ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46982

OPTIMIZATION OF LIQUID ENRICHMENT TO ENHANCE BATCH GROWTH KINETICS OF *LISTERIA* SPP.

MISS SIRIPAILIN KOSONPISIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING (FOOD ENGINEERING)
FACULTY OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
2010

b00246650

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46982

OPTIMIZATION OF LIQUID ENRICHMENT TO ENHANCE BATCH GROWTH KINETICS OF *LISTERIA* SPP.

MISS SIRIPAILIN KOSONPISIT

A SPECAL RESEARCH PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF ENGINEERING (FOOD ENGINEERING)
FACULTY OF ENGINEERING
KING MONGKUT'S UNIVERSITY OF TECHNOLOGY THONBURI
2010

Optimization of Liquid Enrichment to Enhance Batch Growth Kinetics of *Listeria* spp.

Miss Siripailin Kosonpisit B.Eng. (Food Engineering)

A Special Research Project Submitted in Partial Fulfillment
of the Requirements for
the Degree of Master of Engineering (Food Engineering)
Faculty of Engineering
King Mongkut's University of Technology Thonburi
2010

Special Research Project Committee

.....	Chairman of Special Research
(Assoc. Prof. Suwit Siriwattanayotin)	project Committee
.....	Member and Special
(Asst. Prof. Aluck Thipayarat, Ph.D.)	Research Project Advisor
.....	Member
(Assoc. Prof. Punchira Vongsawasdi, Ph.D.)	

Copyright reserved

Special Research Project Title	Optimization of Liquid Enrichment to Enhance Batch Growth Kinetics of *Listeria* spp.
Special Research Project Credits	6
Candidate	Miss Siripailin Kosonpisit
Special Research Project Advisor	Asst. Prof. Dr. Aluck Thipayarat
Program	Master of Engineering
Field of study	Food Engineering
Department	Food Engineering
Faculty	Engineering
B. E.	2553

E46982

Abstract

Listeria spp. growth in liquid enrichment was scrutinized comprehensively to formulate fundamental knowledge to enhance *Listeria* spp. detection protocol. *Listeria* spp. was grown on five different common growth substrates (i.e., LB, BPW, NB, BLEB, and TSB). Sigmodial-type mathematical model was applied to capture the growth characteristics during batch cultivation and to extract key kinetic parameters (i.e., maximum specific growth rate and inflection time) for medium optimization purpose. The logistic model showed good fit and was able to represent batch growth profile of *L. ivanovii* well. The estimated kinetic parameters were used to compare the growth of *L. ivanovii* on different types of nitrogen and carbon sources. The most suitable generic medium for *L. ivanovii* growth was LB and substitution of nitrogen and carbon compositions in the LB by other commercially-available alternatives did not alter the growth attribute of *L. ivanovii*. In addition, the use of LB as a pre-enrichment medium had proven to be very effective in increasing the probability of detecting vulnerable *L. ivanovii* by effectively multiplying to a very high cell density. The detection of *L. ivanovii* at concentrations of less than 10^7 CFU/mL using the USDA FSIS protocol (applying UVM and FB as primary and secondary enrichments) likely returned false negative results. Examination of the selectivity of primary and secondary media to isolate *L ivanovii* and *L. innocua* from *Salmonella* spp. and *E.coli* was investigated. All media were competent to select *Listeria* spp. from other microorganisms; however, different media had different degrees of screening efficiency. Palcam was shown to be

E46982

the most effective in isolating *E.coli* and *Salmonella* spp. from *Listeria* spp. The research thus proposes including a pre-enrichment step prior to primary enrichment to elevate the likelihood of *Listeria* spp. detection and to minimize false negativity in subsequent detection.

Keywords: Growth Kinetics/ *Listeria* spp. / Maximum Specific Growth Rate/ Non Selective Enrichment Broth/ Selective Enrichment Broth

หัวข้อโครงการศึกษาวิจัยพิเศษ	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งจลนพลศาสตร์การเจริญเติบโตแบบกะในอาหารเหลวของเชื้อลิสทีเรีย
หน่วยกิต	6
ผู้เขียน	นางสาวศิริไพลิน โกศลพิศิษฐ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร.อาลักษณ์ ทิพยรัตน์
หลักสูตร	วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมอาหาร
ภาควิชา	วิศวกรรมอาหาร
คณะ	วิศวกรรมศาสตร์
พ.ศ.	2553

E46982

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อลิสทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเสริมคุณค่า เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างความรู้พื้นฐานในการปรับปรุงวิธีการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย ทั้งนี้ทำการเลี้ยงเชื้อลิสทีเรียในสารตั้งต้นทั่วไปที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ แอลบี บีพีดับเบิลยู เอ็นบี บีแอลอีบี และ ทีเอสบี และประยุกต์ใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เพื่อเก็บข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโตระหว่างการเลี้ยงเชื้อแบบกะ และคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญ ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) และระยะเวลาที่อัตราการเจริญเติบโตสูงสุด (t_0) เพื่อเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุด จากผลการวิเคราะห์พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ชนิดลอจิสติกสามารถแสดงลักษณะการเจริญเติบโตแบบกะของเชื้อลิสทีเรีย อิวาโนวิ ได้เป็นอย่างดี จากนั้นจึงนำค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่คำนวณได้มาใช้ในการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของลิสทีเรีย อิวาโนวิ ในแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนต่างชนิดกัน พบว่าอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของ เชื้อลิสทีเรีย อิวาโนวิ มากที่สุดคือแอลบี และการแทนที่องค์ประกอบไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแอลบีด้วยแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนทางการค้าชนิดอื่นไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อลิสทีเรีย อิวาโนวิ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแอลบีเป็นอาหารเสริมคุณค่าเบื้องต้นช่วยเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อลิสทีเรีย อิวาโนวิ ที่อ่อนแอ โดยการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีประสิทธิผลจนความหนาแน่นของเซลล์มีค่าสูงมาก ในการตรวจหาเชื้อลิสทีเรีย อิวาโนวิ ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10^7 ซีเอฟยู/มิลลิลิตร โดยใช้วิธีมาตรฐานของ USDA FSIS (ประยุกต์ใช้ยูวีเอ็มเป็นอาหารเสริมคุณค่าขั้นที่ 1 และเอฟบีเป็นอาหารเสริมคุณค่าขั้นที่ 2) พบว่าผลการทดลองผิดพลาดอันเกิดจากการไม่ปฏิเสธสิ่งที่เป็นเท็จ และจากการทดสอบความสามารถในการคัดแยกของอาหารขั้นที่ 1 และขั้นที่ 2 ในการแยกเชื้อลิสทีเรีย อิวาโนวิ และลิสทีเรีย อินโนคัว ออกจากเชื้อเอสเชอริเชีย โคไล

E46982

และ ซาลโมเนลลา พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดสามารถใช้ในการคัดแยกเชื้อลิสทีเรียออกจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ อย่างไรก็ตามอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันมีประสิทธิภาพในการคัดแยกเชื้อแตกต่างกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพาลคามแสดงประสิทธิภาพสูงสุดในการคัดแยกเชื้อเอสเชอริเชียโคไล และ ซาลโมเนลลา ออกจากเชื้อลิสทีเรีย งานวิจัยนี้ได้เสนอขั้นตอนการเสริมคุณค่าเบื้องต้นก่อนการเสริมคุณค่าขั้นที่ 1 เพื่อเพิ่มความเป็นไปได้ในการระบุเชื้อลิสทีเรียและลดข้อผิดพลาดอันเกิดจากการไม่ปฏิเสธสิ่งที่เป็นเท็จในการตรวจหาเชื้อภายหลัง

คำสำคัญ: การศึกษาจลนพลศาสตร์/ เชื้อลิสทีเรีย/ อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดจำเพาะ/ อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวแบบมีสารยับยั้ง/ อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวแบบไม่มีสารยับยั้ง

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis could not have been success without helpful from many people. I would like to express my appreciation and gratitude for the assistance given by those who contributed to fulfill this special research project. First of all, Asst. Prof. Dr. Aluck Thipayarat for giving an opportunity to research this thesis project and giving a recommendation all along. My appreciation goes to all project committee members including, Assoc. Prof. Suwit Siriwatanayotin and Assoc. Prof. Dr. Punchira Vongsawasdi for giving a valuable suggestion and knowledge during presentation and project.

Moreover, my special gratitude is extended to the professors and all of staff members of Food Engineering Department, KMUTT who time-honored an outstanding program like FEPS to give me this great opportunity to progress my knowledge and skills. Furthermore, I would like to thank all the ALUCK Research Team including, Ruamporn Liamkaew, Juthamas Khueankhancharoen, Pattarin Supanichwatin, Settawitt Somposasain and Wanchana Saeaung for not only their helpful suggestions but also how to work with other people as a team. Last of all, I also want to grateful thanks my friends and seniors at Food Engineering and Food Engineering Practice School (FEPS) programs for their support and encouragement, which was often needed desperately when struggling to reach the end.

Special thanks are extended to "The Partnership of Innovation and Knowledge Project" by association of King Monkut's University of Technology Thonburi, The Thailand Research Fund, and Bangkok Bank Public Company Limited for their graduate scholarship support.

CONTENTS

	PAGE
ENGLISH ABSTRACT	ii
THAI ABSTRACT	iv
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	xi

CHAPTER

1. INTRODUCTION	**1**
1.1 Introduction	1
1.2 Objectives	3
1.3 Scopes	3
1.4 Expected Benefits	3
2. THEORY AND LITERATURE REVIEWS	**5**
2.1 Economical Impact of Food borne Outbreaks	5
2.2 Principles of *Listeria*	8
2.3 The Conventional *Listeria* Isolation and Identification	11
2.4 Ingredients used in Microbiological Media	16
2.5 Literature Reviews	20
2.6 Mathematical Modeling for Growth of *Listeria*	21
3. MATERIALS AND METHODOLOGY	**22**
3.1 Bacterial Strains	22
3.2 Equipments and Instruments	22
3.3 Media culture and Chemical Reagents	22
3.4 Experimental Design	24
3.5 Sample Preparation	24
3.6 *Listeria* spp. Cell Enumeration	30

3.7 Growth Characteristic Determination Using Logistic Model 31

4. RESULTS AND DISCUSSION **32**

4.1 Investigation of Non Selective Enrichment of *Listeria ivanovii* 32

4.2 Selectivity of Selective Media for *Listeria ivanovii, Listeria innocua, Escherichia coli* and *Salmonella* spp. 40

4.3 Evaluation of Inhibitory Effects of Selective Enrichment Media Concentration on *Listeria ivanovii* Growth 43

4.4 Proposed Selective Enrichment Strategies to Isolate *Listeria ivanovii* and *Listeria innocua* 48

5. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS **52**

5.1 Conclusions 52

5.2 Recommendations 54

REFERENCE **55**

APPENDIX **58**

A. Experimental Data 58

B. Statistical Data 77

CIRRICULUM VITAE **81**

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Causes of food borne illness in U. S.	5
2.2	Causes of death by food borne illness in U. S.	5
2.3	Causes of food borne illness in France	6
2.4	Causes of death by food borne illness in France	6
2.5	High-risk Foods among Cases of Perinatal Listeriosis	8
2.6	Differentiation of *Listeria* species	10
2.7	Primary enrichment media for *Listeria* detection	13
2.8	Secondary enrichment media for *Listeria* detection	14
2.9	The composition of peptones	18
4.1	The effect of non selective media on the growth of *Listeria* spp.	35
4.2	The effect of different nitrogen source media on the growth of *Listeria* spp.	38
4.3	The effect of different carbon source media on the growth of *Listeria* spp.	40
4.4	The effect of different concentrations of primary selective enrichment media on the growth of *Listeria* spp (Minimum relative number)	45
4.5	The effect of different concentrations of primary selective enrichment media on the growth of *Listeria* spp. (Maximum relative number)	46
4.6	The effect of different concentrations of secondary selective enrichment media on the growth of *Listeria* spp. (Minimum relative number)	47
4.7	The effect of different concentrations of secondary selective enrichment media on the growth of *Listeria* spp. (Maximum relative number)	48
4.8	The effect of standard method of selective enrichment media on the growth of *Listeria ivanovii*	50
4.9	The effect of standard method of selective enrichment media on the growth of *Listeria innocua*	50
4.10	The effect of purposed method of selective enrichment media on the growth of *Listeria ivanovii*	51
4.11	The effect of purposed method of selective enrichment media on the growth of *Listeria innocua*	51

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
A.1	Data of *Listeria ivanovii* in non selective enrichment broth	59
A.2	Data of *Listeria ivanovii* in different nitrogen sources broth (1)	60
A.3	Data of *Listeria ivanovii* in different nitrogen sources broth (2)	61
A.4	Data of *Listeria ivanovii* in different carbon sources broth (1)	62
A.5	Data of *Listeria ivanovii* in different carbon sources broth (2)	63
A.6	Data of *Listeria ivanovii* in selective enrichment broth	64
A.7	Data of *Listeria innocuai* in selective enrichment broth	65
A.8	Data of *Escherichia coli* in selective enrichment broth	66
A.9	Data of *Salmonella* spp. in selective enrichment broth	67
A.10	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration Fraser Broth	68
A.11	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration UVM Broth	69
A.12	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration Selective Enrichment Broth	70
A.13	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration *Listeria* Enrichment Broth	71
A.14	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration Half Fraser Broth	72
A.15	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration Buffered *Listeria* Enrichment Broth	73
A.16	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration MOPS Buffered *Listeria* Enrichment Broth	74
A.17	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration Demi Fraser Broth	75
A.18	Data of *Listeria ivanovii* in different concentration Palcam Broth	76
B.1	Statistic data of *Listeria ivanovii* in non selective broth	77
B.2	Statistic data of *Listeria ivanovii* in different nitrogen sources broth	78
B.3	Statistic data of *Listeria ivanovii* in different carbon sources broth	79

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	*Listeria monocytogenes*	10
2.2	*L. monocytogenes, L. ivanonii, L. innocua* and *L. welshimeri*	11
2.3	Schematic diagram of *Listeria* conventional detection method	12
2.4	Enumeration of bacteria using spread plated technique	16
3.1	Schematic diagram of *Listeria* spp.cell harvesting procedure	25
3.2	Schematic diagram of *Listeria* spp. serial dilution	25
3.3	Different carbon sources broth in test tube	27
3.4	Different concentrations of enrichment media in test tube	28
3.5	Selective enrichment media in 96-microwell plate	29
3.6	Micro inoculation technology scopes	30
4.1	An example of photograph of *Listeria* spp. colonies grown on TSA in a 96 micro-wells for 8 hours at 37°C	33
4.2	Growth characteristics of *Listeria* ivanovii grown on different non selective media (LB, BPW, NB, BLEB and TSB) at 37°C	34
4.3	Comparing the growth kinetic of *Listeria* spp. between different nitrogen source media	37
4.4	Comparing the growth kinetic of *Listeria* spp. between different carbon source media	39
4.5	Comparion of Growth profiles of *Listeria ivanovii, Listeria innocua, Escherichia coli* and *Salmonella* spp. on different primary and secondary selective enrichment media	42
4.6	The growth kinetic of *Listeria ivanovii* in primary enrichment between the different concentrations of selective enrichment media at 0.25X, 0.50X, 1.00X and 2.00X	45
4.7	The growth kinetic of *Listeria ivanovii* in secondary enrichment between the different concentrations of selective enrichment media at 0.25X, 0.50X, 1.00X and 2.00X	47