ผลของน้ำโอโซนและการบรรจุแบบสุญญากาศต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เสื่อมเสียบางชนิดในปลานิล *Oreochromis niloticus* แล่

นางสาวอาทิตยา ทิพย์มณี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF OZONE WATER AND VACUUM PACKAGING ON GROWTH OF SOME PATHOGENIC AND SPOILAGE BACTERIA IN NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus* FILLETS

Miss Atitaya Tipmanee

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของน้ำโอโซนและการบรรจุแบบสุญญากาศต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เสื่อมเสียบางชนิดในปลานิล *Oreochromis niloticus* แล่
โดย	นางสาวอาทิตยา ทิพย์มณี
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร.ธีรนันท์ เจนจรัสสกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิติพงศ์ อัศตรกุล)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

อาทิตยา ทิพย์มณี : ผลของน้ำโอโซนและการบรรจุแบบสุญญากาศต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เสื่อมเสียบางชนิดในปลานิล *Oreochromis niloticus* แล่ (EFFECTS OF OZONE WATER AND VACUUM PACKAGING ON GROWTH OF SOME PATHOGENIC AND SPOILAGE BACTERIA IN NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus* FILLETS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สุเมธ ตันตระเธียร, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา, 76 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้โอโซนในรูปของสารละลายต่ออายุการเก็บรักษาปลานิลแล่แช่เย็นที่บรรจุในบรรยากาศปกติและสุญญากาศ ติดตามคุณภาพทางจุลินทรีย์ และกายภาพเคมี โดยศึกษาการใช้น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0-2 ppm) สำหรับทำความสะอาดปลานิลแล่ด้วยวิธีการแช่ และใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm ทำความสะอาดเป็นตัวอย่างควบคุม พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ลดลง (log reduction) ค่าดัชนีสีขาว (whiteness index) ค่าความแตกต่างสี (ΔE) ค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (TBARS) และ % การสูญเสียน้ำหนัก (% weight loss) ของปลานิลแล่มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโอโซนเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) น้ำโอโซนที่ 1 ppm คือความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้โดยไม่แตกต่างจากน้ำโอโซนที่ 1.5 ppm ($p \leq 0.05$) และยังคงรักษาคุณภาพทางกายภาพเคมีของปลานิลแล่ การใช้น้ำโอโซนความเข้มข้น 1 ppm แช่ปลานิลเป็นเวลา 1 นาที สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด *Staphylococcus aureus* lactic acid bacteria (LAB) และ *Pseudomonas* spp. ได้ 0.40 0.46 0.47 และ 0.28 log ตามลำดับ เนื่องจากตัวอย่างปลานิลแล่ที่ใช้ในการศึกษาไม่พบการปนเปื้อนของ *Vibrio cholerae* และ *Salmonella* spp. ในปลานิลแล่ จึงเติมเชื้อลงในตัวอย่างปลานิลแล่ เมื่อนำมาแช่ด้วยน้ำโอโซน 1 ppm เป็นเวลา 1 นาที พบว่าน้ำโอโซนสามารถลดจำนวนแบคทีเรียดังกล่าวได้ 0.36 และ 0.26 log จากการทดลองเก็บรักษาปลานิลแล่ผ่านการแช่น้ำโอโซนที่ 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm บรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติ (ตัวอย่างควบคุม) และสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส พบว่าตัวอย่างที่แช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์บรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติและสุญญากาศ มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินเกณฑ์มาตรฐานกำหนดที่ 10^7 CFU/g ในวันที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างแช่น้ำโอโซนบรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติและสุญญากาศ มีปริมาณจุลินทรีย์เกินมาตรฐานในวันที่ 5 และ 7 ตามลำดับ การติดตามลักษณะทางกายภาพเคมี พบว่าค่าดัชนีสีขาวของปลานิลแล่ทุกสภาวะการเก็บรักษามีแนวโน้มลดลง และปลานิลแล่แช่ด้วยน้ำโอโซนบรรจุสุญญากาศยังคงมีค่าดัชนีสีขาวสูงกว่าทุกตัวอย่าง ในขณะที่ค่า Total Volatile Base Nitrogen (TVB-N), pH และ TBARS ไม่เกิน 30 mg /100 g, pH 7 และ 2 mgMDA/kg ตามลำดับตลอดการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ของปลานิลแล่แช่ด้วยน้ำโอโซนบรรจุสุญญากาศ ดังนั้นจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำโอโซนในการแช่และการบรรจุสภาวะสุญญากาศ สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์และยังรักษาคุณภาพทางกายภาพเคมี และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของปลานิลแล่ได้เพิ่มขึ้น 2-3 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต	.....
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	.....
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม	.....

5772219023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY
KEYWORDS:

ATITAYA TIPMANEE: EFFECTS OF OZONE WATER AND VACUUM PACKAGING ON GROWTH OF SOME PATHOGENIC AND SPOILAGE BACTERIA IN NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus* FILLETS. ADVISOR: ASSOC. PROF.SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 76 pp.

This research was aimed to study effect of ozonated water in the concentration range of 0-2 ppm on shelf-life of Nile tilapia fillets, packed in plastic bags and in vacuum-packaged under refrigeration at 4 ± 2 ° C. Tilapia fillets were assessed by microbiological and physicochemical analyses. Tilapia fillets soaked in 10 ppm of sodium hypochlorite was applied as control. From the results, the reduction in the microbial count, whiteness index (WI), ΔE, Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and % weight loss increased as the ozone concentrations increased. Ozone at a concentration of 1 ppm is the lowest concentration that can reduce the amount of bacteria and no significant differences compared with 1.5 ppm, and without physicochemical changes of the tilapia fillets. Ozonated water of 1 ppm could effectively reduce of total viable count, *Staphylococcus aureus*, lactic acid bacteria and *Pseudomonas* spp. by 0.40, 0.46, 0.47 and 0.28 log, respectively. *Vibrio cholerae* and *Salmonella* spp were not found in all sample. Artificial contamination of *V. cholerae and S.* Typhimurium samples were prepared. They were soaked in 1 ppm ozonated water, the number of both bacteria in samples were reduced 0.36 and 0.26 log, respectively. Tilapia fillets that was treated with ozonated water at concentration 1 ppm for 1 minute, kept in atmospheric and vacuum conditions could prolong the shelf-life to 5 and 7 days, respectively. The tilapia fillets that treated with sodium hypochlorite, kept in atmospheric and vacuum conditions, could be kept for 4 and 5 days, respectively. In addition, it was found that the whiteness index of tilapia at all storage conditions tended to decrease. However, tilapia soaked with ozonated water kept in vacuum condition had higher whiteness index than those soaked by sodium hypochlorite. The total volatile base Nitrogen (TVB-N), pH and TBARS from these sample were not exceeded 30 mg /100 g, pH 7 and 2 mgMDA/kg, respectively. The current study confirm that treatment with ozonated water along with the storage in vacuum condition could effectively prolong the shelf-life (2-3 days) and maintain the quality of tilapia fillets.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Department:	Food Technology	Student's Signature	.....
Field of Study:	Food Technology	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2017	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอกราบขอบคุณเป็นอย่างสูงต่ออาจารย์ รศ.ดร.สุเมธ ตันตระเธียร อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย และ รศ.ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และคอยอบรมสั่งสอน ให้ข้อคิดในการทำงานเสมอมา ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอบกราบขอบคุณ อาจารย์ ดร.ธีรนันท์ เจนจรัสสกุล กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ผศ.ดร.กิติพงศ์ อัศตรกุล และศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ ครูส่ง ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และกรุณาให้คำแนะนำตรวจสอบ กลั่นกรองและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารและทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาแนะนำเสมอมา

ขอขอบคุณ บริษัท ฟิลเตอร์ วิชั่น จำกัด (มหาชน) ที่อนุเคราะห์ให้เช่าเครื่องผลิตน้ำโอโซน และให้คำแนะนำ ดูแลการใช้เครื่องตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบคุณครอบครัวที่คอยส่งเสริม ให้โอกาสที่ดี และสนับสนุนสำหรับการศึกษาครั้งนี้ ตลอดจนให้กำลังใจและความช่วยเหลือทุก ๆ ด้านเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญภาพ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 7

1.1 ที่มาและความสำคัญ 7

1.2 วัตถุประสงค์ 2

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 3

2.1. ปลานิล 3

2.1.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับปลานิล 3

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในปลานิลและปลาน้ำจืด 4

2.2.1 จุลินทรีย์ทั่วไป (microflora) 4

2.2.2 จุลินทรีย์ก่อโรคทั่วไป (pathogen flora) 4

2.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาในระหว่างการเก็บรักษา 6

2.3.1 การเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ในปลาและผลิตภัณฑ์ปลา 6

2.3.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ 9

2.4 การลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ 11

2.5 โอโซน 12

2.5.1 ความหมาย ลักษณะและความสำคัญของโอโซน 12

2.5.2 การผลิตโอโซน 14

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

2.5.3 กลไกลการทำงานของโอโซนในการยับยั้งจุลินทรีย์ 15
2.5.4 ปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบอินทรีย์กับโอโซน 18
2.5.6 ข้อจำกัดสำหรับการใช้โอโซน 22
2.5.7 ความเป็นพิษของโอโซน 22
2.6 การบรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum Packaging) 23
บทที่3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 27
3.1 วัตถุดิบ จุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 27
3.1.1 วัตถุดิบ 27
3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ 27
3.1.3 เครื่องมือ 27
3.1.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ 28
3.2 ขั้นตอนการวิจัย 29
3.2.1 เตรียมตัวอย่าง 29
3.2.2 เตรียมน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ 29
3.2.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย 30
3.2.4 ศึกษาปัจจัยต่างๆของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ 31
3.2.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นโอโซนต่อคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี ของปลานิลแล่ 32
3.2.6 ศึกษาผลของความเข้มข้นโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในปลานิลแล่ 33
3.2.7 ศึกษาผลของการบรรจุต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของปลานิล 33
3.2.8 ศึกษาผลของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สร้างการปนเปื้อนในปลานิลแล่ 34
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 36
4.1 ปัจจัยต่าง ๆ ของโอโซนที่ส่งผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ 36
4.1.1 ผลของเวลาของการแช่ปลานิลแล่ในน้ำโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ 36

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

4.1.2 ผลของความเข้มข้นของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ 37

4.2 ผลของความเข้มข้นโอโซนต่อคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี ของปลานิลแล่.....40

4.4 ผลของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สร้างการปนเปื้อนในปลานิลแล่.....54

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 56

รายการอ้างอิง.....57

ภาคผนวก ก 66

ภาคผนวก ข.....68

ภาคผนวก ค 70

ภาคผนวก ง.....71

ภาคผนวก จ.....75

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 76

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 ปลานิล *Oreochromis niloticus* 3
ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลง TMAO ไปเป็น TMA 10
ภาพที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลง เปลี่ยน TMAO ไปเป็น DMA และ formaldehyde 10
ภาพที่ 2.4 ลักษณะการแตกตัวของออกซิเจนกลายเป็นโอโซน 13
ภาพที่ 2.5 โอโซนในน้ำสลายตัวเกิดอนุมูลอิสระ 14
ภาพที่ 2.6 ลักษณะการเกิดก๊าซโอโซนโดยปรากฏการณ์โคโรนาดิสชาร์จ 15
ภาพที่ 2.7 กลไกลการยับยั้งจุลินทรีย์ของโอโซน 16
ภาพที่ 2.8 ผลของการใช้โอโซนต่อเซลล์จุลินทรีย์ 16
ภาพที่ 2.9 การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (A และ B) *Salmonella* Enteritidis และ (C และ D) *Bacillus subtilis* ก่อนและหลังการใช้โอโซน ตามลำดับ โดยส่องผ่าน transmission electron microscope 17
ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้าง Molozonides, Zwitter ion และ Ozonide 19
ภาพที่ 3.1 แผนผังการผลิตน้ำโอโซน 29
ภาพที่ 3.2 ลักษณะของเซลล์ UNK1 ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 30
ภาพที่ 4.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของปลานิลแล่ที่ลดลง (log reduction) หลังจากสัมผัสกับน้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 1 ppm เป็นเวลา 1 5 และ 10 นาที 37
ภาพที่ 4.2 จำนวนแบคทีเรียก่อโรค (ก) และแบคทีเรียเน่าเสีย (ข) ที่ลดลง (log reduction) หลังจากสัมผัสกับน้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที 39
ภาพที่ 4.3 ค่าดัชนีสีขาว และ ความแตกต่างของค่าสี ΔE ของชิ้นปลานิลแล่ หลังจากการแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 ppm เป็นเวลา 1 นาที และการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที (ตัวอย่างควบคุม) 41
ภาพที่ 4.4 ค่า TBARS ของชิ้นปลานิลแล่ หลังจากการแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 ppm เป็นเวลา 1 นาที และการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที (ตัวอย่างควบคุม) 42
ภาพที่ 4.5 น้ำหนักของชิ้นปลานิลแล่ที่สูญเสีย (%) หลังจากการแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 ppm เป็นเวลา 1 นาที และการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที (ตัวอย่างควบคุม) 43
ภาพที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียในปลานิลที่ลดลง (log reduction) หลังจากการแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 0.75 1 และ 1.5 ppm เป็นเวลา 1 นาที และการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที (ตัวอย่างควบคุม) 45

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของ Total viable count (ก) และ *Pseudomonas* spp. (ข) ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ 48
ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงของ lactic acid bacteria ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ ..49
ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของ TVB-N ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ 49
ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของ pH ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ 50
ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของ TBARS ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ 51
ภาพที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีสีขาวระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ 52
ภาพที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงของ *Staphylococcus aureus* ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ 54
ภาพที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงของ *Salmonella* Typhimurium (ก) และ *Vibrio cholerae* (ข) ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ 55

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 การเสื่อมเสียทางด้านจุลินทรีย์ในอาหาร 6
ตารางที่ 2.2 สารประกอบที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติที่ผลิตจากการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ที่อุณหภูมิ 4 ℃ 7
ตารางที่ 2.3 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในปลาสดและปลาแช่เย็นหรือบนน้ำแข็งที่สภาวะต่างๆ 8
ตารางที่ 2.4 ครึ่งชีวิตของโอโซนในรูปก๊าซที่อุณหภูมิต่างๆ 13
ตารางที่ 2.5 ครึ่งชีวิตของโอโซนในรูปน้ำโอโซนที่สภาวะความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ 14
ตารางที่ 3.1 การบรรจุปลานิลแล่ที่สภาวะต่างๆ 33
ตารางที่ 3.2 การบรรจุปลานิลแล่ที่สภาวะต่างๆ ของชิ้นปลานิลแล่ที่สร้างการปนเปื้อน 34

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยมีมูลค่าผลผลิตต่อปีสูงสุดในบรรดาสัตว์น้ำจืดทั้งหมดเป็นที่ต้องการทั้งตลาดในและต่างประเทศสูง (กรมประมง, 2550) สามารถส่งเป็นสินค้าออกไปสู่ต่างประเทศในลักษณะของปลาแล่เนื้อ ตลาดที่สำคัญ ๆ เช่น ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี เป็นต้น การบริโภคปลานิลในประเทศไทยสูงถึง 30% ของการบริโภคปลาทั้งหมด (Piumsombun & Dey, 2003) แต่ยังพบปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียทำให้อาหารเน่าเสียในปลานิลอย่างเช่น *Shewanella putrefaciencs* และ *Pseudomonas* spp. เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพ และยังพบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ *Staphylococcus aureus, Salmonella* spp., *Clostridium botulinum, Clostridium perfringens*และ *Vibrio cholerae* เป็นต้น ทั้งนี้แบคทีเรียอาจจะปนเปื้อน มากับวัตถุดิบ ขั้นตอนการผลิต การล้างด้วยน้ำสะอาดเพียงอย่างเดียวไม่สามารถกำจัดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ให้ออกไปหมด ดังนั้นจึงมีการล้างด้วยน้ำผสมสารฆ่าเชื้อ ซึ่งสารฆ่าเชื้อที่นิยมใช้ส่วนมากคือสารประกอบคลอรีน เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ คลอรีนไดออกไซด์และแคลเซียมคลอไรท์ (Fabrizio et al., 2002) แต่งานวิจัยในปัจจุบันได้แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษของคลอรีน เมื่อทำปฏิกิริยากับกลุ่มของกรดอินทรีย์ (organic acid) เช่น กรดฮิวมิค (humic acid) เกิดไตรฮาโลมีเทน (Trihalomethanes : THMs) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง จึงมีการนำน้ำโอโซนมาใช้ในขั้นตอนการล้างวัตถุดิบเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากทำลายจุลินทรีย์รวดเร็วและสลายตัวง่าย วิธีการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ด้วยโอโซนนั้นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ ไม่เกิดสารตกค้าง หากใช้ในปริมาณที่เหมาะสม (Thanomsub et al., 2002) จากงานวิจัยพบว่าโอโซนมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารได้หลายชนิด แต่ยังไม่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร (ทิพรักษ์ วงษาดี, ณัฐนนท์ ตราชู และ, & ไมตรี สุทธจิตต์, 2551) การประยุกต์ใช้น้ำโอโซนต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม การเพิ่มความเข้มข้นโอโซนจะเพิ่มการทำลายจุลินทรีย์ได้ดี แต่หากใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสมจะทำให้คุณภาพของวัตถุดิบไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Indun, 2005) ดังนั้นหากสามารถ

ยับยั้ง หรือชะลอการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ได้ จะส่งผลต่อการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อปลาและความปลอดภัยของผู้บริโภค การบรรจุแบบสุญญากาศสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียในอาหารได้ (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2538) อีกทั้งเป็นที่ยอมรับและนำมาใช้ยืดอายุการเก็บรักษาอาหารหลายชนิด

1.2 วัตถุประสงค์

การศึกษาการใช้โอโซนในรูปของสารละลายแทนการใช้สารประกอบคลอรีน และการบรรจุแบบสุญญากาศ และติดตามคุณภาพทางจุลินทรีย์ และกายภาพเคมีปลานิลแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1. ปลานิล

2.1.1 ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับปลานิล

ปลานิล (Nile Tilapia) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus* มีถิ่นฐานดั่งเดิมแถบลุ่มแม่น้ำไนล์ในแอฟริกาตะวันออก ตลอดจนบริเวณลุ่มน้ำเซกัลและในเจอร์และในแอฟริกาตะวันออก เป็นปลาน้ำจืดที่อาศัยในแหล่งน้ำจืดรวมทั้งบริเวณชายทะเลที่น้ำกร่อย ด้านข้างของปลานิลมีลักษณะแบน ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล มีลายพาดขวาง 9-10 แถบ ครีบหลังมีอันเดียว ประกอบด้วยก้านครีบอ่อน 9-10 อัน (อุดม เรืองนพคุณ, 2547)

ภาพที่ 2.1 ปลานิล *Oreochromis niloticus*
ที่มา: มกษ. 7001-2556

ปลานิลจัดเป็นปลาที่เพาะเลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว สามารถขยายพันธุ์ได้เองในธรรมชาติ และสามารถปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ดี มีปริมาณเนื้อมากและรสชาติดีนิยมนำไปแปรรูปในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก ปัจจุบันจึงเป็นปลาที่นิยมบริโภคในหมู่ประชากรทั่วไป (ละอองวรรณ ศรีจันทร์, ทิพย์ บุญล้ำ, & และ ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล, 2558) ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยมีมูลค่าผลผลิตต่อปีสูงสุดในบรรดาสัตว์น้ำจืดทั้งหมดเป็นที่ต้องการทั้งตลาดในและต่างประเทศสูง (กรมประมง, 2550) สามารถส่งเป็นสินค้าออกไปสู่ต่างประเทศในลักษณะของปลาแล่เนื้อ ตลาดที่สำคัญ ๆ เช่น ประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี เป็นต้น

2.2 จุลินทรีย์ที่พบในปลานิลและปลาน้ำจืด

2.2.1 จุลินทรีย์ทั่วไป (microflora)

ปลาสดสามารถปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ทั่วไป (microflora) ในส่วนต่างๆ ได้ เช่น ลำไส้ เนื้อผิวหนัง พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกออกมาได้จากลำไส้เล็กและผิวหนังปลาส่วนใหญ่ คือ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* (60% isolates) และ *Corynebacterium*, *Flavobacterium* และ *Micrococcus* (20% isolates) และเมือกของปลาจะมีแบคทีเรียพวก *Pseudomonas*, *Alcaligenes, Micrococcus, Flavobacterium, Corynebacterium, Saricina, Serratia, Vibrio* และ *Bacillus* และมักพบว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวปลามักจะเป็นชนิดเดียวกับที่มีอยู่ในแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ ซึ่งจำนวนและชนิดของ microflora จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ คุณภาพของน้ำ และพันธุ์ปลา (Ray, 1996) จุลินทรีย์ที่พบในปลาและสัตว์น้ำส่วนใหญ่ที่อาศัยในน้ำเขตอบอุ่น (Temperate water) และเขตร้อน (Tropical water) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียต้องการอากาศ (aerobic bacteria) (Longree & Armbruster, 1996) โดยพบว่าร้อยละ 60-80 ของแบคทีเรียที่พบบริเวณหนังปลามี 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ได้แก่ *Pseudomonas, Alteromonas, Shewanella, Moraxella* และ *Acinetobacter* กลุ่มที่สอง ได้แก่ *Vibrio, Flavobacterium* และ *Cytophage* (Ruiter, 1995) และอาจพบแบคทีเรียแกรมบวกบางสกุลเช่น *Micrococcus* และ *Coryneform* สำหรับ *Clostridium* พบได้บ่อยเช่นกัน และถ้าเป็นปลาน้ำเค็มก็จะพบแบคทีเรียพวก *Aeromonas, Lactobacillus, Brevibacterium, Alcaligenes* และ *Streptococcus* ซึ่งแบคทีเรียที่พบในเหงือกและผิวหนังของปลาจะมีจำนวนตั้งแต่ 10^3-10^5 CFU/g (Ashie, Smith, & Simpson, 1996; Farber, 1991; Molin, Stenstrom, & Ternstrom, 1983)

2.2.2 จุลินทรีย์ก่อโรคทั่วไป (pathogen flora)

ปลาสดมักประสบกับปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งก่อให้เกิดความไม่น่าเชื่อถือของสินค้าในแง่ความปลอดภัยของอาหาร ส่งผลเสียต่อภาพพจน์ของประเทศและทำให้ผู้บริโภคเสี่ยงต่อการเกิดโรคจากอาหารเป็นพาหะ (อัจฉรา แสนคม, น้ำทิพย์ ขันตยา, & วราภา มหากาญจนกุล, 2553) มีรายงานพบแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ปนเปื้อนในปลา เช่น *Vibrio* spp., *Listeria monocytogenes, A. hydrophilla, Yersinia enterocoltica, Clostridium perfringens* และ *C. botulinum* (Fraser & Sumar, 1998) ซึ่งการเจริญและกิจกรรม (activity) ของแบคทีเรียก่อโรคในปลาจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและสุขลักษณะในการเก็บรักษา พบว่าการเก็บรักษาปลาที่อุณหภูมิ <1℃ ตลอดเวลาการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้จะถูกยับยั้ง ส่วนใหญ่ปลาและอาหารทะเลจำเป็นต้องพิจารณาถึงความปลอดภัย จากการเจริญและการสร้างสารพิษจากแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีน (non-proteolytic) ของ *C.*

botulinum โดยเฉพาะสายพันธุ์ E (Church & Prsons,1995) เพราะสารพิษที่ผลิตขึ้นก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบประสาท (neuroparalytic disease) และ *Vibrio* spp. ยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในลำไส้และระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บรักษาและขนส่งปลาอาจมีการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ เช่น *Staphylococcus aureus, Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* (Parry, 1993; Richter & Banwart, 1983)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ปลาแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (วิจิตรา แดงปรก, 2555) คือ

1. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นดัชนี (indicator microorganism) เป็นจุลินทรีย์ที่บ่งชี้ถึงความสด ความสะอาดของผลิตภัณฑ์ สุขลักษณะของโรงงานและพนักงาน ได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (aerobic plate count) , *E. coli*, *faecal Streptococci* ถ้าหากว่ามีปริมาณมากเกินกำหนด จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค
2. จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic microorganism) ได้แก่ *S. aureus, Salmonella* spp., *C. botulinum, C. perfringens, V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae*
3. จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (spoilage microorganism) จุลินทรีย์กลุ่มนี้เมื่อปนเปื้อนในอาหาร ทำให้อาหารนั้นเสียและอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonads* ได้แก่ *P. ambigua, P. convexa, P. fragi, P. fluorescens, P. incognata, P. ovalis, P. perolens* และ *P. putrefaciens*

Al-Harbi & Naim (2004) ศึกการเปลี่ยนแปลงฤดูกาลต่อความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียบริเวณเครื่องใน (Inrtestine) ของปลานิลลูกผสม (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) โดยตรวจสอบจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และจำแนกแบคทีเรียในฤดูกาลต่างๆคือ ต้นฤดูร้อน (22-35 °C) ฤดูร้อน (23-39 °C) ฤดูใบไม้ร่วง (22-31 °C) และฤดูหนาว (7-20 °C) พบว่าฤดูใบไม้ร่วงมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุดคือ 3.1×10^{8}- 1.3×10^{9} CFU/g และฤดูหนาวมีจำนวนน้อยที่สุดคือ 8.9×10^{5}- 1.3×10^{7} CFU/g นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบร้อยละ 77 และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ 17 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ *Aeromonas hydrophilla, Shewanella putrefaciens, Corynebacterium urealyticum, Escherichia coli* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งในฤดูหนาวพบเฉพาะ *Pseudomonas* spp. เท่านั้น ส่วน *Photobacterium damselae, pasteuralla spp., Cellulomonas sp.* และ *Bacillus sp.* จะพบบางฤดูกาล

Mungai, Mwatha, & Okemo (2002) พบเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Vibrio cholerae* ในตัวอย่างปลานิล ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจาก 2 สถานประกอบการ คือ 1% และ 1.4% ตามลำดับ ซึ่งมี

การรายงานว่าเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุให้เกิดโรคไทฟอยด์และอหิวาตกโรคระบาดในประทศเคนยา โดยการระบาดของโรคเหล่านี้ได้รับการเชื่อมโยงกับแหล่งน้ำอาจจะมาจากปลาการเกิดโรคระบาดจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในสินค้าประมงตั้งแต่วัตถุดิบสัตว์น้ำ จนถึงผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ แหล่งน้ำอาจได้รับการปนเปื้อนมาจากแหล่งชุมชน น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำทิ้งจาการเพาะเลี้ยง การปนเปื้อนเหล่านี้มักหาวิธีป้องกันได้ยาก เช่น การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* spp., *E. coli*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* (Parry, 1993)

2.3 การเปลี่ยนแปลงคณุภาพของเนื้อปลาในระหว่างการเก็บรักษา

2.3.1 การเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ในปลาและผลิตภัณฑ์ปลา

การเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ในอาหารมีมากมายหลายรูปแบบแต่ส่วนใหญ่เป็นผลเนื่องมาจากผลของการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์เอง หรือส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การเสื่อมเสียทางด้านจุลินทรีย์ในอาหาร

กิจกรรมทางจุลินทรีย์	คุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส
ทำลายองค์ประกอบของอาหาร	เกิดกลิ่นและรสที่ไม่พึงประสงค์
การผลิตสารโพลีแซกคาไรด์ภายนอกเซลล์	การสร้างเมือก
การสร้าง CO_2 จากคาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโน	การสร้างแก๊ส
การผลิตเม็ดสี	เกิดการปนเปื้อนสี

ที่มา: Gram & Huss (1996)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ปลาเป็นอาหารที่เน่าเสียได้เร็ว การเน่าเสียเกิดจากการสลายตัวของโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (autolysis) การรวมตัวกับออกซิเจนของไขมันทำให้เกิดกลิ่นหืน และการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Dalgaard, Gram, & Huss, 1993; สุมาลี เหลืองสกุล, 2539) การสูญเสียคุณภาพเริ่มต้นในปลาเริ่มจากการย่อยตัวเอง ซึ่งไม่เกี่ยวกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการย่อยตัวเองเป็นการช่วยให้จุลินทรีย์เจริญได้ง่าย เนื่องจากสามารถใช้สารอาหารที่ถูกย่อยได้ง่าย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องถนอมปลาโดยเร็วหลังจากจับปลาได้ ภายหลังจากปลาตายใหม่ๆจะเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) ระยะนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นระยะที่ยังไม่เกิดการสลายตัวของโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนโดยเอนไซม์ของปลาเอง และจุลินทรีย์ยังไม่สามารถใช้เนื้อปลาเป็นอาหารได้ ดังนั้นถ้าช่วงระยะนี้ยาวออกไปก็จะทำให้ปลามีอายุการเก็บนานขึ้น และอายุการเก็บรักษาจะเพิ่มมากขึ้นถ้าปลาไม่มีการสูญเสียกำลังมากในขณะถูกจับ และการขนส่งปลาทำด้วยความระมัดระวัง (Farber, 1991; Fraser & Sumar, 1998; สุมาลี เหลืองสกุล, 2539) และหลังจาก

ผ่านระยะการเกร็งตัวแล้ว เอนไซม์ที่มีอยู่ภายในตัวปลาและเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ย่อยสลายองค์ประกอบของเนื้อปลาและผลิตสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า นอกจากนี้การย่อยสลายโปรตีนในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (putrefaciens) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่ระเหยและก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่าได้เช่นกัน เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide), เมทิลเมอแคปแทน (methylmercaptan), อินโดล (indole), เอมีน (amine) และแอมโมเนีย (ammonia) ซึ่งการเน่าเสียแบบนี้มักมีสาเหตุจาก *Clostridium* spp. หลายชนิด และ แบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเล็กน้อย (facultative bacteria) เช่น *Pseudomonas* spp., *Alcaligenas* และ *Proteus* บางชนิด (Fraser & Sumar, 1998; Gray, Hoover, & Muir, 1983; Manzano et al., 2006) การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาหลังการจับและหลังจากปลาตาย ขึ้นกับความเข้มข้นของสารประกอบและผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมทาโบลิซึม ปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (endogenous enzymes) การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และสภาวะลักษณะหลังจากการจับปลา โดยปกติการเน่าเสียของปลาเราจะสังเกตเห็นการสูญเสียกลิ่นรสที่แสดงถึงความสด (fresh fish flavor) เช่น รสหวาน (sweet) รสชาติคล้ายสาหร่าย (seaweedy) หลังจากนั้นกลิ่นเหม็นเน่าและรสที่ผิดปกติ ก็จะเกิดขึ้นทำให้ปลาไม่เป็นที่ยอมรับแก่ผู้บริโภค ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สารประกอบที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติที่ผลิตจากการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) ที่อุณหภูมิ 4 ℃

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย	**สารประกอบที่สร้างกลิ่นผิดปกติ**
Shewanella putrefaciens	TMA, H_2S, CH_3SH, $(CH_3)_2S$, Hx
Photobacterium phosphoreum	TMA, Hx
Pseudomonas spp.	Ketones, aldehydes, esters, non-H_2 S sulphide
Vibrionaceae	TMA, H_2S
Anaerobic spoilage bacteria	NH_3, acetic, butyric and propionic acid

หมายเหตุ: TMA= trimethylamine, H_2S=hydrogen sulphide, CH_3SH=methylmercaptan, $(CH_3)_2S$=dimethylsulphide, Hx = hypoxanthine, NH_3=ammonia

ที่มา: Fraser (1998)

Cai, Herrison & Silva (1968) และ Ray (1996) กล่าวว่าแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในปลาส่วนมากเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) คือ *P.* (*Alteronomas*) *putrefaciens, Psychrobactor, Acinetobacter, Flavobacterium, Moraxella* spp. และ

Vibrio ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถย่อยสลายโปรตีน (proteolytic) ด้วยเอนไซม์โปรทีเนส (protease) ให้กลายเป็นเปปไทด์ (peptide) กรดอะมิโน (amino acid) อินโดล (indole) เอมีน (amine) สารประกอบซัลไฟด์ (sulfide compound) และ แอมโมเนีย (ammonia) ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ไลเปส (lipase) ทำหน้าที่ย่อยสลายไขมันให้กลายเป็นกรดไขมัน (fatty acid) กลีเซอรอล (glycerol) และสารประกอบอื่นๆ ก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นหืนอีกด้วย (Gram & Huss, 1996)

นอกจากนี้แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียที่มีบทบาทสำคัญในปลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ คือ *S. putrefaciencs* และ *Pseudomonas* spp. ปลาน้ำเค็มจากเขตอบอุ่นมักเสื่อมเสียเนื่องจาก *Photobacterium phosphoreum* ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกเป็นสาเหตุในการเสื่อมเสียของปลาน้ำจืดหรือปลาในแถบเขตร้อน ซึ่งบรรจุใต้สภาวะต่างๆ แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของปลาสดปลาแช่เย็นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำน้อยกว่า 4 °C หรือเก็บรักษาในน้ำแข็งแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในปลาสดและปลาแช่เย็นหรือบนน้ำแข็งที่สภาวะต่าง

แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในปลาสดและปลาแช่เย็น		**สภาวะ**		
		อากาศ	สุญญากาศ	คาร์บอนไดออกไซด์
เขตอบอุ่น	ปลาสด	- *Pseudomonas* spp.	- Lactic acid bactria	- Lactic acid bactria
	ปลาทะเล	- *Shewanella putrefaciens* - *Pseudomonas* spp.	- *Shewanella putrefaciens* - *Photobacterium phosphoreum*	- *Photobacterium phosphoreum*
เขตร้อน	ปลาสด	- *Pseudomonas* spp.	- Lactic acid bactria	- Lactic acid bactria TMAO reducing bacteria
	ปลาทะเล	- *Shewanella putrefaciens* - *Pseudomonas* spp.	- Lactic acid bactria	- Lactic acid bactria TMAO reducing bacteria

ที่มา: Gram & Huss (1996)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ

ลักษณะการเน่าเสียทางกายภาพของเนื้อปลาที่สามารถสังเกตเห็นได้ คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีผิวและเนื้อปลาเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ทั้งแบบที่เกิดโดยเอนไซม์ (enzymatic oxidation) และแบบที่เกิดโดยไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง (nonenzymatic oxidation) พบว่า สีเหลือง ส้ม แดง หรือไม่มีสีของปลาและสัตว์น้ำ เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบคาร์โรทีนอยส์ (carotenoids) ซึ่งมีในผิวหนังและสีของปลาเนื้อขาว (white fish) อาจเปลี่ยนเป็นสีครีมหรือสีเทา เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นแบบที่เกิดโดยเอนไซม์ของรงควัตถุฮีม (heme pigment) ส่วนกล้ามเนื้อแดง (dark red muscle) จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และพบว่าเนื้อปลาสดจะใส แต่ปลาที่เน่าเสียแล้วเนื้อจะขุ่น บางครั้งการเกิดการเปลี่ยนสีของเนื้อปลามีสาเหตุจากการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น อาจมีสีเหลืองออกเขียวที่เกิดจากการเจริญของ *P. fluorescens*, สีเหลืองจาก *Micrococcus*, สีแดงหรือชมพูจาก *Sarcina, Micrococcus* และ *Bacillus* หรือจะเกิดจากราหรือยีสต์บางชนิด (Potter & Hotchkis, 1995)

การเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัส (texture) ของปลาเกิดโดยสูญเสียการสปริงตัว (springiness) และความนิ่มจะเพิ่มขึ้น ปลาเน่าจะมีลักษณะเนื้อยุ่ย (paste-like texture) ซึ่งในระยะแรกของการเก็บรักษา ความนิ่มของเนื้อสัมผัสเกิดจากการย่อยของกล้ามเนื้อและการอ่อนตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และการเกิดการแยกตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibril) ในระยะหลังเกิดจากเอนไซม์โปรทีเอสในตัวปลาและเอนไซม์ประเภทเดียวกันนี้จากแบคทีเรีย (endogenous and bacterial proteinase) จนทำให้เกิดการเน่าเสีย (กนกอร อินทราพิเชฐ, 2538)

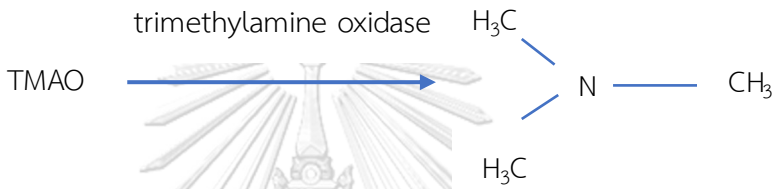
การเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสของเนื้อปลาสด พบว่ากลิ่นของเนื้อปลาสดเกิดจากสารประกอบ คาร์บอนิล (carbonyl compounds) และแอลกอฮอล์ ซึ่งประกอบด้วย hexanal, 1-octan-3-ol, 1,5octadien-3-ol และ 2,5 –octadien-1-ol และกลิ่นผิดปกติ (offensive odors) ซึ่งแสดงว่าการเกิดเน่า เสียเกิดจากการย่อยและแตกตัวของกรดอะมิโน cysteine และ methionine ได้สารประกอบ mercaptan, trimethylsulfide และ H_2S กลิ่นเหม็นเน่าเกิดจกกสารประกอบ indol, putrescine, cadaverine และ diamines อื่นๆ จากการย่อยกรดอะมิโนของแบคทีเรีย (Potter & Hotchkis, 1995)

2.3.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี

การติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี นิยมใช้ดรรชนีคุณภาพทางเคมี (chemical indicators) ซึ่งดัชนีที่นิยมตรวจวัด เพื่อใช้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเนื้อปลา (เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน, 2546) มีดังนี้

2.3.3.1 ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide : TMAO), ไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine: TMA) และ ไดเมทิลเอมีน (Dimethylamine: DMA)

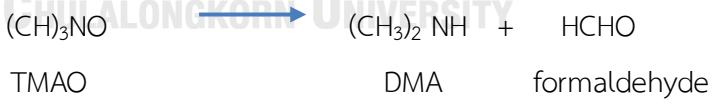
การสลายตัวของสารประกอบที่ไม่ใช้โปรตีนแล้วให้สารระเหยที่ก่อให้เกิดกลิ่นคาว และกลิ่นเหม็นเน่าของปลาและสัตว์น้ำ คือ การเปลี่ยนไตรเมทธิลเอมีนออกไซด์ (TMAO) ซึ่งเป็นสารที่ป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากตัวปลา (water logout) พบมากบริเวณผิวหนังโดย TMAO สามารถเปลี่ยนเป็น ไตรเมทธิลเอมีน (TMA) ด้วยเอนไซม์ไตรเมธิลเอมีนออกซิเดส (trimethylamine oxidase) จากปฏิกิริยารีดักชั่นของแบคทีเรีย เช่น *S. putrifaciens* ซึ่งจะได้รับพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญจากการเปลี่ยนแปลง TMAO ไปเป็น TMA ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลง TMAO ไปเป็น TMA
ที่มา: เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน (2546)

ซึ่ง TMA ที่ผลิตขึ้นก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่าและมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนแบคทีเรีย คุณภาพทางประสาทสัมผัสและความสดของปลา และ จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ในตัวปลา (endogenous enzyme) จะเปลี่ยน TMAO ไปเป็น DMA และ formaldehyde ดังแสดงในภาพ 2.3

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลง เปลี่ยน TMAO ไปเป็น DMA และ formaldehyde
ที่มา: เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน (2546)

จากปฏิกิริยาทั้ง 2 จะทำให้ปริมาณเบสที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile bases) ค่อยๆเพิ่มขึ้นโดยปกติ TMAO ที่พบในปลาจะมีปริมาณแตกต่างกัน คือ ในปลาคอดและปลาแซล มอล พบประมาณ 1% และ ปลาฉลาม ประมาณ 1.5% ปริมาณ TMA ที่ผลิตขึ้นสามารถใช้เป็นดัชนีคุณภาพทางเคมี (chemical indicator) เพื่อวัดการเสื่อมเสียของปลา ซึ่งกำหนดว่าปลาที่มีความสดและยังมีคุณภาพดีจะมี TMA น้อยกว่า 1.5 mg TMA-N/100g ตัวอย่าง แต่ถ้ามีปริมาณสูงถึง 10-

15 mg TMA-N/100g ตัวอย่างจะมีลักษณะเป็นที่ไม่ยอมรับ เนื่องจากมีกลิ่นเหม็นเน่าและคาวปลาอย่างรุนแรง (Debevere & Boskou, 1996; Sleat & Robinson, 1984)

2.3.3.2 สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen : TVB-N)

การสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) จัดเป็นดัชนีคุณภาพทางเคมีค่าหนึ่งที่ใช้วัดความสดของปลา โดยทำการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนีย เอมีน ไตรเมทิลเอมีน (TMA), ไดเมทิลเอมีน (DMA) และสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีและสารประกอบไนโตรเจน โดยปริมาณ TVB-N ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับคุณภาพทางประสาทสัมผัส คุณลักษณะปรากฏของเนื้อปลาและการเจริญ และการปนเปื้อของจุลินทรีย์รวมถึงปริมาณ TMA ด้วย โดยปริมาณ TVB-N ที่ กำหนดให้มีได้สูงสุดในปลาคือ 25-30 mg TVB-N/100g (Ashie et al., 1996; PÉRez-Villarreal & Pozo, 1990)

2.3.3.3 การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด - ด่าง (pH)

หลังจากปลาตายจะเกิดการใช้ไกลโคเจน (glycogen) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) เกิดเป็นกรดแลคติกขึ้น ทำให้ pH ของเนื้อปลาลดลง โดยทั่วไป pH จะลดลงต่ำที่สุดประมาณ 6.2 เพราะปริมาณของไกลโคเจนในเนื้อปลามีน้อย จึงทำให้ปริมาณกรดแลคติกมีไม่มากนัก และหลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในช่วงหลังจากระยะการเกร็งตัว (postmortem) จะมีการสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส ส่งผลให้ pH ของเนื้อปลาเพิ่มขึ้น โดยอัตราการเพิ่มขึ้นของ pH ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Sikorski, Kołakowska, & Pan, 1990)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.4 การลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์

การล้างเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการแปรรูปสัตว์น้ำ เป็นการทำความสะอาดสัตว์น้ำหลังการจับเพื่อลดการปนเปื้อนที่ติดมาจากสิ่งแวดล้อม จากคนและอุปกรณ์ เป็นการลดปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นและจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีโอกาสตรวจพบ เช่น *Vibrio* spp. และ *Salmonella* spp. เป็นต้น ดังนั้นน้ำที่ใช้ล้างสัตว์น้ำจึงมีความสำคัญ (ณัฐพล ฟ้าภิญโญ, 2550) โดยทั่วไปนอกจากจะใช้น้ำที่มีอุณหภูมิต่ำแล้วยังต้องมีการเติมสารเคมีที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำได้ สารเคมีที่เติมมีทั้งที่เป็นตัวฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือลดค่าความเป็นกรด-เบส ให้ต่ำลง สารที่นิยมใช้ส่วนมากคือสารประกอบคลอรีน เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรท์ คลอรีนไดออกไซด์ และ แคลเซียมคลอไรท์ (Fabrizio et al., 2002; Ward & Baj, 1988)

การใช้คลอรีนและสารประกอบไฮโปคลอไรท์นั้น อาจประสบปัญหาหลายอย่างได้ เช่น หากในน้ำที่ใช้มีสารแขวนลอยจะห่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ไม่ให้ถูกทำลายโดยคลอรีน นอกจากนี้

สารอินทรีย์ยังทำปฏิกิริยากับคลอรีนทำให้เสียคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ เช่น แอมโมเนีย (NH_3) จะทำปฏิกิริยากับคลอรีนเกิดเป็นพวกคลอรามีน ทำให้คุณสมบัติในการฆ่าเชื้อลดลง

Condie (1986) พบว่าการใช้คลอรีนในน้ำดื่มทำให้เกิดสาร trihalomethane (THM) มากขึ้น นอกจากนี้สารอินทรีย์ที่ไปรวมตัวกับคลอรีนคือ กรดฮิวมิก (humic acid) และกรดฟูลวิค (fulvic acid) ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบพวก chlorinated organic ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogens) ซึ่งสอดคล้องกับ Environmental and Health Organization ที่ยืนยันว่าการใช้สารประกอบคลอรีนอาจสร้างสาร trihalomethane (Graham, 1997) หรือ chloro-organic compounds (Restaino et al., 1995) นอกจากนี้คลอรีนมีคุณสมบัติในการกัดกร่อน ระคายเคืองผิว ดังนั้นการนำโอโซนมาใช้ในการล้าง จึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน (Graham, 1997) เนื่องจากโอโซนสามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกว่าคลอรีนถึงร้อยละ 52 โดยทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียและ ไวรัส โอโซนสามารถสลายตัวได้ง่ายให้อะตอมของออกซิเจน ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและไม่ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็งหรือสารก่อการกลายพันธุ์ (Budavari, 1996; Xu, 1999; สิริพร สธนเสาวภาคย์, 2543)

สืบเนื่อง ชัยชนะ (2549) ศึกษาประสิทธิภาพสารละลายโอโซนอิ่มตัว 6.3 ppm ต่อการลดการปนเปื้อน *Salmonella* spp. จำนวน 20 ซีโรวาร์ และ *Listeria* sp. ที่มักปนเปื้อนบนหนังหมู เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (100 และ 200 ppm) พบว่าหากหนังหมูมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4-5 log CFU/g เมื่อนำมาแช่ในสารละลายโอโซนนาน 10 วินาที แล้วทิ้งระยะเวลาสัมผัสตัวอย่าง 0 (เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทันที), 15 และ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °C) ทำให้เชื้อ *Salmonella* spp. ลดลง 0.93-1.96 log CFU/g (81.7-98.6%), 1.60-2.73 log CFU/g (97.5-99.8%) และ 1.56-2.76 log CFU/g (97.2-99.8%) ตามลำดับ สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ที่เวลาสัมผัส 0, 15 และ 30 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อทั้ง 20 ซีโรวาร์อยู่ในช่วง 0.32-1.39 log CFU/g (52-95.9%), 0.44-1.60 log CFU/g (63.3-98.6%) และ 0.63-1.80 log CFU/g (76.3-98.4%) ตามลำดับ สารละลายโอโซนอิ่มตัวจึงมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้ง 20 ซีโรวาร์ ดีกว่าสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์อย่างมีนัยสำคัญ

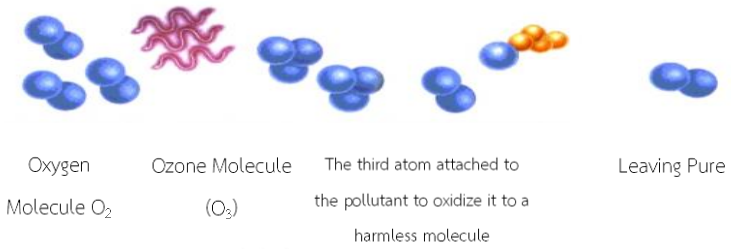
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.5 โอโซน

2.5.1 ความหมาย ลักษณะและความสำคัญของโอโซน

- ชื่อทางเคมี Ozone (โอโซน)
- สูตรเคมี O_3 ประกอบด้วยธาตุออกซิเจน (O) 3 อะตอม
- น้ำหนักโมเลกุล 47.9982

โอโซน คือ สารชนิดหนึ่งที่ถูกผลิตจากออกซิเจนซึ่งมีอยู่ทั่วไปในอากาศโดยใช้พลังงานไฟฟ้าหรือรังสีอัลตราไวโอเลทเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของออกซิเจนจาก 2 อะตอม (O_2) ให้เป็น 3 อะตอม (O_3) ใน 1 โมเลกุล ดังภาพที่ 2.4 ซึ่งต่อกันด้วยปฏิกิริยา photochemical ทำให้เกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็ว (Graham, 1997)



ภาพที่ 2.4 ลักษณะการแตกตัวของออกซิเจนกลายเป็นโอโซน
ที่มา: Ozone Solutions, Inc (2004a)

คุณสมบัติของโอโซน เป็นก๊าซสีฟ้าเมื่อละลายน้ำเป็นสีฟ้าถึงสีน้ำเงินเข้ม มีกลิ่นฉุนค่อนข้างรุนแรงคล้ายคาวปลา มีค่าออกซิเดชั่นโพเทนเชียลสูง (-2.07V) เมื่อเทียบกับกรดไฮโปคลอรัส (-1.49V) หรือคลอรีน (-1.36V) จึงเป็นตัวออกซิแดนท์ที่รุนแรง มีความเสถียรต่ำ ไม่มีสารตกค้าง สลายตัวง่ายคือมีครึ่งชีวิต (half - life) ประมาณ 36 นาทีถึง 2 ชั่วโมงในรูปก๊าซ ส่วนในรูปสารละลายประมาณ 20 นาที และเมื่อสลายตัวจะลายเป็นออกซิเจน (Budavari, 1996; Xu, 1999) ทั้งนี้ครึ่งชีวิตที่สั้นขึ้นอยู่กับสภาวะของอุณหภูมิของตัวกลาง ดังตารางที่ 2.4 และ 2.5

ตารางที่ 2.4 ครึ่งชีวิตของโอโซนในรูปก๊าซที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

อุณหภูมิ (°C)	ครึ่งชีวิต
-50	3 เดือน
-35	18 วัน
-25	8 วัน
20	3 วัน
120	1.5 นาที
250	1.5 วินาที

ที่มา: Ozone Solutions, Inc (2004b)

ตารางที่ 2.5 ครึ่งชีวิตของโอโซนในรูปน้ำโอโซนที่สภาวะความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	ครึ่งชีวิต (นาที)
15	30
20	20
25	15
30	12
35	8

ที่มา: Ozone Solutions, Inc (2004b)

เมื่อโอโซนในน้ำสลายตัวเกิดอนุมูลอิสระคือ ไฮโดรเพอร์โรซิล (HO_2) ไฮโดรซิล (OH^-) และซูปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการออกซิไดซ์สูงมาก สามารถทำปฏิกิริยากับสิ่งสกปรกต่างๆ เช่น เกลือของโลหะ สารประกอบอินทรีย์ ไฮโดรเจน และไฮดรอกไซด์ในน้ำ

$$O_3 + H_2O \rightarrow HO_3^- + OH^-$$
$$HO_3^- + OH^- \rightarrow 2H_2O$$
$$O_3 + HO_2^{\bullet} \rightarrow OH^{\bullet} + 2O_2$$
$$OH^{\bullet} + O_2 \rightarrow H_2O + O_2^-$$

ภาพที่ 2.5 โอโซนในน้ำสลายตัวเกิดอนุมูลอิสระ
ที่มา: Kim, Yousaf, & Dave (1999)

2.5.2 การผลิตโอโซน

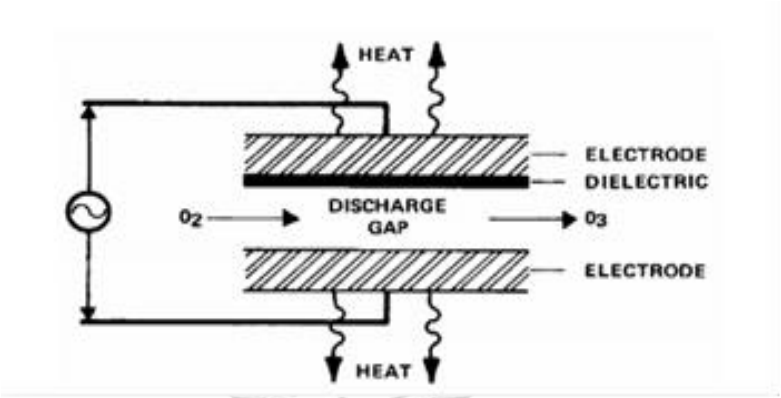
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

มีการผลิตหลายวิธี (จิราภา เสถจินตนิน, 2547) ได้แก่

2.5.2.1 วิธี Photochemical โดยใช้รังสีจากหลอดอัลตราไวโอเลทที่มีความยาวคลื่น 185 นาโนเมตร เข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้เกิดการรวมตัวกันใหม่ในรูปของก๊าซโอโซน วิธีนี้ให้ความแรงของการออกซิไดซ์สูงและใช้พลังงานในการผลิตน้อย จะผลิตก๊าซโอโซนความเข้มข้นต่ำ 0.01% - 0.1% โดยน้ำหนัก (หรือ 100 ppm - 1,000 ppm) นิยมใช้กับอากาศมากกว่าใช้กับน้ำ เพราะถ้าใช้กับน้ำการละลายจะต่ำมาก

2.5.2.2 วิธี Corona discharge เป็นวิธีที่นิยมใช้อย่างกว้างขวาง โดยให้ก๊าซออกซิเจนแห้งและบริสุทธิ์ผ่านเข้าไปในสนามไฟฟ้า (Electrical field) หลายพันโวลท์ ทั้งชนิดความถี่ต่ำ (50 Hz - 100 Hz) ความถี่ปานกลาง (100 Hz - 1,000 Hz) และความถี่สูง (1,000 Hz ขึ้นไป) ที่บริเวณ Discharge gap ซึ่งเกิดจากการผลิตกระแสไฟฟ้าที่บริเวณ Dielectric surface ณ สนามไฟฟ้าแห่งนี้มีผลให้ก๊าซออกซิเจนในอากาศแตกกระจายออกเป็นออกซิเจนอะตอม (O) และ

รวมตัวกับก๊าซออกซิเจนโมเลกุลอื่น ได้เป็นก๊าซโอโซนออกมาด้วยความเข้มข้นสูง ตั้งแต่ 1%-10% โดยน้ำหนัก สามารถนำไปใช้บำบัดน้ำได้อย่างดีขนาดเครื่องมีตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ (ระดับมิลลิกรัม ถึง ระดับกิโลกรัม ต่อ ชั่วโมง) (Kim et al., 1999)



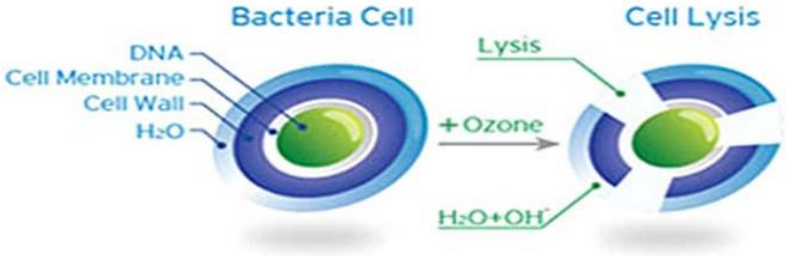
ภาพที่ 2.6 ลักษณะการเกิดก๊าซโอโซนโดยปรากฏการณ์โคโรนาดิสชาร์จ
ที่มา: Khadre, Yousaf, & Kim (2006)

2.1.2.3 วิธี Electrochemical เป็นวิธีที่ใช้หลักการ Electrolysis แยกน้ำออกเป็นไฮโดรเจนและออกซิเจนอะตอม แล้วแยกโมเลกุลไฮโดรเจนออกไป ส่วนอะตอมออกซิเจนจะรวมกันเป็นก๊าซโอโซน (O_3) และ Diatomatic oxygen O_2

2.5.3 กลไกลการทำงานของโอโซนในการยับยั้งจุลินทรีย์

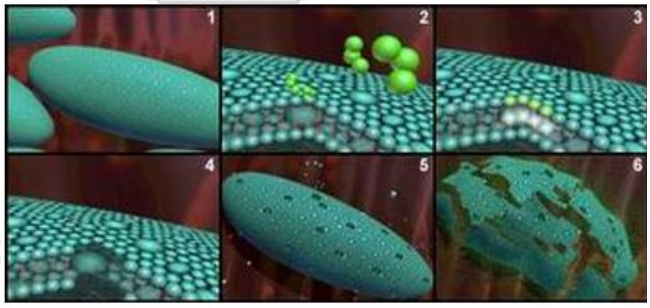
โอโซนสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ได้แก่ *E. coli* O157: H7, *P. fluorescens*, *S.* Typhimurium, *Y. enterocolitica, L. monocytogenes, S. aureus, B. cereus* รวมทั้งยีสต์และสปอร์เชื้อรา เช่น *Aspergillus niger* (Byun et al., 1998; Moore, Griffith, & Peters, 2000; Restaino et al., 1995ประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อของโอโซนขึ้นกับความเข้มข้น ระยะเวลาที่สัมผัสกับจุลินทรีย์และสภาวะที่เป็นกรดของมีเดียจะช่วยให้โอโซนฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ดีขึ้น ก๊าซโอโซน และ Reactive by product เช่น $^{\bullet}OH$, $^{\bullet}O_2^-$ และ $HO^{\bullet}_2$ เป็นสารสำคัญในการทำลาย ลักษณะการทำลายจุลินทรีย์ของโอโซน แสดงดังภาพที่ 2.7 (Moore et al., 2000) ประกอบด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



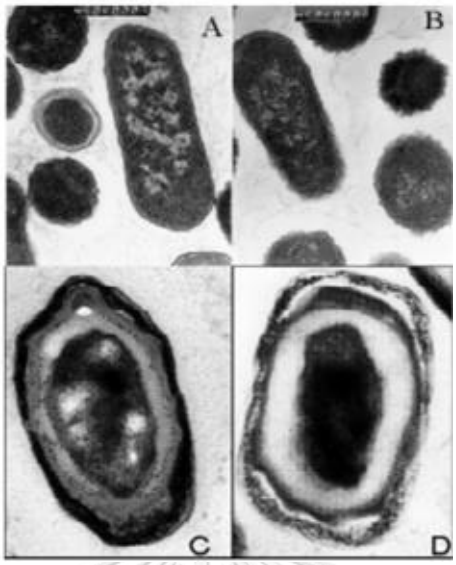
ภาพที่ 2.7 กลไกลการยับยั้งจุลินทรีย์ของโอโซน
ที่มา: Mitntdevices (2012)

1. ผนังเซลล์ (Cell envelopes) ภาพที่ 2.8 (1) บริเวณดังกล่าวเป็นส่วนแรกที่โอโซนเข้าทำปฏิกิริยา ดังภาพที่ 2.8 (2) โอโซนอาจจะออกซิไดซ์สารต่างๆของ Cell envelopes ดังภาพที่ 2.8 (3) เช่น พันธะคู่ของกรดไขมันอิ่มตัว, SH gr. ของ Membrane-bound enzyme, ไกลโคโปรตีน และ ไกลโคลิพิด ทำให้เกิดการรั่วของเซลล์ ดังภาพที่ 2.8 (5) สูญเสียการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ทำให้ผนังเซลล์แตก ของเหลวภายในเซลล์ไหลออกมา ซึ่งเกิดจากกระบวนการ lysis ดังภาพที่ 2.8 (6) ในปี 1999 Dave (อ้างถึงใน Khadre et al., 2006) ศึกษาการใช้ก๊าซโอโซนในภาวะของเหลวกับ *Salmonella* Enteritidis พบว่ามีการแตกของเซลล์เมมเบรน



ภาพที่ 2.8 ผลของการใช้โอโซนต่อเซลล์จุลินทรีย์
ที่มา : Ozone Solutions, Inc (2004c)

2. บริเวณสปอร์ (Bacterial spore coats) จากรายงานของ Foegending (1985) พบว่าโปรตีนที่เคลือบสปอร์ และ ชั้นนอกของสปอร์ *B. cereus* ถูกกำจัดออกไปอย่างรวดเร็ว และบางงานวิจัยพบว่าสปอร์ของ *B. subtilis* เกิดการแตกตัวของ outer spore coat อย่างชัดเจนเมื่อผ่านสารละลายโอโซน ดังแสดงในภาพที่ 2.9



ภาพที่ 2.9 การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (A และ B) *Salmonella* Enteritidis และ (C และ D) *Bacillus subtilis* ก่อนและหลังการใช้โอโซน ตามลำดับ โดยส่องผ่าน transmission electron microscope ที่มา: Khadre et al. (2006)

3. เอนไซม์ (Enzymes) โอโซนมีผลต่อเอนไซม์โดยโอโซนทำลายเอนไซม์ได้ดีกว่าคลอรีน เนื่องจากก๊าซโอโซนทให้โปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเอนไซม์หลายชนิดที่มีบทบาทในการทำให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญต่างๆตกตะกอนออกมา ทำให้โปรตีนเสียสภาพ การทำลายเอนไซม์ของโอโซนพบว่าจะทำลายเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และรบกวนระบบการหายใจของจุลินทรีย์จึงตายในที่สุด (Khadre et al., 2006)

4. กรดนิวคลีอิก (Nucleic material) พบว่าโอโซนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง DNA และ RNA หรือเกิดพันธะกับ RNA ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ DNA และ RNA เกิดขึ้นได้อย่างไม่สมบูรณ์ และเข้าทำลายในส่วน plasmid DNA ลดความสามารถในการ Transfromed, ทำให้เกิด Single & Double strand ที่ไม่สมบูรณ์ใน plasmid DNA และลด Transcription activity ด้วย (Khadre et al., 2006)

Restaino et al. (1995) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำโอโซนที่ความเข้มข้น 0.188 ppm เป็น เวลา 1-5 นาที ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ สามารถยับยังได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *L. monocytogenes, Stap. aureus, B. cereus* และ *Enterococcus faecalis* แบคทีเรียแกรมลบ คือ *P. aeruginosa,Yersinia enterocolitica, E. coli* และ *S.* Typhimurium

Chen et al. (1992) ศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด 9 ชนิด ในสารละลายเกลือ 0.8% ที่ 25 °C ใช้โอโซนที่อัตราการไหล 100 ml/min พบว่าโอโซนมีผลต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *Stap. aureus, E. coli, P. aeruginosa, P. putida, P.*

fluorescens, V. parahaemolyticus, V. cholera, S. Typhimurium, *Flavobacterium aquatile*

Kim & Youself (2000) รายงานว่าจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีความทนทานต่อโอโซนแตกต่างกัน โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ *E. coli* O157:H7*, P. fluorescens*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *L. monocytogenes*

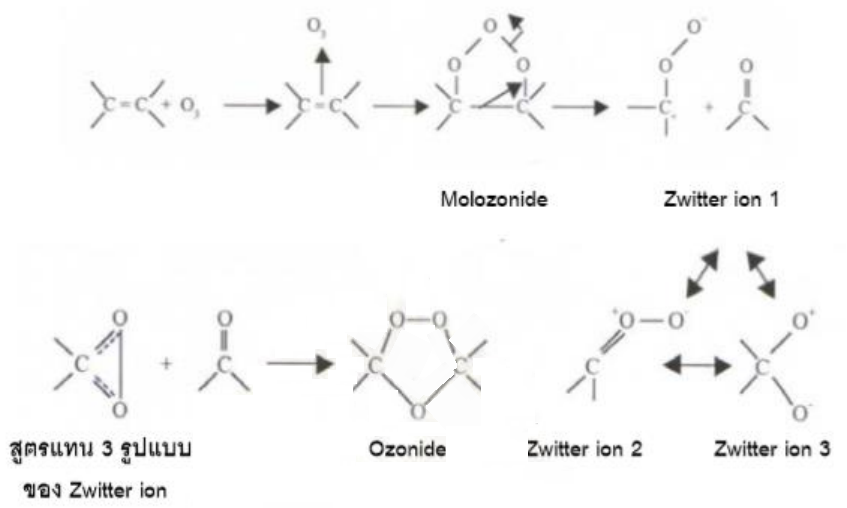
2.5.4 ปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบอินทรีย์กับโอโซน

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ระหว่างสารอินทรีย์กับโอโซนสามารถแบ่งเป็น

1. ปฏิกิริยาโดยตรง (Direct attack) สารอินทรีย์ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับโอโซน (ปฏิกิริยา electrophilc หรือ dipolar) โดยโอโซนเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับสารอินทรีย์บริเวณพันธะ (C=C, C=C-O-R, C=C-X) หรืออะตอมที่มีประจุลบ (N, P, O, S และ nucleophilic C) ทำให้เกิดสาร intermediate ที่ไม่คงตัวกลายเป็น Molozonides จากนั้น Zwitterion ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับ aldehyde อย่างรวดเร็วเกิด Ozonide ที่มีคุณสมบัติเป็นพิษ แสดงในภาพที่ 2.10 สามารถเข้าไปออกซิไดซ์ สารชีวเคมีต่างๆ ทำให้เซลล์แตกและเสียสภาพในที่สุด (สุรพล รักษ์ปทุม, 2543) สารอะโรมาติคส์ที่มีหมู่ OH, CH_3, หรือ OCH_3 อยู่ตรงบริเวณออโธจะทำปฏิกิริยากับโอโซนได้ดี (high reactivity) แต่ถ้ามีหมู่ NO_2, CO_2H หรือ CHO ปฏิกิริยาจะเกิดช้า ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตไม่มีหมู่นิวคลีโอฟีลิค จึงทำให้การเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างช้า ปฏิกิริยาระหว่างโอโซนกับโพลีแซคคาไรด์เริ่มจากการทำลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) ตามด้วยการออกซิไดซ์หมู่แอลกอฮอล์ (OH) ของ free monosaccharide ได้สารอัลดีไฮล์ และกรดที่เป็นโซ่ยาว (aliphatic acid)

2. ปฏิกิริยาโดยอ้อม (Indirect attack) อนุมูลอิสระ (free radicals) ของโอโซนที่เกิดจากปฏิกิริยาโดยตรง ได้แก่ OH° และ OH_2° จะทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์สารอินทรีย์และสารอินทรีย์ประเภท acids, aldehydes, ketones และพวก less highly activated aromatic ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 2.10 สูตรโครงสร้าง Molozonides, Zwitter ion และ Ozonide
ที่มา: สุรพล รักปทุม (2543)

ปฏิกิริยาทั้ง 2 ขั้นตอนสามารถแสดงได้ดังนี้

O_3 + M → Product or OH° + Product (initiation step)

M + OH° → Product or OH_2° + Product (termination step)

2.5.5 ประยุกต์ใช้โอโซนอุตสาหกรรมอาหาร

ปี ค.ศ. 1997 โอโซนได้รับการยอมรับว่าเป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal agent) โดยทั่วไปถือว่าปลอดภัย (GRAS; Generally recognized as safe) สำนักงานคณะกรรมอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (USFDA) ได้ยอมรับเป็นทางการว่าโอโซนทั้งในสถานะก๊าซและของเหลว สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารระหว่างการแปรรูปและการเก็บรักษา (Graham, 1997)

2.5.5.1 ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้

วรพรรณี เผ่าทองศุข (2550) ศึกษาการใช้โอโซนร่วมกับอุณหภูมิในการกำจัดแบคทีเรีย *S.* Typhimurium *E. coli* และ ยีสต์ *Saccharomyces cereviseae* ในน้ำตาลสดและน้ำลำไย โดยหลังจากการสร้างการปนเปื้อนจุลินทรีย์ดังกล่าวในน้ำผลไม้ จะทำการพ่นโอโซนความเข้มข้น 300 มก. โอโซน/ชั่วโมง ด้วยอัตรา 2.5 ลิตร/นาที การทดองทำที่อุณหภูมิแตกต่างกันได้แก่ อุณหภูมิต่ำ (4 °C) อุณหภูมิสูง (50 °C) และอุณหภูมิห้อง (28 °C) และจะใช้การพ่นอากาศที่ผ่านการกรองกำจัดเชื้อ

แล้วเป็นชุดควบคุม ผลการทดลองพบว่าโอโซนสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดในน้ำผลไม้ได้ โดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทั้งระดับต่ำและสูงจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อของโอโซน โดยโอโซนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium และ *E. Coli* ได้ในระดับใกล้เคียงกัน แต่ยีสต์จะมีความทนทานต่อโอโซนมากกว่า

Barth et al. (1995) ศึกษาการใช้ก๊าซโอโซนที่ความเข้มข้น 0.3 ppm เก็บรักษา Blackberries ที่อุณหภูมิ 2 °C พบว่าโอโซนสามารถยืดอายุการเก็บได้ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ทำให้เกิดตำหนิหรือการเปลี่ยนแปลงของสี นอกจากนี้โอโซนสามารถชะลอการสุกของผลไม้ โดยการลดการผลิตแก๊สเอทิลีนที่ทำให้ผลไม้สุกได้

Yuk et al. (2006) ศึกษาประสิทธิภาพในการลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* ที่สร้างการปนเปื้อนบน enoki mushroom 10^5 CFU/g ด้วยสารละลายโอโซน 5 ppm และ สารละลายโอโซน 3 ppm ร่วมกับ 1% organic acids ที่ระยะเวลาสัมผัสสารนาน 5 นาที พบว่าการ ใช้สารละลายโอโซนที่เติม 1% organic acids มีประสิทธิภาพในการลดเชื้อดังกล่าว 2.26 และ 1.32 log CFU/g ตามลำดับ ในขณะที่การแช่ในสารละลายโอโซนเพียงอย่างเดียวสามารถลดเชื้อได้เพียง 1 และ 0.5 log CFU/g ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากตัวกลางที่มีสภาวะเป็นกรดทำให้โอโซนสามารถละลาย น้ำและทำปฏิกิริยากับสารได้ดีขึ้น

Sharma et al. (2002) ศึกษาการใช้โอโซนในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่ปนเปื้อนบน alfafa sprouts 10^8 CFU/ml พบว่าการแช่ตัวอย่างในสารละลายโอโซนอิ่มตัว 21 ppm เป็นเวลา 64 นาที สามารถลดเชื้อได้ 0.85 log CFU/g แต่ตัวอย่างที่มีการเติมก๊าซโอโซนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2-64 นาที สามารถลดเชื้อได้ 0.83-2.2 log CFU/g โดยไม่ส่งผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของตัวอย่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.5.5.2 เนื้อสัตว์

Bosilevac et al. (2005) ศึกษาประสิทธิภาพการฉีดพ่นสารละลายโอโซน (2 ppm) ที่ความดัน 4,800 ที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 10 วินาที บริเวณเนื้อขาหลังของวัวก่อนเข้าสู่กระบวนการฆ่า พบว่าสามารถลดเชื้อ aerobic plate count ได้ 2.1log CFU/100 cm^2 และแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterobactericeae* ได้ 3.4 log CFU/100 cm^2 สูงกว่าตัวอย่างควบคุม (control) ซึ่งสามารถลดเชื้อได้ 0.5 และ 0.9 log CFU/100 cm^2 ตามลำดับ

Kaess & Weidemann (1973) รายงานเกี่ยวกับจำนวนเชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Clostridium scotti* ที่ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อวัวลดปริมาณลงอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้โอโซนที่มากกว่า 2 ppm และการใช้แก๊สโอโซน 0.1 ppm สามารถควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อ *Pseudomonas* spp., *Samonella* spp., *Staphylococcus* spp. บนผิวหน้าเนื้อสัตว์ในระหว่างการบ่มที่ความชื้นสัมพัทธ์ (RH) 60 –90% ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Dondo et al. (1992)

พบว่าการใช้โอโซนในการเก็บรักษาเนื้อวัวในสภาวะแช่แข็ง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียที่บริเวณผิวหน้าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยยังรักษาคุณภาพทางประสาทสัมผัสและลดการเกิดสารระเหยซึ่งเป็นองค์ประกอบของ ไนโตรเจน

Pohlman et al. (2002) ศึกษาประสิทธิภาพการลดเชื้อ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ที่สร้างการปนเปื้อนบนเนื้อวัว ด้วยโอโซนที่ความเข้มข้น 10 ppm ร่วมกับ 0.5% cetylpyridinium chloride (OC), 10 ppm โอโซนร่วมกับ 5% acetic acid (OA) และ 200 ppm chlorine dioxide ร่วมกับ 10% trisodium phosphate ต่อเชื้อจุลินทรีย์ และลักษณะทางประสาทสัมผัสของเนื้อบด (ground beef) พบว่าการ ทดสอบด้วย OC และ OA สามารถลดเชื้อ *E. coli*, *S.* Typhimurium, Coliform และ aerobic plate count ได้ 1.68, 1.77, 1.88 และ 1.50 log CFU/g โดยไม่ส่งผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อบด

2.5.5.3 สัตว์น้ำ

อัจฉรา แสนคม และคณะ (2553) ศึกษาการใช้น้ำโอโซนล้างวัตถุดิบสัตว์น้ำสดร่วมกับการเก็บที่อุณหภูมิต่ำเพื่อลดจำนวนเชื้อ จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติและยืดอายุการเก็บ พบว่าสภาวะเหมาะสมที่ให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *E. coli* ดีที่สุด เมื่อใช้น้ำ โอโซนความเข้มข้น 0.5 ppm ล้างกุ้งขาว, หมึกและเนื้อปลานิลแล่ ตามลำดับ เวลาล้าง 15 นาที ที่25℃ ร่วมกับการเขย่าอย่างต่อเนื่องที่ความเร็วรอบ 150 rpm สามารถลดปริมาณเชื้อทั้งหมดในตัวอย่างได้ 0.63 (76.92 %), 0.56 (72.03%) และ 0.27 (46.41 %) log CFU/g

Indun (2005) ศึกษาการใช้น้ำโอโซนล้างกุ้ง รายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำโอโซนจาก 0.2 ppm เป็น 0.8 ppm และเพิ่มเวลาในการล้างจาก 5 นาทีเป็น 15 นาที สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี แต่มีผลทำให้คุณภาพเนื้อสัมผัสของกุ้งเปลี่ยนแปลงโดยเนื้อกุ้งจะเปลี่ยนเป็นสีแดงที่ 0.8 ppm นอกจากนั้นพบว่ากุ้งที่ได้มีกลิ่นเหม็นของก๊าซโอโซนตกค้างอยู่ทำให้คุณภาพกุ้งที่ได้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การเลือกสภาวะการใช้น้ำโอโซนในการล้างอาหารสดได้อย่างเหมาะสมนั้น นอกจากคำนึงถึงประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ตามต้องการแล้วยังต้องคำนึงถึงคุณภาพการยอมรับของผลิตภัณฑ์ด้วย

Manousaridis et al. (2005) ศึกษาผลของการใช้น้ำโอโซนต่อการยืดอายุการเก็บรักษาหอยแมลงภู่ที่บรรจุในสุญญากาศ มีการแปรปัจจัยในการแช่โอโซนนาน 60 นาที และ 90 นาที โดยการประเมินทางจุลินทรีย์ การศึกษาจะมุ่งเน้นถึงการติดตามจุลินทรีย์ดังนี้ aerobic plate count (APC), Lactic acid bacteria (LAB) และ *Pseudomonas* spp. ตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่ผ่านการใช้โอโซนจะมีจำนวนเชื้อ APC ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม จำนวนเชื้อ APC เริ่มต้นของตัวอย่างควบคุมคือ 3.4 log CFU/g ในขณะที่จำนวน APC ของตัวอย่างที่แช่น้ำโอโซนนาน 60 และ 90 นาที คือ 3.1 และ 2.7 log CFU/g ตามลำดับ ดังนั้นการใช้โอโซนสามารถลดจำนวนเชื้อ APC ได้ทั้งหมด

0.7 log CFU/g และในวันที่ 8 ของการเก็บรักษาตัวอย่างที่แช่น้ำโอโซน 60 และ 90 นาที มีจำนวน APC 5-6 log CFU/g ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีจำนวนเชื้อ APC ถึง 7 log CFU/g สำหรับ LAB โอโซนมีผลกระทบต่อ LAB เพียงเล็กน้อยซึ่งลดจำนวนเชื้อ LAB ได้ 0.2 log CFU /g และโอโซนสามารถลดจำนวน *Pseudomonas* spp. ได้ 0.8 log CFU /g หลังจากการแช่ตัวอย่างนาน 90 นาที

2.5.6 ข้อจำกัดสำหรับการใช้โอโซน

ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ คือ อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับไขมันสัตว์ ทำให้เกิดกลิ่นหืน หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสในเนื้อสัตว์ได้ การจุ่มเนื้อวัวในสารละลายโอโซนเข้มข้น 9.64 ppm เป็นเวลา 30 วินาที มีผลต่อปริมาณ thiobarbituric acid – reactive substances (TBARS) ที่ใช้เป็นดัชนีวัดการ เกิดปฏิกิริยาการเหม็นหืน (lipid oxidation) ในตัวอย่างเพียงเล็กน้อย ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม (control) และสามารถปรับปรุงคุณภาพของ เนื้อวัวและไข่ (Bailey et al., 1996) ทั้งนี้การเสื่อมเสียคุณภาพของอาหารจากการใช้โอโซนขึ้นอยู่กับองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร ความเข้มข้นและเวลาในการสัมผัส

ในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำคือ การล้างเนื้อปลาด้วยน้ำที่ผสมโอโซนจะให้ค่าความขาวมากกว่าวิธีอื่น การเปลี่ยนแปลงสีสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของความขาว การเพิ่มของค่า L* และการลดลง ของค่า a* จะทำให้เกิดความโปร่งแสงเนื่องจากการสูญเสียไมโอโกลบิน (Myoglobin) การฟอกสีโดยใช้โอโซนนั้น โอโซนจะเข้าทำลายโครงสร้างของพอร์ไฟริน (porphyrin) ในไมโอโกลบินและฮีโมโกลบิน การใช้โอโซนในการผลิตซูริมิสามารถเพิ่มความขาวได้ โดยทดลองล้างเนื้อปลาแมคเคอเรล โดยใช้โอโซนใน 0.04 M ซิเต-รทบัฟเฟอร์ ที่ค่า pH 3.0 เป็นเวลา 30 นาที ได้ค่าความขาวเป็น 51.7–60.1 และค่า L* เป็น 53.9–62.6 รวมทั้งลดปริมาณไมโอโกลบินและปริมาณรงควัตถุทั้งหมด

Labbe, Kinsley, & Wu (2001) รายงานว่าตัวกลางที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูงเช่น ในเนื้อสัตว์ มีองค์ประกอบของโปรตีนและไขมัน ซึ่งเป็นสารที่โอโซนสามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ เป็นผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อลดลง นอกจากความเข้มข้นและระยะเวลาสัมผัสสารละลายโอโซน ประสิทธิภาพของโอโซนยังขึ้นกับตัวกลางที่เข้าทำปฏิกิริยา

2.5.7 ความเป็นพิษของโอโซน

ก๊าซโอโซนเป็นก๊าซที่มีค่า Thresholud Limit Value Long Term Exposure Limit ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับก๊าซชนิดอื่นอย่างเช่น CO_2, N_2, O_2 จึงเป็นก๊าซที่มีความปลอดภัยกว่าชนิดอื่น (Xu, 1999) โอโซนระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่กลุ่มบุคคลทั่วไปสามารถสัมผัสได้ คือ 0.1 ppm เนื่องจากทำให้เกิดการระคายเคืองต่อจมูก ลิ้น และ ตา Scott & Lesher (1963) รายงานว่ามนุษย์สามารถที่จะ

รับรู้กลิ่นของโอโซน แม้มีปริมาณเพียง 0.02 – 0.04 ppm และหากมีความเข้มข้น 1,000 ppm หรือมากกว่านี้อาจทำให้อันตรายถึงขั้นเสียชีวิตได้

มาตรฐานความปลอดภัย (heath standards) ของโอโซน

1. FDA หรือสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดว่าเครื่องผลิตโอโซนสำหรับใช้ภายในอาคารไม่ควรผลิตเกิน 0.05 ppm

2. OSHA (Occupational Safety and Health Administration) ตั้งข้อกำหนดว่าไม่ควรทำงานในบริเวณที่มีความเข้มข้นของโอโซนเกิน 0.10 ppm เกินกว่า 8 ชั่วโมง

3. NIOSH (National Institute Occupational Safety and Health) ตั้งข้อกำหนดว่าไม่ควรอยู่ในบริเวณที่มีโอโซนเกิน 0.10 ppm ไม่ว่ากรณีใดๆ

4. สำนักงาน EPA (Enviromental Protection Agency) ตั้งข้อกำหนดว่าไม่ควรอยู่ในที่ที่มีโอโซนถึง 0.08 ppm เกิน 8 ชั่วโมง

2.6 การบรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum Packaging)

เป็นการบรรจุผลิตภัณฑ์ลงในฟิล์มที่มีความสามารถในการต้านทานการซึมผ่าน ของก๊าซ O_2 สูงจากนั้นดึงอากาศออกจากภาชนะบรรจุและปิดผนึกเพื่อให้บรรยากาศภายในภาชนะบรรจุจะมีสภาพเป็นสุญญากาศ จะเกิดการยุบตัวของฟิล์มรอบๆ ผลิตภัณฑ์ เนื่องจากความดันภายในภาชนะบรรจุน้อยกว่าความดันบรรยากาศภายนอก โดยปกติปริมาณ O_2 ที่อยู่ในภาชนะบรรจุจะน้อยกว่า 1% ที่สภาวะนี้จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ เช่น *Pseudomonas*, *Aeromonas* แต่ในระหว่างการเก็บรักษาอัตราส่วนของก๊าซจะเปลี่ยนแปลงไป (King & Nagel, 1967)

Masniyom, Benjama, & Maneesri (2013) ศึกษาผลของการบรรจุแบบดัดแปลงบรรยากาศ และการบรรจุแบบสุญญากาศกับต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลานิลแช่เย็นที่ 4 ℃ พบว่าในที่การบรรจุแบบดัดแปลงบรรยากาศและแบบสุญญากาศสามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียในกลุ่ม mesophile และ psychrotrophie ได้มากกว่าการบรรจุในบรรยากาศปกติตามลำดับ อย่างไรก็ตามการบรรจุแบบดัดแปลงบรรยากาศเกิดการสูญเสียเพิ่มขึ้นเนื่องจากโปรตีนกล้ามเนื้อถูกทำลายด้วยกรดคาร์บอนิก และพบว่าค่า TBARS ของตัวอย่างที่เก็บไว้ภายใต้บรรจุภัณฑ์สุญญากาศมีค่าต่ำกว่าการบรรจุแบบดัดแปลงบรรยากาศและบรรจุในบรรยากาศปกติตลอดการเก็บรักษา 15 วัน

บทที่3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ จุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

- ปลานิลขนาด 400 กรัม/ตัว ซื้อจากซุปเปอร์มาร์เกต จามจุรีสแควร์ ผ่านการขอดเกล็ดและควักไส้

- ถุง polyamide (Nylon, PA) ขนาด 6×9 นิ้ว ความหนา 0.0900 mm ความหนาแน่น 2.17 g/cm^3

3.1.2 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

งานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้ *Lactobacillus plantarum* Plan 10621, *Escherichia coli* ATCC 2592, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 จากห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย *Vibrio cholerae* non-o1/non-o139 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ *Pseudomonas* spp. และ จุลินทรีย์ UNK1 คัดเลือกได้จากปลานิลแล่ นำแบคทีเรียมาขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (streak plate) nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส และ สำหรับ *Pseudomonas* spp. บ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ทำการต่อเชื้อทุก 3 สัปดาห์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.1.3 เครื่องมือ

- เครื่องวัดกรด ด่าง (pH meter, Metter Toledo AG8603, Switzerland)
- เครื่องเขย่า (shaker, New bruns wisk sciencetific, USA)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอ (autoclave, Tomy SX 700, USA)
- เครื่องบดตัวอย่าง (stomacher, Seward, 400 Circulator, England)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge, KUBOTA 5310, Japan)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge, Micro22R Hettich, Germany)
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer, Vortex-2 Genie, USA)

- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (analytical balance, Metter Toledo ML1602/01, Switzerland)
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance, Metter Toledo ML204/01, Switzerland)
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave, LG, MS2127CW, Thailand)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer, Genesys, Thailand)
- เครื่องบรรจุสุญญากาศ (multivac, A300/16, Germany)
- เครื่องผลิตน้ำโอโซน (ozone generator, Biowellozone Model: CDU, Potts Point NSW, Australia)
- เครื่องปิดผนึกปากถุง (sealer, model: 450109)
- เครื่องวัดสี (chroma meter, Model CR-400 series, Minolta, Japan)
- ตู้บ่ม (incubator, WTC Binder, Germany)
- ตู้ปลอดเชื้อ (biological safety cabinet, Telstar bioultra, USA)
- ตู้เย็น (refrigerator, Whirlpool WRN-57HGG3, Korea)
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven, WTB Binder FD 115, Germany)

3.1.4 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- Baird Parker Agar Base (Himedia, India)
- Glutamate Starch Phenol Red Agar (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydrochloric acid (Merck, Germany)
- Lactobacillus MRS Agar (Himedia, India)
- Nutrient both (Himedia, India)
- Ozone Test Kit (HANNA HI-38054, Hanna Instruments SRL Com, Salaj, Romania)
- Peptone water (Himedia, India)
- Plate count agar (Himedia, India)
- Sodium chloride (Univar, Austraria)
- Sodium hypochlorite (T.S. Inter Lab Limited Partnership, Thailand)
- Thiobabituric acid (Sigma-Aldrich, Germany)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

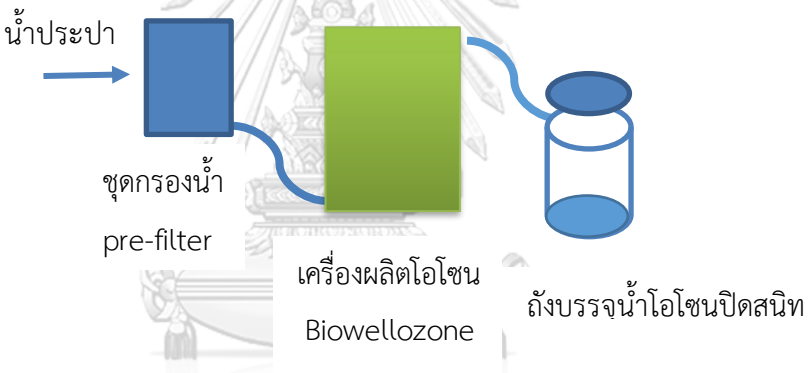
- Trichloroacetic acid (Fisher scientific, UK)
- Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar (Himedia, India)
- Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (Himedia, India)

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

3.2.1 เตรียมตัวอย่าง

ปลานิลบรรจุในลังโฟมที่มีน้ำแข็ง ขนส่งมายังภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จากนั้นล้างทำความสะอาดด้วยน้ำปลอดเชื้อ และทำการแล่ ตัดแต่ง ให้ได้ชิ้นปลาประมาณ 80 กรัม ล้างด้วยน้ำปลอดเชื้อวางบนตะแกรงให้สะเด็ดน้ำประมาณ 15 นาที (เนตรนรินทร ขุนสูงเนิน, 2546) ก่อนใช้สำหรับการศึกษาขั้นตอนต่อไป

3.2.2 เตรียมน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นต่างๆ



ภาพที่ 3.1 แผนผังการผลิตน้ำโอโซน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.2.2.1 การเตรียมน้ำโอโซน

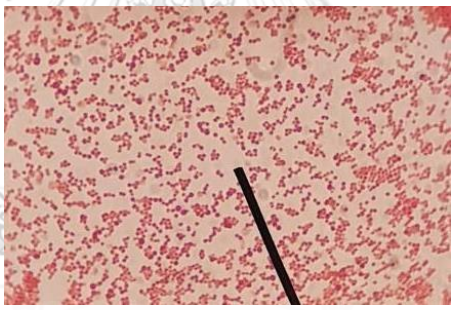
การเตรียมน้ำโอโซนโดยผ่านน้ำประปาเข้าชุดกรองที่ประกอบด้วยไส้กรอง 2 ชนิด คือ ไส้กรองขนาด 10 นิ้ว 5 ไมครอน และ ไส้กรอง carbon block ความละเอียด 5 ไมครอน ยี่ห้อ Everpure รุ่น 4CB5-K น้ำที่ผ่านการกรองแล้วจะไหลตามท่อเข้าสู่เครื่องผลิตโอโซน Biowellozone Model: CDU, Potts Point NSW, Australia (180 LPH, 200 mg/hr) เก็บสารละลายที่ออกจากเครื่องผลิตโอโซนลงในถังพลาสติกจนได้ปริมาตร 3 ลิตร จะได้โอโซนที่มีความเข้มข้นสูงสุด 2 ppm ทดสอบความเข้มข้นโอโซนด้วย Ozone Test Kit (HANNA HI-38054, Hanna Instruments SRL Com, Salaj, Romania) ตามภาคผนวก ง.1

3.2.2.2 การสลายตัวของโอโซน

ทดสอบการสลายตัวของโอโซนจากสารละลายโอโซนโดยการใช้น้ำโอโซนที่เตรียมได้ตาม 3.2.2.1 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28±2℃) และเก็บตัวอย่างมาทำการวัดความเข้มข้นของโอโซนหลังจากทิ้งไว้นาน 0 5 10 15 20 และ 30 นาที และนำค่าความเข้มข้นที่ได้ของแต่ละเวลามาคำนวณหาครึ่งชีวิตของน้ำโอโซน และใช้ข้อมูลที่ได้สำหรับเตรียมน้ำโอโซนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของทุกการทดลอง (Eriksson, 2005)

3.2.3 การคัดแยกจุลินทรีย์จากปลานิลแล่

คัดแยกด้วยวิธี direct plating โดยการเตรียมตัวอย่างปลานิแล่สำหรับคัดแยกจุลินทรีย์ตามภาคผนวก ข.1 และ ข.2 ใช้เทคนิค pour plate สำหรับการคัดแยกจุลินทรีย์ Unknown (UNK1) ที่เป็นตัวแทน ซึ่งคัดเลือกจากจุลินทรีย์ที่เป็น predominant โดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันของโคโลนีที่เกิดขึ้น จากนั้นทำการย้อมสีและพิจารณาใต้กล้องจุลทรรศน์ และพบว่าติดสี แกรมลบและมีเซลล์ขนาดเล็ก ลักษณะกลม ดังแสดงในภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ลักษณะของเซลล์ UNK1 ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 1000 เท่า

สำหรับการคัดแยก *Pseudomonas* spp. ใช้เทคนิค spread plate ตามภาคผนวก ข.5 จากนั้นนำแบคทีเรีย UNK1 มาขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (streak plate) nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส และ สำหรับ *Pseudomonas* spp. บ่มที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18±2 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ทดสอบในการทดลองและทำการต่อเชื้อทุก 3 สัปดาห์

3.2.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ UNK1 และ *Pseudomonas* spp. ที่คัดแยกได้จากปลานิลแล่และเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *Lb. plantarum*, *S.* Typhimurium, *Stap. aureus, E. coli* และ *V. cholerae* โดยถ่ายเชื้อแต่ละชนิดลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว NB และ สำหรับ lactic acid bacteria ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth บ่มสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18±2

ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากแบคทีเรีย แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 2 รอบ หลังจากนั้นปรับค่าความขุ่นด้วยสารละลายโซเดียมคลอ-ไรด์ความเข้มข้น 0.85% ให้มีค่าประมาณ 0.25 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร (CLSI, 2006 และ จิราภา เสธจินตนิน, 2547) เพื่อใช้สำหรับการทดลอง

3.2.4 ศึกษาปัจจัยต่างๆของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

3.2.4.1 ศึกษาผลของระยะเวลาของการแช่ปลานิลแล่ในน้ำโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count) เริ่มต้น ในปลานิลแล่ที่เตรียมตาม 3.2.1 จากนั้นนำปลานิลแล่ที่เตรียมไว้แช่น้ำโอโซนเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นโอโซน 1 ppm ระยะเวลาในการแช่ 1 5 และ 10 นาที จากนั้นตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ที่เหลือทั้งหมดที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธีมาตรฐาน ตามภาคผนวก ข.1 และ ข.2

3.2.4.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

นำแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.3 ผสมกับน้ำโอโซนเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ 9 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นโอโซนต่างๆ ดังนี้ 0 0.25 0.5 075 1 และ 1.5 ppm และบ่มแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยคัดเลือกระยะเวลาสำหรับแช่จากข้อ 3.2.4.2 จากนั้นตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่เหลือแต่ละชนิดด้วยวิธีมาตรฐาน

3.2.4.3 การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์

ปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ เจือจางโดยเติม 0.1% peptone ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการปั่นผสมด้วยเครื่องผสมสาร (vortex mixer) จะได้ตัวอย่างที่ความเจือจางเท่ากับ 10 เท่า จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) ตามความเหมาะสม และเลือกความเจือจางที่ระดับเหมาะสม 3 ระดับปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงในจานเพาะเชื้อ (spread plate) หรือ 1 มิลลิลิตร สำหรับวิธี pour plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะแต่ละชนิดของแบคทีเรียดังนี้

- Total viable count ด้วยอาหาร plate count agar ตามวิธีของ BAM (2001) ภาคผนวก ข.2
- *S.* Typhimurium ด้วยอาหาร XLD agar ตามวิธีของ Thung et al. (2016) ภาคผนวก ข.3
- *Lb. plantarum* ด้วยอาหาร Lactobacillus MRS agar ตามวิธีของ มอก. 2539-2548 (ISO 15214) ภาคผนวก ข.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Pseudomonas spp. ด้วยอาหาร GSP agar ตามวิธีของ Khalafalla, Ali & Hassan (2015) ภาคผนวก ข.5

- *Stap. aureus* ด้วยอาหาร BP agar ตามวิธีของ BAM (2001) ภาคผนวก ข.6

- *V. cholerae* ด้วยอาหาร TCBS agar ตามวิธีของ BAM (2004) ภาคผนวก ข.7

3.2.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นโอโซนต่อคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี ของปลานิลแล่

วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมีของปลานิลแล่เริ่มต้นที่เตรียมตาม 3.2.1 จากนั้นนำปลานิลแล่ที่เตรียมไว้แช่น้ำโอโซนเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร ด้วยความเข้มข้นโอโซนและเวลาในการแช่ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.4 และปลานิลแล่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที วิธีวัดความเข้มข้นตามวิธี ISO 7393-3 (1995) ภาคผนวก ง.2 จากนั้นนำปลานิลแล่ที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำโอโซนและปลานิลแล่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์มาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี

- ดัชนีความขาว (Whiteness index) วัดสีในระบบ CIE LAB โดย Chroma meter และคำนวณจากสูตรตามวิธีของ Jiang et al., 2006 และ Zhao et al., 2017 (ภาคผนวก ก.4)

$$\text{Whiteness} = 100-[(100-L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

- ความแตกต่างของสี (ΔE) วัดสีในระบบ CIE LAB โดย Chroma meter และคำนวณจากสูตรตามวิธีของ Zhao et al., 2017 (ภาคผนวก ก.4)

$$\Delta E^* = [(L_1^*-L_2^*)^2 + (a_1^*-a_2^*)^2 + (b_1^*-b_2^*)^2]^{1/2}$$

โดยกำหนดให้ subscript 1 คือ ค่าสีที่วัดเริ่มต้นในแต่ละตัวอย่าง

subscript 2 คือ ค่าสีที่วัดได้ในแต่ละครั้ง

- Thiobarbituricacid- reactive substances (TBARS) ตามวิธีของ Buege & Aust, 1978 (ภาคผนวก ก.1)

- % การสูญเสียน้ำหนัก (% weight loss) โดยเปรียบเทียบน้ำหนักก่อนแช่โอโซนและหลังแช่โอโซน และคำนวณจากสูตรตามวิธีของ เนตรนรินทร ขุนสูงเนิน (2546) ภาคผนวก ก.5

$$\%\ \text{weight loss} = \frac{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)} - \text{น้ำหนักของตัวอย่างหลังจากที่เก็บรักษา (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

คัดเลือกความเข้มข้นโอโซนที่ไม่ทำให้คุณลักษณะดังกล่าวของปลานิลแล่เปลี่ยนแปลงจากตัวอย่างควบคุม เพื่อใช้สำหรับศึกษาขั้นตอน

3.2.6 ศึกษาผลของความเข้มข้นโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในปลานิลแล่

ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count) เริ่มต้น ในปลานิลแล่ที่เตรียมตาม 3.2.1 จากนั้นนำปลานิลแล่ที่เตรียมไว้แช่น้ำโอโซนเตรียมไว้ที่อุณหภูมิห้องในอัตราส่วน 1 กรัม ต่อ 5 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้นโอโซนและเวลาในการแช่ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.5 และแช่ปลานิลแล่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที นำปลานิลแล่ที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำโอโซนและปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์มาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียที่เหลือแต่ละชนิดด้วยวิธีมาตรฐานตามข้อ 3.2.4.3 และเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์จุลินทรีย์ตาม ภาคผนวก ข. 1

3.2.7 ศึกษาผลของการบรรจุต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของปลานิล

นำตัวอย่างปลานิลแล่ที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที และปลานิลแล่ที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำโอโซนโดยเลือกความเข้มข้นที่สามารถลดจำนวนของจุลินทรีย์ได้มากที่สุด และไม่ทำให้คุณภาพกายภาพเคมีเปลี่ยนแปลงไปจากตัวอย่างควบคุม จากข้อ 3.2.5 มาบรรจุในถุง Nylon ที่สภาวะแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การบรรจุปลานิลแล่ที่สภาวะต่าง ๆ

Treatment	สารละลายสำหรับแช่	สภาวะบรรจุ
Trt 1	โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm	บรรยากาศปกติ (ตัวอย่างควบคุม)
Trt 2	โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm	สุญญากาศ
Trt 3	โอโซนความเข้มข้นที่คัดเลือกจาก 3.2.5	บรรยากาศปกติ
Trt 4	โอโซนความเข้มข้นที่คัดเลือกจาก 3.2.5	สุญญากาศ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

จากนั้นปิดผนึกและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลานิลแล่แช่เย็นเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุก 0 1 3 5 และ 7 วัน ทดสอบสมบัติทางเคมีกายภาพ และจุลินทรีย์ ดังนี้ TBARS และวัดค่าดัชนีสีขาว ตามข้อ 3.2.5 วัดค่าความสด โดยวัดในรูปของปริมาณด่างทั้งหมดที่ระเหยได้ (TVB-N) ตามวิธีของ Conway & Byrne (1936) ภาคผนวก ก.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ตามวิธีของ Lanier (1992) ภาคผนวก ก.3

ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธีมาตรฐาน ตามข้อ 3.2.4.3

3.2.8 ศึกษาผลของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สร้างการปนเปื้อนในปลานิลแล่

นำปลานิลแล่ที่เตรียมตาม 3.2.1 มาสร้างการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด คือ *S.* Typhimurium และ *V. cholerae* โดยใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1:1 หยดลงบนตัวอย่างและใช้แท่งแก้ว (spreader) เกลี่ยให้ทั่วชิ้นปลา ผึ่งบนตะแกรงที่ปลอดเชื้อและวางในตู้ laminar air flow cabinet ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และผึ่งให้สะเด็ดน้ำประมาณ 5 นาที (จิราภา เสธจินตนิน, 2547; สืบเนื่อง ชัยชนะ, 2549) ก่อนทำการทดสอบและตรวจสอบเชื้อเริ่มต้น ตามวิธีในข้อ 3.2.4.3

นำตัวอย่างที่สร้างการปนเปื้อนประมาณ 4 $\log_{10}$ CFU/g แช่ในน้ำโอโซนความเข้มข้นที่คัดเลือกจาก 3.2.5 เปรียบเทียบกับการแช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธีมาตรฐาน ตามวิธีในข้อ 3.2.4.3 จากนั้นนำชิ้นปลาที่ผ่านการแช่น้ำโอโซนและ โซเดียมไฮโปคลอไรท์มาบรรจุในถุง มาบรรจุในถุง Nylon ที่สภาวะแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 การบรรจุปลานิลแล่ที่สภาวะต่างๆ ของชิ้นปลานิลแล่ที่สร้างการปนเปื้อน

Treatment	สารละลายสำหรับแช่	สภาวะบรรจุ
Trt 1	โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm	บรรยากาศปกติ (ตัวอย่างควบคุม)
Trt 2	โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm	สุญญากาศ
Trt 3	โอโซนความเข้มข้นที่คัดเลือกจาก 3.2.5	บรรยากาศปกติ
Trt 4	โอโซนความเข้มข้นที่คัดเลือกจาก 3.2.5	สุญญากาศ

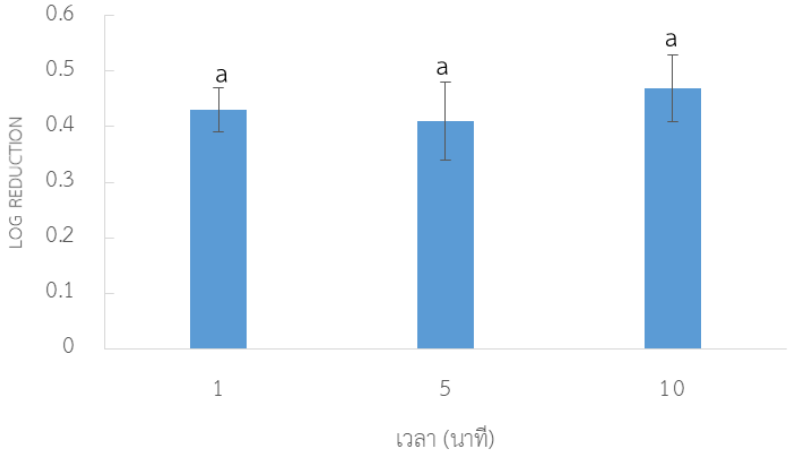
ปิดผนึกและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ศึกษาการเปลี่ยนแปลงแบคทีเรียแต่ละชนิด ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดด้วยวิธีมาตรฐาน ตามข้อ 3.2.4.3 เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุก 0 3 และ 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (3 ซ้ำ) ทดสอบข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 23, SPSS Inc., Chicago, USA เปรียบเทียบความแตกต่างโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 95%

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ปัจจัยต่าง ๆ ของโอโซนที่ส่งผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

4.1.1 ผลของเวลาของการแช่ปลานิลแล่ในน้ำโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

จากผลการทดลองภายหลังการแช่ปลานิลแล่ในน้ำโอโซนความเข้มข้น 1 ppm เป็นเวลา 1 5 และ 10 นาที พบว่าการแช่ปลานิลแล่ด้วยน้ำโอโซนที่ระยะเวลาต่าง ๆ สามารถลดปริมาณ total viable count ได้ 0.43±0.04, 0.41±0.07 และ 0.47±0.06 log reduction ตามลำดับ ซึ่งระยะเวลาในการแช่ที่ 1 5 และ 10 นาที ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ดังแสดงในภาพ 4.1 และจากการทดสอบการสลายตัวของโอโซนในสารละลายโอโซน พบว่าโอโซนมีค่าครึ่งชีวิตคือ 12±0.7 นาที ที่อุณหภูมิ 28±2 ºC เนื่องจากคุณสมบัติของโอโซนสามารถสลายตัวง่าย เข้าไปทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ต่าง ๆ ได้อย่างรวดเร็ว (Thanomsub et al., 2002) และเนื่องจากสารอินทรีย์มีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพของโอโซน (จิราภา เสธจินตนิน, 2547) จากการศึกษาของ Chawla, Bell, & Janes (2007) ที่ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการใช้น้ำโอโซนต่อการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกุ้งปอกเปลือก โดยตัวอย่างกุ้งถูกแช่ในน้ำโอโซนที่ความเข้มข้น 3 ppm เป็นเวลา 20 40 และ 60 วินาที ผลการศึกษาพบว่า เวลา 40 วินาที และ 60 วินาที จำนวน aerobic plate count (APC) ลดลงมากที่สุด และ 60 วินาที ทำให้แบคทีเรีย *Pseudomonas* spp. ลดลงมากที่สุด การใช้น้ำโอโซนสำหรับแช่กุ้งเป็นเวลา 60 วินาที จึงถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบอายุการเก็บรักษาและการทำลาย *Listeria monocytogenes* ในเนื้อกุ้งที่ปอกเปลือก de Mendonça & Gonçalves (2017) ที่ศึกษาผลของระยะเวลาในการสัมผัสระหว่างปลานิลแล่กับน้ำโอโซน เป็นเวลา 5 10 และ 15 นาที พบว่าประสิทธิภาพสูงสุดของโอโซนสามารถทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดจะอยู่ในช่วง 5 นาทีแรกเท่านั้น โดยอธิบายว่าเนื่องจากความไม่เสถียรของอะตอมโมเลกุลของโอโซนและการปลดปล่อยออกซิเจนในน้ำ ดังนั้นจากผลการทดลองจึงเลือกเวลา 1 นาที สำหรับแช่ปลานิลแล่และใช้สำหรับการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของปลานิลแล่ที่ลดลง (log reduction) หลังจากสัมผัสกับน้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 1 ppm เป็นเวลา 1 5 และ 10 นาที

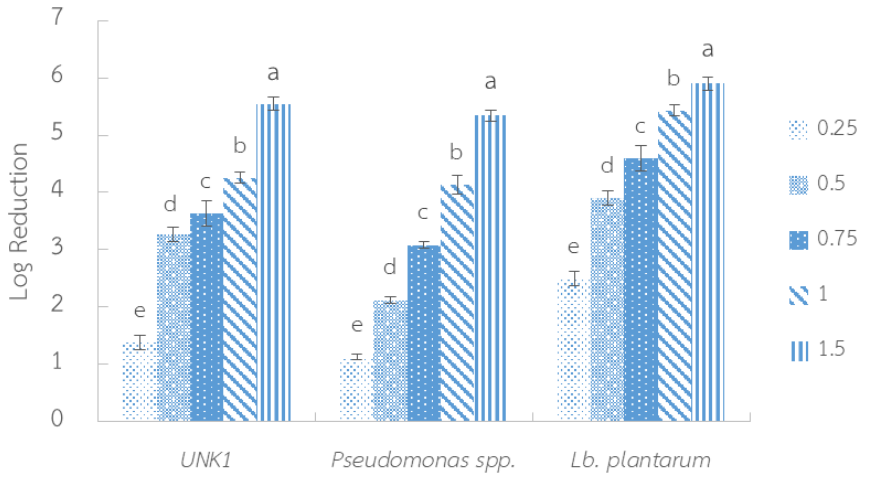
4.1.2 ผลของความเข้มข้นของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

จากนั้นจะคัดเลือกระดับความเข้มข้นโอโซนจาก 6 ระดับ คือ 0 0.25 0.5 075 1 และ 1.5 ppm เพื่อศึกษาผลของน้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 9 log CFU/ml สัมผัสกับน้ำโอโซนเป็นเวลา 1 นาที แสดงดังตารางผนวกที่ จ.1 พบว่าผลของการทดลองปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดลดลงเมื่อเปรียบเทียบค่า log reduction ของแบคทีเรียแต่ละชนิดกับความเข้มข้นโอโซนที่ระดับต่าง ๆ และระดับความเข้มข้นโอโซนแต่ละความเข้มข้นสามารถลดปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกัน แสดงในภาพที่ 4.2 และพบว่าผลของน้ำโอโซนต่อการลดปริมาณแบคทีเรียแปรผันตามระดับความเข้มข้นน้ำโอโซน กล่าวคือเมื่อระดับความเข้มข้นโอโซนเพิ่มขึ้นส่งผลให้การลดปริมาณแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยที่ระดับความเข้มโอโซนต่ำสุดที่สามารถลดปริมาณแบคทีเรียได้คือ 0.25 ppm (ประมาณ 1 log reduction) ในขณะที่การใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 1.5 ppm สามารถลดปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดได้มากที่สุด (มากกว่า 5 log reduction) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ จิราภา เสธจินตนิน (2547) พบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดมีจำนวนลดลงตามความแปรผันของโอโซน และ ที่ความเข้มข้นโอโซน 0.54 mg/l มีแนวโน้มทำลายแบคทีเรียเริ่มต้น 5 log CFU/ml ได้หมด และพบว่าน้ำโอโซนสามารถลดจำนวน *Stap. aureus* (6 log reduction) ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Lb. planntarum* (5.90), *S.* Typhimurium (5.56), UNK1 (5.54), *Pseudomonas* spp. (5.34) *V. cholerae* (5.25) และ *E. coli* (4.21) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโอโซนมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Stap. aureus* และ *Lb. planntarum* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) และ

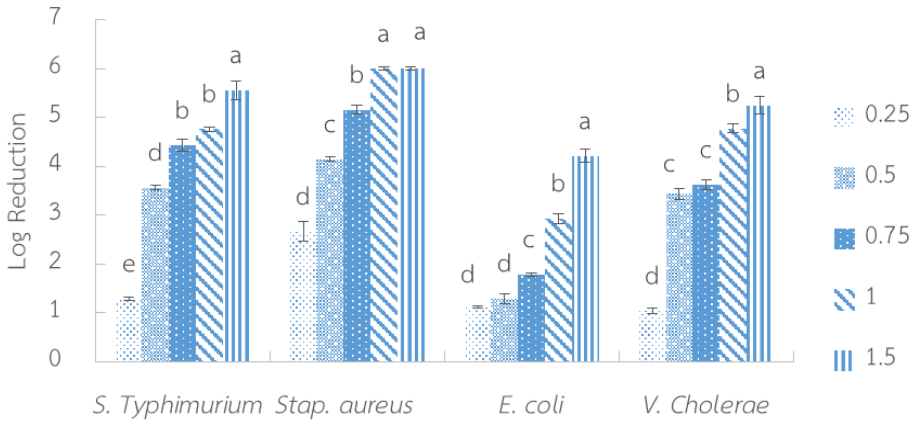
สามารถยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ดังภาพ 4.1 เนื่องจากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อชั้นนอก (outer membrane) ที่มีสารโลโพพอลิแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบของเยื่อชั้นนอกจึงเป็นตัวกั้นการซึมผ่านของสารได้ดี ในขณะผนังเซลล์ที่แบคทีเรียแกรมบวกประกอบไปด้วยเปปติโดไกลแคน ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโอโซนทำปฏิกิริยากับโปรตีนได้มากกว่าไขมัน (Thanomsub et al., 2002) ซึ่งงานวิจัยของ Chen et al. (1992) ศึกษาผลของโอโซนที่ความเข้มข้น 1.4 ppm ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งหมด 9 ชนิด ในสารละลายเกลือ 0.8% ที่ 25 °C พบว่าโอโซนมีผลต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ *Stap. aureus, E. coli, P. aeruginosa, P. putida, P. fluorescens, V. parahaemolyticus, V. cholerae, S.* Typhimurium, *Flavobacterium aquatile* และ Restaino et al. (1995) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำโอโซนที่ความเข้มข้น 0.18 ppm เป็น เวลา 1-5 นาที ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ สามารถยับยังได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *L. monocytogenes, Stap. aureus, B. cereus* และ *Enterococcus faecalis* แบคทีเรียแก-รมลบ คือ *P. aeruginosa, Y. enterocolitica, E. coli* และ *S.* Typhimurium

จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของโอโซนต่อการทำลายจุลินทรีย์แปรผันตามความเข้มข้นโอโซน แต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าโอโซนมีผลต่อคุณภาพเนื้อสัมผัส สี และมีกลิ่นตกค้างทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากคำนึงถึงประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ตามต้องการแล้ว ยังต้องคำนึงถึงคุณภาพการยอมรับของผลิตภัณฑ์ด้วย (Indun, 2005) จึงศึกษาผลของน้ำโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพกายภาพเคมีในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ก.



ข.

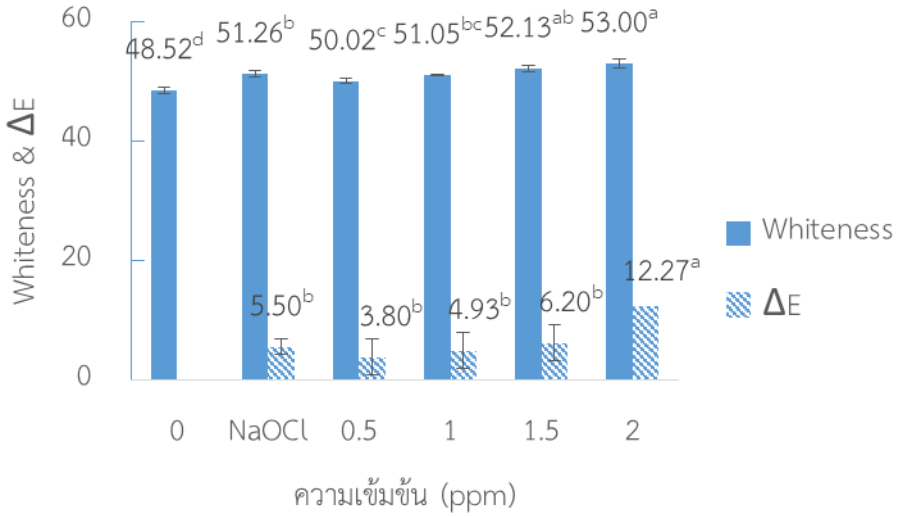
ภาพที่ 4.2 จำนวนแบคทีเรียเน่าเสีย (ก) และแบคทีเรียก่อโรค (ข) ที่ลดลง (log reduction) หลังจากสัมผัสกับน้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที

4.2 ผลของความเข้มข้นโอโซนต่อคุณสมบัติทางกายภาพ-เคมี ของปลานิลแล่

การศึกษานี้จะคัดเลือกระดับความเข้มข้นโอโซนจาก 5 ระดับความเข้มข้นคือ 0 0.5 1 1.5 และ 2 ppm เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการแช่ปลานิลแล่ โดยที่ไม่ทำให้ปลานิลเกิดการเปลี่ยนแปลงจากปลานิลที่แช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm (ตัวอย่าควบคุม) โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีความขาว (WI), ความแตกต่างของค่าสี (ΔE), ค่า Thiobarbituricacid- reactive substances (TBARS) และ % การสูญเสียน้ำหนัก ดังแสดงในภาพที่ 4.3 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ

สีเป็นสมบัติทางกายภาพที่มองเห็นได้ของอาหารและมีบทบาทต่อความพึงพอใจของผู้บริโภค (Indun, 2005) จากการศึกษาผลของความเข้มข้นโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะด้านสีของเนื้อปลานิล พบว่าค่า WI และ ΔE แปรผันตามความเข้มข้นน้ำโอโซน กล่าวคือที่ระดับความเข้มข้นโอโซนเพิ่มขึ้นส่งผลให้เนื้อปลานิลมีค่า WI เพิ่มขึ้น ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้ค่า ΔE เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ค่า ΔE เป็นค่าที่บอกความแตกต่างของสีจากตัวอย่างที่ไม่ผ่านการแช่สารละลาย และผลของการแช่ปลานิลแล่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และการแช่ปลานิลแล่ด้วยน้ำโอโซนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า WI และ ΔE เพิ่มขึ้นจากปลานิลแล่ที่ไม่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของตัวอย่างที่แช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับตัวอย่างที่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นโอโซนสูงสุดที่ทำให้ค่า WI และ ΔE ของปลานิลเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) คือ ปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซนความเข้มข้น 2 ppm (WI = 53±0.79 และ ΔE = 4.12±0.02) ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Zhao et al. (2017) ศึกษาผลของน้ำโอโซน 4.5 ppm ต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลานิลแล่แช่แข็ง แสดงให้เห็นว่าการใช้โอโซนสำหรับแช่ปลานิลแล่ส่งผลให้ค่าสีขาวเพิ่มขึ้นจากตัวอย่างคุม สังเกตจากค่า L* ที่เพิ่มขึ้นโดยค่า L* ของตัวอย่างควบคุมคือ 43.43±2.79 และตัวอย่างที่แช่ด้วยน้ำโอโซนคือ 52.77±2.54 โดยที่ Jiang et al. (2006) อธิบายว่าการเพิ่มขึ้นของค่าความสว่างเป็นผลมาจากโอโซนทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ของโปรตีนหรือเปปไทด์ และรงควัตถุฮีมในเนื้อปลา Chen et al. (1992) และ Kim et al. (1999) มีแนวคิดว่าโอโซนเข้าไปทำลายโครงสร้างของฮีม (heme) ในไมโอโกลบิน (myoglobin) และฮีโมโกลบิน (haemoglobin) ทำให้สีของเนื้อปลาจางลง อีกทั้งโอโซนมีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดส์ (oxidize) ที่รุนแรงจึงสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับสารประกอบอินทรีย์หลายชนิด นอกจากนี้โอโซนและอนุมูลไฮดรอกซี (hydroxyl radical, OH-) อาจทำให้วงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ที่เป็นองค์ประกอบของสารสีแตกออก หลังจากนั้นจะเกิดออกซิเดชั่นของกรดอินทรีย์ (organic acid), แอลดีไฮด์ (aldehyde) และ คีโตน (ketone) ทำให้สีของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

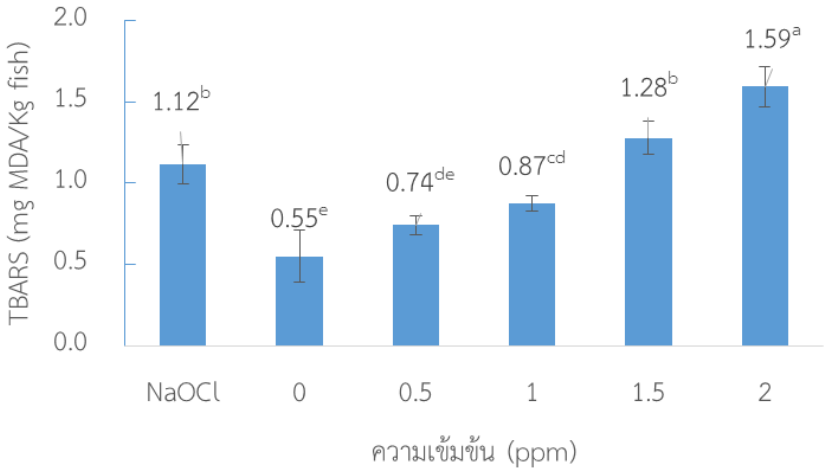


ภาพที่ 4.3 ค่าดัชนีสีขาว และ ความแตกต่างของค่าสี ΔE ของชิ้นปลานิลแล่ หลังจากการแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 ppm เป็นเวลา 1 นาที และการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที

TBARS มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการหืนที่ประเมินทางประสาทสัมผัส (Jayasingh & Cornforth, 2003) จากการศึกษาผลของความเข้มข้นโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลงค่า TBARS ของเนื้อปลานิล พบว่าค่า TBARS แปรผันตามความเข้มข้นน้ำโอโซน กล่าวคือที่ระดับความเข้มข้นโอโซนเพิ่มขึ้นส่งผลให้เนื้อปลานิลมีค่า TBARS เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) การแช่ปลานิลแล่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และ การแช่ปลานิลแล่ด้วยน้ำโอโซนมีผลให้ค่า TBARS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลแล่ที่ไม่ผ่านการแช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์และน้ำโอโซน (0 ppm) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของตัวอย่างที่แช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับตัวอย่างแช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้โอโซนที่ระดับความเข้มข้น 2 ppm ในการแช่ปลานิลแล่ส่งผลให้เนื้อปลานิลมีค่า TBARS มากกว่าปลานิลแล่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ดังแสดงในภาพที่ 4.4 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ de Mendonça & Gonçalves (2017) ศึกษาผลของน้ำโอโซน 0-1.5 ppm ต่อคุณภาพทางกายภาพเคมี แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นโอโซนสำหรับแช่ปลานิลแล่ส่งผลให้ค่า TBARS เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้น 1.5 ppm ค่า TBARS เพิ่มขึ้นจากตัวอย่างเริ่มต้นคือ 0.68±0.00 เป็น 1.19±0.03 mg MDA/Kg sample ตามลำดับ เนื่องจากการวัดค่า TBARS เป็นการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์อันดับสองคือมาโลนาลดีไฮด์ ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการใช้โอโซนที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดส์ที่รุนแรง จึงสามารถเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในปลานิลให้สูงขึ้นได้ โดยโอโซนสามารถเกิดกับปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับผลิตภัณฑ์ได้ 2 ทางคือ ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับโมเลกุลของโอโซน และ ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เช่น หมู่ –OH ที่เกิดจากการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แตกตัวของโอโซน (de Mendonça & Gonçalves (2017); Zhao et al., 2016) นอกจากนี้ Crowe et al. (2012) รายงานค่า TBARS เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่ออยู่ภายใต้การรักษาด้วยโอโซน เนื่องจากเกิดการสลายตัวของโอโซน ทำให้เกิดการปลดปล่อยออกซิเจน ซึ่งช่วยในการเกิดออกซิเดชั่นกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอาหาร



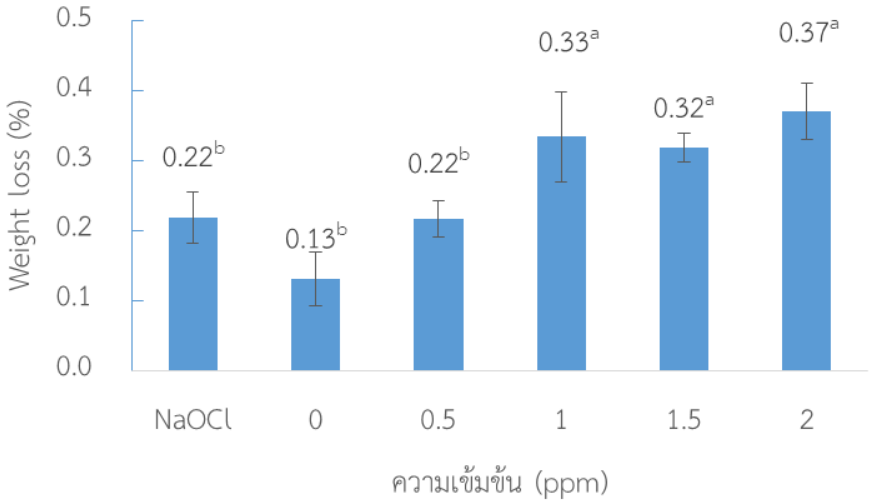
ภาพที่ 4.4 ค่า TBARS ของชิ้นปลานิลแล่ หลังจากการแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 ppm เป็นเวลา 1 นาที และการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นโอโซนต่อการเปลี่ยนแปลง % การสูญเสียน้ำหนักของเนื้อปลานิล แสดงผลในภาพที่ 4.5 พบว่า % การสูญเสียน้ำหนักแปรผันตามความเข้มข้นน้ำโอโซน กล่าวคือที่ระดับความเข้มข้นโอโซนเพิ่มขึ้นส่งผลให้เนื้อปลานิลมี % การสูญเสียน้ำหนักเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลของตัวอย่างที่แช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับตัวอย่างแช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้โอโซนในการแช่ปลานิลแล่ส่งผลให้เนื้อปลานิลมี % การสูญเสียน้ำหนักเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นโอโซนที่ทำให้ % การสูญเสียน้ำหนักของปลานิลเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) คือ ระดับความเข้มข้นโอโซน 1- 2 ppm (0.33±0.06, 0.32±0.02 และ 0.37±0.04 mg MDA/Kg sample ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามผลแสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของ % การสูญเสียน้ำหนักเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจากโอโซนมีคุณสมบัติเป็นสารออกซิไดส์ที่รุนแรงจึงสามารถทำลายโปรตีนให้เสียสภาพส่งผลต่อการอุ้มน้ำ (water holding capacity) (ณัฐพล ฟ้าภิญโญ, 2550) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mudd et al. (1989) จากการทดลองใช้โอโซนในการผลิตซูริมิปลาแมคเคอเรล โอโซนจะออกซิไดซ์หมู่ซัลฟ์ไฮดริลอิสระบนโมเลกุลของโปรตีนก่อให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ นอกจากนี้โอโซนยังสามารถออกซิไดซ์ไดซัลไฟด์และเกิดเป็นกรดซีสเตอิก หรือ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สามารถทำลายพันธะไดซัลไฟด์และเกิดเป็นกรดซัลโฟนิก ส่งผลทำให้เกิดการเสียสภาพโปรตีนทำให้ความสามารถในการเกิดเจลลดลง

จึงเลือกระดับความเข้มข้นโอโซน 0.5-1.5 ppm ศึกษาสำหรับขั้นตอนถัดไป ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ยังคงรักษาคุณภาพทางกายภาพเคมี (ดัชนีความขาว, ความแตกต่างของค่าสี, TBARS และ % การสูญเสียน้ำหนัก) ของชิ้นปลานิลแล่



ภาพที่ 4.5 น้ำหนักของชิ้นปลานิลแล่ที่สูญเสีย (%) หลังจากการแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 0 0.5 1 1.5 และ 2 ppm เป็นเวลา 1 นาที และการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

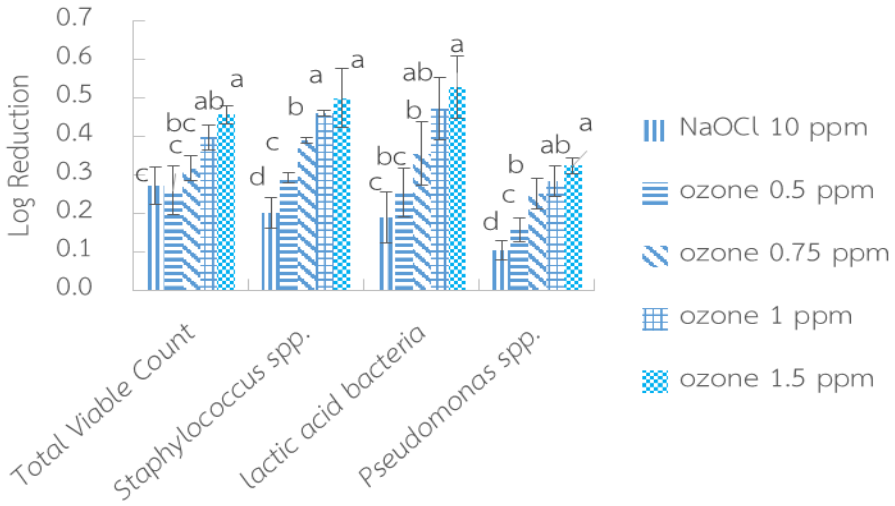
4.3 ผลของความเข้มข้นโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในปลานิลแล่

จากผลการทดลองข้อ 4.2 จึงเลือกใช้ความเข้มข้น 0.5-1.5 ppm เพื่อศึกษาผลน้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในปลานิลแล่ ตลอดการศึกษาไม่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. และ *V. cholerae* จำนวนแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงดังตารางผนวกที่ จ.2 และ จ.3 เมื่อเปลี่ยนตัวกลางจากน้ำกลั่นมาเป็นปลานิลแล่ พบว่าโอโซนยังสามารถลดปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ แต่ประสิทธิภาพของโอโซนจะลดลง นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่า log reduction ของแบคทีเรียแต่ละชนิดกับความเข้มข้นโอโซนที่ระดับต่าง ๆ พบว่าระดับความเข้มข้นโอโซนแต่ละความเข้มข้นทำให้ค่า log reduction แบคทีเรียแต่ละชนิดแตกต่างกัน แสดงภาพที่ 4.6 และพบว่าผลของน้ำโอโซนต่อการลดจำนวนจุลินทรีย์แปรผันตามความเข้มข้นน้ำโอโซน กล่าวคือเมื่อความเข้มข้นโอโซนเพิ่มขึ้นส่งผลให้การลดปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น แต่ที่ระดับความเข้มข้นโอโซน 1 และ 1.5 ppm ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และมีแนวโน้มในการ

ทำลายเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria (0.53 log reduction) ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Stap. aureus* (0.50 log reduction), total viable count (0.46 log reduction) และ *Pseudomonas* spp. (0.32 log reduction) ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมสามารถลดจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้ 0.19, 0.20, 0.27 และ 0.10 log reduction ตามลำดับ ซึ่งผลของการลดจำนวนแบคทีเรียแต่ละชนิดของของการแช่ปลาในน้ำโอโซนต่างจากการทดลองที่ 4.2 เพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียของโอโซนในตัวกลางที่ไม่เหมือนกันจะสามารถทำลายแบคทีเรียได้ต่างกัน เนื่องจากสารอินทรีย์มีผลต่อประสิทธิภาพของโอโซน และแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการยึดเกาะตัวกลางแตกต่างกัน พื้นที่ผิวของตัวกลางขรุขระ ซ้อนทับกันทำให้โอโซนเข้าไปทำลายได้ยากขึ้น (Bancroft et al., 1984; จิราภา เสธจินตนิน, 2547) นอกจากนี้ Manousaridis et al. (2005) ศึกษาผลของการใช้น้ำโอโซนที่ความเข้มข้น 1 ppm โดยการประเมินสมบัติทางจุลินทรีย์ การศึกษาจะมุ่งเน้นถึงการติดตามจุลินทรีย์ดังนี้ aerobic plate count (APC), Lactic acid bacteria (LAB) และ *Pseudomonas* spp. ตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่ผ่านการใช้โอโซนจะมีจำนวนเชื้อ APC ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม การใช้โอโซนสามารถลดจำนวนเชื้อ APC ได้ทั้งหมด 0.7 log สำหรับ LAB โอโซนมีผลกระทบต่อ LAB เพียงเล็กน้อยซึ่งลดจำนวนเชื้อ LAB ได้ 0.2 log และโอโซนสามารถลดจำนวน *Pseudomonas* spp. ได้ 0.8 log หลังจากการแช่ตัวอย่างนาน 90 นาที

การทดลองนี้จึงเลือกระดับความเข้มข้นโอโซนที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ คือ 1 ppm ซึ่งไม่แตกต่างจากความเข้มข้นโอโซน 1.5 ppm อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ de Mendonça & Gonçalves (2017) ที่ศึกษาผลของน้ำโอโซน 0-1.5 ppm ต่อคุณภาพกายเคมี และจุลินทรีย์ พบว่าความเข้มข้นโอโซน 1 และ 1.5 ppm มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ไม่ต่างกันจึงเลือกใช้ความเข้มข้นโอโซน 1 ppm เนื่องจากสามารถลดต้นทุนในการผลิตน้ำโอโซนได้ อีกทั้งเป็นความเข้มข้นที่ไม่ทำให้คุณภาพทางกายภาพเคมีของชิ้นปลานิลแล่เปลี่ยนแปลงจากตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้ ณัฐพล ฟ้าภิญโญ (2550) ศึกษาการลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้น้ำโอโซน (0.5-1 ppm) แช่ปูนิ่ม และพบว่า ที่ 1 ppm ให้ปริมาณในการลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดดีที่สุด และยังคงรักษาลักษณะปรากฏของปูนิ่มได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 4.6 จำนวนแบคทีเรียในปลานิลที่ลดลง (log reduction) หลังจากการแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 0.75 1 และ 1.5 ppm เป็นเวลา 1 นาที และการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที (ตัวอย่างควบคุม)

4.3 ผลของการบรรจุต่อคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของปลานิล

จากการศึกษาผลของน้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียเน่าเสียบางชนิด และการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพเคมีของปลานิลแล่ ในการทดลองนี้จึงเลือกการแช่ปลานิลในน้ำโอโซนความเข้มข้น 1 ppm เป็นเวลา 1 นาที ร่วมกับการบรรจุแบบสุญญากาศ โดยตัวอย่างควบคุมคือ ปลานิลแล่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm บรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษาเมื่อปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์แต่ละชนิด ค่า pH, TVB-N, TBARS และค่าดัชนีสีขาว ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน พบว่าค่าที่ได้จากตัวอย่างแช่ด้วยน้ำโอโซนและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ที่บรรจุในสภาวะต่างกันในแต่ละวันของการเก็บรักษามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต และทำให้เกิดการเน่าเสีย (Monousaridis et al., 2005) พบว่าจำนวน total viable count และ *Pseudomonas* spp. ของทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มจำนวนขึ้นตลอดการเก็บรักษา และตัวอย่างที่แช่ด้วยน้ำโอโซนมีจำนวนจุลินทรีย์ต่ำกว่าตัวอย่างที่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปรคลอไรท์ การเก็บปลานิลแล่ที่แช่โซเดียมไฮโปคลอไรด์บรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติ (ตัวอย่างควบคุม) และสุญญากาศ มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินเกณฑ์มาตรฐานกำหนดที่ 10^7 CFU/g (ICMFS, 1986) ในวันที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างแช่น้ำโอโซนบรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติและสุญญากาศ มีปริมาณจุลินทรีย์เกินมาตรฐานในวันที่ 5 และ 7 ตามลำดับ ดังแสดงใน ภาพที่ 4.7

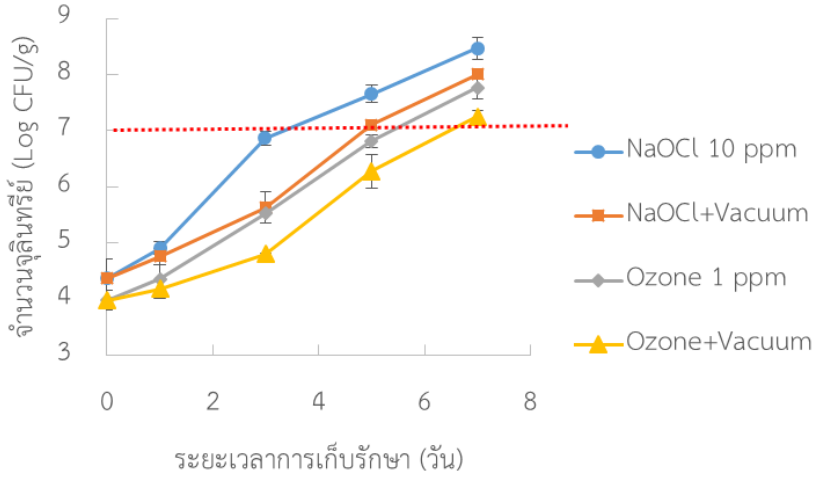
Manousaridis et al. (2005) ศึกษาผลของการใช้น้ำโอโซน 1 ppm ต่อการยืดอายุการเก็บรักษาหอยแมลงภู่ที่บรรจุในสุญญากาศ มีการแปรปัจจัยในการแช่โอโซนนาน 60 นาที และ 90 นาที โดยการประเมินสมบัติทางจุลินทรีย์ การศึกษาจะมุ่งเน้นถึงการติดตามจุลินทรีย์ดังนี้ aerobic plate count (APC), Lactic acid bacteria (LAB) และ *Pseudomonas* spp. ตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่ผ่านการใช้โอโซนจะมีจำนวนเชื้อ APC ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ในวันที่ 8 ของการเก็บรักษาตัวอย่างที่แช่น้ำโอโซน 60 และ 90 นาที มีจำนวน APC 5-6 $\log_{10}$ CFU/g ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีจำนวนเชื้อ APC ถึง 7 $\log_{10}$ CFU/g และเชื้อ LAB และ *Pseudomonas* spp. ยังคงเพิ่มจำนวนขึ้นตลอดการเก็บรักษาในสภาวะสุญญากาศ โดยเพิ่มขึ้นจาก 1 ถึง 6.6 $\log_{10}$ CFU/g และ 2.5 ถึง 7.7 $\log_{10}$ CFU/g ตามลำดับ ของการเก็บรักษาเป็นเวลา 12 วัน ผลการเจริญของจุลินทรีย์สอดคล้องกับค่า Total Volatile Basic Nitrogen (TVB-N) ซึ่งปริมาณของ TVB-N จะมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของปลา คือ ปลาสดจะมีปริมาณ TVB-N น้อยกว่า 12 mg TVB-N/100g ตัวอย่าง และ >30 mg TVB-N/100g ตัวอย่าง ไม่สามารถรับประทานได้ (Regenstein, 1991) การทดลองพบว่าค่า TVB-N เริ่มต้นของปลานิลเฉลี่ยเท่ากับ 12.27 และระหว่างการเก็บรักษาพบว่าค่า TVB-N เพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษาเช่นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ TVB-N ตัวอย่างที่ผ่านการแช่โอโซนบรรจุในสภาวะสุญญากาศมีค่า TVB-N อยู่ในเกณฑ์กำหนดตลอดการเก็บรักษา ซึ่งตัวอย่างที่ผ่านการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์บรรจุในสภาวะสุญากาศมีค่า TVB-N สูงเกินเกณฑ์กำหนดในวันที่ 7 ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีค่าสูงเกินเกณฑ์กำหนดในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา ดังแสดงในรูปที่ 4.9 ค่า TVB-N ของปลานิลที่เก็บสภาวะปกติมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเร็วกว่าสภาวะสุญญากาศ สอดคล้องกับงานวิจัย Masniyom et al. (2013) ศึกษาผลของการบรรจุดัดแปลงบรรยากาศสุญญากาศต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลานิลแล่ แสดงให้เห็นว่าค่า TVB-N ของปลานิลแล่ที่บรรจุสภาวะบรรยากาศปกติสูงกว่าปลานิลแล่ที่บรรจุดัดแปลงบรรยากาศและสุญญากาศ ตามลำดับ และรายงานว่าค่า TVB-N ประกอบด้วย แอมโมเนีย ไตรเมทิลเอมีน (TMA) ไดเมทิลเอมีน (DMA) เมทิลเอมีน (methylamine) และสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีนและองค์ประกอบอื่น ๆ ก่อให้เกิดกลิ่นและรสที่ผิดปกติแก่ปลาเนื่องจากแบคทีเรียและเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา และ Ježek & Buchtova (2014) ศึกษาผลของการบรรจุสุญญากาศต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพกายภาพเคมีของปลาเรนโบว์เทราต์พบว่าค่า TVB-N ของตัวอย่างที่บรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษา ตัวอย่างบรรจุสภาวะปกติมีค่า TVB-N สูงกว่าตัวอย่างบรรจุสุญญากาศแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ(p<0.05) และพบว่าค่า pH ของตัวอย่างที่บรรจุสุญญากาศมีค่าลดลงซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างที่บรรจุบรรยากาศปกติที่มีค่า pH เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้คือ การเปลี่ยนแปลง pH ในตัวอย่างเนื้อปลานิลแล่เฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 6.65 และเมื่อเก็บภายใต้สภาพบรรยากาศปกติพบว่า pH จะเพิ่มขึ้นตลอดช่วงอายุการเก็บรักษา และ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

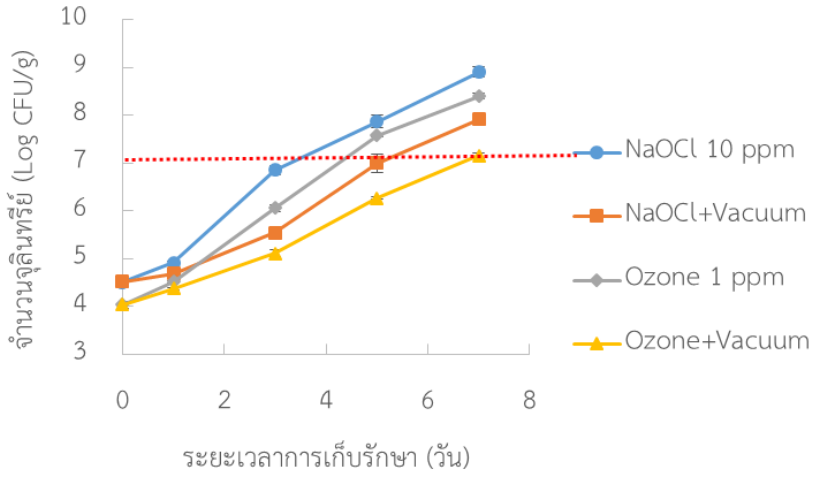
มีลักษณะปรากฏที่บ่งบอกถึงการเน่าเสีย พบว่าค่า pH ของตัวอย่างควบคุมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและเกินเกณฑ์กำหนด pH 7 (Ježek & Buchtova, 2014) ในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ในขณะตัวอย่างที่บรรจุในสภาวะสุญญากาศ pH ค่อยๆลดลงระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งค่า pH ของตัวอย่างที่แช่ด้วยน้ำโอโซนและโซเดียมไอโปคลอไรท์ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.10 สาเหตุการเพิ่มขึ้นของ pH หลังจากการเปลี่ยนแปลงในระยะหลังจากการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อปลา (post mortem) เนื่องจากมีการเจริญของจุลินทรีย์พร้อม ๆ กับการผลิตสารเมทาโบไลท์ต่าง ๆ ขณะเดียวกันจะเกิดการสลายตัวของสารประกอบไนโตรเจน (nitrogenous compounds) เช่น TVB-N ทำให้ pH เพิ่มสูงขึ้น (Sikorski et al., 1990) การเปลี่ยนแปลงค่า pH เกิดจากการเสียสภาพของสารประกอบต่าง ๆ และโปรตีน และเกิดกรดคาร์บอนิกซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้ pH ลดลง นอกจากนี้การบรรจุสภาะสุญญากาศ แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม คือ จะมีสภาวะเป็นแบบไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) ทำให้จุลินทรีย์ทีเจริญได้เป็นจุลินทรีย์พวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย ซึ่งได้แก่ กลุ่ม lactic acid bacteria เมื่อมีการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ จะมีการสร้างกรดแลคติกทำให้ pH ของอาหารลดต่ำลงด้วย (Farber, 1991; Fraser & Sumar, 1998; Gram & Huss, 1996; Parry, 1993)

ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria (LAB) ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลที่บรรจุภายใต้สภาวะต่าง ๆ ดังภาพที่ 4.8 พบว่าจำนวน LAB ของปลานิลที่บรรจุภายใต้สภาวะสุญญากาศ เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 1 มีจำนวนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน ปรากฏว่าการเก็บรักษาปลานิลในสภาวะบรรยากาศปกติและสภาวะสุญญากาศมีจำนวน LAB เพิ่มมากขึ้น แต่ในสภาวะสุญญากาศจะมีจำนวน LAB สูงกว่าการบรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติตลอดการเก็บรักษาปลานิลแล่ และพบว่าตัวอย่างที่แช่ด้วยโอโซนและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่แตกต่างกัน ($p<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากการบรรจุปลานิลในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศไม่เจริญ แต่จุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศและชนิดที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศจะเจริญ ขึ้นมาแทนที่จากจำนวนของแบคทีเรียที่สร้างแล็กติกที่ใกล้เคียงกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด นอกจากนี้จากการทดลองพบว่าปลานิลที่บรรจุภายใต้สภาวะสุญญากาศ ถึงแม้จำนวนจุลินทรีย์ในวันสุดท้ายมีปริมาณใกล้เคียงกับวันหมดอายุในการเก็บรักษาในสภาวะปกติ แต่ไม่พบกลิ่นเน่าเสียได้ ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสียส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในที่มีอากาศ เช่น *Pseudomonas* spp. ซึ่งสามารถย่อยสลายโปรตีนและก่อให้เกิดกลิ่นเน่าเสีย (Enfors & Molin, 1980) ดังนั้นเมื่อบรรจุปลานิลที่สภาวะสุญญากาศทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศไม่เจริญ แต่จะมีแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic bacteria) และแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะมีและไม่มีอากาศ เช่น LAB (Wang & Brown, 1983) เพิ่มจำนวนขึ้นเมื่อเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงไม่ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะบรรจุแบบสุญญากาศ เนื่องจากมีการรายงานว่าแบคทีริ

โอซินจาก LAB บางชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ เช่น *C. botulinum B. cereus Stap. aureus* เป็นต้น (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550) นอกจากนี้การสร้างกรดของเชื้อ LAB อาจส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* และพบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus Lactococcus Streptococcus* และ *Pediococcus* สามารถยับยั้งเชื้อ Non-compolytic *Clostridium botulinum* (สายพันธุ์ 17B, Beluga และ 202F) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานมากที่สุด (Rodgers, Peiris, & Casadei, 2003)

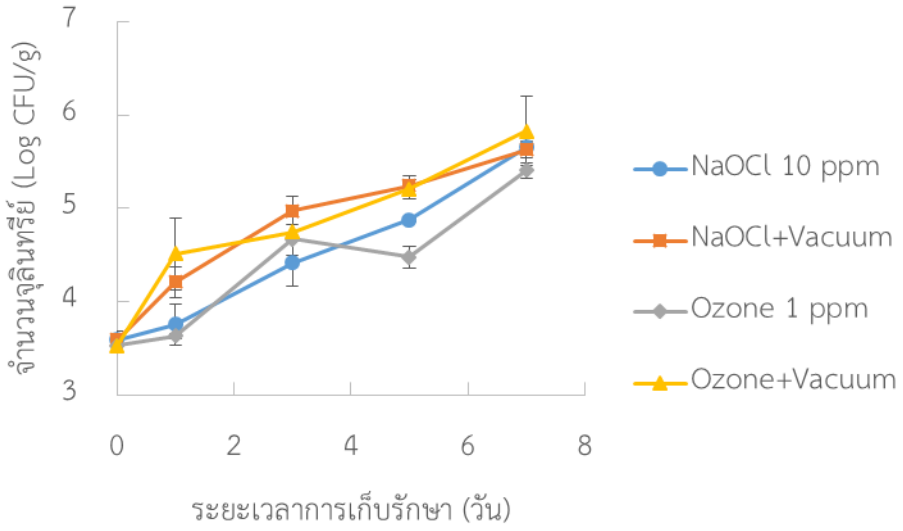


ก.

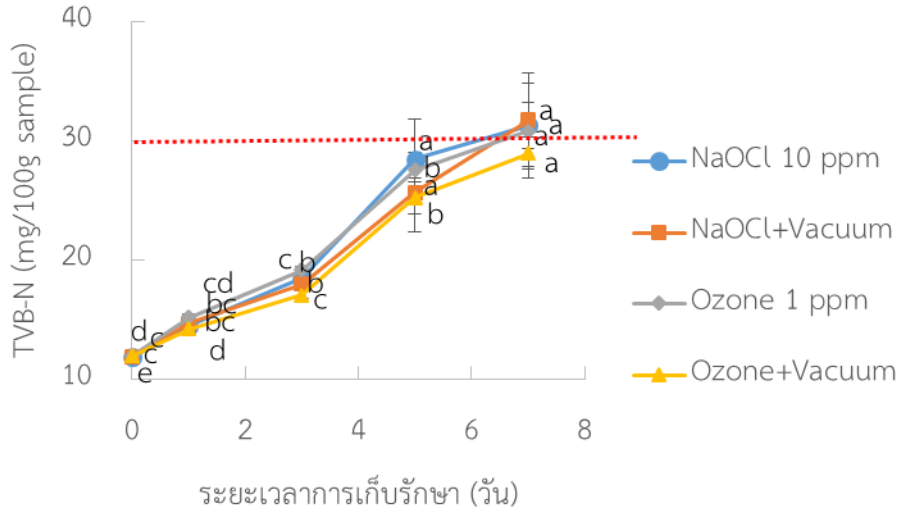


ข.

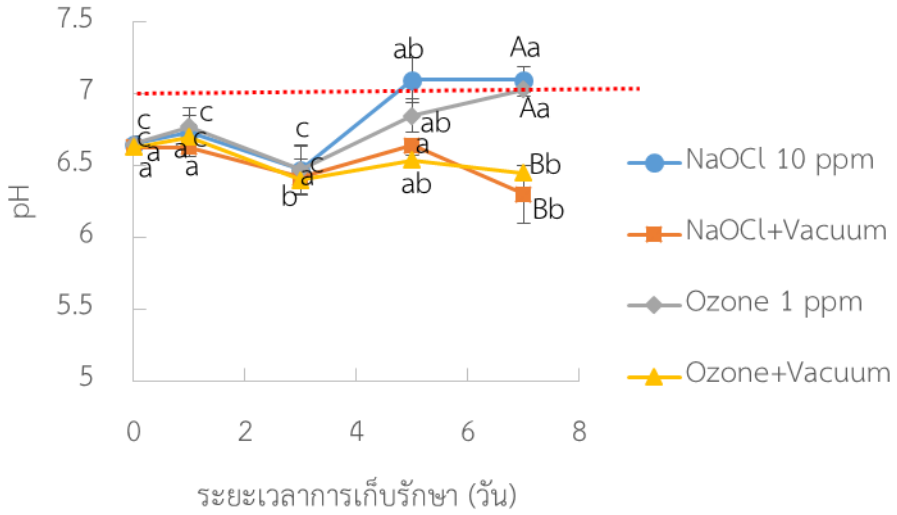
ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของ Total viable count (ก) และ *Pseudomonas* spp. (ข) ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงของ lactic acid bacteria ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ



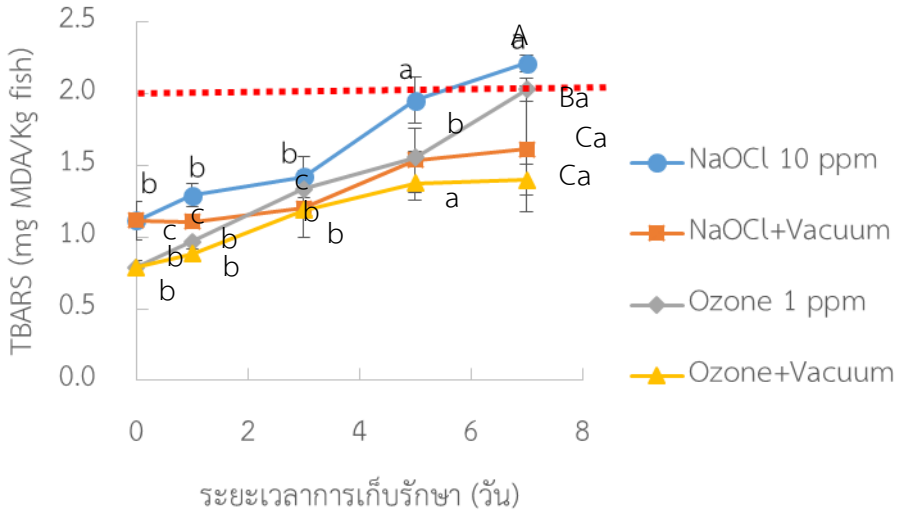
ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของ TVB-N ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของ pH ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ

การวัดค่า TBARS เป็นการวัดปริมาณของสารประกอบมาโลนัลดีไฮด์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อันดับสองจากการสลายตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ในการศึกษาการออกซิเดชั่นของไขมันในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดรวมทั้งในผลิตภัณฑ์ปลา (de Mendonça & Gonçalves, 2017) จากการศึกษาพบว่าค่า TBARS ของปลานิล เฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 0.55 mgMDA/kg sample มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษา และสำหรับตัวอย่างที่บรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติมีค่า TBARS เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีสูงกว่าตัวอย่างที่บรรจุในสภาวะสุญญากาศ ในขณะที่ตัวอย่างบรรจุแบบสุญญากาศจะเพิ่มอย่างช้าๆ โดยที่ตัวอย่างที่แช่ด้วยน้ำโอโซนและโซเดียมไอโปคลอไรท์มีค่าไม่แตกต่างกัน (p<0.05) ซึ่งตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำโอโซนบรรจุในสภาวะสุญญากาศมีค่า TBARS ต่ำสุดตลอดการเก็บรักษา ดังแสดงในภาพที่ 4.11 อย่างไรก็ตามค่า TBARS ที่ได้ของตัวอย่างปลานิลทั้ง 3 ตัวอย่างยังคง เป็นค่าที่แสดงว่ายังคงมีคุณภาพที่เป็นที่ยอมรับได้ โดยค่ามาตรฐานอยู่ที่ไม่เกิน 2 mgMDA/kg sample ยกเว้นตัวอย่างควบคุมที่มีค่า TBARS เกินมาตรฐานในวันที่ 5 ของการเก็บรักษาปลานิลที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส Masniyom et al. (2013) ศึกษาผลของการบรรจุดัดแปลงบรรยากาศสุญญากาศต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลานิลแล่ แสดงให้เห็นว่าค่า TBARS ของปลานิลแล่เพิ่มขึ้นตลอดการเก็บรักษา บ่งบอกถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นระหว่างการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามปลานิลแล่ที่บรรจุสุญญากาศมีค่า TBARS ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บปลานิลแล่ที่สภาวะปกติและดัดแปลงบรรยากาศ และรายงานว่าสภาวะในการบรรจุแบบสุญญากาศสามารถช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ TBARS ได้ เนื่องจากการบรรจุแบบสุญญากาศช่วยลดปริมาณออกซิเจนตั้งต้น สามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของผลิตภัณฑ์ได้ และแสดงให้เห็นว่าออกซิเจนเป็นสาเหตุก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นไขมันในผลิตภัณฑ์

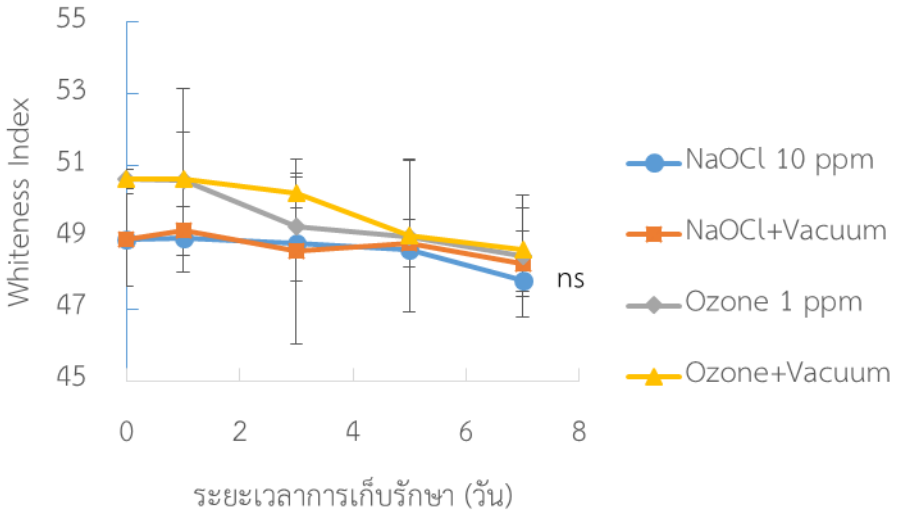
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของ TBARS ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ

การวัดค่าดัชนีความขาวซึ่งได้จากสูตรการคำนวณ พบว่าค่าดัชนีความขาวของปลานิลเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ 48.52 ตัวอย่างที่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์จะมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ในขณะตัวอย่างปลานิลที่ผ่านการแช่น้ำโอโซนมีการเปลี่ยนแปลงลดลงตลอดการเก็บรักษาแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างปลานิลที่ผ่านการแช่น้ำโอโซนยังคงมีค่าดัชนีความขาวสูงกว่าตัวอย่างที่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ตลอดการเก็บรักษา โดยที่ตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำโอโซนบรรจุในสภาวะสุญญากาศจะมีค่าดัชนีความขาวสูงที่สุดตลอดการเก็บรักษาแต่ไม่แตกต่างตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำโอโซนบรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติ (p<0.05) ดังแสดงในภาพที่ 4.12 ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าสภาวะในการบรรจุแบบสุญญากาศสามารถช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงสีของผลิตภัณฑ์ได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของค่าดัชนีสีขาวระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ

การเปลี่ยนแปลงของสีผิวและเนื้อปลาเป็นผลมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ทั้งแบบที่เกิดโดยเอนไซม์ (enzymatic oxidation) และแบบที่เกิดโดยไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง (nonenzymatic oxidation) พบว่า สีเหลือง ส้ม แดง หรือไม่มีสีของปลาและสัตว์น้ำ เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบคาร์โรทีนอยส์ (carotenoids) ซึ่งมีในผิวหนังและสีของปลาเนื้อขาว (white fish) ทำให้เปลี่ยนเป็นสีครีมหรือสีเทา เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นแบบที่เกิดโดยเอนไซม์ของรงควัตถุฮีม (heme pigment) ส่วนกล้ามเนื้อแดง (dark red muscle) จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และพบว่าเนื้อปลาสดจะใส แต่ปลาที่เน่าเสียแล้วเนื้อจะขุ่น บางครั้งการเกิดการเปลี่ยนสีของเนื้อปลา มีสาเหตุจากการเจริญของจุลินทรีย์ (Potter & Hotchkis, 1995)

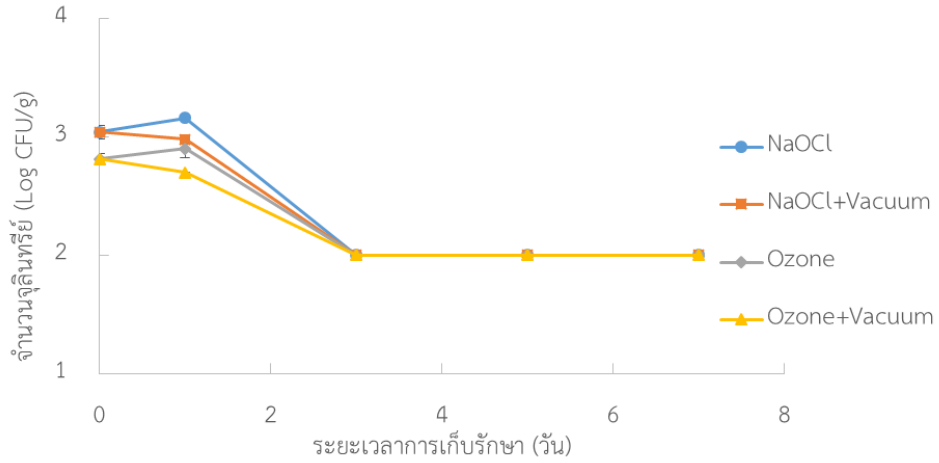
จากผลการทดลองพบว่า ปลานิลแล่ที่เก็บรักษาสภาวะสุญญากาศสามารถยืดอายุการเก็บได้ 1-2 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลแล่ที่เก็บรักษาสภาวะบรรยากาศปกติ ทั้งนี้เนื่องจากงานวิจัยนี้เลือกใช้ถุงพอลิเอไมด์หรือไนลอนสำหรับบรรจุปลานิลแล่ที่สภาวะต่างๆ ซึ่งมีคุณสมบัติเด่นคือ แข็งแรงเหนียว ต้านทานแรงดึง และแรงฉีกขาดได้ดี ทนต่อการกัดกร่อนและการเสียดสี ไม่เสียรูปทรงง่าย สามารถยืดหยุ่นได้ ซึ่งบรรจุภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของไนลอน ได้แก่ vacuum packing บรรจุภัณฑ์อาหารแช่แข็ง เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าใช้เป็นวัสดุสำหรับบรรจุภัณฑ์อาหาร ที่ต้องการความคงทน แข็งแรง แต่ป้องกันการซึมผ่านเข้าออกของก๊าซได้ปานกลาง (O_2 transmission rate = 58.90 cc/cm^2/day) เมื่อเปรียบเทียบกับเอทิลีนไวนิลแอลกอฮอล์ (O_2 transmission rate = 11.12 cc/cm^2/day) นอกจากนี้การป้องกันการซึมผ่านของก๊าซลดลงเมื่อความชื้นเพิ่มขึ้น (Moey & Mohd, 2011; อรสา อ่อนจันทร์, 2006) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้

แบคทีเรียที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย เช่น *Pseudomonas* spp. สามารถเจริญได้เมื่อระยะเวลาการเก็บปลานิลแล่นานขึ้น

สำหรับแบคทีเรียก่อโรคจำเป็นต้องตรวจจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ตลอดการศึกษาและเก็บรักษาปลานิลไม่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp. และ *V. cholerae* ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตรของปลานิล (2556) คือ ไม่พบในตัวอย่างปลานิล 25 กรัม สำหรับ *Salmonella* spp. และ *V. cholerae* และเนื่องจากสภาวะการเก็บไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* spp. และ *V. cholerae* ที่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 8-45 และ 10-44 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Kornacki, 2010; Farber, 1991) แต่สภาวะการเก็บในการทดลองนี้คือ 4 องศาเซลเซียส จึงเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้

เชื้อ *Stap. aureus* เป็นแบคทีเรียที่มักพบได้ตามผิวหนังของคน เจริญได้ดีในช่วง 7-48 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส มีโอกาสปนเปื้อนระหว่างการทดลองจึงต้องหาจำนวนเชื้อดังกล่าว ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษา ผลพบในตัวอย่างปลานิลเริ่มต้นมีปริมาณ *Stap. aureus* สูงถึง 3 $\log_{10}$ CFU/g ซึ่งเกินเกณฑ์มาตรฐานสินค้าเกษตรของปลานิล (2556) กำหนด คือ น้อยกว่า 2 $\log_{10}$ CFU/g แต่อย่างไรก็ตามเมื่อปลานิลผ่านการแช่ด้วยโอโซนจะมีเชื้อเกินเกณฑ์เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวน *Stap. aureus* ของตัวอย่างทุกตัวอย่างจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากวันที่ 1 ของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทุกตัวอย่างไม่แตกต่างกัน ($p<0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4.13 อาจเนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาของการทดลองเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Stap. aureus* การลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ระหว่างการทดลองและการใช้อุณหภูมิต่ำที่สามารถยับยั้งการเจริญได้จึงทำให้ *Stap. aureus* ไม่สามารถเจริญได้ดีระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Soccol, Oetterer, & Gallo (2005) ที่ศึกษาผลการบรรจุดัดแปลงบรรยากาศและสุญญากาศต่ออายุการเก็บรักษาของปลานิลแล่ และพบว่าการเก็บรักษาปลานิลในสภาวะบรรยากาศปกติ สภาวะสุญญากาศ และการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ ทำให้จำนวน *Stap. aureus* ของทุกตัวอย่างลดลง และรายงานว่าการเก็บรักษาในสภาวะดัดแปลงบรรยากาศและสุญญากาศช่วยยับยั้งการเจริญของ *Stap. aureus* ได้ตลอดการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

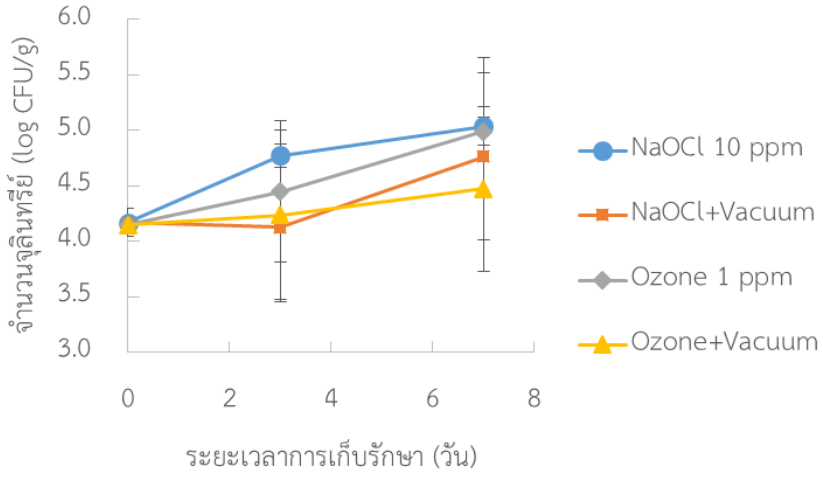


ภาพที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงของ *Staphylococcus aureus* ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ

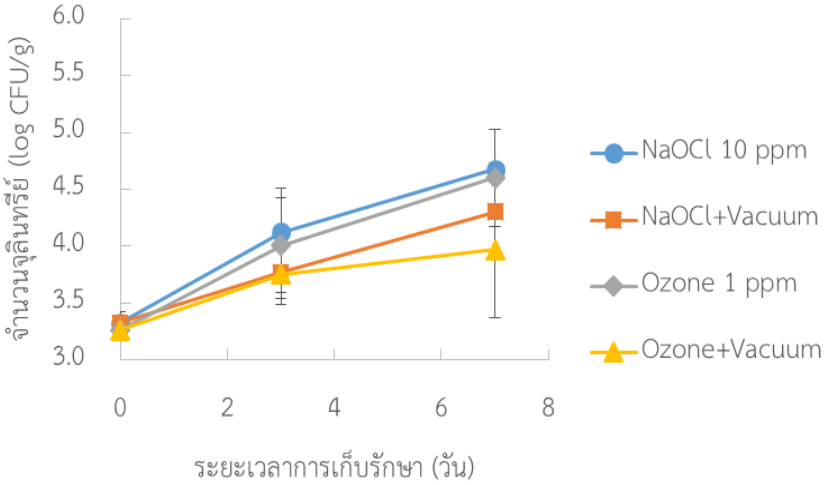
4.4 ผลของโอโซนต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่สร้างการปนเปื้อนในปลานิลแล่

จากผลการทดลองข้อ 4.3 แสดงให้เห็นว่าไม่พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคคือ *Salmonella* spp. และ *V. cholerae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศเจริญได้ดีกว่า ในการทดลองนี้จึงสร้างการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด โดยแช่ชิ้นปลานิลในน้ำโอโซนความเข้มข้น 1 ppm และบรรจุที่สภาวะบรรยากาศปกติและสุญญากาศ และใช้ชิ้นปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้ม 10 ppm บรรจุในสภาวะบรรยากาศปกติเป็นตัวอย่างควบคุม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพ 4.14 พบว่าโอโซนสามารถลดจำนวน *S.* Typhimurium และ *V. cholerae* ที่ปนเปื้อนชิ้นปลานิลแล่ได้จาก 4.41±0.1 เหลือ 4.15±0.05 $\log_{10}$ CFU/g (0.36 log reduction) และ 3.63±0.1 เหลือ 3.27±0.04 $\log_{10}$ CFU/g (0.26 log reduction) ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างที่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์เหลือ 4.17±0.1 $\log_{10}$ CFU/g (0.30 log reduction) และ 3.33±0.12 $\log_{10}$ CFU/g (0.24 log reduction) ตามลำดับ นอกจากนี้ตลอดการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด มีการเจริญค่อนข้างช้า และชิ้นปลานิลแล่ที่บรรจุสภาวะสุญญากาศมีจำนวนแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด น้อยกว่าในตัวอย่างที่บรรจุสภาวะปกติตลอดการเก็บรักษา โดยตัวอย่างที่แช่ด้วยน้ำโอโซนและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะการเก็บไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* spp. และ *V. cholerae* ซึ่งเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 8-45 และ10-44 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Kornacki , 2010; Farber , 1991) แต่สภาวะการเก็บในการทดลองนี้คือ 4±2 องศาเซลเซียส จึงเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ซึ่งการรายงานว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่ *Salmonella* spp.

เจริญได้คือ 6.2 องศาเซลเซียส (Olgunoğlu, 2012) การศึกษาของ Ingham et al. (1990) ระบุว่าอุณหภูมิที่ป้องกันการเจริญเติบโตของ *S.* Typhimurium ในเนื้อปู คืออุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส



ก.



ข.

ภาพที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงของ *Salmonella* Typhimurium (ก) และ *Vibrio cholerae* (ข) ระหว่างการเก็บรักษาของปลานิลแล่ที่แช่ด้วยโอโซน 1 ppm และโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm และบรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการใช้น้ำโอโซนสำหรับการลดการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคและเน่าเสียบางชนิดและการบรรจุในสภาวะสุญญากาศและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียสของชิ้นปลานิลแล่ พบว่าการแช่ปลานิลแล่ในน้ำโอโซนเป็นเวลา 1 นาที ที่ความเข้มข้นโอโซนที่ 1 ppm สามารถลดจำนวนเชื้อกลุ่ม lactic acid bacteria ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Stap. aureus*, total viable count และ *Pseudomonas* spp. และจากการสร้างการปนเปื้อนโอโซนสามารถลด *V. cholerae* และ *S.* Typhimurium ได้ 0.36 และ 0.26 log ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้น้ำโอโซนแช่ปลานิลแล่ส่งผลให้ ค่าดัชนีสีขาว (whiteness index) ค่าความแตกต่างสี (ΔE) ค่ากรดไทโอบาร์บิวทูริก (TBARS) และ % การสูญเสียน้ำหนัก (% weight loss) ของปลานิลแล่มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโอโซนเพิ่มขึ้น ปลานิลแล่ที่ผ่านการแช่ด้วยน้ำโอโซน 1 ppm และบรรจุสภาวะสุญญากาศสามารถเก็บรักษาอุณหภูมิ 4±2 องศาเซลเซียสได้ 7 วัน เมื่อเทียบกับปลานิลแล่แช่ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์เก็บได้ 4-5 วัน โดยใช้จุลินทรีย์เป็นเกณฑ์กำหนด นอกจากนี้โอโซนมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนแบคทีเรียโดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียในรูปสารแขวนลอยได้คือ 0.25 ppm ความเข้มข้นสูงสุดคือ 1.5 ppm สามารถลดแบคทีเรียได้มากกว่า 5 log CFU/g โดยพบว่าน้ำโอโซนสามารถทำลาย *Stap. aureus* (6 log reduction) ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *Lp. plantarum* (5.90) *S.* Typhimurium (5.56) UNK1 (5.54) *Pseudomonas* spp. (5.34) *V. cholerae* (5.25) และ *E. coli* (4.21)

จากผลงานวิจัยแสดงว่าโอโซนมีประโยชน์ในการปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของปลานิลทำให้มีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นลดลงและสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับฟอกสีขาวของเนื้อปลาได้ แต่อย่างไรก็ตามเพื่อเพิ่มประสิทธิของน้ำโอโซนควรศึกษาการใช้น้ำโอโซนที่อุณหภูมิต่ำ หรือใช้ในอาหารหรือตัวอย่างที่มีสภาวะเป็นกรด นอกจากนี้ควรศึกษาการใช้น้ำโอโซนร่วมกับการบรรจุแบบดัดแปลงบรรยากาศซึ่งนิยมใช้สำหรับบบรรจุผลิตภัณฑ์อาหารในปัจุบันเพื่อรักษาคุณภาพทางกายภาพเคมี และจุลินทรีย์ได้นานขึ้นระหว่างการเก็บรักษา

รายการอ้างอิง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รายการอ้างอิง

กนกอร อินทราพิเชฐ. (2538). การเปลี่ยนแปลงของวัสดุชีวภาพหลังการเก็บเกี่ยว. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี: สาขาเทคโนโลยีอาหาร.

กรมประมง. (2550). คู่มือประกอบการฝึกอบรม เทคนิคการปฏิบัติงานด้าน อนุกรมวิธานสัตว์น้ำ (Vol. 1). กรุงเทพ: กลุ่มงานวิจัยความหลากหลาย ทางชีวภาพสัตว์น้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

งามทิพย์ ภู่วโรดม. (2538). ก๊าซกับการบรรจุผลิตภัณฑ์อาหาร. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ลินคอร์นโปรโมชั่น.

จิราภา เสธจินตนิน. (2547). การปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ที่ตลาดกลางกุ้งจังหวัดสมุทรสาครโดยโอโซน. (ปริญญามหาบัณฑิต), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.

ณัฐพล ฟ้าภิญโญ. (2550). คุณภาพและการยืดอายุการเก็บรักษาปูนิ่ม (*Scylla serrata Forskal*) โดยใช้โอโซน กรดแอซีติก กรดแล็กติก กรดแอสคอร์บิก และการเก็บรักษาภายใต้สภาะปรับบรรยากาศ. (ปริญญาเอก), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ทิพรักษ์ วงษาดี, ณัฐนนท์ ตราชู และ, & ไมตรี สุทธจิตต์. (2551). ผลของน้ำโอโซนต่อการรอดชีวิตของ *Campylobacter jejuni*. วารสารวิจัย มข., 13(8), 919-929.

เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน. (2546). การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อ ปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

ละอองวรรณ ศรีจันทร์, ทิพย์ บุญล้ำ, & และ ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล. (2558). การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลานิลแล่ที่แช่ในสารละลายฟอสเฟตและเคลือบไคโตซานเก็บในสภาวะแช่เย็น. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร ฉบับพิเศษ, 55-64.

วรพรรณี เผ่าทองศุข. (2550). ผลของการใช้โอโซนร่วมกับความร้อนในการกำจัดเชื้อ *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในน้ำตาลสด น้ำลำไย และน้ำมะพร้าว. วารสาร มฉก.วิชาการ วิทยาศาสตร์สุขภาพ. ปีที่ 20, ฉบับที่ 39 (ก.ค.-ธ.ค. 2559), 119-131.

สิริพร สธนเสาวภาคย์. (2543). โอโซนกับความปลอดภัยในอาหาร. วารสารอาหาร, 79-86.

สืบเนื่อง ชัยชนะ. (2549). การลดการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. บนซากสุกรด้วยสารละลายโอโซนอิ่มตัว. (ปริญญามหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพมหานคร.

สุมาลี เหลืองสกุล. (2539). คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ชัยเจริญ.

สุรพล รักษ์ปทุม. (2543). โอโซนเพื่อชีวิตและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ภาพพิมพ์.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2550). แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสาวิทยาศาสตร์ มศว, ปี่ที่ 23(2), 145-160.

อัจฉรา แสนคม, น้ำทิพย์ ขันตยา, & วราภา มหากาญจนกุล. (2553). การประยุกต์ใช้สารฆ่าเชื้อกลุ่มออกซิไดส์ซิ่งเพื่อลดจุลินทรีย์ ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 (3-5 กุมภาพันธ์), 408-416.

อุดม เรืองนพคุณ. (2547). การเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพมหานคร: อักษรสยามการพิมพ์.

Al-Harbi, A. H., & Naim Uddin, M. (2004). Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus×Oreochromis aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture, 229*(1), 37-44.

Ashie, I. N., Smith, J. P., & Simpson, B. K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36*(1-2), 87-121.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2012). *Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International* Washington DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.

Bailey, J. S., Buhr, R. J., Cox, N. A., & Berrang, M. E. (1996). Effect of hatching cabinet sanitation treatments on *Salmonella* cross-contamination and hatchability of broiler eggs. *Poultry Science, 75*(2), 191-196.

Bancroft, K., Chrostowski, P., Wright, R. L., & Suffet, I. H. (1984). Ozonation and oxidation competition values: Relationship to disinfection and microorganisms regrowth. *Water Research, 18*(4), 473-478.

Barth M, M., Zhou, C. E. N., Mercier, J., & Payne Frederick, A. (1995). Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *International Journal of Food Science, 60*(6), 1286-1288.

Bosilevac, J. M., Shackelford, S. D., Brichta, D. M., & Koohmaraie, M. (2005). Efficacy of ozonated and electrolyzed oxidative waters to decontaminate hides of cattle before slaughter. *Journal of Food Protection, 68*(7), 1393-1398.

Budavari, S. (1996). *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck.

Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology, 52*, 302-310.

Cai, P., Harrison, M. A., Huang, Y.-W., & Silva, J. L. (1997). Toxin production by *Clostridium botulinum* Type E in packaged channel catfish. *Journal of Food Protection, 60*(11), 1358-1363.

Chawla, A., Bell, J. W., & Janes, M. E. (2007). Optimization of ozonated water treatment of wild-caught and mechanically peeled shrimp meat. *Journal of Aquatic Food Product Technology, 16*(2), 41-56.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Chen, H., Huang, S., Moody, M. W., & jiang, S. (1992). Bacteriocidal and mutagenic effects of ozone on shrimp (*Penaeus monodon*) meat. *International Journal of Food Science, 57*(4), 923-927.

Chen, H. H., Chiu, E. M., & Huang, J. R. (2006). Color and Gel‐forming properties of horse mackerel (*Trachurus japonicus*) as related to washing conditions. *International Journal of Food Science, 62*(5), 985-991.

Church, I.J., & Parsons, A.L. (1995). Modified atmosphere packaging technology: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 67*(2), 143-152.

CLSI. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow gerobically. *approved standard—seven edition, Clinical and Laboratory Standards Institute USA*.

Condie, L. W. (1986). Toxicological problems associated with chlorine dioxide. *Journal American Water Works Association, 78*(6), 73-78.

Conway, E. J., & Byrne, A. (1933). An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: The micro-determination of ammonia. *Biochemical Journal, 27*(2), 419-429.

Crowe, K. M., Skonberg, D., Bushway, A., & Baxter, S. (2012). Application of ozone sprays as a strategy to improve the microbial safety and quality of salmon fillets. *Food Control, 25*(2), 464-468.

Dalgaard, P., Gram, L., & Huss, H. H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology, 19*(4), 283-294.

de Mendonça, S. A. M., & Gonçalves, A. A. (2017). Effect of aqueous ozone on microbial and physicochemical quality of Nile tilapia processing. *Journal of Food Processing and Preservation, 41*(6), e13298.

Debevere, J., & Boskou, G. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on the TVB/TMA-producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology, 31*(1), 221-229.

Dondo A., Nachtman C., Doglione L., Rosso A., & Genetti A. (1992). Foods: their preservation by combined use of refrigeration and ozone. Ing. Aliment. Conserve Anim., *8*:16-25.

Enfors, S. O., & Molin, G. (1980). Effect of high concentrations of carbon dioxide on growth rate of *Pseudomonas fragi*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus cremoris*. *Journal of Applied Microbiology, 48*(3), 409-416.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Eriksson, M. (2005). *Ozone chemistry in aqueous solution –Ozone decomposition and stabilization.* (Licentiate Thesis), , Royal Institute of Technology Stockholm, Sweden.

Fabrizio, K. A., Sharma, R. R., Demirci, A., & Cutter, C. N. (2002). Comparison of electrolyzed oxidizing water with various antimicrobial interventions to reduce *Salmonella* species on poultry. *Poultry Science, 81*(10), 1598-1605.

Farber, J. M. (1991). Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology - A review. *Journal of Food Protection, 54*(1), 58-70.

Foegending, P. M. (1985). Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populatin and the importance of the spore coat to resistance. *International Journal of Food Microbiology, 2*, 123-134.

Fraser, O. P., & Sumar, S. (1998). Compositon changes and spoilage fish (part II) microbiological induced deterioration. *International Journal of Food Sciences and Nutrition, 6*(3), 325-329.

Graham, D. M. (1997). Use of ozone for food processing. *Food Technology, 51*(6), 72-75.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology, 33*(1), 121-137.

Gray, R.J.H., Hoover, D.G., & Mur, A.M. (1983). Attenuation of microbial growth on modified atmosphere-packaged fish. *Journal of Food Protection*. *46*(9), 600-613.

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Food). (1986). Microorganisms in Food. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, Vol. 2, 2nd ed. University of Toronto Press, Toronto, 181-196.

Indun, D. (2005). Study of the efficacy of peroxyacetic acid, chlorine dioxide and ozone for inactivating *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia col*i on Black Tiger Shrimp. *M.S. Thesis, Kasetsart University.*

Ingham, S. C., Escude, J. M., & McCown, P. (1990). Comparative growth rates of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas frugi* on cooked chicken loaf stored under air and two modified atmospheres. *Journal of food protection, 53*, 289-291.

ISO 7393-3:1990. (1990). Water quality - Determination of free chlorine and total chlorine -- Part 3: Iodometric titration method for the determination of total chlorine. 2. Retrieved from https://www.iso.org/standard/14108.html [18 April 2017]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Jayasingh P., & Cornforth D.P. (2003). Comparison of antioxidant effects of milk mineral, butylated hydroxytoluene and sodium tripolyphosphate in raw and cooked ground pork. *International Journal of Meat Science, 66*, 83-89.

Ježek F, Buchtová H. (2014). The effect of vacuum packaging on physicochemical changes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during cold storage. ACTA VET. BRNO, 83: S51–S58

Jiang, S. T., Ho, M. L., Jiang, S. H., Lo, L., & Chen, H. C. (2006). Color and quality of mackerel surimi as affected by alkaline washing and ozonation. *International Journal of Food Science, 63*(4), 652-655.

Kaess, G., & Weidemann J, F. (1973). Effects of ultraviolet irradiation on the growth of micro-organisms on chilled beef slices. *International Journal of Food Science & Technology, 8*(1), 59-69.

Khadre, M. A., Yousef, A. E., & Kim, J. G. (2006). Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. *International Journal of Food Science, 66*(9), 1242-1252.

Khalafalla, F. A., Ali, F. H. M., & Hassan, A.-R. H. A. (2015). Quality improvement and shelf-life extension of refrigerated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets using natural herbs. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 4*(1), 33-40.

Kim, J. G., Yousef, A. E., & Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *Journal of Food Protection , 62*(9), 1071-1087.

Kim, J. G & A.E. Yousef. (2000) Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *International Journal of Food Science*, 65(3): 521-528.

King A, D., & Nagel Charles, W. (1967). Growth inhibition of a *Pseudomonas* by carbon dioxide. *International Journal of Food Science, 32*(5), 575-579.

Kornacki, J. L. (2010). Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment. Retrieved from http://www.bookmetrix.com/help [29 May 2018]

Labbe, R. G., Kinsley, M., & Wu, J. (2001). Limitations in the use of ozone to disinfect maple sap. *Journal of Food Protection, 64*(1), 104-107.

Lanier, T.C. 1992. Measurement of surimi composition and functional properties, pp. 123-163. In T.C. Lanier and C.M. Lee, eds. Surimi Technology. Marcel DekkerInc, New York.

CHULALONGKORN UNIVERSITY

Longree, K., & Armbruster, G. (1996). *Quality Food Sanitation. 5th Ed. New York*: John Wiley & Son.

Manousaridis, G., Nerantzaki, A., Paleologos, E. K., Tsiotsias, A., Savvaidis, I. N., & Kontominas, M. G. (2005). Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *International Journal of Food Microbiology, 22*(1), 1-9.

Masten, S. J. and Davis S. H. R. (1994). The use of ozonation to degrade organic contaminants in waste waters. *Journal of Environmental Science & Technology*, 28, 181-185

Masniyom, P., Benjama, O., & Maneesri, J. (2013). Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on quality changes of refrigerated tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *International Food Research Journal, 20*(3), 1401-1408.

Mazorra-Manzano, M. A., Pacheco-Aguilar, R., Díaz-Rojas, E. I., & Lugo-Sánchez, M. E. (2006). Postmortem changes in black skipjack muscle during storage in ice. *International Journal of Food Science, 65*(5), 774-779.

Mitntdevices, (2012). How ozone works. Retrieved from http://www.mintdevices.com.au/ozone-information [28 April 2018]

Moey, S., & Mohd, T.S. (2011). Effect of different packaging materials on the shelf life of modified atmosphere packaged red tilapia (*Oreochromis mossambica*) fillets. *International Food Research Journal, 18*(3), 1091-1095.

Molin, G., Stenstrom, I. M., & Ternstrom, A. (1983). The microbial flora of herring fillets after storage in carbon dioxide, nitrogen or air at 2 degrees C. *Journal of Applied Microbiology, 55*(1), 49-56.

Moore, G., Griffith, C., & Peters, A. (2000). Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal disinfectant. *Journal food protection, 63*(8), 1100-1106.

Mudd, J. B., Leavith, L., Ongun, A., & McManus, T. T. (1989). Reaction of ozone with amino acid and protien. *Atomic Simulation Environment, 23*, 669-674

Mungai, D., Mwatha, W., & Okemo, P. (2002). *Salmonella* and *Vibrio cholerae* in Nile perch (*Latesniloticus*) processing establishments in Kenya. *Journal of Tropical Microbiology and Biotechnology, 1*, 79-88.

Olgunoğlu, İ. A. (2012). *Salmonella in Fish and Fishery Products*. InTech: Mahmoud BSM.

Ozone Solutions, Inc. 2004a. Ozone Odor Control. Retrieved from [29 May 2018] http://www.ozoneaplication.com/info/ozone_control.htm

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Ozone Solutions, Inc. 2004b. Ozone and Food Processing. Retrieved from http://www.ozoneapplications.com/food_processing/food_processing.htm [29 May 2018]

Ozone Solutions, Inc. 2004c. Effect of Ozone on Bacteria. Retrieved from http://www.ozoneapplications.com/info/bacteria_destruction.htm [29 May 2018]

Parry, R. T. (1993). *Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods*: Glasgow: Blackie.

PÉRez-Villarreal, B., & Pozo, R. (1990). Chemical composition and ice spoilage of albacore (*Thunnus alalunga*). *International Journal of Food Science, 55*(3), 678-682.

Piumsombun, S., & Dey, M. M. (2003). *Analysis of Demand for Fish Consumed at Home in Thailand*.

Pohlman, F. W., Stivarius, M. R., McElyea, K. S., Johnson, Z. B., & Johnson, M. G. (2002). The effects of ozone, chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride and trisodium phosphate as multiple antimicrobial interventions on microbiological, instrumental color, and sensory color and odor characteristics of ground beef. *International Journal of Meat Science, 61*(3), 307-313.

Potter, N. N., & Hotchkis, J. H. (1995). *Food Science*. New York: Chapman & Hall.

Ray, B. (1996). *Fundamental Food Microbiology*. New York: CRC Press.

Regenstein, M. J. (1991). *Introduction to Fish Technology*. New York: Published by Van Nostrand Reinhold.

Restaino, L., Frampton, E. W., Hemphill, J. B., & Palnikar, P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology, 61*(9), 3471-3475.

Richter, E. R., & Banwart, G. J. (1983). Microbiological and sensory evaluation of fresh fish packaged in carbon dioxide for retail outlets in the midwest. *Journal of Food Protection, 46*(3), 245-247.

Rodgers, S., Peiris, P., & Casadei, G. (2003). Inhibition of nonproteolytic *Clostridium botulinum* with lactic acid bacteria and their bacteriocins at refrigeration temperatures. *Journal of Food Protection, 66*(4), 674-678.

Ruiter, A. (1995). *Fish and fishery products: composition, nutritive properties and stability*. Wallingford: CAB international.

Scott, D. B. M., & Lesher, E. C. (1963). Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology, 85*(3), 567-576.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Sharma, R. R., Demirci, A., Beuchat, L. R., & Fett, W. F. (2002). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on inoculated alfalfa seeds with ozonated water and heat treatment. *Journal of Food Protection, 65*(3), 447-451.

Sikorski, Z. E., Kołakowska, A., & Pan, B. S. (1990). The nutritive composition of the major groups of marine food organisms (pp. 29-54). Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.

Sleat, R., & Robinson, J. P. (1984). A Review The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic compounds. *Journal of Applied Microbiology, 57*(2), 381-394.

Soccol, M. C. H., Oetterer, M., & Gallo, C. R. (2005). Effects of modified atmosphere and vacuum on the shelf life of tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *Brazilian Journal of Food Technology, 8*(1), 7-15.

Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., Poonkhum, R., & Srisukonth, C. (2002). Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology, 48*(4), 193-199.

Thung, T. Y., Mahyudin, N. A., Basri, D. F., Wan Mohamed Radzi, C. W., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., & Radu, S. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in raw chicken meat at retail markets in Malaysia. *Poultry Science, 95*(8), 1888-1893.

Ward, D.R., & Baj, N.J. (1988). Factors affecting microbiological quality of seafood. *Food Technology, 3*, 85-89.

Xu, L. (1999). Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technology, 53*(10), 58-63.

Yuk, H.-G., Yoo, M.-Y., Yoon, J.-W., Marshall, D. L., & Oh, D.-H. (2007). Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* on Enoki mushroom. *Food Control, 18*(5), 548-553.

Zhao, Y., Yang, X., Li, L., Hao, S., Wei, Y., Cen, J., & Lin, H. (2016). Chemical, microbiological, color and textural changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets sterilized by ozonated water pretreatment during frozen storage. *Journal of Food Processing and Preservation, 41*(1), e12746. doi:10.1111/jfpp.12746

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
คุณภาพทางด้านกายภาพเคมี

ก.1 Thiobarbituric acid (TBA) ใช้วิธีของ Buege and Aust (1978)

1. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 0.5 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย TBA ลงไป 5 มล. (ประกอบด้วย TBA 0.375 กรัม Trichloroacetic acid (TCA) 15 กรัมและกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.875 มล.ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.) เขย่าให้เข้ากันดี
3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จะเกิดสีชมพูหรือชมพูอมส้มขึ้นและมีความขุ่นวางไว้ให้เย็น
4. เทเฉพาะส่วนใสไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 3600 รอบ/นาที นาน 10นาที
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร
6. หาปริมาณ TBA โดยการคำนวณ $7.8 \times OD_{532}$ แสดงผลค่า TBARS ในรูปของมาโลอัลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง

ก.2 TVB-N ใช้วิธีของ Conway & Byrne (1936)

1. ชั่งเนื้อปลาที่บดละเอียดมา 3 กรัม เติมสารละลาย TCA ความเข้มข้นร้อยละ 4 ลงไป 7 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
2. กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มล.
3. ทาวาสลีนที่ขอบฝาจานคอนเวย์
4. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มล. ลงในวงชั้นนอกของจาน
5. ปิเปต Inner ring solution 1 มล. ลงในวงชั้นในของจาน
6. ปิเปตสารละลายอิ่มตัว K_2CO_3 1 มล.ลงไปผสมกับตัวอย่าง (ระวังอย่าให้สารวงในและวงนอกผสมกัน) ปิดฝาจาน
7. นำจานไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง
8. นำไปไตเตรทกับ 0.02 HCl ไตเตรทจนสีเขียวเปลี่ยนเป็นสีชมพู

9. ทำ Blank โดยใช้ TCA ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 1 มล. แทนตัวอย่างปลานิล
10. คำนวณค่า TVB-N โดยใช้สูตร TVB-N (mg/100g) = $\frac{(N)(14)(A-B)(V)(100)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$

N คือ Normality ของ HCl

A คือ ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

B คือ ปริมาตรของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรต Blank

V คือ ปริมาตรรวมของตัวอย่างและสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกที่ใช้

ก.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ใช้วิธีของ Lanier (1992)

ปั่นตัวอย่างเนื้อปลาให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer โดยชั่งเนื้อปลา 10 กรัมปั่นผสมกับน้ำกลั่น (deionized water) 90 มิลลิลิตร นำ ตัวอย่างที่ได้วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วย pH meter โดยทำการ calibrate เครื่องมือก่อนใช้ทุกวัน

ก.4 การวัดสี ใช้วิธีของ Zhao et al. (2017)

ปั่นตัวอย่างเนื้อปลาให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย homogenizer นำไปวัดสีในระบบ CIE (L* a* b*) ด้วยเครื่อง จากค่า L* a* b* นำไปคำนวณ (Lanier, 1992) หาค่าความขาว (Whiteness) ได้จากสูตร

$$\text{Whiteness} = 100-[(100-L^*)^2 + a^{*2}+ b^{*2}]^{1/2}$$

$$\Delta E^* = [(L_1^*-L_2^*)^2 + (a_1^*-a_2^*)^2 + (b_1^*-b_2^*)^2]^{1/2}$$

โดยกำหนดให้ subscript 1 คือ ค่าสีที่วัดเริ่มต้นในแต่ละตัวอย่าง

subscript 2 คือ ค่าสีที่วัดได้ในแต่ละครั้ง

ก.5 % การสูญเสียน้ำหนัก ใช้วิธีของ เนตรนริทนร์ ขุนสูงเนิน (2546)

สำหรับการติดตามการสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างเนื้อปลาทำได้โดย เปรียบเทียบน้ำหนักของเนื้อปลาก่อนและหลังจากการแช่น้ำโอโซน และคำนวณออกมาเป็น % การสูญเสียน้ำหนัก (weight loss)

% weight loss (%) =

$$\frac{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)} - \text{น้ำหนักของตัวอย่างหลังจากที่เก็บรักษา (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

ภาคผนวก ข
คุณภาพด้านจุลินทรีย์

ข.1 การเตรียมตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก BAM, 2001)

ชั่งตัวอย่างเนื้อปลานิลแล่ 25 กรัม ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ ทำการเจือจางโดยปั่นผสมกับ Butterfield's Phosphate Buffered Dilution Water 225 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher) เป็นเวลา 2 นาทีจะได้ตัวอย่างที่ความเจือจางที่ 10^{-1} ทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) ตามความเหมาะสม เลือกความเจือจางระดับที่เหมาะสม 3 ระดับ

ข.2 การตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด Total viable count (ดัดแปลงจาก BAM, 2001)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวละลายแล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (pour-plate) ประมาณ 15 มิลลิลิตร ที่มีตัวอย่างที่เจือจางแต่ละรดับ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชม. ตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยเลือกนับเฉพาะจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี รายงานผลเป็น CFU/g

ข.3 การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. (ดัดแปลงจาก Thung et al., 2016) ด้วยวิธี Most Probable Method (MPN) ชนิด 3 หลอด (3-tubes series MPN)

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร จากระดับการเจือจาง 10^{-1} ใส่ใน 10 มิลลิลิตร Rappaport Vassiliadis broth จำนวน 3 หลอด และการเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ทำเช่นเดียวกัน นำไปบ่มที่ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชม.สังเกตการเจริญเติบโต จากจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก (ขุ่น) ในแต่ละการเจือจาง และการยืนยันแซล โมเนลลาโดย streak plate ลงบนอาหาร XLD agar นำไปบ่มที่ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชม.สังเกตการเจริญเติบโต และนำไปหา MPN index จากตาราง MPN จะได้ค่า ความเข้มข้นแซลโมเนลลา (concentration of *Salmonella* spp.) รายงานผลเป็น MPN/g

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ข.4 การตรวจวิเคราะห์ Lactic acid bacteria (ดัดแปลงจาก ISO 15214:1998)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS Agar ที่เติม 0.5% calcium carbonate โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวละลายแล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (pour-plate) ประมาณ 15 มิลลิลิตร ที่มีตัวอย่างที่เจือจางแต่ละรดับ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากนั้นนำไปบ่มที่ 37±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชม. ภายใต้โถบ่มสุญญากาศ (anaerobic jar) ตรวจนับโคโลนีที่สร้างวงใส โดยเลือกนับเฉพาะจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี รายงานผลเป็น CFU/g

ข.5 การตรวจวิเคราะห์ *Pseudomonas* spp. (ดัดแปลงจาก Khalafalla et al., 2015)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Glutamate starch phenol red agar medium (GSP, Merck Millipore, USA) ที่เติม 100,000 IU sodium penicillin กรัม/ลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวละลายแล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนแข็ง จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มล. ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเกลี่ยให้แห้ง (spread plate) บ่มที่ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้น *Pseudomonas* spp. ลักษณะโคโลนีจะเป็นสีชมพู โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี รายงานผลเป็น CFU/g

ข.6 การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus* (ดัดแปลงจาก BAM, 2001)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker agar ที่เติม Egg Yolk Tellurite ต่อระดับความเจืองจางโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวละลายแล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนแข็ง ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มล.ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเกลี่ยให้แห้ง (spread plate) นำไปบ่มที่ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้นที่มีลักษณะ กลม นูน สีเทาถึงสีดำ ขนาด 2-3 มม. มีโซนขุ่นและใสรอบโคโลนี โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 20 – 200 โคโลนี รายงานผลเป็น CFU/g

ข.7 การตรวจวิเคราะห์ *Vibrio cholerae* (ดัดแปลงจาก BAM, 2004)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar ต่อระดับความเจืองจางโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวละลายแล้วนำไปผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนแข็ง ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 0.1 มล.ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเกลี่ยให้แห้ง (spread plate) นำไปบ่มที่ 37±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้นที่มีลักษณะแบนเรียบ ขนาดใหญ่ สีเหลืองส้ม โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนี อยู่ ในช่วง 25 – 250 โคโลนี รายงานผลเป็น CFU/g

ภาคผนวก ค

ภาพประกอบชิ้นส่วนปลานิลสำหรับวิเคราะห์คุณภาพ

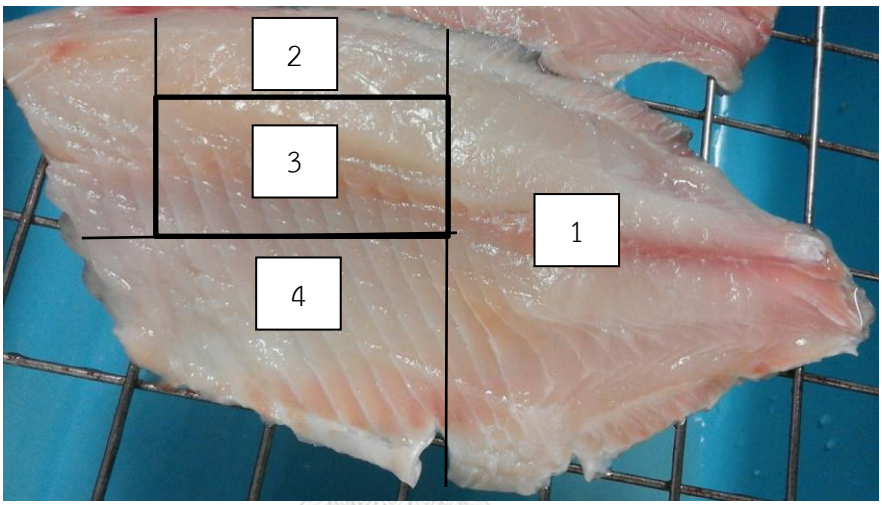
การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ และกายภาพเคมี ใช้ชิ้นส่วนต่าง ๆ ของปลานิล ดังแสดงในภาพ ค.1 โดยมีรายละเอียดดังนี้

ส่วนที่ 1 ใช้สำหรับวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลินทรีย์

ส่วนที่ 2 ใช้สำหรับวิเคราะห์ค่า pH

ส่วนที่ 3 ใช้สำหรับวิเคราะห์ค่าสี

ส่วนที่ 4 ใช้สำหรับวิเคราะห์ค่า TBARS และ TVB-N



ภาพผนวกที่ ค.1 ชิ้นส่วนปลานิลสำหรับวิเคราะห์คุณภาพจุลินทรีย์ และกายภาพเคมี (ดัดแปลงจาก: Zhao et al. 2017)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ง
วิธีวัดความเข้มข้นโอโซนและโซเดียมไฮโปคลอไรท์

ง.1 วิธีวัดความเข้มข้นน้ำโอโซน (HANNA HI-38054)

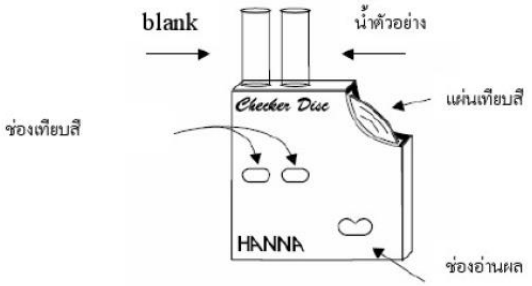
ประกอบด้วย

1. ชุดจานเทียบสี	จำนวน 1 ชุด
2. ผงทดสอบ HI93711-0	จำนวน 100 ซอง
3. น้ำ DI (Deionized water)	1 ขวด
4. หลอดแก้วสำหรับวัดพร้อมฝา	2 หลอด
5. ปิเปตพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร	1 อัน

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. ใช้ปิเปตพลาสติกดูดตัวอย่าง 5 มล. เติมลงในหลอดแก้วทั้ง 2 หลอด เติมให้ถึงขีดข้างกระบอก

2. นำหลอดดังกล่าว 1 หลอดใส่ในช่องด้านซ้ายสุดสำหรับเป็น blank ดังรูป

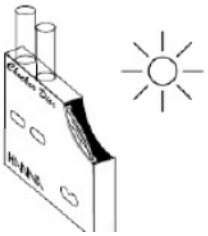


3. เติมน้ำ DI ขนาด 10 มล. ลงในหลอดแก้วอีกหลอดหนึ่ง (น้ำตัวอย่าง) ปิดฝาและเขย่าให้เข้ากัน

4. จากนั้นเปิดฝา และใส่สาร HI93711-0 จำนวน 1 ซอง ปิดฝาและเขย่าให้เข้ากัน รอประมาณ 2 นาที

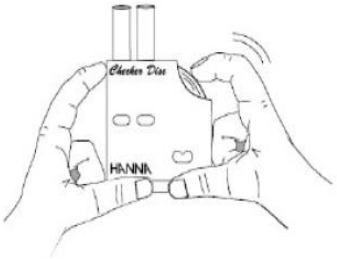
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. นำหลอดแก้ว (น้ำตัวอย่าง) ใส่ลงช่องขวา แล้วนำชุดจานหันเข้าหาแสงโดยให้ระยะห่างจากสายตาประมาณ 30-40 ซม



.

6. หมุนจานเทียบสีจนกระทั่งสีทั้ง 2 ช่องกัน และอ่านค่าที่ช่องด้านล่างในหน่วย mg/l หรือ ppm



ภาพผนวกที่ ง.2 ชุดทดสอบความเข้มข้นโอโซน ozone Test Kit HANNA HI-38054, Hanna Instruments SRL Com, Salaj

ภาพผนวกที่ ง.1 เครื่องผลิตน้ำโอโซน ozone generator, Biowellozone Model: CDU, Potts Point NSW, Australia

ง.2 วิธีหาปริมาณคลอรีนอิสระ ตามวิธี ISO 7393-3 (1995)

วิธีเตรียมสาร Phosphate buffer solution

ชั่ง Na_2HPO_4 24 g KH_2PO_4 46 g และ EDTA 800 mg นำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 mL เก็บในขวดสีชา

วิธีเตรียมสาร N, N-Diethy-p-phenylenediamine (DPD) indicator solution

ชั่ง 1.1 g anhydrous DPD sulfate, 8 mL (1 mL น้ำกลั่น + 3 mL H_2SO_4) และ EDTA 200 mg ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 mL เก็บในขวดสีชา

วิธีเตรียมสาร Ferrous ammonium sulfate (FAS) titrant

ชั่ง 1.106 g $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2{\cdot}6H2O$ และ 1 mL (1 mL น้ำกลั่น + 3 mL H_2SO_4) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1000 mL เก็บในขวดสีชา

วิธีวิเคราะห์

นำน้ำตัวอย่าง 50 mL ใส่ในขวดรูปชมพู่ 250 mL ใส่ Phosphate buffer solution 2.5 mL และใส่ indicator solution 2.5 mL ผสมให้เข้ากัน นำไปไตเตรทด้วย Ferrous ammonium sulfate จนสีชมพูเปลี่ยนเป็นไม่มีสี จะได้ค่าปริมาณคลอรีนอิสระในหน่วย ppm

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ จ.1 *จำนวนแบคทีเรียที่เหลือ log_{10} CFU/ml หลังจากสัมผัสกับน้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที*

ชนิดแบคทีเรีย	ปริมาณแบคทีเรียที่เหลือ log_{10} CFU/ml					
	0 ppm	0.25 ppm	0.5 ppm	0.75 ppm	1 ppm	1.5 ppm
UNK1	9.18±0.10	7.79±0.06	5.92±0.05	5.55±0.13	4.92±0.07	3.53±0.06
S. Typhimurium	9.22±0.09	7.92±0.09	5.65±0.12	4.79±0.08	4.45±0.05	3.86±0.09
Stap. aureus	9.00±0.04	6.34±0.24	4.85±0.09	3.84±0.09	≤3.00±0.00	≤3.00±0.00
E. coli	9.08±0.08	7.97±0.06	7.79±0.05	7.29±0.10	6.15±0.15	4.87±0.09
V. cholerae	9.29±0.11	7.79±0.06	5.92±0.05	5.55±0.13	4.92±0.07	3.53±0.06
Pseudomonas spp.	8.96±0.03	7.83±0.02	6.84±0.06	5.87±0.03	4.82±0.14	3.62±0.08
Lb. plantarum	8.94±0.04	6.44±0.46	5.04±0.12	4.34±0.19	3.51±0.14	3.04±0.07

ค่าเฉลี่ย ± SD ของการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ จ.2 *จำนวนแบคทีเรียของปลานิลที่เหลือ log_{10} CFU/ml หลังจากแช่น้ำโอโซนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 1 นาที*

ความเข้มข้นโอโซน (ppm)	Total viable count	*Pseudomonas* spp.	Lactic acid bacteria	*Stap. aureus*
0	4.61±0.07	3.89±0.05	3.63±0.13	3.75±0.03
0.5	4.34±0.04	3.74±0.07	3.38±0.08	3.46±0.05
0.75	4.30±0.06	3.64±0.02	3.28±0.08	3.36±0.02
1	4.21±0.08	3.61±0.02	3.16±0.02	3.29±0.04
1.5	4.17±0.08	3.57±0.08	3.11±0.02	3.25±0.08

ค่าเฉลี่ย ± SD ของการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ จ.3 จำนวนแบคทีเรียของปลานิลที่เหลือ log_{10} CFU/ml หลังจากแช่โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 10 ppm เป็นเวลา 30 นาที

ความเข้มข้น (ppm)	Total viable count	*Pseudomonas* spp.	Lactic acid bacteria	*Stap. aureus*
0	4.62±0.09	3.89±0.03	3.76±0.10	3.75±0.14
10	4.35±0.08	3.79±0.02	3.57±0.09	3.46±0.10

ค่าเฉลี่ย ± SD ของการทดลอง 3 ซ้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอาทิตยา ทิพย์มณี เกิดวันที่ 17 พฤษภาคม พ.ศ. 2535 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2557

ผู้เขียนได้นำเสนอผลงานวิจัยด้วยโปสเตอร์ในหัวข้อ Influence of ozonated water on microbial and physiochemical quality of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) fillets ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ International Conference of Agriculture and Natural Resources (ANRES 2018) สถานที่: Hotel Windsor Suites & Convention Bangkok Thailand ในวันที่ 26 – 28 เมษายน 2561

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University