



สภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไมโดยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

พรกรัณย์ พันธุ์โมงค์ และ คมกฤต เล็กสกุล*

ภาควิชาวิศวกรรมอุตสาหกรรม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สายสมร ลำยอง จตุรงค์ คำหล้า และ นครินทร์ สุวรรณราช

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 08 9700 4972 อีเมล: komgrit@eng.cmu.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2022.09.003

รับเมื่อ 29 ธันวาคม 2563 แก้ไขเมื่อ 11 พฤษภาคม 2564 ตอรับเมื่อ 15 มิถุนายน 2564 เผยแพร่ออนไลน์ 2 กันยายน 2565

© 2023 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไมโดยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา (Plasma Activated Water; PAW) ที่ช่วยสังเคราะห์อนุมูลไฮดรอกซิล ($\text{OH}\cdot$) ในรูปของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้มีปริมาณความเข้มข้นสูงขึ้น ปัจจัยการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ อัตราการไหลของก๊าซผสมอาร์กอนและออกซิเจน (อาร์กอน 98 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 2 เปอร์เซ็นต์) และระยะเวลาดิสชาร์จ โดยนำวิธีออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็มจำนวน (22) ที่จุดกึ่งกลาง 5 จุด เพื่อนำไปกำหนดเงื่อนไขของปัจจัยและการทดลองยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไมบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ อัตราการไหลของก๊าซผสมอาร์กอนและออกซิเจน 25 ลิตรต่อนาที และระยะเวลาดิสชาร์จ 120 นาที ทำให้มีปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 12.43 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการทดลอง 10 นาที น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาสามารถลดจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งขาวแวนนาไมจาก 5.98 log CFU/กรัม เหลือเพียง 3.49 log CFU/กรัม หรือประมาณ 41.63 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา กุ้งขาวแวนนาไม การยับยั้งจุลินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การอ้างอิงบทความ: พรกรัณย์ พันธุ์โมงค์, คมกฤต เล็กสกุล, สายสมร ลำยอง, จตุรงค์ คำหล้า และ นครินทร์ สุวรรณราช, “สภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไมโดยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา,” วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ, ปีที่ 33, ฉบับที่ 2, หน้า 516-525, เม.ย.-มิ.ย. 2566.



Optimization for Growth Inhibition of Microbial in Vannamei White Shrimp by Plasma Activated Water

Pornkaran Phan-umong and Komgrit Leksakul*

Department of Industrial Engineering, Faculty of Engineering, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

Saisamon Lumyong, Jaturong Kumla and Nakarin Suwannarach

Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 08 9700 4972, E-mail: komgrit@eng.cmu.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2022.09.003

Received 29 December 2020; Revised 11 May 2021; Accepted 15 June 2021; Published online: 2 September 2022

© 2023 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

This research aimed to study the appropriate parameters for inhibiting microbial growth in *Litopenaeus vannamei* by plasma-activated water (PAW) by plasma technology to generate high concentration hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$) in hydrogen peroxide (H_2O_2). The examined factors consist of premix argon and oxygen gas (Ar 98% and O_2 2%) flow rate and exposure time. A two-level full factorial design along with five center points was used to determine all experimental conditions. The experiment was performed in order to investigate the microbial growth inhibition phase. Based on the experiment, the optimum conditions were as follows: premix gas flows rate of 25 l/min and exposure time of 120 min., resulting in of H_2O_2 concentration of 12.43 mg/l. Given 10-min treatment time, plasma-activated water was found to reduce overall microorganisms by 41.63%, from 5.98 logs CFU/g to 3.49 log CFU/g.

Keywords: Plasma Activated Water, Vannamei White Shrimp, Inhibition of Microorganism, Hydrogen Peroxide

Please cite this article as: P. Phan-umong, K. Leksakul, S. Lumyong, J. Kumla, and N. Suwannarach , "Optimization for growth inhibition of microbial in vannamei white shrimp by plasma activated water," *The Journal of KMUTNB*, vol. 33, no. 2, pp. 516–525, Apr.–Jun. 2023 (in Thai).



1. บทนำ

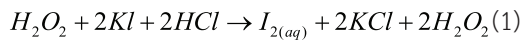
ความท้าทายทางด้านความสะอาดและความปลอดภัยของอาหารถือเป็นเรื่องที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับผู้ผลิตอาหารทะเลแช่แข็ง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในการส่งออกที่สำคัญประเภทหนึ่งของไทย โดยตลาดการส่งออกหลัก คือ สหภาพยุโรป (EU) และอาเซียน ในกรณีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้บ่อยในผลิตภัณฑ์กึ่งปรุงสุก ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* [1] อีกทั้งยังมีการตรวจพบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Listeria monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในกุ้งที่ผ่านความร้อนและกุ้งสดแช่เยือกแข็ง [2] มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกำหนดคุณสมบัติของอาหาร มาตรฐานที่ มกอช. 7017-2549 ได้กำหนดในอาหารดิบเชื้อจุลินทรีย์รวมต้องน้อยกว่า 1.0×10^6 CFU ต่อกรัม โคลิฟอร์มต้องน้อยกว่า 20 MPN ต่อกรัม [3] โดยทั่วไปอุตสาหกรรมจะใช้คลอรีนเป็นสารเคมีในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แต่ข้อเสียของคลอรีนคือ เมื่อใช้ในปริมาณที่มากอาจทำให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบหายใจ หากเกิดเข้าตาอาจทำให้ตาบอดได้ และเมื่อเกิดการตกค้างทำให้เกิดสารก่อมะเร็งไตรฮาโลมีเทน (Trihalomethanes) ที่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคและยากที่จะทำลาย [4] มีการศึกษานวัตกรรมใหม่เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี และหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงในคุณลักษณะทางโภชนาการและประสาทสัมผัส เพื่อปรับปรุงความปลอดภัยของคุณภาพอาหารโดยไม่ส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะทางโภชนาการและประสาทสัมผัสได้ [5] ความน่าสนใจในเทคโนโลยีพลาสมา (Plasma Technology) เป็นเทคนิคที่ปลอดภัยไม่ทำให้เกิดการตกค้าง เนื่องจากสารละลายเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันกับเซลล์ของจุลินทรีย์และเกิดการสลายตัวอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ไม่เกิดการตกค้าง และก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์

ในการพัฒนาแนวคิดการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในปัจจุบัน เทคโนโลยีใหม่ที่จะแก้ไขปัญหานี้ได้คือ เทคโนโลยีพลาสมา ถือเป็นเทคโนโลยีทางเลือกใหม่ที่กำลังได้รับความนิยมของนักวิจัยในการนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านต่างๆ ซึ่งเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างหนึ่งคือ การผลิตน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา (PAW) เป็นการพัฒนาและยกระดับสมบัติที่ผิวของผลิตภัณฑ์เป้าหมาย โดยการสร้างสายพันธุ์ออกซิเจน

ที่มีปฏิกิริยา (Reactive Oxygen Species; ROS) [อะตอมออกซิเจน (O) ซูเปอร์ออกไซด์ (O₂⁻) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) อนุมูลไฮดรอกซิล (OH•) และออกซิเจนสายเดี่ยว (¹O₂)] และไนโตรเจนที่มีปฏิกิริยา (Reactive Nitrogen Species; RNS) [ไนโตรเจนมอนอกไซด์ (NO•) ไนโตรเจนไดออกไซด์ (NO₂•) กรดไนตริก (HNO₂) และกรดไนตริก (HNO₃)] [6], [7] จากการศึกษาของ Zhang แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ระหว่าง ROS และ RNS ทำให้เกิดความเสียหายกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อส่วนประกอบภายในเซลล์รวมถึง DNA และเอนไซม์ต่างๆ [8] แต่อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการผลิตน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา เช่น ชนิดของก๊าซ อัตราการไหล ระยะเวลาดีสชาร์จ [9], [10] และปัจจัยทางด้านจุลินทรีย์ เช่น ชนิดและลักษณะทางกายภาพของจุลินทรีย์มีผลต่อการต้านทานของสารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆ [11]

การผลิตน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาได้รับความนิยมแพร่หลายจากทางอุทยานวิทยาศาสตร์ภาคเหนือ (Northern Science Park) ให้ใช้เครื่องต้นแบบผลิตน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแบบ Pinhole Plasma Jet ชนิด 5 หัว สามารถผลิตน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาอย่างน้อย 7 ลิตร โดยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาที่ได้นั้นต้องบรรจุในขวดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถนำมาใช้งานได้ภายใน 24 ชั่วโมง

ในการวัดประสิทธิภาพของน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา จะสามารถวัดได้จากปริมาณของ OH• ซึ่งอนุมูลไฮดรอกซิลมีค่าความไวในการเกิดออกซิเดชันสูงมาก และโดยปกติ OH• ในน้ำจะอยู่ในรูปของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นในการวัด OH• จะวัดผ่านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก (Spectrophotometric Method) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการวัดความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในช่วงตั้งแต่ 0.25–70 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก โดยหลักการวิธีนี้ได้ทำปฏิกิริยาโดยตรงของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารละลายไอโอดีน (Iodine Solution) กับไทลูดีนบลู (Toluidine Blue; TB) การเกิดปฏิกิริยาแสดงดังสมการที่ (1) [12]



จากการศึกษางานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติและสภาวะของน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไม โดยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาสามารถร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็มจำนวน และผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพของการใช้น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา และสภาวะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไมให้ได้ตามมาตรฐานการส่งออกได้

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การออกแบบการทดลอง

งานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ หาปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมามากที่สุด ได้ประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็มจำนวน 22 สามารถแสดงสภาวะที่ใช้ในการออกแบบการทดลองทั้งหมด 2 ปัจจัย ได้แก่ อัตราการไหลของก๊าซผสมอาร์กอน (A) ที่ระดับต่ำ 20 ลิตรต่อนาที ระดับสูง 25 ลิตรต่อนาที และระยะเวลาดีสชาร์จ (B) ระดับต่ำ 30 นาที ระดับสูง 120 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่มีระดับการทดลองแบบสุ่ม และทดลองซ้ำที่จุดกึ่งกลาง 5 จุด ทำให้ได้เงื่อนไขการทดลอง 17 การทดลอง โดยเกณฑ์ในการเลือกค่าของปัจจัยคือ เป็นอัตราการไหลต่ำสุดและสูงที่สุดที่เครื่องต้นแบบผลิตน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และหาระยะเวลาในการแช่พลาสมาที่เหมาะสมสำหรับการทดลองการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระยะเวลาการแช่พลาสมา 1, 3, 5 และ 10 นาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ปรับจาก [13])

2.2 เตรียมอุปกรณ์สำหรับการทดลอง

2.2.1 การเตรียมสารละลาย

สารละลายที่ใช้สำหรับตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริก

ประกอบไปด้วย สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium Iodide; KI) 2 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร เตรียมโดยชั่งโพแทสเซียมไอโอไดด์ 32.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น เกลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid; HCl) 2 โมลาร์ เตรียมโดยตวงกรดไฮโดรคลอริก 32.9 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นและเกลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในตู้ดูดควัน สารละลายโทลูดีนบลู 0.001 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งโทลูดีนบลู 0.02 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและเกลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมแอซิเตต (Sodium acetate; $C_2H_3O_2$) 2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมแอซิเตต 32.81 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและเกลงในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร สารละลายแต่ละตัวเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยวิธีการเตรียมสารเคมีในงานวิจัยนี้ได้อ้างอิงจากงานวิจัยของ Sunil [14]

2.3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในการทำการทดลองทั้งก่อนและหลังการแช่น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาจะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบบวุ้นแข็ง (Plate Count Agar; PCA; Merck, Germany) ส่วนประกอบของอาหารมีความแตกต่างกันไปแต่โดยทั่วไปประกอบด้วย เพปไทน์ (Peptone) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) กลูโคส (Glucose) และวุ้นเตรียมโดยชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PCA 9.4 กรัม ลงไปในขวดที่มีน้ำกลั่นเตรียมไว้ พร้อมนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งแรงดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดนำออกมาพักในอ่างน้ำร้อน (Water Bath) ป้อนกันไม่ให้อาหารวุ้นแข็งตัว ทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในเพลทพลาสติกสำหรับจุลินทรีย์ขนาด 60×15 มิลลิเมตร

2.3.3 การเตรียมกุ้งขาวแวนนาไม

การทดลองจะใช้กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ขนาดตัว 26–30 ตัวต่อกิโลกรัม ที่หาซื้อได้จากห้างสรรพสินค้าในตัวเมืองเชียงใหม่ หลังจากได้กุ้งมานั้นทำการแช่น้ำแข็ง โดยที่น้ำแข็งถูกห่อด้วยถุงพลาสติกเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำแข็งสัมผัสกับตัวกุ้งโดยตรง และป้องกันการปนเปื้อนจุลินทรีย์จากน้ำแข็ง หลังจากนั้น นำกุ้งที่ได้ปอกเปลือก



พร้อมตัดหัว และพันกึ่งให้มีขนาด $2 \times 2 \pm 0.5$ เซนติเมตร และมีน้ำหนักต่อชิ้นละ 2 ± 0.5 กรัม ผสมให้คละกัน โดยในการเตรียมตัวอย่างกึ่งขาวแวนนาไมในงานวิจัยนี้ได้อ้างอิงจากงานวิจัยของ Kang และคณะ [13]

2.3.4 การทำกราฟมาตรฐานของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

ปิเปตน้ำกลั่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาติสซาร์จ 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที ตัวอย่างละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์และสารละลายไฮโดรคลอริก สารละลายละ 1 มิลลิลิตร เขย่า และตั้งทิ้งไว้ 3 นาที จะได้สารละลายสีเหลือง แล้วเติมสารละลายโทลูดีนบลู 0.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมแอสซิเตต 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีความยาวคลื่น 628 นาโนเมตร จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำกลั่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ และน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาที่ระยะเวลาติสซาร์จต่างๆ เพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาในการทดลองต่อไป (ปรับจาก [14])

การคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถคำนวณได้ดังสมการที่ (2)

$$y = -0.0307x + 0.3843 \quad (2)$$

โดยที่

y คือ ปริมาณความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

x คือ ค่าที่ได้จากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.4 การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกึ่งขาวแวนนาไมโดยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

การใช้น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมายับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกึ่งขาวแวนนาไม โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างกึ่งที่เตรียมไว้จาก 2.3.3 ให้ได้ 10 กรัม ใส่ลงในน้ำ DI เพื่อเป็นชุดควบคุม และ

น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแต่ละเงื่อนไข ปริมาตรอย่างละ 90 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (Orbital Shaker) จากนั้นปิเปตสารละลายออกมา 1 มิลลิลิตร และเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} โดยทั่วไปการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Spread Plate จะนับเชื้อจุลินทรีย์ 30-300 โคโลนี ซึ่งจากการทดลองพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ จึงจะนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-3} โดยปิเปตสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่เตรียมไว้ แล้วนำแท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยบริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วจนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง หลังจากนั้นนำเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ และคำนวณปริมาณการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์ดังสมการที่ (3) [15]

$$CFU/g = \frac{\sum C}{(V_1 n_1 + 0.1 n_2) d} \quad (3)$$

โดยที่

CFU/g คือ จำนวนโคโลนีที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

$\sum C$ คือ ผลรวมของโคโลนีที่นับได้ทั้งหมดบนจานเลี้ยงเชื้อที่นับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

V_1 คือ ปริมาณของสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

n_1 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่รับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นแรก

n_2 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่รับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี ในระดับความเข้มข้นที่สอง

d คือ ระดับความเข้มข้นแรกที่สามารถนับได้ในช่วง 30-300 โคโลนี

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการทดลองการหาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

ผลการทดลองของปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแสดงดังตารางที่ 1

นำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม Minitab 18 โดยผลการวิเคราะห์มีดังนี้

ตารางที่ 1 ผลการออกแบบการทดลองแบบต่อปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

Std. Order	Run Order	Center Pt	Time (min)	Gas Flow (L/min)	H ₂ O ₂ (mg/L)
1	1	1	30	20	1.38
2	2	1	120	20	6.19
3	3	1	30	25	2.19
4	4	1	120	25	12.23
5	5	1	30	20	1.93
6	6	1	120	20	6.56
7	7	1	30	25	1.67
8	8	1	120	25	12.52
9	9	1	30	20	1.25
10	10	1	120	20	6.68
11	11	1	30	25	1.48
12	12	1	120	25	13.1
13	13	0	75	22.5	5.13
14	14	0	75	22.5	4.73
15	15	0	75	22.5	4.63
16	16	0	75	22.5	5.11
17	17	0	75	22.5	5.3

3.1.1 การวิเคราะห์ผลกระทบที่มีผลต่อการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ

การวิเคราะห์ผลกระทบต่อการทดลองสามารถทราบถึงผลกระทบทั้งหมดได้อย่างอิสระ ผลกระทบหลัก (Main Effect) และผลกระทบร่วม (Interaction Effect) โดยได้กำหนดค่าระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($\alpha = 0.05$) ซึ่งการวิเคราะห์ผลกระทบของปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา แสดงดังตารางที่ 2 พบว่า ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง ได้แก่ อัตราการไหลของก๊าซผสมอาร์กอน (A) ระยะเวลาดิสชาร์จ (B) และปัจจัยที่มีผลกระทบร่วมระหว่าง 2 ปัจจัย

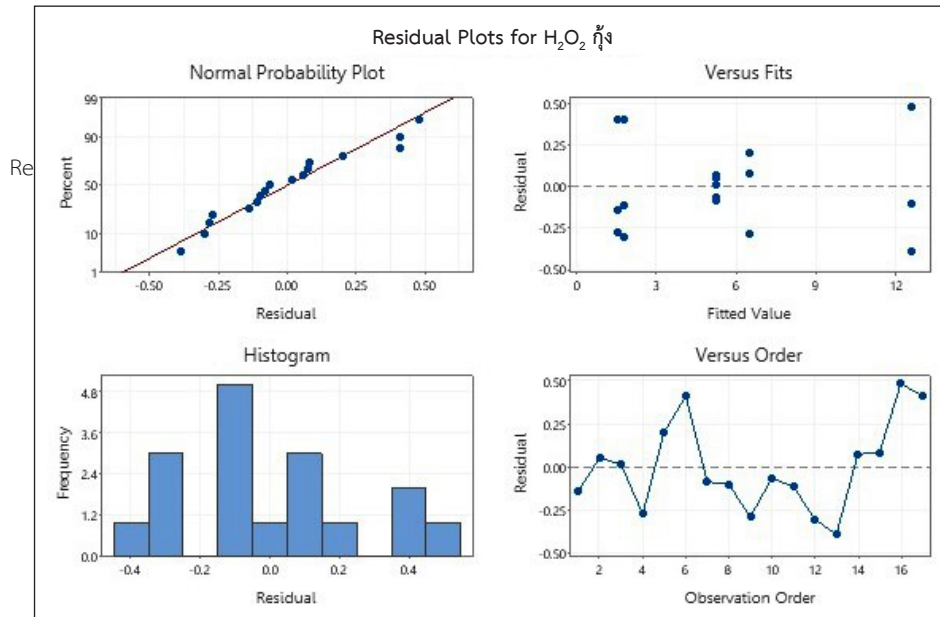
ได้แก่ อัตราการไหลของก๊าซผสมอาร์กอนกับระยะเวลาดิสชาร์จ (AB) ซึ่งมีค่า p -value น้อยกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นสามารถสร้างสมการแบบจำลองได้ดังสมการที่ (3)

$$H_2O_2 = 5.5983 + 1.600A + 3.9483B + 1.4700AB \quad (3)$$

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

Estimated Effect and Coefficients for mg/l (coded units)					
Term	Effect	Coef	SE Coef	T	P
Constant		5.5983	0.0864	64.82	0.000
A	3.2000	1.6000	0.0864	18.53	0.000
B	7.8967	3.9483	0.0864	45.72	0.000
A*B	2.9400	1.4700	0.0864	17.02	0.000
Ct Pt		-0.324	0.159	-2.04	0.064
S = 0.299173, R-sq = 99.56%					
R-sq(adj) = 99.42%, R-sq(pred) = 99.02%					
Analysis of Variance for mg/l (coded units)					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F	P
Main Effect	2	217.792	108.896	1216.65	0.000
A	1	30.720	30.720	343.22	0.000
B	1	187.072	187.072	2090.09	0.000
2-way	1	25.931	25.931	289.72	0.000
A*B	1	25.931	25.931	289.72	0.000
Curvature	1	0.371	0.371	4.15	0.064

3.1.2 การตรวจสอบความเหมาะสมของแบบจำลองเป็นการพิจารณาความเหมาะสมของแบบจำลองจากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ R-Square หรือ R-Square(adj) มีค่าเท่ากับ 99.42 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นยอมรับสมมติฐานหลักที่นัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าแบบจำลองมีความเหมาะสมแล้ว และผลการวิเคราะห์ทางสถิติเกี่ยวกับเส้นโค้งพบว่า ค่าทางสถิติเส้นโค้ง (Curvature) มีค่าเท่ากับ 4.15 และค่า p -value มีค่าเท่ากับ 0.064 จึงยอมรับสมมติฐานหลักที่แสดงว่าแบบจำลอง



รูปที่ 1 ส่วนค้างของแบบจำลองปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา

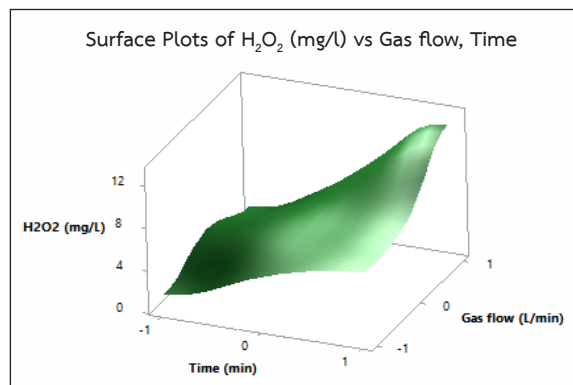
เชิงเส้นเหมาะสมแล้ว

3.1.3 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

การตรวจสอบความเหมาะสมจะถูกสร้างเป็นสมการจำลองเพื่อใช้ตรวจสอบความน่าเชื่อถือของแบบจำลอง แบบจำลองที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพควรที่จะประกอบไปด้วยปัจจัยที่จำเป็น และสามารถทำนายผลที่ปัจจัยต่างๆ ได้ใกล้เคียงกับผลการทดลองจริง แสดงดังรูปที่ 1 พบว่า กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนค้าง (Normal Probability Plot) พบว่า ข้อมูลมีการกระจายตัวมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง ส่วนการตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน (Versus Fits) พบว่า ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบอิสระทั้งด้านบวกและด้านลบ แต่มีลักษณะตำแหน่งที่ซ้ำกัน ซึ่งไม่มีความเกี่ยวข้องกับลำดับในการทดลอง มีการแจกแจงแบบปกติ และส่วนการตรวจสอบความเป็นอิสระต่อกัน (Independent) จากกราฟมีการกระจายตัวของข้อมูลที่ไม่มีแบบแน่นอน ไม่มีแนวโน้ม แสดงถึงการกระจายตัวของข้อมูลไม่ขึ้นอยู่กับลำดับของการทดลอง

3.1.4 การสร้างพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface)

การสร้างพื้นผิวผลตอบของปริมาณความเข้มข้นของ



รูปที่ 2 พื้นผิวตอบระหว่างอัตราการไหลของก๊าซผสมอาร์กอนและระยะเวลาดีสชาร์จจากการจำลองด้วยโปรแกรม

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อเปรียบเทียบกับปัจจัยที่มีนัยสำคัญคือ อัตราการไหลของก๊าซอาร์กอนต่อออกซิเจน และระยะเวลาดีสชาร์จ แสดงดังรูปที่ 2

จากกราฟแสดงขอบเขตพื้นที่ที่ให้ค่ามากที่สุด ขอบเขตที่มีสีเขียวเข้มมีผลต่อปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมามากที่สุด ที่อัตราอัตรา

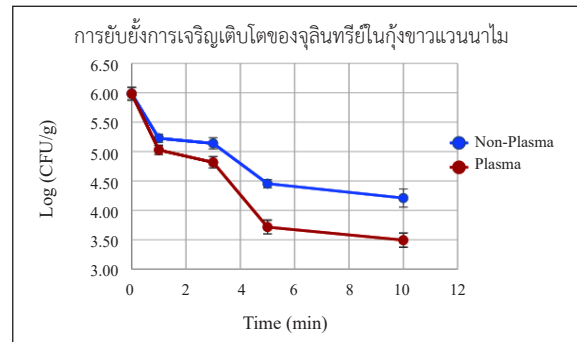
การไหลของก๊าซผสมอาร์กอน 25 ลิตรต่อนาที และระยะเวลาติสซาร์จ 120 นาที ได้ปริมาณความเข้มข้น 12.64 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.2 ผลการทดลองใช้น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมายับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไม

ผลของการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไมของชุดการทดลองแช่น้ำพลาสมาและชุดควบคุมที่ระยะเวลา 1, 3, 5 และ 10 นาที ตามลำดับ ในการทดลองเลือกค่าตามสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ อัตราการไหลของก๊าซผสมอาร์กอน 25 ลิตรต่อนาที และระยะเวลาติสซาร์จ 120 นาที โดยผลการทดลองยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งขาวแวนนาไม แสดงดังรูปที่ 3

ผลการทดลองพบว่า อัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งขาวแวนนาไม โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจากสมการที่ (2) โดยเมื่อระยะเวลาการแช่น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาเพิ่มขึ้น ทำให้อัตราการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น

จากการทดลองแช่ตัวอย่างกุ้งชุดควบคุมเปรียบเทียบกับชุดที่แช่น้ำพลาสมา ซึ่งมีจุลินทรีย์ตั้งต้นในกุ้งทั้งหมด 5.98 Log CFU ต่อกรัม พบว่าระยะเวลาที่ 10 นาที ชุดที่แช่น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดเหลือ 3.49 Log CFU ต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หรือคิดเป็น 41.63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตให้เป็นไปตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร กำหนดให้ค่าปริมาณจุลินทรีย์รวมไม่เกิน 1.0×10^6 CFU ต่อกรัม [16] และ [17] ได้วิเคราะห์การสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ลดลงเหลือ 100 ไมโครโมลาร์ หลังการทดลอง 5 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ [18], [19] ได้รายงานผลว่าปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะค่อยๆ ลดลงที่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเวลา ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่เสถียรเมื่ออยู่สภาวะอุณหภูมิที่สูง ดังนั้นน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาสามารถสลายตัวไม่เกิดการตกค้าง เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีครึ่งชีวิตในช่วง 8–20 วัน [20]



รูปที่ 3 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไมเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ขึ้นอยู่กับปริมาณของความเข้มข้น ผลที่ได้จากการใช้น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาที่แตกต่างกันในอาหารส่วนใหญ่ เนื่องจากปัจจัยที่แตกต่างกันในการผลิตน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมา และความซับซ้อนของโครงสร้างและประสิทธิภาพของจุลินทรีย์และปริมาณของน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาที่ใช้ [21]

4. สรุป

การทดลองยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกุ้งขาวแวนนาไมโดยน้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาแบบ Pinhole Plasma Jet ชนิด 5 หัว และประยุกต์ใช้การออกแบบการทดลองแบบแฟกทอเรียลเต็มจำนวน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งขาวแวนนาไมได้ 41.63 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาทำการทดลอง 10 นาที และสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองนี้ ได้แก่ อัตราการไหลของก๊าซผสมอาร์กอน 25 ลิตรต่อนาที และระยะเวลาติสซาร์จ 120 นาที ดังนั้นเมื่อปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และระยะเวลาการแช่น้ำกระตุ้นด้วยพลาสมาเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก็จะเพิ่มขึ้นตาม และการใช้เทคโนโลยีพลาสมาสามารถยับยั้งการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ให้ผ่านมาตรฐานของการส่งออกอาหารทะเลได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเชิงธุรกิจด้านเทคโนโลยีพลาสมา



สำหรับเกษตรและชีวภาพ อุทยานวิทยาศาสตร์ภาคเหนือ ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้สามารถใช้เครื่องผลิตน้ำกระดุนด้วยพลาสมาแบบ Pinhole Plasma Jet ชนิด 5 หัว และศูนย์วิจัยด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จนสำเร็จจุล่งไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- [1] R. Kongkum. "Production of bacteriocin by *Enterococcus faecalis* ts9s17 and application to inhibit *Listeria monocytogenes* in peeled cooked shrimp," Master's thesis, Department of Biotechnology Sciences, Graduate School, Prince of Songkla University, Songkla, Thailand, 2015.
- [2] H. Hosseini, A. M. Cheraghali, R. Yalfani, and V. Razavilar, "Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran," *Food Control*, vol. 15, No. 3, pp. 187–190, 2004.
- [3] S. Janthima, C. Sawangrat, D. Boonyawan, S. Lumyong, J. Kumla, and N. Suwannarach, "Appropriate parameters of plasma activated water for growth inhibition of *E. coli* by Box-Behnken design," *Engineering Journal Chiang Mai University*, vol. 26, pp. 179–189, 2019 (in Thai).
- [4] L. A. Keskinen, A. Burke, and B. A. Annous, "Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves," *Int J Food Microbiol*, vol. 132, pp 134–140, 2009.
- [5] M. Sireno, E. T. Mársico, M. da Silva Ferreira, M. L. G. Monteiro, H. de Carvalho Vital, C. A. C. Júnior, and S. B. Mano. "Propriedades físico-químicas, sensoriais e bacteriológicas de camarões (*Litopenaeus brasiliensis*) irradiados e armazenados sobrefrigeração," *Rev. Bras. Cienc vet.*, vol. 17, pp. 91–95, 2010.
- [6] J. Shen, Y. Tian, Y. Li, R. Ma, Q. Zhang, J. Zhang, and J. Fang, "Bactericidal effects against *S. aureus* and physicochemical properties of plasma activated water stored at different temperatures," *Sci Rep-UK*, vol. 6, 2016, Art. no. 28505.
- [7] R. Thirumdas, A. Kothakota, U. Annature, K. Silveru, R. Blundell, R. Gatt, and V. P. Valdramidis, "Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture," *Trends Food Sci Technol*, vol. 77, pp. 21–31, 2018.
- [8] Q. Zhang, Y. Liang, H. Feng, R. Ma, Y. Tian, J. Zhang, and J. A. Fang, "Study of oxidative stress induced by non-thermal plasma-activated water for bacterial damage," *Appl Phys Lett*, vol. 102, 2013, Art. no. 203701.
- [9] F. Girard, M. Peret, N. Dumont, V. Badets, S. Blanc, K. Gazeli, C. Noël, and T. Belmonte, "Correlations between gaseous and liquid phase chemistries induced by cold atmospheric plasmas in a physiological buffer," *Phys Chem Chem Phys*, vol. 20, pp. 9198–9210, 2018.
- [10] Z. Machala, B. Tarabová, D. Sersenová, M. Janda, and K. Hensel, "Chemical and antibacterial effects of plasma activated water: Correlation with gaseous and aqueous reactive oxygen and nitrogen species, plasma sources and air flow conditions," *J Phys D Appl Phys*, vol. 52, 2018, Art. no. 034002.
- [11] C. Smet, M. Govaert, A. Kyrylenko, M. Easdani,

- J. L. Walsh, and J. F. Van Impe, "Inactivation of single strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium planktonic cells and biofilms with plasma activated liquids," *Front Microbiol.*, vol. 10, 2019, Art. no. 1539.
- [12] A. Zaribafan, K. Haghbeen, M. Fazli, and A. Akhondali, "Spectrophotometric method for hydrogen peroxide determination through oxidation of organic dyes," *Environmental Studies of Persian Gulf*, vol. 1, no. 15, pp. 93–101, 2014.
- [13] C. Kang, D. Zhao, W. Wang, L. Niu, and Y. Bai, "Inactivation of *Pseudomonas deceptionensis* CM2 on chicken breasts using plasma-activated water," *Food Science and Technology*, vol. 56, pp. 4938–4945, July 2019.
- [14] K. Sunil and B. Narayana, "Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream sample," *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 81, pp. 422–426, 2008.
- [15] H. S. Kim, D. H. Lee, A. Fridman, and Y. I. Cho, "Residual effects and energy cost of gliding arc discharge treatment on the inactivation of *Escherichia coli* in water," *Heat and Mass Transfer*, vol. 77, pp. 1075–1083, 2014.
- [16] Office of the Food and Drug Administration. (2016). Manual for Compliance with the Notification of the Ministry of Public Health (No. 364) 2013 on food standards for microbes causing disease. Office of the Food and Drug Administration. Bangkok, Thailand [Online]. Available: <http://e-library.dmsc.moph.go.th/ebooks/files/micro-ISBN60.pdf>
- [17] P. Lules, E. Dolezalona, I. Sistraova, and M. Clupek, "Aqueous-phase chemical and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: Evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H_2O_2 and HNO_2 ," *Plasma Sources Science and Technology*, vol. 23, no. 1, 2014, Art. no. 015019.
- [18] K. Marouf-Khelifa, F. Abdelmalek, A. Khelifa, M. Belhadj, A. Addou, and J. L. Brisset, "Reduction of nitrite by sulfamic acid and sodium azide from aqueous solutions treated by gliding arc discharge," *Separation and Purification Technology*, vol. 50, no. 3, pp. 373–379, 2006.
- [19] J. Shen, Y. Tian, Y. Li, R. Ma, Q. Zhang, and J. Fang, "Bactericidal effects against *S. aureus* and physicochemical properties of plasma activated water stored at different temperatures," *Scientific Reports*, vol. 6, 2016, Art. no. 28505.
- [20] P. Sun, H. Wu, N. Bai, H. Zhou, R. Wang, H. Feng, and J. Fang, "Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in water by a direct-current, cold atmospheric-pressure air plasma microjet," *Plasma Processes and Polymer*, vol. 9, no. 2, pp. 157–164, 2012.
- [21] N. N. Misra, "Quality of cold plasma treated plant foods," in *Cold Plasma in Food and Agriculture*. Academic Press, 2016, pp. 253–271.