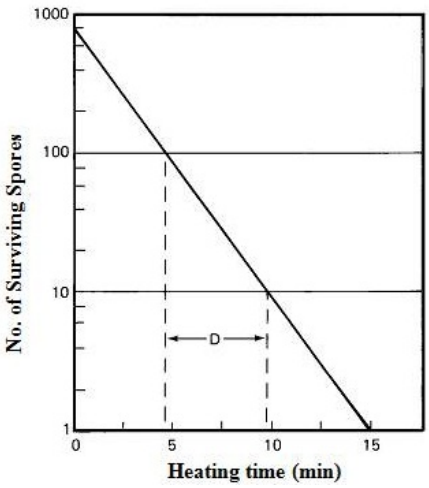
บทปฏิบัติการที่ 5
การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการอยู่รอกของเชื้อจุลินทรีย์
(D-value: decimal reduction time and z-value)

บทนำ

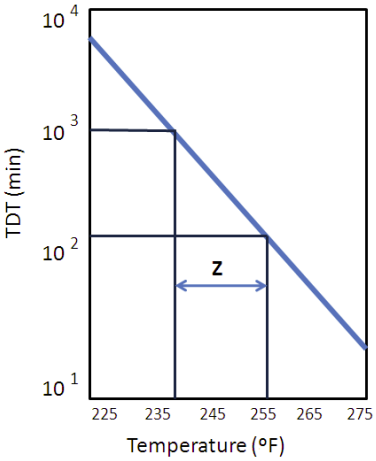
ความร้อนมักถูกใช้เพื่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ทั้งนี้ระดับความร้อนที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ประกอบด้วยลักษณะของอาหาร ผลกระทบของความร้อนต่ออาหาร การส่งผ่านความร้อนผ่านอาหารและภาชนะบรรจุ ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และความทนทานต่ออาหาร ทั้งนี้ในการคำนวณปริมาณความร้อน (อุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อน) ที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งๆถูกกำจัดไปนั้นสามารถหาได้จากค่า F-value หรือที่เรียกว่า thermal death time ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ใช้ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ลงจำนวนหนึ่งที่อุณหภูมิหนึ่งๆ และในสภาวะหนึ่งๆเท่านั้น เช่นในงานวิจัยของ Vijaykumar Desai et al. (2010) ที่ทดลองกำจัดเชื้อ *Bacillus cereus* ที่อุณหภูมิ 56°C ในน้ำนมพร่องมันเนย กับ ใน BHI broth เพื่อให้จำนวนเชื้อลดลงมาเท่ากัน พบว่าค่า F-value เท่ากับ 91.2 และ 127.2 นาที ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 60°C ค่า F-value มีค่าเข้าใกล้กันมากขึ้น (44.4 vs. 49.2 นาที) ทั้งนี้ค่า F-value นั้นนั้นก็ขึ้นกับความทนทานต่อความร้อนของเชื้อแต่ละตัวอีกด้วย ซึ่งในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนนั้น การลดลงของเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากความร้อนจะเป็นไปในรูปแบบ logarithmic ซึ่งเมื่อนำข้อมูลของ $\log_{10}$ (จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่รอด) มาสร้างความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ให้ความร้อน ณ อุณหภูมิหนึ่งๆ จะได้กราฟเส้นตรง เช่นในรูปที่ 1



$$D = \frac{Time_2 - Time_1}{\log(CFU\,1) - \log(CFU\,2)}$$

รูปที่ 1 กราฟแสดงการหาค่า D-value (http://ecoursesonline.iasri.res.in/mod/resource/view.php?id=5822)

และจากลักษระกราฟเช่นนี้ จะทำให้สามาหรถหาระยะเวลาที่ทำให้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ลดลง 90% หรือ 1 log ได้ เรียกว่า decimal reduction time หรือ D-value (มีหน่วยเป็นนาที) ดังนั้นหากทราบว่า เชื้อจุลินทรีย์ A ในน้ำนมพร่องมันเนยมีค่า D-value ที่อุณหภูมิ 60°C เท่ากับ 4.2 นาที หากต้องการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์นี้ลง 10^4 CFU/mL ก็จะต้องใช้เวลาเท่ากับ 4x4.2 เท่ากับ 16.8 นาที อย่างไรก็ตามหากต้องการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปเพื่อลดระยะเวลาในการให้ความร้อนซึ่งจะทำให้ลดผลกระทบต่อการเสื่อมสลายของสารอาหารและลักษณะต่างๆของอาหาร เช่น สี กลิ่น รส ก็จำเป็นที่จะต้องทำการทดลองที่อุณหภูมิต่างๆ ซึ่งเมื่อนำค่า $\log_{10}$ (F-value) ที่อุณหภูมิต่างมาสร้างกราฟกับอุณหภูมิต่างๆที่ทดลอง จะทำให้ได้กราฟดังรูปที่ 2



$$Z = \frac{Temp_2 - Temp_1}{TDT_1 - TDT_2}$$

$$TDT_2 = TDT_1 10^{\frac{Temp_2 - Temp_1}{z}}$$

รูปที่ 2 กราฟแสดงการหาค่า z-value (Rudi Radrigán Ewoldt, 2012)

ดังนั้นหากรู้ค่า z-value นี้ ก็จะทำให้สามารถหาค่า F-value ที่อุณหภูมิอื่นๆได้ และเนื่องจาก F-value สามารถคำนวณได้จากจำนวนเท่าของการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ดังนั้นค่า z-value ก็สามารถหาได้มาจากการสร้างกราฟระหว่าง $\log_{10}$(D-value) ที่อุณหภูมิต่างๆ และเมื่อต้องการค่า F-value ที่อุณหภูมิอื่นๆ ก็สามารถคำนวณได้จากค่า D ของอุณหภูมินั้นๆ จะเห็นได้ว่าความสัมพันธ์ระหว่าง D-value, z-value และ F-value ค่อนข้างมีประโยชน์เป็นอย่างมาก ซึ่งค่า D-value และ ค่า z-value ที่อุณหภูมิ 121 °C ของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถหาได้จากเอกสารทางวิชาการต่างๆ อย่างไรก็ตาม ค่า D-value และ ค่า z-value ของเชื้อจุลินทรีย์นั้นเปลี่ยนแปลงได้ตามปัจจัยต่างๆ ประกอบด้วย อาหารที่ใช้ และความเป็นกรด-ด่าง ดังนั้นการนำค่าที่ได้จากเอกสารวิชาการต่างๆมาใช้จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวัง อย่างไรก็ตามค่าที่ได้จากเอกสารทางวิชาการก็น่าจะมีความใกล้เคียงกับในสภาวะความเป็นจริงหากทำการทดลองที่อุณหภูมิสูง

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. นิสิตสามารถหาค่า D-value ของเชื้อจุลินทรีย์ได้
2. นิสิตสามารถหาค่า z-value ของเชื้อจุลินทรีย์ได้
3. สามารถประยุกต์คำนวณหาค่า F-value ได้หากทราบค่า D-value และค่า z-value

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. waterbath อุณหภูมิ 60, 70, 80 °C
2. sterile test tube จำนวน 60 หลอด
3. dilution tube 9 mL sterile peptone water 140 หลอด
4. Plate count agar 220 จาน
5. sterile pipette tip 5 กล่อง
6. auto pipette 200-1000 μL 2 อัน
7. spreader กลุ่มละ 2 อัน
8. Incubator 30°C
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. เชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 541 เลี้ยงใน MRS broth 24 ชั่วโมง
11. test tube rack

วิธีการทดลอง

1. ในการทดลองที่อุณหภูมิหนึ่งๆจะใช้ 2 กลุ่มในการทำการทดลอง โดยกลุ่มหนึ่งทำการทดลองที่เวลาการให้ความร้อนที่ 0, 4, 8 นาที และอีกกลุ่มหนึ่งที่เวลา 2, 6, 10 นาที
2. ปรับอุณหภูมิใน waterbath ให้ได้อุณหภูมิ 60 °C
3. ถ่ายเชื้อ *L. plantarum* 1 mL ลงใน sterile test tube เพื่อใช้ในการให้ความร้อนที่ 0, 4, 8 นาที หรือ 2, 6, 10 นาที
4. นำหลอดทดลองที่มีเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 3 ใส่ลงใน test tube rack แล้วไปให้ความร้อนใน waterbath ตามระยะเวลาในข้อ 3
5. เมื่อครบกำหนดเวลา นำ test tube 1 หลอดมาเติม sterile peptone water 9 mL (aseptic) เพื่อลดอุณหภูมิลงและเป็นการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์ แล้วนำไป vortex ให้เข้ากัน
6. นำหลอดที่ได้จากข้อ 5 ไปทำการเจือจาง (ดูด 1 mL ผสมกับ sterile peptone water 9 mL (aseptic)) ตามตารางด้านล่าง แล้วจึงนำไป spread ลงในจานอาหาร PCA โดยใช้หลอดที่เจือจางมากสุด 3 หลอดสุดท้าย ทำการ spread dilution ละ 2 plates
7. นำจานอาหาร PCA ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. เริ่มกระบวนการทดลองใหม่โดยเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 70 และ 80 °C ตามลำดับ

ตารางที่ 1 การเจือจางเชื้อจุลินทรีย์

ระยะเวลาในการให้ความร้อน (นาที)	60 °C	70 °C	80 °C
	การเจือจาง (เท่า)		
0	10^6	10^6	10^5
2	10^5	10^5	10^4
4	10^4	10^4	10^3
6	10^4	10^3	10^2
8	10^3	10^2	10^2
10	10^3	10^2	10^1

คำถาม

ถ้าต้องการลดจำนวนเชื้อ L. plantarum ที่เลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 100 °C ลง $8D_{100}$ ต้องใช้ระยะเวลากี่นาที

References

Vijaykumar Desai, S. and Chakravarathy Varadaraj, M. (2010). Behavioural pattern of vegetative cells and spores of *Bacillus cereus* as affected by time-temperature combinations used in processing of Indian traditional foods. Journal of Food Science and Tehnology. 47(5): 549–556.

Rudi Radrigán Ewoldt (2012). Computer Simulation of Thermal Processing for Food, Heat Transfer Phenomena and Applications, Dr M. Salim Newaz Kazi (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/51815. Available from: http://www.intechopen.com/books/heat-transfer-phenomena-and-applications/computer-simulation-of-thermal-processing-for-food