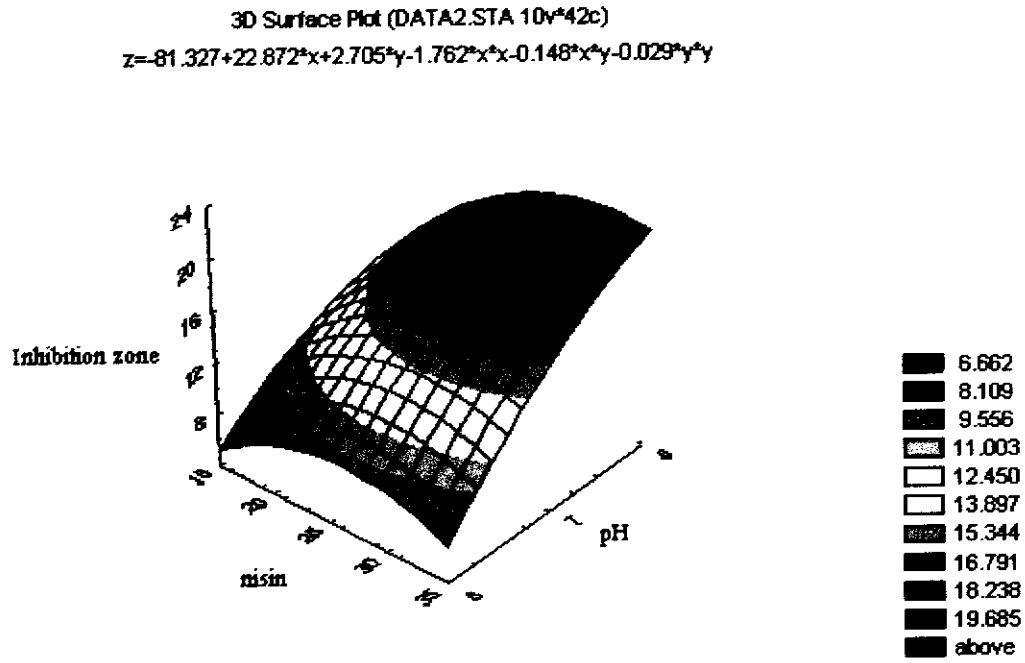
สำหรับจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganisms) อื่นๆ ที่ทำการศึกษาเช่น *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. และ *Salmonella* spp. จากการตรวจทุกตัวอย่างตรวจไม่พบจุลินทรีย์เหล่านี้ อย่างไรก็ตามโดยหลักการแล้วจะพบการเน่าเสียเมื่อใช้ตัวบ่งชี้ทางเคมีก่อนการตรวจพบจุลินทรีย์กลุ่มนี้เสมอ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Post et al. (1985) จากการศึกษาของ Llobrera (1983) พบว่า การเก็บรักษาที่ 100% CO_2 หรือ 70% CO_2 : 30% อากาศ ที่อุณหภูมิการเก็บ 4.4 °ซ การเน่าเสียที่แสดงทางด้านประสาทสัมผัส (sensory spoilage) จะเกิดก่อนการตรวจพบสารพิษในชิ้นปลา

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการบรรจุภายใต้สภาวะ MAP พบว่า สภาวะการบรรจุ 75% CO_2 : 25% N_2 เป็นสภาวะการบรรจุที่เหมาะสมที่สุด จึงใช้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดนี้ ในการศึกษาการหาปริมาณของไนซินที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการงอกและการเจริญของสปอร์ (Germination) ของ *C. perfringens* ที่คัดแยกจากชิ้นปลา

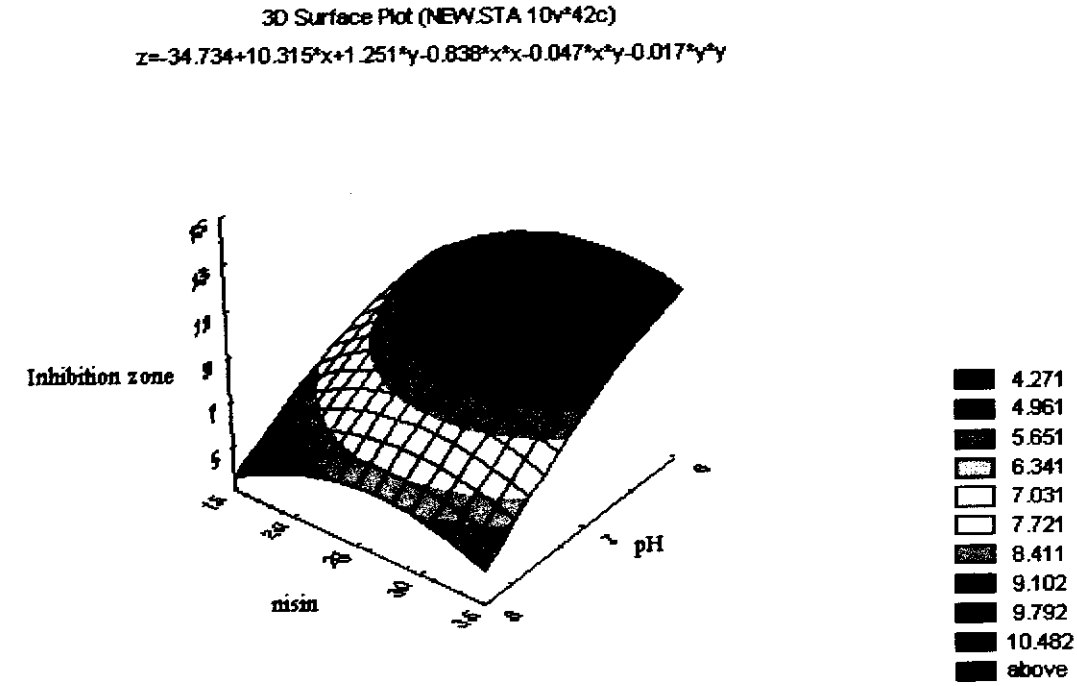
2. การศึกษาความสามารถของไนซินในการยับยั้งการงอกและการเจริญของสปอร์

จากการทดสอบความสามารถของไนซิน (Nisin) ในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ *Clostridium perfringens* ด้วยวิธี disc agar diffusion โดยการวัด Inhibition zone ซึ่งทำการทดลองที่จำนวนสปอร์เริ่มต้น 3 ระดับ คือ 10^2, 10^3 และ 10^4 spores/ml (Gram, 2001; Sivertsvik, Jeksrud and Rosnes, 2001) โดยในแต่ระดับของจำนวนสปอร์เริ่มต้นใช้ความเข้มข้นของไนซิน 5 ระดับ คือ 15, 20, 25, 30 และ 35 ppm ที่สภาวะ pH 3 ระดับ คือ 6, 7 และ 8 ผลการทดลองที่ได้นำไปสร้างกราฟ 3D Surface Plot ระหว่าง Inhibition zone, ความเข้มข้นของไนซินและ pH

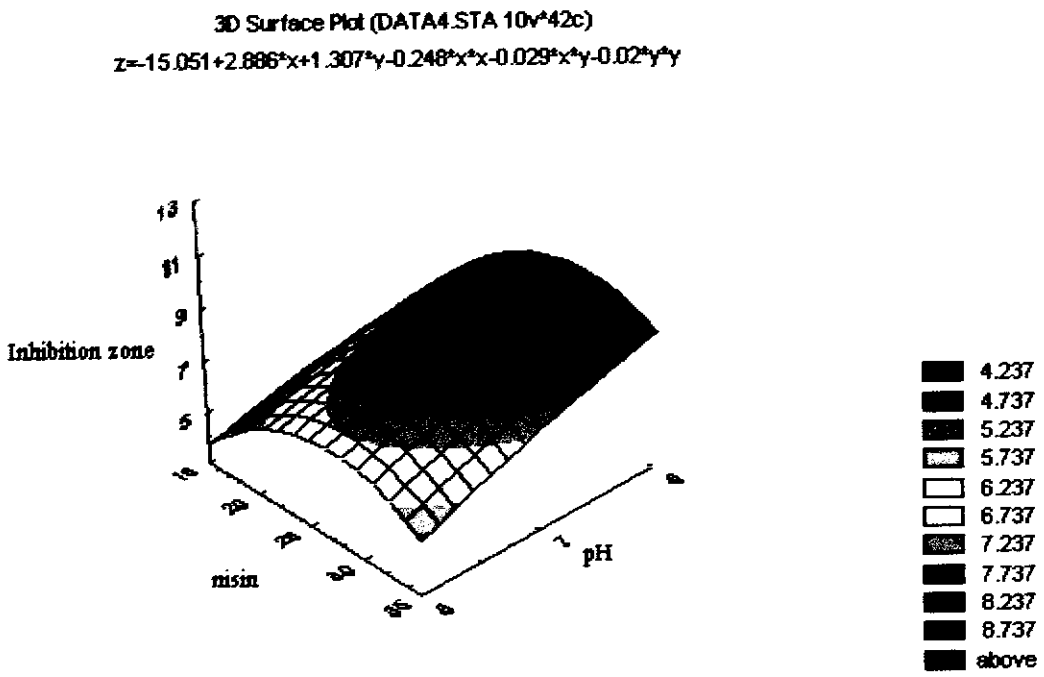
เมื่อพิจารณาที่ระดับจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^2 spores/ml ที่ pH 8 เมื่อความเข้มข้นของไนซินเพิ่มขึ้นระดับของ Inhibition zone ก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันจนถึงระดับความเข้มข้นของไนซินที่ระดับหนึ่ง จากนั้นขนาดของ Inhibition zone ก็มีแนวโน้มลดลงแต่ลดลงในระดับเล็กน้อยเท่านั้น แต่ที่ pH 6 กลับไม่มีแนวโน้มลดลง ดังรูปที่ 7 ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องและมีแนวโน้มเดียวกับการทดลองที่จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^3 และ 10^4 spores/ml ดังรูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Inhibition zone, ความเข้มข้นของไนซินและ pH ที่ระดับจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^2 spores/ml



รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Inhibition zone, ความเข้มข้นของไนซินและ pH ที่ระดับจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^3 spores/ml



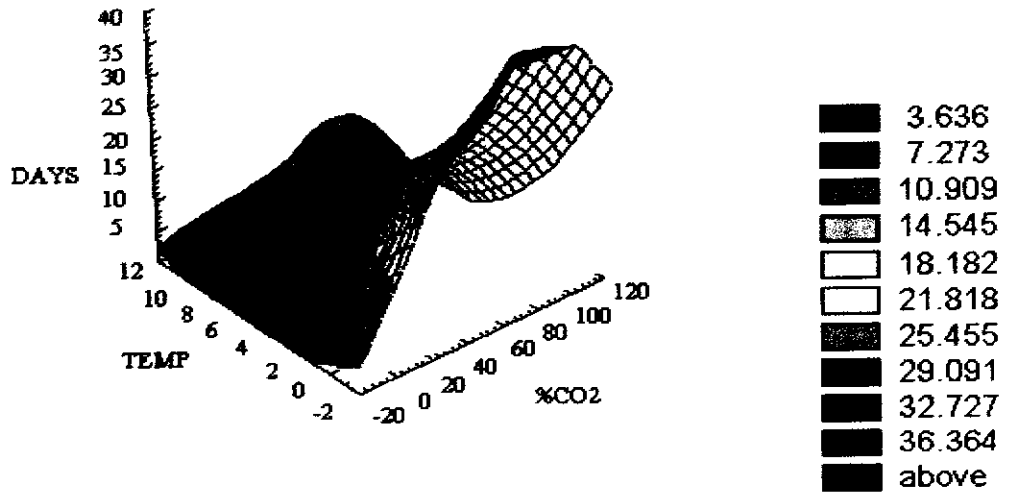
รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Inhibition zone, ความเข้มข้นของไนซินและ pH ที่ระดับจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^4 spores/ml

พิจารณาระดับความเข้มข้นของไนซินและ pH ที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการยับยั้งการงอกและการเจริญของสปอร์ที่ระดับ 10^2 spores/ml คือ ความเข้มข้นของไนซินอยู่ในช่วง 25-35 ppm และ pH เท่ากับ 6 เช่นเดียวกันกับที่ระดับสปอร์เริ่มต้นที่ 10^3 spores/ml และที่ระดับสปอร์เริ่มต้นที่ 10^4 spores/ml ความเข้มข้นของไนซินอยู่ในช่วง 25-30 และ pH เท่ากับ 6 จะเห็นได้ว่าที่ระดับ pH 6 (กรดอ่อน) ให้ผลการทำงานร่วมกับไนซินในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด และระดับของไนซินที่เหมาะสมที่สุดอยู่ในช่วง 25-35 ppm จากระดับของไนซินนี้ เพื่อหาระดับที่ให้ผลในการยับยั้งการงอกดีที่สุด จึงได้ทำการคำนวณโดยการแทนค่าของระดับความเข้มข้นของไนซินที่ระดับต่างๆ ในแต่ละสมการที่ได้จากการสร้างกราฟ 3D Surface Plot ในแต่ละระดับของสปอร์เริ่มต้น โดยให้ pH คงที่ที่ 6 ผลที่ได้พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนซิน เท่ากับ 30 ppm ให้ผลในการยับยั้งสูงที่สุดในทุกระดับของจำนวนสปอร์เริ่มต้น เพราะฉะนั้นสรุปได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของไนซินที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการงอกและการเจริญของสปอร์ คือ 30 ppm ที่ pH 6

บทที่ 4
บทสรุป

1. สรุปผลการวิจัย

ประสิทธิภาพของการบรรจุแบบ MAP และอุณหภูมิในการเก็บรักษา การเน่าเสียและอายุการเก็บของปลานิลเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอากาศปกติ โดยใช้ตัวบ่งชี้ทางด้านเคมี และด้านจุลินทรีย์ พบว่าการบรรจุชิ้นปลานิลในถุงฟิล์ม PA/LDPE ภายใต้ความเข้มข้นของก๊าซ 75% CO_2 : 25% N_2 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 °ซ เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษา (รูปที่ 10) สามารถเพิ่มอายุการเก็บได้นานถึง 37 วัน และผลิตภัณฑ์ยังคงมีความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค ในขณะที่ตัวอย่างควบคุม (สภาวะอากาศปกติ) เก็บได้เพียง 10 วัน โดยที่ปลานิลสดยังคงมีคุณภาพตามที่มาตรฐานกำหนดตลอดช่วงอายุการเก็บรักษา และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2 และลดอุณหภูมิประสิทธิภาพในการเก็บรักษาจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ตัวอย่างปลายังมีความปลอดภัยจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค



รูปที่ 10 Surface plot ของชิ้นปลานิลสดที่เก็บไว้ที่ความเข้มข้นของก๊าซและอุณหภูมิ ที่แตกต่างกัน

ค่า pH ของอาหารจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของไนซิน โดยพบว่าที่ค่า pH 6 เมื่อใช้ไนซินที่มีความเข้มข้นในช่วง 25-30 ppm จะทำให้ไนซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด เมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของไนซินที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์โดยใช้สมการจากกราฟ 3D surface ของแต่ละระดับของจำนวนสปอร์เริ่มต้น (รูปที่ 7, 8

และ 9) ที่ค่า pH 6 พบว่า ความเข้มข้นของไนซินที่ 30 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ *C. perfringens* ได้ดีที่สุด

2. ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยนี้ได้ข้อมูลความเข้มข้นก๊าซที่เหมาะสมที่ใช้ในการบรรจุแบบ MAP ปริมาณไนซินและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์ปลานิลสด เป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ปลาสดชนิดอื่นที่ต้องการยับยั้งการเจริญของ *C. perfringens* ส่งผลถึงการขยายระยะเวลาในการขนส่ง อีกทั้งช่วยลดอัตราการเสี่ยงต่อการสร้างสารพิษของ *C. perfringens* ที่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค ซึ่งสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

บรรณานุกรม

นริศรา อ่อนศรี. (2549). ***คลอสตริเดียม โบทูลินัม* เชื้อโรคร้ายในอาหารกระป๋อง** [ออนไลน์]. ได้มาจาก: http://www.dss.go.th/dssweb/st-articles/files/bsp_2_2549_clostridium.pdf

วิทย์ ธารชลานุกิจ. (2538). การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย. **บทความทางวิชาการและเอกสารประกอบการสอน.** กรุงเทพ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวาพร ศิวเวชช. (2542). **การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Anellis, A., Berkowitz, D., Kemper, D. and Rowley, D. B. (1972). Production of types A and B spores of *Clostridium botulinum* by the biphasic method: effects on spore population, radiation resistance, and toxigenicity. **Appl. Microbiol.** 23: 734-739. quoted in Mazzotta, A. S., Crandall, A. D. and Montville, T. J. (1997). Nisin Resistance in *Clostridium botulinum* Spores and Vegetative Cells. **Appl. Environ. Microbiol.** 63(7): 2654–2659.

AOAC. (1993). Official Methods of Analysis. **Association of official analytical Chemists.** Arlingtion, VA. p.1-8.

AOAC. (1995). Official Methods of Analysis, 15 th ed. **Association of official analytical Chemists.** Arlingtion, VA. p.7.

Ashie, A., Smith, P. and Simpson, K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 36: 87-121.

Baker, D. A. and Genigeorgis, C. (1990). Predicting the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of the lag phase growth. **J. Food Prot.** 53: 131-153.

Banks, H., Nickelson, R. and Finne, G. (1980). Shelf life studies on carbon dioxide packaged finfish from the Gulf of Mexico. **J. Food Sci.** 45: 157-159.

Boskou, G. and Debevere, J. (1997). Reduction of trimethylamine oxide by *Shewanella* spp. under modified atmospheres in vitro. **Food Microbiol.** 14: 543–553.

Bryan, F. L. and Bartleson, C. A. (1985). Mexicans style foodservice operations: hazard analyses, critical control points and monitoring. **J. Food Prot.** 48: 509-524.

Cai, P., Harrison, M. A., Huang, Y. W. and Silva, J. L. (1997). Toxin production by *Clostridium botulinum* Type E in package Channel Catfish. **J. Food Prot.** 60: 1385-1363

Church, N. (1994). Developments in modified atmosphere packaging and related technologies.

Trends Food Sci. Technol. 5: 345-352.

Church, I. and Parsons, A. (1995). Modified atmosphere packaging technology: a review. **J. Sci. Food Agric.** 67: 143-152.

Dalgaard, P., Gram, L. and Huss, H. H. (1993). Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmosphere. **Int. J. Food Microbiol.** 19: 283-294.

Daniels., J. A., Krishnamurthl R. and Rizvi, S. H. H. (1986). Effect of carbonic acid dips and packaging films on the shelf life of fresh fish fillets. **J. Food Sci.** 51: 929-931.

Davis, H. K. (1990). Some effects of modified atmosphere packaging gases on fish and chemical tests for spoilage. In: **Chilling and Freezing of New Fish Products** (p. 929-931). International Institute of Refrigeration Commission C2.

Debevere, J. and Boskou, G. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. **Int. J. Food Microbiol.** 31: 221-229.

Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its application as a food preservative. **Food Technol.** 44 (11): 100–117.

Delves-Broughton, J. (2005). Nisin as a food preservative. **Food Australia.** 57 (12): 525-527.

Dhananjaya, S. and Stroud, G. D. (1994). Chemical and sensory changes in haddock and herring stored under modified atmosphere. **Int. J. Food Sci. Tech.** 29: 575-583.

Elotmani, F. and Assobhei, O. (2003). In vitro inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 60-65.

EPA Method 3C. (1991). Determination of Carbon dioxide, Methane, Nitrogen, and oxygen from stationary source. CFR. 56, 24522-24524. quoted in Galli, A., Franzetti, L., Carelli, S., Pieriovanni, L. and Fava, P. (1993). Microbiological quality and shelf life of chilled cod fillets in vacuum-skin and modified atmosphere packaging. **Pack. Technol. Sci.** 6: 147-157.

Epling, L. K., Carpenter, J. A. and Blackenship, L. C. (1993). Prevalence of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. on pork carcasses and the reduction with lactic acid. **J. Food Prot.** 56:479-485.

Farber, J. M., Warburton, D. W., Gour, L. and Milling, M. (1990). Microbiological quality of foods packaged under modified atmospheres. **Food Microbiol.** 7: 327-334.

Fujii, T., Hirayama, M., Okuzumi, M., Yasuda, M., Nishino, H. and Yokoyama, M. (1989). Shelf-life studies on fresh sardine packaged with carbon dioxide-nitrogen gas mixture. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 55: 1971-1975.

Garcia, G. W., Genigeorgis, C. and Lindroth, S. P. (1987). Risk of growth and toxin production by *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B, E and F in salmon fillets stored under modified atmosphere at low and abuse temperatures. **J. Food Prot.** 50: 330-336.

Gill, T. A., Thomson, J. W., Gould, S. and Sherwood, D. (1987). Characterization of quality deterioration in yellowfin tuna. **J. Food Sci.** 52 (3): 580-583.

Gould, G. W. (1989). **Mechanism of action of food preservation procedures**. In Modified atmosphere. London: Elsevier Applied Science.

Gould, G. W. (1996). Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **J. Food Prot. Suppl.** 59: 82-86.

Gram, L. (2001). CHAPTER III Potential Hazards in Cold-Smoked Fish: *Clostridium botulinum* type E. **J. Food Sci.** 66 (7): 1082-1087.

Gram, L. and Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. **Int. J. Food Microbiol.** 33: 121-137.

Gray, R. J. H., Hoover, D. G. and Mur, A. M. (1983). Attenuation of microbial growth on modified atmosphere-packaged fish. **J. Food Prot.** 46: 600-613.

Handumrongkul, C. and Silva, J. L. (1994). Aerobic counts, color and adenine nucleotide change in CO_2 packed refrigerated striped bass strips. **J. Food Sci.** 59: 67-69.

Hoover, D. G. (1993). Bacteriocins with potential for use in foods. In **Antimicrobials in Foods.** P. M. Davidson and A. L. Branen (Eds.), 1988.

Hwang, C. A. and Beuchat, L. R. (1995). Efficiency of selected chemical for killing pathogenic and spoilage microorganisms on chicken skin. **J. Food Prot.** 58: 19-23.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1996). *Clostridium botulinum*. In: **Microorganisms in Foods 5: Microbiological Specifications for Foods Pathogens** (p. 66-111). London: Blackie Academic and Professional.

Johnson, E. A. (1990). **Foodborne Diseases**. New York: Academic Press.

Lalitha, K. V. and Gopakumar, K. (2000). Distribution and ecology of *Clostridium botulinum* in fish and aquatic environments of a tropical region. **Food Microbiol.** 17: 535-541.

Larson, A. E., Johnson, E. A., Barmore, C. R. and Hughes, M. D. (1997). Evaluation of the botulism hazard from vegetables in modified atmodphere packaging. **J. Food Prot.** 60(10): 1208-1214.

Larson, A. E. and Johnson, E. A. (1999). Evaluation of botulinal toxin production in packaged

fresh-cut cantaloupe and honey melon. **J. Food Prot.** 62(8): 948-52.

Leistner, L. and Gorris, L. G. M. (1995). Food preservation by hurdle technology. **Trends Food Sci. Technol.** 6: 41-46.

Lilly, T., Solomon, H. M. and Rhodehamel, E. J. (1996). Incidence of *Clostridium botulinum* in vegetables packaged under vacuum or modified atmosphere. **J. Food Prot.** 59(1): 59-61.

Lindroth, S. E. and Genigeorgis, C. A. (1986). Probability of growth and toxin production by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish stored under modified atmosphere. **Int. J. Food Microbiol.** 3: 167-174.

Llobrera, A. T. (1983). **Bacteriological safety assessment of** *Clostridium botulinum* **in fresh fish and shellfish packaged in modified atmosphere containing CO_2.** Ph.D. Thesis, Texas A&M University, pp. 85.

Lundstrom, R. C. and Racicot, L. D. (1983). Gas chromatographic determination of dimethylamine and trimethylamine in seafoods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 66: 1158-1164.

Malle, P. and Poumeyrol, M. (1989). A new chemical criterion for the quality control of fish: Trimethylamine/Total volatile basic nitrogen (%). **J. Food Prot.** 52: 419-423.

Manzano-mazorra, M. A., Aguilar, R. P., Rojas, E. I. and Sanchez, M. E. (2000). Postmortem changes in Black Skipjack muscle during storage in ice. **J. Food Sci.** 65: 774-779.

Mazzotta, A. S., Crandall, A. D. and Montville, T. J. (1997). Nisin Resistance in *Clostridium botulinum* Spores and Vegetative Cells. **Appl. Environ. Microbiol.** 63(7): 2654–2659.

Moyls, A. L., Sholberg, P. L. and Gaunce, A. P. (1996). Modified atmosphere packaging of grapes and strawberries fumigated with acetic acid. **Hortscience.** 31: 414-416.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF). (1992). **Vacuum or modified atmosphere packaging for refrigerated raw fishery products.** Report of the NACMCF. Adopted March 20, 1992.

Parry, R. T. (1993). **Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Food.** London: Blackie Academic & Professional.

Post, L. S., Lee, D. A., Solberg, M., Furgang, D., Specchio, J. and Graham, C. (1985). Development of botulinal toxin and sensory deterioration during storage of vacuum and modified atmosphere packaged fish fillets. **J. Food Sci.** 50: 990-996.

Sivertsvik, M., Jeksrud, W. K. and Rosnes, J. T. (2001). A review of modified atmosphere packaging

of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. **Int. J. Food Sci. Tech.** 37: 107-127.

Somers, E. B., Schoeni, J. C. and Wong, A. C. L. (1994). Effect of trisodium phosphate on biofilm and plankton cells f *Campylobacter jejuni*; *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. **Int. J. Food Microbiol.** 22: 269-276.

Surette, M. E., Gill, T. A. and Lablanc. P. J. (1988). Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus Morlua*) and its relationship to spoilage. **J. Agic. Food Chem.** 36: 19-22.

Ray, B. (n.d.). **Fundamental food microbiology** (p. 419). Florida: CRC Press.

Reddy, N. R., Roman., M. G., Villanueva, M. Solomon, H. M., Kautter, V. and Rhodehamel, E. J. (1997). Shelf life and *Clostridium botulinum* toxin development during storage of modified atmosphere-packaged fresh catfish fillets. **J. Food Sci.** 62: 878-883.

Ryder, J. M. (1985). Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.** 33: 678-680.

Vannetten, P., Mossel, D. A. A. and Tveld, J. H. I. (1995). Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses-a pilot plant study. **Int. J. Food Microbiol.** 25: 1-9.

Villemure, G., Simard, R. E. and Picard, G. (1986). Bulk storage of Cod fillets and Gutted Cod (*Gadus morhua*) under carbon dioxide atmosphere. **J. Food Sci.** 51: 317-320.

Wang, M. Y. and Brown, W. D. (1983). Effect of elevated CO_2 atmosphere on storage of freshwater Crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). **J. Food Sci.** 48: 158-162.

ภาคผนวก

ก. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Baird-Parker Agar

Basal medium		
Tryptone	10.0	กรัม
Beef extract	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Sodium pyruvate	10.0	กรัม
Glycine	12.0	กรัม
Lithium chloride.$6H_2O$	5.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	950	มิลลิลิตร

pH 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง

ถ่ายอาหาร 95 มิลลิลิตร ใส่ขวดจุกเกลียวนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากออกจากหม้อนึ่งถ้าจะใช้อาหารนี้เลยทิ้งให้อุณหภูมิอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงที่ 50 °ซ ถึงเติม 5 มิลลิลิตร egg yolk telluride enrichment ที่อุ่นจนมีอุณหภูมิ 45-50 °ซ เขย่าให้เข้ากันแล้วเท 15-18 มิลลิลิตรต่อ 1 จาน ทำให้อาหารแห้งก่อนใช้

2. Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Oxgall	20.0	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อนไม่รุนแรง ใส่หลอดขนาด 20×150 มิลลิเมตร หลอดละประมาณ 10 มิลลิลิตร บรรจุหลอดขนาด 10×75 มิลลิเมตร ให้คว่ำอยู่ข้างในหลอด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเปิดหม้อนึ่งต้องรอให้อุณหภูมิต่ำกว่า 75 °ซ

3. Eosin Methylene-Blue Lactose Sucrose agar (EMB)

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม

Sucrose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
Agar	13.0	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วนำไปให้ความร้อนเพื่อละลายให้วุ้นหลอมเหลว ตวงใส่ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละประมาณ 200 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงที่ 50 °ซ จึงเทลงในจานปลอดเชื้อจานละ 15-20 มิลลิลิตร

4. Lactose broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม

pH 6.9±0.2 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ใส่หลอดขนาด 20×150 มิลลิเมตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนเปิดหม้อนึ่งต้องรอให้อุณหภูมิต่ำกว่า 75 °ซ

5. Mann Rogosa Sharpe (MRS) agar

Proteose peptone No. 3	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Dispotassium phosphate	2.0	กรัม
Sodium acetate trihydrate	5.0	กรัม
Triammonium citrate	2.0	กรัม
Magnesium sulfate.$7H_2O$	0.2	กรัม
Magnesium sulfate.$4H_2O$	0.05	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

pH 6.2-6.6 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมในน้ำ ต้มให้เดือดเพื่อให้วุ้นละลาย ถ่ายใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

6. Plate Count Agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม.
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

pH 7.0 ที่อุณหภูมิห้อง

ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลายส่วนผสม แบ่งใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้ให้เติมสารปฏิชีวนะ Chlortetracycline-HCl และ Chloramphenicol อย่างละ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

7. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) Agar

Yeast extract	5.0	กรัม
Polypeptone	10.0	กรัม
Sodium citrate.$2H_2O$	10.0	กรัม
Sodium thiosulfate.$5H_2O$	10.0	กรัม
Oxgall	5.0	กรัม
Sodium cholate	3.0	กรัม
Sucrose	20.0	กรัม
Sodium chioride	10.0	กรัม
Ferric citrate	1.0	กรัม
Thymol blue	0.04	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

pH 8.6 ที่อุณหภูมิห้อง

ผสมส่วนประกอบต่างๆ แล้วให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย ให้ยกลงจากเตาทันทีที่อาหารเดือด เพื่อป้องกันการทำลายสารอาหารด้วยความร้อนสูง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 °ซ แล้วจึงเทใส่ในจานปลอด

เชื้อจานละ 10-20 มิลลิลิตร โดยไม่ต้องทำให้ TCBS ปลอดเชื้อ ทำให้ผิวหน้าอาหารแห้ง โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 18 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

8. Trypticase Peptone Glucose Yeast Extract Broth

Trypticase หรือ Tryptone	50.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	20.0	กรัม
Glucose	4.0	กรัม
Disodium phosphate	5.0	กรัม
Sodium thioglycollate	1.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

pH 7.3 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ใส่หลอดขนาด 20×150 เซนติเมตร หลอดละ 15 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ เป็นเวลา 8 นาที (ถ้าปริมาตรมากกว่านี้ใช้เวลา 15 นาที) เก็บในตู้เย็นจนกว่าจะใช้

9. Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) agar

Tryptose	15.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	1.0	กรัม
Sodium metabisulfite	1.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.6 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 °ซ เติมสารละลาย D-cycloserine 4.0% ซึ่งผ่านการกรองฆ่าเชื้อแล้ว 10.0 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ได้เป็น EY-free TSC agar)

แล้วเติมไข่แดง 50% ในสารละลายเกลือ (0.85%) ต่ออาหาร 500 มิลลิลิตร เทอาหารใส่จานปลอดเชื้อสำหรับ surface plating ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ให้เตรียมอาหารใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

10. Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar

Xylose	3.5	กรัม
Lysine	5.0	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Sodium desoxycholate	2.5	กรัม
Sodium thiosulfate	6.8	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Distilled water เพื่อปรับปริมาตรรวมให้ได้	1,000	มิลลิลิตร

pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง

ผสมส่วนผสมประกอบต่างๆ ใช้แท่งแก้วคนให้ผงอาหารกระจายในน้ำกลั่น จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่นที่เหลือทั้งหมดโดยมีปริมาตรรวม 1,000 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลาย ให้ยกลงจากเตาทันทีที่อาหารเลี้ยงเชื้อเดือด เพื่อป้องกันการทำลายสารอาหารด้วยความร้อนสูง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 °ซ แล้วจึงเทใส่ในจานปลอดเชื้อจานละ 10-20 มิลลิลิตร โดยไม่ต้องทำให้ XLD ปลอดเชื้อ ทำให้ผิวหน้าอาหารแห้งโดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 18 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ และควรใช้ทันทีไม่ควรเก็บไว้เกิน 1 วัน

ประวัติผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก

ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก

Asst. Prof. Dr. Piyawan Gasaluck

การศึกษา :

วุฒิ	สาขา	ปีที่จบ	สถาบัน/ประเทศ
ปริญญาเอก	Applied Sciences and Biotechnology	2539	Mie University/Japan
ปริญญาโท	Biotechnology and Biochemistry	2536	Mie University/Japan
ปริญญาตรี	Biology	2523	ม.ขอนแก่น/ไทย

ตำแหน่งทางวิชาการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตำแหน่งปัจจุบัน

หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประสบการณ์การทำงาน

1. ความชำนาญเฉพาะด้าน

Food Microbiology, Food fermentation and Food Safety

2. ประสบการณ์ทำงาน/ดูงาน/ฝึกอบรม

งานบริการวิชาการ

- เป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำด้านอนามัยสิ่งแวดล้อมสำหรับกิจการที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพแก่ศูนย์อนามัยสิ่งแวดล้อมเขต 5 นครราชสีมา

- เป็นที่ปรึกษาแก่โรงงานอุตสาหกรรม และร่วมเป็นวิทยากรอบรมพนักงานโรงงานในเขตนครราชสีมาเรื่องมาตรฐานความปลอดภัยGMP/HACCP

- เป็นคณะทำงานจัดทำระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการเพื่อการรับรองคุณภาพตามมาตรฐาน มอก. 17025 แก่หน่วยงาน (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี) ของมหาวิทยาลัย

- เป็นคณะจัดทำระบบการจัดการอาชีวอนามัยและความปลอดภัย มอก. 18001

- เป็นวิทยากรในหลักสูตรการตรวจสอบจุลินทรีย์ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารไทยร่วมกับสถาบันอาหารและศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ

- เป็นวิทยากรอบรมหลักสูตร GMP/HACCP/การปนเปื้อนข้าม/อันตรายของอาหาร/การควบคุมสุขลักษณะส่วนบุคคล ให้แก่ โรงงาน TPK starch จ. นครราชสีมา

- เป็นวิทยากรอบรมหลักสูตรแนวทางการจัดทำระบบคุณภาพมาตรฐาน GMP ของโรงงานผลิตอาหารสัตว์ ให้แก่ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. สาขาวิชาที่มีศักยภาพและสนใจในการทำวิจัย

Food Microbiology, Food Fermentation and Food Safety

- Control of food borne pathogen
- Food biopreservatives/Natural antimicrobials
- Starter cultures for food fermentation
- Microbe-microbe interaction, microbiological challenge testing

4. ผลงานทางวิชาการ :

Published Researches

1. Thongrajai, P., Gasaluck, P. et al., 1986, Diarrhoea in Children in Rural Thailand. A Full research report to the USAID Department of Microbiogy Faculty of Medicine Khon Kaen University.
2. Thongrajai, P., Gasaluck, P. et al., 1986, Detection of Anti-Rota Virus Secretory IgA by ELISA. The Second Annual Meeting on Faculty of Medicine Khon Kaen University.
3. Thongrajai, P., Chanarat, P., Kulapongs, P., Chanarat, N. and Gasaluck, P., 1988, Seroepidemiology of Anti-HIV I Antibodies. In Thailand, Srinagarind Hospital Medicine Vol 3. No. 4, Oct-Dec.
4. Thongrajai, P., Chanarat, P., Kulapongs, P., Chanarat, N., Gasaluck, P. and Kaewpila, S., 1988, Epidermiological Assessment of Anti-HIV I Anti-bodies in Thailand, Sounteast Asian. J. Trop. Med. Pub. Hith. Vol 19. No. 4 Dec.
5. Gasaluck, P., Midorigawa, Y., Imai, M. and Yoshimura, H., 1990, Enteropathogenic *E.coli* (ETEC) Isolation in Northeast Thailand and Their Resistance to Antibiotics. Mie Medical J.

40(3):379-384.

6. Midorigawa, Y., Hibasami, H., Gasaluck, P., Yoshimura, H., Masuji, A., Nakashima, K. and Imai, M., 1991, Evaluation of the Antimicrobial Activity of Methyglyoxal Bis (Guanylhydrazone) Analogdes, The Inhibitors for Polyamine Biosynthetic pathway. J. Applied. Bacteriol. 70: 291-293.
7. Hibasami, H., Midorigawa, Y., Gasaluck, P., Yoshimura, H., Masuji, A., Takaji, S., Nakasahima, K. and Imai M., 1991, Bactericidal Effect of 15-Deoxyspergualin, on *Staphylococcus aureus*. J. Chemotherapy. 37: 202-205.
8. Hibasami, H., Midorikawa, Y., Gasaluck, P., Tsukada, T., Shirakawa, S., Yoshimura, H., Imai, M. and Nakashima, K., 1992, Growth Inhibition of Canida By 15- Deoxyspergualin, an Immunosuppressive Agent Used In Experiment Organ Transplantation. Letters in Applied Microbiology. 14: 81-83.
9. Gasaluck, P., 1994, Thai Fermented Fish Sauce. In Proceedings of the International Seafood Research Meeting of Mie University, Mie Academic Press, September 30.
10. Chinzei, Y., Gasaluck, P., et al., 1995, A Study of Three Endemic Diseases in Rural Areas of Northeast Thailand. International Scientific Research Program (Grant No. 04041057), Mie University, School of Medicine.
11. Gasaluck, P., Yokoyama, K, , Kimura, T. and Sugahara, I., 1996, Some Chemical and Microbiological Properties of Thai Fish Sauce and Paste. J. Antibact. Antifung. Agents. 24(6): 385-390.
12. Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I., 1996, The occurrence of *Bacillus cereus* in Local Thai Traditional Foods. J. Antibact. Antifung. Agents. 24(5): 349-356.
13. Gasaluck, P., 1999, The Development of the Curricula of Food Technology of Suranaree University of Technology (SUT). In Proceedings of the International Workshop on University Education, Research and in Asia-Pacific Region, Mie University Press, April 6 and 7.
14. Thongbai, B., Waites, W. M. and Gasaluck, P., 2005, The susceptibility of Bioluminescent *Salmonella typhimurium* contaminating chicken carcasses to cetylpyridinium cholide an nisin. Kasetsart Journal: Natural Science October-December. 39 (4): 622-632.
15. Oonmetta-aree J., Suzuki T., Gasaluck, P. and Eumkeb, G., 2006, Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. LWT Food Science and Technology. 39: 1214-1220.

16. Thongbai, B., Gasaluck, P. and Waites, W. M., 2006, Morphological changes of temperature- and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. LWT Food Science and Technology. 39: 1180-1188.

Presentation Experiences :

1) "Detection of Anti-Rota Virus secretory Ig A byElISA" Medical Technology Association of Thailand, Pattaya, Thailand, April 1986.

2) "Seroepidermiology of Anti-HIV I Antibodies in Thailand." Annual Medical Symposium, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand, October 1988.

3) "Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) Isolated in Northeast Thailand and their Resistence to antibiotic. Japanese Tropical Medicine and Hygiene Meeting 32 nd, Yogahama University, Japan, November 1990.

4) "Microflora in Thai Kapi Paste." Japanese Society and Scientific Fisheries Meeting, University, Japan, April 1991.

5) "Monitoring of Food Poisoning Bacteria in Thai Food." Japanese Society and Scientific Fisheries Meeting, Nagasaki, University, Japan, October 1993.

6) "Thai fermented Fish Sauce." International Seafood Research Meeting of Mie University, Mie-Ken, Japan, September 1992.

7) "The Development of the Curricula of Food Technology of Suranaree University of Technology (SUT) ." International Workshop on University Education, Research and Management in Asia-Pacific Region, Mie University, Mie-Japan, April 1999.

Poster presentation :

1) Gasaluck, P. and Sugahara, I. Microbial Aspect of Thai Local fermentative Food. International Bio Symposium, 92 Nagoya, Japan, January 1992.

2) Oonmetta-aree, J., Gasaluck, P. and Eumkeb, G. Antimicrobial properties of galangal (*Alipinia galangal* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. The ten World Congress on Clinical Nutrition, International College of Nutrition (ICN), Prince of Songkla University, 30 November - 3 December, 2004. Thailand.

3) Thongbai, B. and Gasaluck, P. Effect of Temperature, Cetylpyridinium Chloride and Nisin on Morphological Changes of *Salmonella*. The eight Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy (8APEM), Kanazawa, 7-11 June, 2004. Japan.

4) Petkongkaew, A., Mathieu, F., Taillanddier, P., Gasaluck and Lebrihi,A. (2005). Interaction between *Bacillus subtilis* and *Aspergillus flavus* isolated from Thai fermented soybean product. Euro-maghrebin symposium on Biological, Contamination and Safety in Food, 7-9 September 2005. Morocco.