การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในน้ำผลไม้โดยสนามไฟฟ้าพัลส์

Inhibition of *Escherichia coli* in Fruit Juices by Pulsed Electric Fields

ชัชวาลย์ กันทะลา[1] นิติกร วงค์จันทร์แก้ว[2] พานิช อินต๊ะ[3*] และ ผดุงศักดิ์ รัตนเดโช[1]

[1]ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต) อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

[2]บริษัท ไดอิเล็กทริค เทคโนโลยี จำกัด เลขที่ 5 ถนนชมดอย ต. สุเทพ อ. เมือง จ. เชียงใหม่ 50200

[3*]วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ 50220

Chatchawan Kantala[1], Nitikorn Wongjankeaw, Panich Intra[3*] and Phadungsak Rattanadecho[1]

[1]Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering, Thammasat University, Klong-Luang, Pathumthani, 12120, Thailand

[2]Dielectric Technology.co.,LTD, 5 Chomdoi Rd., T. Suthep , A. Muang , Chiang Mai, 50200, Thailand

[3*]College of Integrated Science and Technology, Rajamangala University of Technology Lanna, Chiang Mai, 50220, Thailand

[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน: panich_intra@yahoo.com เบอร์โทรศัพท์ 08-9755-1985

บทคัดย่อ

ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* ในน้ำส้มและน้ำฝรั่งโดยใช้สนามไฟฟ้าพัลส์ ดำเนินการทดลองโดยเติมเชื้อ *E. coli* ลงไปในน้ำส้มและน้ำฝรั่งปริมาณ 10^6 CFU/ml จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ความเข้ม 20 kV/cm ความถี่ 1 เฮิร์ท ที่จำนวนพัลส์ 500, 600, 700, 800 และ 900 พัลส์ ตามลำดับ ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดแบบ nonselective ทั้งก่อนและหลังการทดสอบ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นและยังมีชีวิตอยู่ ผลการศึกษาพบว่าสนามไฟฟ้าพัลส์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในน้ำผลไม้ทั้งสองได้ถึง 6 log reduction ความถี่ 1 เฮิร์ท และจำนวนพัลส์มากกว่า 600 พัลส์

คำสำคัญ จุลินทรีย์อีโคไล น้ำผลไม้ สนามไฟฟ้าพัลส์ การยับยั้งเชื้อ

Abstract

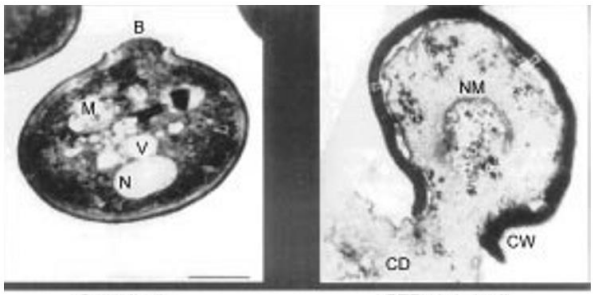
The Study of inhibition of a bacteria, *E. coli*, in orange and guava juices by pulse electric field was experimented. The experiment was done by inoculation *E. coli* about 10^6 CFU/ml. Both of bacteriums were determined for their *E. coli* inhibition by pulsed electric field strength about 20 kV/cm with the frequency of 1 Hz at five pulse numbers including 500, 600, 700, 800 and 900 pulses, respectively. Total bacteria plate count performed by using nonselective growth technic by culture them on nutrient agar before then incubated at 37°C for 24 hrs to measure the initial and surviving number cells. The results found that PEF inhibited the inoculated bacteria in both of juices about 6 logarithmic at the frequency of 1 Hz with pulse number greater than 600 pulses.

Keywords: *E. coli*, juice, pulsed electric field, inhibition.

1. บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมเลือกอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตที่น้อยที่สุด เพื่อให้อาหารมีคุณลักษณะที่ใกล้เคียงกับอาหารสดและลดปริมาณการใช้สารเคมีกันบูด [1] น้ำผลไม้ก็เป็นหนึ่งในนั้นที่แสดงให้เห็นถึงพฤติกรรมผู้บริโภคที่ต้องการคุณภาพของอาหารที่จะเลือกรับประทาน โดยน้ำผลไม้จะผลิตจากผลไม้และเก็บรักษาในกระบวนการที่มีการรักษาความเย็นและอาจมีอายุการเก็บรักษาที่ไม่นานนัก ด้วยเหตุผลนี้การยืดอายุการเก็บรักษาน้ำผลไม้ จำเป็นต้องทำการหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำผลไม้ โดยวิธีการพาสเจอร์ไรซ์ และการสเตอริไรซ์ ซึ่งจะใช้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม [2-3] ซึ่งจะเห็นได้ว่ากระบวนการถนอมหรือเก็บรักษาอาหารเหลว เป็นการใช้ความร้อนเป็นตัวกลางในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะทำให้สูญเสียรสชาติ และคุณค่าทางโภชนาการของอาหารเหลวไป ดังนั้นจึงมีระบบพาสเจอร์ไรซ์อีกทางเลือกหนึ่งซึ่งใช้พลังงานต่ำด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (pulsed electric field) เป็นระบบที่ใช้อุณหภูมิต่ำ โดยไม่ผ่านความร้อน ไม่มีกระบวนการทางเคมี ทำให้เป็นระบบที่มีผลกระทบน้อย กระบวนการของสนามไฟฟ้าแบบพัลส์จะใช้ระยะเวลาสั้นๆ (1-20 μs) และสร้างสนามไฟฟ้าแรงดันสูง (ประมาณ 20-50 kV/cm) ลงไปในอาหารเหลวเพื่อฆ่าแบคทีเรีย รา หรือจุลินทรีย์อื่นๆ โดยการแทรกซึมสนามไฟฟ้าผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ที่เรียกว่าอิเล็กโทรโพเลชัน (electroprolation) ดังแสดงในรูปที่ 1 เนื่องจากพัลส์ที่ใส่ลงไปมีความถี่สูง ทำให้มีผลกับของเหลวทั้งหมดที่อยู่ระบบในกระบวนการสนามไฟฟ้าแบบพัลส์นั้น จะสามารถฆ่าเชื้อได้ด้วยอัตรา 5 ถึง 9 log ซึ่งได้ผลที่ใกล้เคียงกับการฆ่าเชื้อโดยระบบพาสเจอร์ไรซ์ [4]

จากการสืบค้นผลงานวิจัย เกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลวต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศ พบว่ามีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและมีการผลิตในเชิงพานิชอย่างกว้างขวาง [5]-[10] อาทิเช่น พานิช อินต๊ะ และคณะ [5] ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *E. coli* สำหรับการพาสเจอร์ไรซ์ชานมด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ โดยมีระบบการจ่ายไฟฟ้าแรงดันสูงแบบพัลส์ ห้องยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และระบบการไหลของของไหล โดยปั๊มจะดูดเอาน้ำชานมเข้าไปในห้องยับยั้งเชื้อ โดยจะจ่ายแรงดันไฟฟ้ากระแสตรงแบบพัลส์เพื่อสร้างสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูงที่ขั้วอิเล็กโทรดประมาณ 20 kV/cm พบว่าประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อ *E. coli* เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มของสนามไฟฟ้าและจำนวนพัลส์เพิ่มขึ้น อัตราการไหลของน้ำชานมมีผลทำให้การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ลดลง อุณหภูมิเพิ่มขึ้น 2-3 °C ภายหลังผ่านกระบวนการ และสามารถยับยั้งเชื้อได้ 1.64 log reduction ที่เวลา 30 นาที R.A.H Timmermans et al. [6] ได้ทำการศึกษาการประเมินผลกระทบของจุลินทรีย์และตัวแปรที่บ่งบอกคุณภาพในกระบวน



รูปที่ 1 แสดงอิเล็กโตรโพเลชันของเซลก่อนและหลังผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ [4]

การผลิตน้ำส้มผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์อุณหภูมิต่ำ (mild heat pasteurization) กระบวนการผ่านความดันสูง (high pressure processing) และกระบวนการผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (pulsed electric field) พบว่าปริมาณของจุลินทรีย์ในน้ำส้มที่ผ่านกระบวนการทั้ง 3 ลดลงกว่าค่าที่มาตรฐานที่กำหนดไว้ทันทีหลังผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ Concepcion Sanchez-Moreno et al. [6] ได้ทำการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น วิตามินซี คาโรทีนอยด์ (carotenoids) ฟลาวาโนน (flavanones) และความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (DPPH) ในน้ำส้ม เพื่อเปรียบเทียบค่าที่ได้ในเทคโนโลยีการผลิตรูปแบบต่างๆ ได้แก่ วิธีการใช้ความดันสูง (high pressure) การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (pulsed electric fields) การพาสเจอร์ไรส์ที่ความร้อนต่ำ (low pasteurization) การพาสเจอร์ไรส์ที่ความร้อนสูง (high pasteurization) การใช้วิธี HPT ร่วมกับการแช่แข็ง (high pasteurization+ freezing) และวิธีการแช่แข็ง (freezing) กล่าวโดยสรุปพบว่า HP และ PEF เป็นเทคโนโลยีที่มีประสิทธิภาพมากกว่า HPT ในการรักษา

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และ (radical scavenging capacity : RSC) ของน้ำส้มคั้นสด Jonathan Mosquea-Melgar et al. [7] ในงานวิจัยนี้มีการนำเอาเทคโนโลยีการใช้สนามไฟฟ้าพัลส์ความเข้มสูง มาใช้รวมกับสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ [กรดซีตริก (citric acid) หรือ น้ำมันจากเปลือกอบเชย (cinnamon bark oil)] เพื่อดูผลกระทบกับอายุการเก็บรักษาน้ำผลไม้ซึ่งประกอบไปด้วย สตรอเบอรรี่ ส้ม แอปเปิ้ล ลูกแพร์ และมะเขือเทศ รวมถึงคุณสมบัติที่เกี่ยวกับรสชาติสัมผัสต่างๆ ของผลิตภัณฑ์เหล่านี้ รวมถึงศึกษาถึงการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำผลไม้ต่างๆ โดยกรรมวิธีสนามไฟฟ้าพัลส์ความเข้มสูง ที่มีการใช้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ร่วมด้วย และกรรมวิธีที่ไม่ได้ใช้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับน้ำผลไม้สดที่ไม่ได้ผ่านกรรมวิธีฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติในน้ำผลไม้ถูกยับยั้งโดยกรรมวิธีสนามไฟฟ้าพัลส์ความเข้มสูง จากผลการทดลองในน้ำผลไม้ทั้งหลาย พบว่า น้ำสตรอเบอรรี่และน้ำส้มสามารถเก็บได้นานถึง 91 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °C ส่วนน้ำผลไม้ชนิดอื่นได้แก่ แอปเปิ้ล ลูกแพร์ และมะเขือเทศได้ผลในการควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ในระดับเดียวกันถ้าใช้กรรมวิธีสนามไฟฟ้าพัลส์ความเข้มสูง ร่วมกับการใส่สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถทดแทนการใช้ความร้อนในการพาสเจอร์ไรส์ได้ โดยที่ยังคงคุณภาพในความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเชิงรสชาติสัมผัสภายหลังผ่านกรรมวิธีสนามไฟฟ้าพัลส์ความเข้มสูง แต่ในกรรมวิธีที่มีการเติมกรดซีตริค หรือน้ำมันเปลือกอบเชยลงไปมีผลทำให้รสชาติสัมผัสบางอย่างเปลี่ยนไปเช่น กลิ่น รส และความเปรี้ยวที่เพิ่มมากขึ้น Clara Cortes et al. [8] ได้ศึกษาระบบสนามไฟฟ้าความเข้มสูง (HIPEF) ในการประเมินผลกระทบต่อสี ปฏิกิริยาการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และ ปริมาณของสารไฮดรอกซิลเมทิลเฟอร์ฟิวรอล ในน้ำส้มที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์และกระบวนการ HIPEF ระหว่างช่วงการเก็บรักษา 7 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 2 และ 10 °C จากผลที่ได้น้ำส้มพาสเจอร์ไรส์มีแนวโน้มที่ทำให้ค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้นและค่าสีแดงลดลง เมื่อเทียบกับน้ำส้มคั้นสด ในขณะที่น้ำส้มผ่านสนามไฟฟ้าความเข้มสูงมีสีที่ใกล้เคียงกับน้ำส้มคั้นสด ในระยะการเก็บรักษาน้ำส้มพาสเจอร์ไรส์มีการเปลี่ยงแปลงของสีของมากกว่าน้ำส้มที่ผ่านสนามไฟฟ้าความเข้มสูง น้ำส้มที่ไม่ผ่านความร้อนมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (nonenzymatic browning) น้อยกว่าน้ำส้มพาสเจอร์ไรส์ อย่างไรก็ตามพบค่าการเพิ่มขึ้นของค่าดัชนีสีน้ำตาลนี้ในน้ำส้มทุกชนิดหลังจากสัปดาห์ที่ 4 ที่อุณหภูมิ 10 °C ส่วนที่อุณหภูมิที่ 2 °C สามารถคงค่าสีน้ำตาลได้นานกว่าและไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับปริมาณของสารไฮดรอกซิลเมทิลเฟอร์ฟิวรอล ทั้งในน้ำส้มพาสเจอร์ไรส์และน้ำส้มผ่านปริมาณของสารไฮดรอกซิลเมทิลเฟอร์ฟิวรอลเมื่อเทียบกับน้ำส้มคั้นสด จากการทดสอบระดับปริมาณของสารไฮดรอกซิลเมทิลเฟอร์ฟิวรอลในน้ำส้มทุกชนิดต่ำกว่าระดับที่กำหนด ในขณะแช่เย็น Heinz et al. [9] ได้ทำการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิที่สัมพันธ์กับอัตราการตายจากการพาสเจอร์ไรซ์น้ำแอปเปิ้ล โดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ โดยประยุกต์ หลักการใช้สนามไฟฟ้าแบบพลัส์ สำหรับการพาสเจอร์ไรซ์น้ำแอปเปิ้ลเพื่อกำจัดเชื้อ *E. coli* โดยใช้อุณหภูมิร่วมที่ 35-36 °C พบว่าสามารถยังยั้งปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลดลองจาก 100 ให้น้อยกว่า 40 kJ/kg และตรวจสอบการฆ่าเชื้อโดยดูจากอัตราการตายที่ลดลงใน 6 log Cycles ตามกราฟแสดงอัตราการตายแล้วเปรียบเทียบกับกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์แบบใช้ความร้อน พบว่า การพาสเจอร์ไรซ์แบบให้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ มีประสิทธิภาพในการจำกัดเชื้อได้ดี และผลิตภัณฑ์ที่ได้เหมือนสดใหม่ และยังลดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการได้ Oziemblowski and Kopec [10] ได้ทำการศึกษาเรื่องวิธีถนอมอาหารโดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ พบว่าจากการศึกษาเทคโนโลยีสามารถนำมาใช้ในการฆ่าเชื้อในอาหารหรือใช้ในการบรรจุภัณฑ์ ฯลฯ เช่น เทคโนโลยีการฉายรังสี การใช้แรงดันสูง พัลส์ความเข้มสูง และสนามแม่เหล็ก แต่การศึกษาส่วนใหญ่จะเน้นในเรื่องเทคโนโลยีความดันสูง และเทคโนโลยีสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ โดยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ เป็นเทคโนโลยีใหม่ที่สามารถฆ่าเชื้อโดยไม่ใช้ความร้อน ผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังการฆ่าเชื้อจะยังรักษาอาหารและวิตามินให้คงอยู่รวมถึงคุณค่าทางประสาทสัมผัส แต่อาจไม่สามารถยับยั้งสปอร์ของเชื้อไว้ได้ Jeyamkondan et al. [11] ได้ศึกษาเรื่องการพาสเจอร์ไรซ์อาหารเหลวโดยใช้สนาม ไฟฟ้าแรงดันสูงแบบพัลส์ พบว่าการใช้สนามไฟฟ้าแบบ

พัลส์ เป็นการพาสเจอร์ไรซ์โดยไม่ใช้ความร้อนเรียกอีกอย่างว่า การพาสเจอร์ไรซ์เย็น ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์จนแตกส่งผลให้เซลล์ตาย ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อสั้น

ในบทความวิจัยนี้ได้นำเสนอการศึกษาการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในน้ำผลไม้โดยสนามไฟฟ้าพัลส์ ในการศึกษานี้จะใช้น้ำผลไม้น้ำส้มและน้ำฝรั่งแท้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการเติมเชื้อ *E. coli* ลงไปในน้ำผลไม้ทั้งสองชนิดปริมาณ 10^6 CFU/ml และทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ภายในห้องยับยั้งเชื้อโดยใช้ความเข้มของสนามไฟฟ้าแรงดันสูงแบบพัลส์ 20 kV/cm ความถี่ 1 Hz ซึ่งจะทำให้ทราบถึงการลดลงของเชื้อ *E. coli* ในน้ำผลไม้และเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการฆ่าเชื้อในน้ำผลไม้ด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์

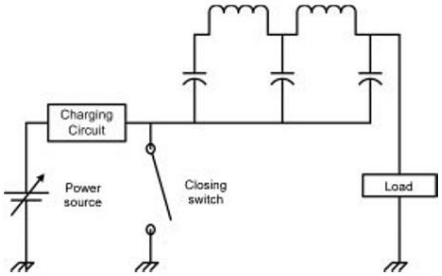
2. ทฤษฎีและวิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 ทฤษฎี

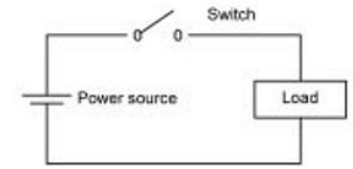
ในระบบพัลส์มีส่วนประกอบหลักอยู่สามส่วน ส่วนแรกคือแหล่งจ่ายไฟกระแสตรง เป็นแหล่งจ่ายไฟกระแสตรงสำหรับระบบสนามไฟฟ้าพัลส์ ซึ่งเป็นส่วนที่จะแปลงกระแสสลับจากสัญญาณไฟฟ้าทั่วไปเป็นไฟกระแสตรงแรงดันสูง ส่วนที่สองของระบบคือโมดูเรเตอร์พัลส์ (pulse modulator) ซึ่งจะแปลงจากไฟกระแสตรงไปเป็นไฟแบบพัลส์ที่มีแรงดันยอดสูง รูปที่ 2 ก. วงจรโมดูเรเตอร์แบบ (pulse forming network) ด้วยสวิตช์แบบปิด รูปที่ 2 ข. แบบฮาร์ดสวิตช์ (hard switch) และรูปที่ 2 ค. แบบการเหนี่ยวนำผ่านหม้อแปลง (transformer coupled system) การออกแบบทั้งสามนี้ได้สรุปวงจรโมดูเลเตอร์แต่ละแบบได้สรุปไว้ในตารางที่ 1 ส่วนสุดท้ายคือห้องฆ่าเชื้อ (treatment chamber) ซึ่งเป็นที่ที่สารเหลวจะได้รับสนามไฟฟ้าแรงดันสูงแบบพัลส์

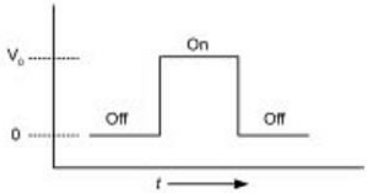
ตารางที่ 1 การประเมินค่าของโมดูเรเตอร์ในรูปแบบต่างๆ โดยให้คะแนนเป็น สูง(H) กลาง(M) ต่ำ(L) [4]

Architecture	Voltage flattop	Rise/ fall time	Variable load impedance	Pulsewidth flexibility	High frequency	Reliability/ lifetime
PFN/Pulse transformer						
Spark gap	M	H	L	L	L	L
SCR	M	H	L	L	M	H
Thyratron	M	H	L	L	L	L
Hybrid modulator						
IGBT	H	M	M	M	M	H
Tetrode (vacuum tube)	H	M	M	M	M	M
Hard switch						
IGBT	H	H	H	H	H	H
Tetrode (vacuum tube)	H	H	M	H	M	M

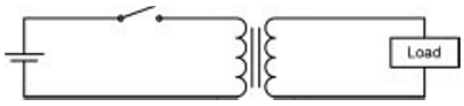


ก.





ข.

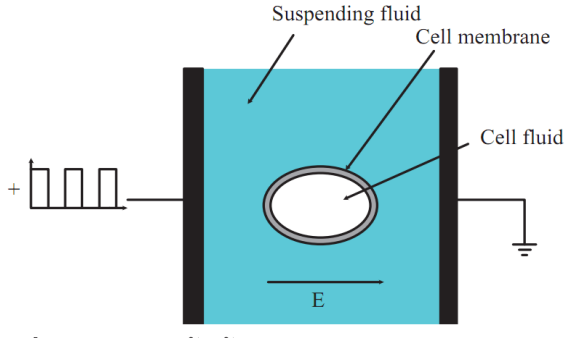


ค.

รูปที่ 2 ก.วงจรโมดูเรเตอร์แบบ PFN ด้วยสวิตช์แบบปิด ข. วงจรโมดูเรเตอร์แบบฮาร์ดสวิตช์ และ ค. วงจรโมดูเรเตอร์แบบการเหนี่ยวนำผ่านหม้อแปลง [4]

การยับยั้งเชื้อในอาหารเหลวด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ประกอบด้วยขั้วอิเล็กโทรด 2 ขั้ววางซ้อนกันโดยจ่ายแรงดันไฟฟ้ากระแสตรงให้กับขั้วหนึ่ง และอีกขั้วหนึ่งมีศักย์ไฟฟ้าเป็นกราวด์ (ground) ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยการยับยั้งเชื้อในอาหารเหลวด้วยด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (pulsed electric field treatment) คือการกำจัดเชื้อจุลชีพ

ที่มีอยู่ในอาการเหลวด้วยกระบวนการอิเล็กโทรโพเรชัน (electropolation) โดยการเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าและสภาพการยอมไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์สามารถทำได้โดยการใช้สนามไฟฟ้าที่มีลักษณะเป็นพัลส์หรือเป็นช่างเวลาเกิดจากการจ่ายพัลส์แรงดันไฟฟ้าให้กับอิเล็กโทรดที่มีความเข้มสนามไฟฟ้า (electric field strength) สูงประมาณ 40 kV/cm และมีลักษณะเป็นพัลส์ในช่างประมาณ 10 ns และ 20 μs [5]



รูปที่ 3 หลักการยับยั้งเชื้อในอาหารเหลวด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ [5]

สนามไฟฟ้าพลัส์ที่มีความเข้มสูงในนี้จะส่งผลทำให้แรงดันไฟฟ้าที่ตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์มีค่าสูงเกินกว่าค่าความคงทนของไดอิเล็กตริก (dielectric strength) ของเยื้อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดรูพรุน (pores) เล็กๆ จำนวนมากขึ้นที่เยื้อหุ้มเซลล์ รูพรุนดังกล่าวจะนำไปสู่กระบวนการของเซลล์ (programmed cell death) ซึ่งมีสองลักษณะคือ อะพอพโตสิส (apoptosis) และเน็คโคสิส (necrosis) โดยลำดับขั้นของกระบวนการอิเล็กโตรโพเรชันที่เกิดขึ้นกับเซลล์จุลินทรีย์แสดงไว้ในรูปที่ 4 โดยแรงดันไฟฟ้าที่ตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์สามารถคำนวณได้จาก [12]

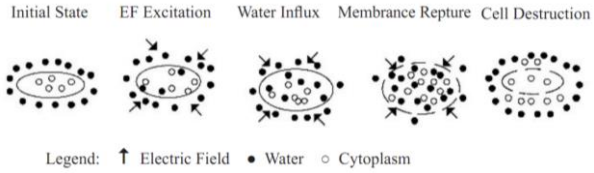
$$V_{cell} = f r_{cell} E_{cell} \quad (1)$$

เมื่อ V_{cell} คือแรงดันไฟฟ้าสูงสุดที่ตกคร่อมที่เยื่อหุ้มเซลล์

f คือค่าคงที่ที่ขึ้นอยู่กับรูปร่างของเซลล์

r_{cell} คือรัศมีวงนอกสุดของเยื่อหุ้มเซลล์

E_{cell} คือค่าความเครียดสนามไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์



รูปที่ 4 ลำดับขั้นของกระบวนการอิเล็กโตรโพเรชันที่เกิดขึ้นกับเซลล์จุลินทรีย์ [13]

ตารางที่ 2 แสดงขนาดของเซลล์แรงดันไฟฟ้าสูงสุดที่ตกคร่อมเยื้อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ [13]

เชื้อจุลินทรีย์	เส้นผ่านศูนย์กลาง (μm)	ความยาว (μm)	แรงดันสูงสุด (V)
E. coli	1.15	6.9	0.26
K. pseudomona	0.83	3.2	1.26
P. aeruginosa	0.73	3.9	1.25
S. aureus	1.03	-	1.00
L. momocytogenesl	0.76	1.7	0.99
C. albicans	4.15	-	2.63

จากตารางที่ 2 แสดงขนาดของเซลล์และแรงดันไฟฟ้าสูงสุดที่ตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เกิดรูพรุนจนทำให้เกิดการถ่ายเทระหว่างของเหลวภายนอกกับไซโทพลาซึม (cytroplasm) ซึ่งเป็นของเหลวภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการขยายตัวเพิ่มขึ้นและนำไปสู่การเบรกดาวน์ของเยื้อหุ้มเซลล์การเกิดรูพรุนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อันเนื่องมาจากความเครียดสนามไฟฟ้า โดยลักษณะของการเกิดรูพรุนแบบไฮโดรฟิลิก (hydrophilic) และ ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) โดยพลังงานที่ใช้ในกระบวนการจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความนำไฟฟ้า อัตราการไหลของอาหารเหลว และความเข้มของสนามไฟฟ้า ซึ่งในทางทฤษฎีสามารถคำนวณกำลังไฟฟ้าสูงสุด (P_{max}) ที่ใช้ในการสร้างพัลส์ของสนามไฟฟ้าของห้องยับยั้งเชื้อได้จากสมการ [14]

$$P_{max} = 2k\pi\sigma E^2 (Q/\pi V)^{3/2} \quad (2)$$

เมื่อ P_{max} คือกำลังไฟฟ้าสูงสุด

Q คืออัตราการไหลของอาหารเหลว
E คือความเข้มสนามไฟฟ้าของห้องยับยั้งเชื้อ
σ คือค่าความนำไฟฟ้าของอาหารเหลว
ν คือความเร็วในการไหลอาหารเหลว
k คือสัดส่วนของความยาว (L) และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (D) ของห้องยับยั้งเชื้อคือ

$$k = L/D \quad (3)$$

2.2 วิธีดำเนินการวิจัย

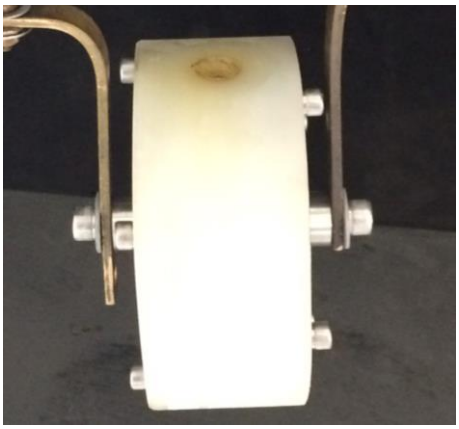
เชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* (TISTR 117) ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยเลี้ยงในอาหารเหลว (nutrient broth, NB) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง (nutrient agar, NA) เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 5 จากนั้นถ่ายเชื้อเลี้ยงในอาหารเหลว (รูปที่ 6) โดยจะเติมเชื้อลงในน้ำผลไม้อัตรา 1 ต่อ 10 นำน้ำส้มและน้ำฝรั่งบรรจุลงในภาชนะฆ่าเชื้อเพื่อผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ดังแสดงในรูปที่ 7 โดยคำนวณเติมปริมาณเชื้อ *E. coli* ในน้ำผลไม้ให้มีค่าเท่ากับ 10^6 CFU/ml จากสมการ

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (4)$$

เมื่อ C_1 คือความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* ที่คำนวณได้
V_1 คือปริมาณของเชื้อ *E. coli* ที่ต้องการใช้
C_2 คือความเข้มข้นของเชื้อ *E. coli* ที่ต้องการ
V_2 คือปริมาณน้ำผลไม้

รูปที่ 5 ลักษณะเชื้อ *E. coli* บนอาหารแข็ง

รูปที่ 6 น้ำส้มและน้ำฝรั่งที่เติมเชื้อจำนวน *E. coli* 10^6 CFU/ml



รูปที่ 7 ภาชนะทดลองฆ่าเชื้อขนาด 100 ml

เมื่อทำการเติมเชื้อ *E. coli* ในน้ำผลไม้เสร็จแล้ว ก็นำไปทดสอบผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ โดยใช้ความเข้มของสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ 20 kV/cm และปรับเปลี่ยนปริมาณพัลส์ที่ 500 600 700 800 และ 900 พัลส์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 หลังจากนั้นจะนำน้ำผลไม้ที่ผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์มาทำการเจือจางลำดับส่วนที่ 10 และ 100 เท่า และ Spread plate เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 18-24 ชั่วโมง ต่อไป

ตารางที่ 3 รายละเอียดเงื่อนไขในการทดลอง

รายละเอียด	ช่วงการทดสอบ
ชนิดของอาหารเหลว	น้ำส้ม และน้ำฝรั่ง
เชื้อจุลินทรีย์	*E. coli*
ความเข้มของสนามไฟฟ้า	20 kV/cm
แรงดันพัลส์	20 kV
ความกว้างของพัลส์	2.5 ms
ความถี่ของพัลส์	1 Hz
จำนวนพัลส์	500 - 900 พัลส์
ความจุของห้องฆ่าเชื้อ	100 ml

3. ผลการวิจัยและอภิปราย

จากตารางที่ 4 แสดงปริมาณการลดลองของเชื้อ *E. coli* หลังผ่านสนามไฟฟ้าพัลส์ที่จำนวนพัลส์ต่างๆ โดยที่น้ำส้มและน้ำฝรั่งที่เติมเชื้อ *E. coli* เข้าไป 10^6 CFU/ml และนำไปผ่านสนามไฟฟ้าพัลส์ ที่จำนวนพัลส์ 500 600 700 800 และ 900 พัลส์ ตามลำดับ พบว่าที่ 500 พัลส์ ไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ ส่วนจำนวนพัลส์ที่ 600 700 800 และ 900 พัลส์ ตามลำดับ สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้เท่ากันถึง 6.00 log reduction ดังแสดงผลการฆ่าเชื้อภายหลังผ่านสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในรูปที่ 6 และยังพบอีกว่าน้ำผลไม้ทั้งน้ำส้มและน้ำฝรั่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยหลังผ่านกระบวนการ ที่จำนวนพัลส์ 500 600 700 800 และ 900 พัลส์ ตามลำดับ มีอุณหภูมิเฉลี่ย 38.7 45.7 55.4 61.0 และ 64.4 °C เนื่องจากไม่ได้หล่อเย็นห้องฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 4 ผลการทดลองการฆ่าเชื้อ *E. coli* และอุณหภูมิที่เกิดขึ้นภายหลังผ่านสนามไฟฟ้าพัลส์ที่จำนวนพัลส์ต่างๆ

จำนวนพัลส์	อุณหภูมิเฉลี่ยหลังผ่านกระบวนการ (°C)	การลดลงของเชื้อ *E. coli* (log)	
		น้ำส้ม	น้ำฝรั่ง
500	38.7	NA	NA
600	45.7	6.00	5.99
700	55.4	6.00	6.00
800	61.0	6.00	6.00
900	64.4	6.00	6.00

จากรูปที่ 8 แสดงจานเพาะเชื้อที่มีการเติมเชื้อ *E. coli* น้ำส้ม และน้ำฝรั่ง ที่ผ่านกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อฯ โดยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ ซึ่งทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตด้วยการ Spread plate บ่มไว้ ที่อุณหภูมิ 37 °C เวลา 18-24 ชั่วโมง โดยน้ำส้มและน้ำฝรั่งที่เติมเชื้อ *E. coli* เข้าไป 10^6 CFU/ml พบว่า Control ของน้ำผลไม้ทั้งสองเกิดโคโลนีของเชื้อ *E. coli* อย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งเมื่อนำน้ำผลไม้ดังกล่าวไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่จำนวนพัลส์ 500 พัลส์ ยังคงมีเชื้อหลงเหลืออยู่ซึ่งไม่สามารถนับได้ (Colony>300) แต่เมื่อนำน้ำผลไม้ทั้งสองไปทดสอบที่จำนวนพัลส์ 600 700 800 และ 900 พัลส์ ตามลำดับ สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เมื่อได้รับสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ การแทรกซึมสนามไฟฟ้าผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (electroprolation) แรงดันไฟฟ้าที่ตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์มีค่าสูงเกินกว่าค่าความคงทนของไดอิเล็กตริกของเยื้อหุ้มเซลล์และส่งผลทำให้ผนังเซลล์เกิดรูพรุนและรั่ว [5, 13] ทำให้เชื้อ *E. coli* ไม่สามารถที่จะเจริญเติมโตต่อไปได้ หรือตายนั้นเอง โดยสามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ถึง 6 log reduction

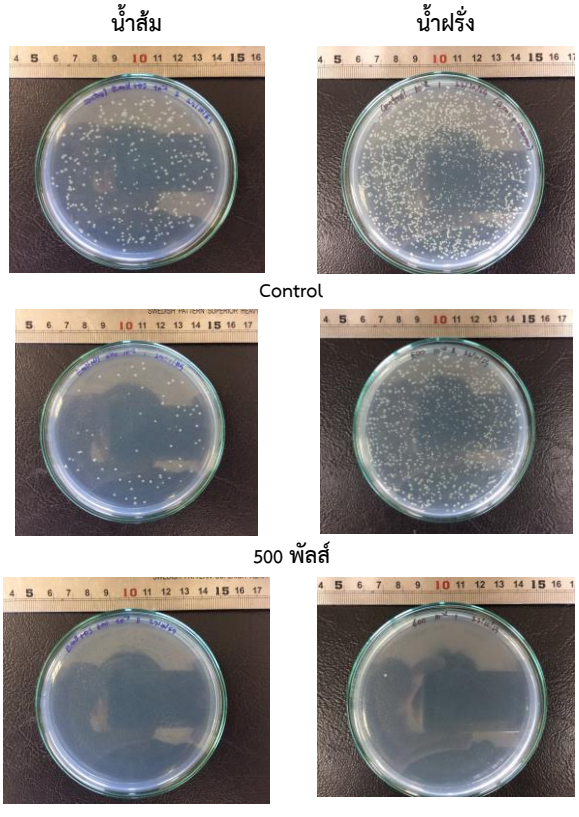
4. บทสรุป

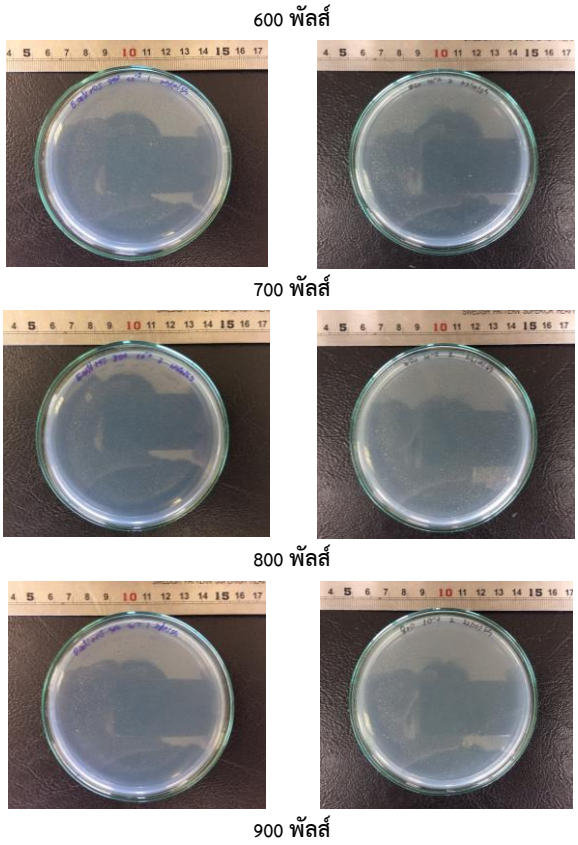
จากผลการทดลองพบว่า จำนวนพัลส์ที่ 500 ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในน้ำผลไม้สองชนิดได้

และจำนวนพัลส์ที่มีค่าไม่น้อยกว่า 600 พัลส์ สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ในน้ำผลไม้ทดลอง ได้ 6 log reduction ซึ่งผ่านมาตรฐานที่กฎหมายได้กำหนดเป็นข้อบังคับในการผลิตอาหารเหลวจะต้องลดจำนวนจุลินทรีย์ได้อย่างน้อย 100,000 เท่า (5 log reduction) อย่างไรก็ตามการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ทำการหล่อเย็นห้องฆ่าเชื้อ จึงทำให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นขณะทำการทดลอง โดยการศึกษาในครั้งต่อไปควรมีการปรับปรุงเรื่องระบบหล่อเย็นของห้องฆ่าเชื้อเพื่อหลีกเลี่ยงความร้อนที่จะเกิดขึ้นในน้ำผลไม้

5. กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรมจาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) รหัสโครงการ P-15-51038 ขอขอบคุณหน่วยวิจัยการประยุกต์ใช้ไฟฟ้าสถิตในงานด้านพลังงานและสิ่งแวดล้อม และภาควิชาวิศวกรรมกระบวนการอาหาร วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ที่ให้การเอื้อเฟื้ออุปกรณ์เครื่องมือ และสถานที่ในการทดสอบครั้งนี้





รูปที่ 8 ผลการทดลองการฆ่าเชื้อ *E. coli* น้ำส้ม และน้ำฝรั่งโดยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Allende A. Tomas-Barberan FA, Gil MI. Minimal Processing for Healthy Traditional Foods. Trends in Food Science and Technology. 2006;17:513-519.

[2] Pasteurization Available form :http://www.horapa.com/webboard/show.php?No=190 [Accessed 27th November 2016]

[3] PasteurizationAvailable form :http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/cell/past.htm [Accessed 27th November 2016]

[4] Kempkes M. A., Pulsed electric field (PEF) systems for commercial food and juice processing, Diversified Technologies, Inc., USA: Woodhead Publishing Limited, 2010

[5] Intra P, Yawootti A, Asanavijit V, Manopian P,

Pengmanee C, Somsri N. Inactivation of E. coli in Milk Tea Undergoing Pulsed Electric Field Pasteurization, KMUTNB J.2015; Vol. 25, No. 3, Sep. - Dec. Thai.

[6] SANCHEZ-MORENO C, PLAZA L, ELEZ-MARTINEZ P, DE ANCOS B, MARTIN-BELLOSO O, PILAR CANO M. Impact of High Pressure and Pulsed Electric Fields on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Orange Juice in Comparison with Traditional Thermal Processing, J of Agr and F Chem. 2015; 53, 4403-4409, June

[7] Mosquea-Melgar J, Raybaudi-Massilia R M, Martin-Belloso L. Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials, f and bio proc.2012; 205-214

[8] Cortes C, Esteve M J, Frigola A. Color of orange juice treated by High Intensity Pulsed Electric Fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice, F Con. 2008 (19); 151–158

[9] Heinz V, Toepfl S, Knorr D. Impact of Temperature on Lethality and Energy Efficiency of Apple Juice Pasteurization by Pulsed Electric Fields Treatment, 2003;Inno F Sci and En Tech.2003;vol. 4, 167-175

[10] Oziemblowski M,. Kopec W. Pulsed Electric Fields (PEF) as an Unconventional Method of Food Preservation, Pol J of F and Nut Sci. 2005;vol. 14/55, SI 1, 31-35

[11] Jeyamkondan S, Jayas D.S, Holley R.A. Pulsed Electric Field Processing of Foods: A Review, J of F Pro Mark, 1999;vol. 62,1088-1096

[12] Panyamuangjai V, Janthara S, Kusuya R, Yawootti A,. Intra P. Application of Pulsed Electric Field for Milk Pasteurization, KMUTT Res and Dev J, 2012; vol. 35, no. 4, 469-484, Thai.

[13] Barbosa-canovas G.V, Pothakamury U.R. Palou E, Swanson B.G. Non-thermal Preservation of Food, New York: Marcel Dekker, 1998.

[14] Addeo K. M. Process for the use of pulsed electric fields coupled with rotational retorting in processing meals ready to eat (MRE). U.S., US6083544A (Patent) 2000.