



HACCP กับวิธีการที่รวดเร็วในการวินิจฉัยจุลินทรีย์

HACCP and Rapid Detection Methods for Microorganisms

สิริพร สรณเสาวภาคย์

สถาบันคั้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศเกษตรอุตสาหกรรม สินค้าที่ส่งออกส่วนใหญ่จึงเป็นสินค้าที่มาจาก การเกษตรโดยเฉพาะอาหารที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารได้เจริญก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว ตลาดทั้งในและต่างประเทศได้ขยายตัวขึ้นเป็นลำดับ สามารถนำเงินตราต่างประเทศเข้าสู่ประเทศได้ มาก ตัวอย่างเช่นในปี 2539 มูลค่าการส่งออกของอุตสาหกรรมอาหารทะเลแปรรูปมีมูลค่าสูงถึง 117,400 ล้านบาท อันดับที่ 2 ได้แก่ผักผลไม้สดและแปรรูป 25,725 ล้านบาท อันดับที่ 3 ได้แก่ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกแช่แข็ง 11,180 ล้านบาท ปัญหาที่สำคัญที่มีผลกระทบต่อ การส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารได้แก่ปัญหาของคุณภาพของ สินค้าไม่เป็นที่พอใจตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้าและสาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งเนื่องมาจากลักษณะ อาหารของโรงงานไม่ดีพอ ดังนั้นความสำคัญทางด้านคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารจึงเป็นสิ่งที่ผู้ผลิต จะหลีกเลี่ยงไม่ได้ ในสมัยก่อนโรงงานผลิตอาหารจะจัดตั้งหน่วยควบคุมคุณภาพ (quality control) เพื่อสุ่ม ตัวอย่างในการผลิตออกมาตรวจสอบ และหน่วยประกันคุณภาพ (quality assurance) เพื่อให้แน่ใจว่าระบบ คุณภาพมีประสิทธิภาพอย่างแท้จริง แต่อย่างไรก็ตามการประกันความปลอดภัยของอาหารที่ผลิตยังคงมี ปัญหา ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าความผิดพลาดนั้นเกิดจากกระบวนการผลิตขั้นตอนใด ต้องเสียเวลาในการ แก้ไขปัญหา บางครั้งก็ต้องทิ้งผลิตภัณฑ์ไปเป็นจำนวนมาก จึงได้มีการพัฒนาระบบ HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) มาใช้ในการประกันความปลอดภัยของอาหารให้แก่ผู้บริโภค ซึ่ง ปัจจุบันมีความนิยมอย่างแพร่หลาย ตัวอย่างเช่นประเทศในกลุ่ม EC ได้กำหนดให้ประเทศกลุ่มสมาชิกนำ ระบบ HACCP เข้ามาใช้ภายในปี 2538 หรือสำหรับประเทศไทยเอง โรงงานที่ส่งผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำไป สหรัฐอเมริกาต้องมี HACCP Manual และกำหนด HACCP Plan ภายในวันที่ 18 ธันวาคม 2540

ความเป็นมาของระบบ HACCP

ในปีพ.ศ. 2502 บริษัท Pillsbury เป็นผู้ริเริ่มพัฒนาระบบ HACCP ร่วมกับ National Aeronautics and Space Administration (NASA) เพื่อตอบสนองความต้องการขององค์การ NASA โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อผลิตอาหารที่มีความปลอดภัยต่อนักบินอวกาศ การใช้ระบบ HACCP ในโครงการอวกาศดังกล่าวประสบ- ผลสำเร็จ โดยอาศัยหลักการประเมินว่าอันตรายจะเกิดขึ้น ณ ขั้นตอนใด และมีความร้ายแรงมากน้อยเพียงใด จากนั้นจะใช้วิธีการเฝ้าระวังปัญหาและการตรวจสอบเพื่อควบคุมมิให้อันตรายดังกล่าวเกิดขึ้น

ระบบ HACCP ได้รับการเผยแพร่เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2514 โดย The Nation Conference on Food Protection และต่อมาในปี พ.ศ. 2536 องค์การมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission) ได้มีการปรับปรุงแก้ไขระบบ HACCP เพื่อให้มีเนื้อหาเหมาะสมกับการนำมาประยุกต์ใช้ใน โรงงานอุตสาหกรรมอาหาร

ระบบ HACCP เป็นระบบที่มุ่งเน้นการป้องกันก่อนปัญหาจะเกิดมากกว่าการตรวจสอบผลิตภัณฑ์- สุกสุดท้าย (finished product) ทำให้การตรวจสอบผลิตภัณฑ์สุกสุดท้ายแทบไม่มีความจำเป็น ระบบ HACCP

จึงเกี่ยวข้องกับการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ และกระบวนการผลิต วัตถุประสงค์ของการใช้ระบบ HACCP เพื่อให้สามารถผลิตอาหารที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภค และสามารถพิสูจน์ได้ว่าผลิตภัณฑ์นั้นได้ถูกผลิตขึ้นอย่างถูกต้องลักษณะ และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

หลักการของระบบ HACCP ครอบคลุมถึงการป้องกันปัญหาอันตรายจาก 3 สาเหตุ ได้แก่

1. อันตรายจากสารเคมี เช่น อันตรายจากสารพิษตกค้าง ยาฆ่าแมลงในผักผลไม้
2. อันตรายทางกายภาพ ได้แก่ สิ่งปลอมปนต่างๆ เช่น เศษกรวด ดิน แก้ว ไม้ โลหะ
3. อันตรายทางชีวภาพ ได้แก่ อันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค อันตรายทางชีวภาพนี้

เป็นสิ่งที่ต้องให้ความสำคัญเป็นที่สุดในระบบ HACCP เนื่องจากอันตรายประเภทอื่น มีขอบเขตการก่อให้เกิดปัญหาต่อผู้บริโภคในวงจำกัด และบางครั้งผู้บริโภคสามารถตรวจพบได้ด้วยตนเอง แต่การบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์นั้น อาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้อย่างแพร่หลาย และพิษที่เกิดขึ้นอาจรุนแรงจนถึงเสียชีวิตได้

ระบบ HACCP เป็นระบบที่มุ่งให้เกิดการผลิตอาหารให้ปลอดภัยต่อการบริโภค ประกอบด้วยหลักการ 7 หัวข้อดังนี้

1. การวิเคราะห์อันตรายที่อาจจะเกิดขึ้น (Hazard Analysis) ประเมินอันตรายที่มีแนวโน้มจะเกิดขึ้นในทุกขั้นตอน ตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการผลิต การเก็บรักษา การจัดจำหน่าย และวิธีการเตรียมของผู้บริโภค พร้อมทั้งให้รายละเอียดมาตรการป้องกัน

2. ระบุจุดควบคุมวิกฤต (Critical Control Points) ในกระบวนการผลิต

3. กำหนดค่าจำกัดวิกฤต (Critical Limit) ทุกจุดที่จัดว่าเป็นจุดควบคุมวิกฤตเพื่อใช้ในการควบคุมตามมาตรการป้องกันที่กำหนดไว้

4. กำหนดวิธีการเฝ้าระวัง (Monitoring) โดยกำหนดความถี่ วิธีการตรวจสอบ การบันทึกเกณฑ์กำหนด

5. กำหนดวิธีการแก้ไข (Corrective Action) เมื่อตรวจพบว่าเกณฑ์กำหนดที่ตรวจวัดได้จากการเฝ้าระวังเบี่ยงเบนออกจากมาตรฐานที่กำหนด

6. กำหนดวิธีการทวนสอบ (Verification) เพื่อให้แน่ใจว่าโปรแกรม HACCP ที่จัดทำขึ้นถูกต้องและมีประสิทธิภาพ

7. กำหนดวิธีการจัดเก็บเอกสาร (Record Keeping) และข้อมูลทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับระบบ HACCP

อันตรายจากจุลินทรีย์ในอาหาร (Microbiological hazards in foods)

บทบาทของจุลินทรีย์ในการทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ตลอดจนเป็นสาเหตุของโรค "foodborne disease " เป็นที่ทราบกันอยู่โดยทั่วไป ในช่วงเวลาที่ผ่านมาการรายงานเกี่ยวกับ foodborne disease เริ่มมีปริมาณสูงขึ้นในบางประเทศที่พัฒนาแล้ว (Table 1) มีการตรวจพบ Salmonella และ Campylobacter เพิ่มขึ้น สาเหตุจากการเพิ่มขึ้นมาจากองค์ประกอบหลายอย่าง เช่น การรายงานผลที่มีประสิทธิภาพ การค้าระหว่างประเทศลดจนการเดินทางระหว่างประเทศเพิ่มมากขึ้น การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่ๆ วิธีการบริโภควิธีการค้าขายอาหารแบบใหม่ๆ การเพิ่มขึ้นของผู้ป่วยโรคมุขมิคุ้มกันบกพร่องซึ่งทำให้ติดเชื้อได้ง่าย ตลอดจนการพัฒนาเทคนิควิธีการตรวจวิเคราะห์อย่างมีประสิทธิภาพ การระบาดของ foodborne diseaseสามารถทำลายการค้าขายทั้งในประเทศและระหว่างประเทศได้ ซึ่งจะมีผลต่อการค้าขาย และความเชื่อมั่นของผู้บริโภค

ที่มา : Vanne et al., (1996)

ICMSF (1986) ได้แบ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหารตามความรุนแรงออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

1. อันตรายขั้นรุนแรง มีผลกระทบต่อสุขภาพโดยตรงกับสุขภาพ (severe, direct health hazards) เช่น *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* 0157 : H7, *Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi* และ *S. paratyphi* A and B

2. อันตรายปานกลาง แต่อาจแพร่กระจายได้ (moderate hazards with potentially extensive spread) เช่น *Salmonella* spp, pathogenic *Escherichia coli* (e.g., enterotoxigenic), *Streptococcus pyogenes* และ *Shigella* spp.

3. อันตรายปานกลาง สามารถควบคุมได้ (moderate hazards with limited spread) เช่น *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni* และ *Yersinia enterocolitica*

วิธีการที่รวดเร็วในการวินิจฉัยจุลินทรีย์ (Rapid detection methods for microbes)

วิธีการวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์แบบดั้งเดิม (conventional methods) บางครั้งกินเวลานาน 7-14 วันทำให้บางครั้งไม่สามารถแก้ปัญหาของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้ทันที่ จึงได้มีการพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วเพื่อใช้ในการวินิจฉัยจุลินทรีย์ขึ้น (Table 2) วิธีการที่รวดเร็วนี้อาจจะเป็นการตรวจเซลล์จุลินทรีย์โดยตรง หรือตรวจเมตาโบไลต์ของจุลินทรีย์ จึงแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. วิธีโดยตรง (direct methods) ใช้วิธีการตรวจเซลล์โดยตรงซึ่งอาจจะมีการบ่ม (incubate) หรือไม่ก็ได้ ตัวอย่างของวิธีนี้ได้แก่ Direct epifluorescent filter technique, DEFT (Pettipher, 1983) และ flow cytometry (MacKenzie and Pinder, 1987)

2. วิธีอ้อม (indirect methods) ใช้วิธีวัดเมตาโบไลต์ หรือการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโตของเซลล์ ตัวอย่างของวิธีนี้ได้แก่ ATP bioluminescence (Ogden, 1993) Impedimetry (Fung, 1994) และ Turbidometry (Mattila, 1987) เป็นต้น

ที่มา : Vanne et al., (1996)

วิธีที่รวดเร็วในการวินิจฉัยจุลินทรีย์ สามารถนำไปใช้ได้ทุกขั้นตอนของระบบ HACCP สามารถเก็บข้อมูลได้อย่างรวดเร็ว ทำให้สร้าง in-house data สำหรับประเมินความเสี่ยง (risk assessment) ทางจุลินทรีย์ได้ ปัจจุบันได้มีการคิดค้นวิธีที่รวดเร็ว สำหรับการตรวจสอบ on-line สำหรับระบบ HACCP เช่น biosensors ถ้าขบวนการผลิตหรือเกณฑ์กำหนด (critical limit) เบี่ยงเบนไป วิธีที่รวดเร็วนี้อาจสามารถวินิจฉัยข้อเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้วิธีที่รวดเร็วสามารถใช้กับตัวอย่างที่สุ่มมาเช็คเพื่อพิสูจน์ว่าจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (ccp_s) สามารถควบคุมได้

ในที่นี่จะกล่าวถึงวิธีการที่รวดเร็วในการวินิจฉัยจุลินทรีย์โดยละเอียด

Direct epifluorescence filter technique (DEFT)

วิธีนี้อาหารจะถูกกรองผ่าน membrane ซึ่งบางครั้งเพื่อให้กรองได้ง่ายขึ้นจะมีการใส่ enzyme - surfactant ลงไป ชั้นส่วนใหญ่จะถูกกรองออกไปก่อน (prefiltration) หลังจากนั้นตัวอย่างที่กรองได้นำมาย้อมสี โดยทั่วไปใช้ Acridine Orange (AO) เซลล์ของจุลินทรีย์จะติดสีเรืองแสง (orange fluorescing) วิธีนี้สามารถต่อเข้ากับกล้องจุลทรรศน์เพื่อให้เกิดระบบภาพอัตโนมัติ เช่น Bio - Foss Automated System (Foss Electric, Denmark) หรือ COBRA system (Biocom, France) ซึ่งสามารถตรวจวินิจฉัยได้ 150 ตัวอย่าง

ภายในเวลา 1 ชั่วโมง วิธี DEFT นี้ถูกนำมาใช้ในอาหารหลายๆ อย่าง เช่น นม และผลิตภัณฑ์นม รวมถึงพวกเครื่องดื่มต่าง ๆ (beverages)

ข้อดีของ DEFT คือมีความไวค่อนข้างสูง (sensitivity) ในทางทฤษฎี 1 เซลล์ของจุลินทรีย์ก็สามารถตรวจพบได้ แต่ในทางปฏิบัติค่าที่สามารถตรวจพบได้ (detection limit) จะอยู่ระหว่าง 1×10^3 เซลล์ /มล. ข้อเสียของวิธีนี้คือราคาของเครื่องมือค่อนข้างสูง

Flow cytometry

เทคนิคของวิธีนี้อาศัยทั้งกล้องจุลทรรศน์ และการตรวจทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ในของเหลว เซลล์จะวิ่งในของเหลว (fluid stream) ผ่านแสงเลเซอร์ซีนอน (xenon) หรือ mercury arc ลำแสงจะกระจายเมื่อผ่านเซลล์ และความเข้มของแสงที่เปลี่ยนไปจะสามารถวัดได้ เซลล์อาจติดฉลากด้วย fluorochromes DNA ที่ย้อมสีหรือ fluorescent antibodies สามารถใช้ติดฉลากเซลล์เป้าหมาย (target cells) การแยกเซลล์เป้าหมายออกจาก background material ทำได้โดยใช้วิธีการ immunomagnetic separation

วิธีการนี้ค่อนข้างรวดเร็วมาก ใช้เวลาเพียง 30 นาที ข้อได้เปรียบที่สำคัญสำหรับ flow cytometry คือสามารถทำได้หลายๆ ตัวอย่างภายในเวลาไม่กี่นาที flow cytometry เหมือนกับวิธี DEFT คือส่วนมากจะใช้กับ นมดิบ เนื้อสัตว์ และอาหารทั่วไป ส่วนค่าที่สามารถตรวจพบได้ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร เช่น นมดิบมีค่าอยู่ระหว่าง 10^4 CFU/ml เนื้อสัตว์ 10^5 CFU/ml โยเกิร์ต 10^2 CFU/ml และเครื่องดื่มมีค่าอยู่ระหว่าง $5.0 \times 10^1 - 1.4 \times 10^4$ CFU/ml

Impedimetry

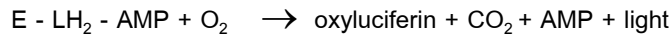
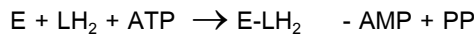
Impedance microbiology ใช้หลักการที่ว่าในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะทำให้ประจุไฟฟ้าเปลี่ยนไป Impedance มีพารามิเตอร์ 2 ส่วนคือ conductance (G) และ capacitance (C) การเปลี่ยนแปลงของ conductivity วัดได้ทั้งโดยตรงและโดยอ้อม ในการวัดโดยตรงโมเลกุลของอาหารจะถูกย่อยเป็นประจุไฟฟ้าเล็กๆ ซึ่งเป็นผลจากเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถวัด conductivity ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไป แต่อย่างไรก็ตามจำนวนของจุลินทรีย์จะต้องถึงระดับชั้น $10^5 - 10^6$ CFU /ml จึงจะสามารถวัดได้ จุดที่การเปลี่ยนแปลงจะเห็นได้เรียก detection time กรณีนีของ conductance curve จะแตกต่างจาก growth curve เล็กน้อย เนื่องจากจะเริ่มต้นจากเซลล์จุลินทรีย์ 10^6 CFU/ml

ส่วนวิธีโดยอ้อม ขึ้นอยู่กับการผลิต CO_2 โดยเชื้อจุลินทรีย์ CO_2 จะถูกดูดโดยสารละลายต่าง และวัดการลดลงของ conductivity ในสารละลาย ข้อแตกต่างจากวิธีวัดโดยตรงคือ การวัด CO_2 จะวัดได้เร็วกว่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้า ทำให้ลดระยะเวลาและมีความไวสูง และไม่จำเป็นต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะเหมือนวิธีโดยตรง

วิธี Impedance ได้รับการยอมรับในทางจุลชีววิทยาทางอาหารมากมายเช่น " The Malthus Salmonella " ได้รับการยอมรับในขั้นแรกโดย AOAC นอกจากนี้ยังใช้กับเชื้ออื่นๆ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* และ *Campylobacter* เป็นต้น ส่วนวิธีโดยอ้อมนำมาใช้กับอาหารชนิดที่มีการปนเปื้อนน้อย เช่น น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม Deak and Beuchat (1995) พบว่า lower detection limit ต่ำถึง 1 เซลล์/10 มล. ก็เป็นไปได้ ถ้าตัวอย่างมีการ pre-incubated ก่อน

ATP bioluminescence

เป็นวิธีการวัด ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งสกัดได้จากเซลล์ ปริมาณของ ATP วัดโดยอาศัยปฏิกิริยา luciferin-luciferase system โดยมี Mg^{2+} และ light energy เป็น catalyst วิธีการนี้รวดเร็วมาก ใช้เวลาเพียงไม่กี่วินาที สำหรับการนำไปใช้ในด้านสุขลักษณะ และน้อยกว่า 1 ชั่วโมงสำหรับการวิเคราะห์ ตัวอย่าง แต่มีข้อจำกัดคือ ATP จะอยู่ในเซลล์ที่มีชีวิตทุกชนิด ดังนั้น ATP ในตัวอย่างจะปนกับ ATP ของเซลล์ ดังนั้นต้องมีการกำจัดโดยการใช้เอ็นไซม์ก่อนที่จะวิเคราะห์



E = luciferase

E - LH₂ - AMP = enzyme bound luciferyl - adenylate

LH₂ = luciferin

PP = pyrophosphate

ปริมาณแสงที่ปล่อยออกมาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ ATP การวินิจฉัย ATP จะบอกแค่จำนวนคร่าวๆ ของจุลินทรีย์ แต่ไม่สามารถแยกจุลินทรีย์ได้ ในทางทฤษฎีจำนวนของ ATP ต่ำสุดประมาณ 100 fg (10^{-13} g) สามารถวัดได้ ซึ่งจะเท่ากับจุลินทรีย์จำนวน 100 เซลล์ ในทางปฏิบัติความไวจะอยู่ระหว่าง 1,000 fg (10^{-12} g) ซึ่งจะเท่ากับ 1,000 เซลล์แบคทีเรีย เซลล์ซึ่งเจริญหรืออยู่ในช่วง stationary growth phase จะมี ATP น้อยซึ่งจะมีผลต่อการวิเคราะห์ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณ ATP ในตัวอย่างสามารถประมาณค่าเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลัง active ซึ่งจะสำคัญมาก เมื่อเราศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

เทคโนโลยีของ ATP นิยมใช้ในโรงงานเพื่อควบคุมสุขลักษณะของพื้นผิวโรงงาน ผลจะออกมาภายในไม่กี่วินาที และจะเป็นตัวแทนสุขลักษณะของโรงงาน (Simpson et al., 1989)

Immunological methods

เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ที่อาศัยหลักการปฏิกิริยาจำเพาะของการจับตัวกันของ แอนติบอดี กับ แอนติเจน แบ่งออกได้เป็นหลายประเภทเช่น

1. Latex agglutination วิธีการนี้จะใช้แอนติบอดีเคลือบ latex particles ถ้ามีแอนติเจนจะทำปฏิกิริยา agglutinate กับ latex particles ภายในเวลาไม่กี่นาที (Huis in't Veld and Hofstra , 1991)

2. Enzyme immunoassay เป็นวิธีการที่ตรวจหาแอนติเจน โดยอาศัยปฏิกิริยาเอ็นไซม์ ใช้เอ็นไซม์เป็น marker เพื่อให้เห็นปฏิกิริยา แอนติเจน-แอนติบอดี ชัดเจนยิ่งขึ้น ข้อเสียของวิธีนี้คือ ทุกๆ ขั้นตอนของการ assay จะต้องมีการล้าง (washing) ซึ่งจะทำให้งานหนักเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเทคนิคทาง immunological ก่อนข้างได้รับการเชื่อถือ เนื่องจากความไว ความจำเพาะ และความรวดเร็ว Table 3 แสดงถึง test kits ที่ผลิตออกมาเป็นการค้า โดยอาศัยหลักการของ ELISA , immunodiffusion และ dip - stick technology ซึ่งส่วนใหญ่ได้รับการยอมรับในระดับแรก (first action) โดย AOAC

ที่มา : Vanne et al., (1996)

Gene technology

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคทาง molecular biology มาใช้ในจุลชีววิทยาทางอาหารเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตัวอย่างเช่น เทคนิคของ DNA hybridization โดยใช้ DNA probe ที่สร้างขึ้นตรวจหา DNA target ที่จำเพาะกัน ที่ผลิตออกมาเป็นการค้าเช่น ชุดตรวจหา Salmonella , S. aureus , Y. enterocolitica,

E. coli , *Listeria* และ *C. jejuni* เป็นต้น อย่างไรก็ตาม detection level ของวิธีนี้จะอยู่ประมาณ 10^5 - 10^6 CFU/ml. และขั้นตอนในการ enrichment ก็ยังจำเป็นอยู่

วิธีใหม่อีกวิธีที่น่าสนใจคือ การเพิ่มจำนวน DNA หรือ RNA ทำให้สามารถตรวจจับ target DNA หรือ RNA ได้ วิธีนี้เรียกว่า Poly-merase Chain Reaction (PCR) วิธีการขึ้นกับการซ้ำ cycle ของการแยก DNA สายคู่ให้เป็นสายเดี่ยว (denaturation) การให้ primer เข้าเกาะ DNA สายเดี่ยว (primer annealing) และขั้นสุดท้ายคือการสร้าง สาย DNA โดยอาศัย primer Tag Polymerase และ DNA template (primer extension) ปฏิกริยา PCR ที่ใช้ RNA probe จะมีข้อดีมากกว่าเนื่องจาก RNA-DNA hybrids จะ stable มากกว่า DNA-DNA ข้อดีของ PCR คือ ค่อนข้างไวและจำเพาะ และด้วยการใช้ระบบอัตโนมัติ สามารถทำ PCR เสร็จภายใน 1 วัน แต่จากการที่ค่อนข้างไว ทำให้มีข้อเสียคือ เกิด cross- contamination โดย external DNA และอีกข้อคือ ไม่สามารถแยก genetic material ของเซลล์ที่ตายแล้วจากเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ข้อเสียจากเทคนิคดังกล่าว PCR จึงยังไม่นิยมนำมาใช้ในงานประจำของห้องปฏิบัติการของโรงงาน เนื่องจากปัญหาการปนเปื้อน และวิธีการค่อนข้างยุ่งยาก

Future prospects (มองไปในอนาคต)

เป็นที่ทราบกันดีว่า การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารนั้นมีปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องมากมาย และบางปัจจัยก็มีผลกระทบกับอีกปัจจัยหนึ่ง ดังนั้นการใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์(mathematical models) สามารถใช้ศึกษาผลกระทบของแต่ละปัจจัย ทำให้สามารถทำนายหรือคาดคะเนการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเฉพาะอย่าง ทำให้เกิดสาขาใหม่ทางจุลชีววิทยาที่เรียกว่า "Predictive Microbiology " (McClure et al., 1994)

Predictive Microbiology เป็นวิชาที่ว่าด้วยการคาดคะเนจุลินทรีย์ โดยสามารถใช้ mathematical model รวมกับความรู้ทางด้าน microbial ecology microbial physiology ทำนายหรือคาดคะเนปริมาณ จุลินทรีย์ อัตราการเจริญเติบโต ปริมาณการผลิตทอกซิน ฯลฯ ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ กัน เช่น อุณหภูมิ % เกลือ pH A_w ทำให้สามารถทำนาย shelf life ของอาหาร ตลอดจนทำให้ทราบถึงความปลอดภัยในการบริโภคอาหารนั้น แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน HACCP โปรแกรม ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ปัจจุบันมีผู้ผลิต models ต่างๆ เป็นการค้าเช่น "The Pathogen Modeling Program" เป็น model ที่ผลิตโดย USDA Food Safety group ใน Philadelphia PMP เป็น spreadsheet- software-based system ซึ่งเป็น model สำหรับการศึกษาดัชนีผลของอุณหภูมิ pH A_w ปริมาณไนเตรต และ ปริมาณออกซิเจน ต่อการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* , *C. botulinum* , *E. coli* O157 และ *Y. enterocolitica* เป็นต้น software นี้จะทำนาย growth curves generation time lag time และ population density ของเชื้อเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ยังมี "Food Micromodel" ผลิตโดย Ministry of Agriculture , UK., "Pseudomonas Predictor" ผลิตโดย University of Tasmania, Australia เป็นต้น

นอกจากนี้การพัฒนาของระบบ biosensors ซึ่งประกอบด้วย sensing element และ transducer ตัว sensing element ซึ่งเรียกตัวรับ อาจประกอบด้วย แอนติบอดี เอ็นไซม์ หรือ DNA transducer จะแปรผลสัญญาณที่เปลี่ยนไปบน sensor โดย electrochemical electric optical หรือ thermal เทคนิค

ดังนั้น biosensors สามารถนำมาใช้ " on - line " ในระบบควบคุมการผลิต เนื่องจากความไวและความรวดเร็ว แต่ biosensors ก็ยังมีข้อจำกัดในแง่ความคงตัว การนำกลับมาใช้ใหม่ และการทำให้ปราศจากเชื้อ (Goldschmidt , 1993)

บทสรุป

ความสำเร็จในการนำเอา HACCP plan และ rapid methods ในการควบคุมจุลินทรีย์มาใช้ทำให้เจ้าของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร สามารถผลิตอาหารที่มีคุณภาพ โดยลดงานในห้องปฏิบัติการ และลดค่าใช้จ่ายโดยรวมทั้งหมดได้มาก ผลประโยชน์นอกจากโรงงานจะได้รับแล้ว ผู้บริโภคเองก็ได้รับด้วย โดยจะมีความปลอดภัยในการบริโภคอาหารเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม rapid methods หลายวิธียังต้องการการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางและลึกซึ้งก่อนจะนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการของโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

บรรณานุกรม

- Deak, T. and Beuchat, L.R. 1995. Modified indirect conductimetric technique for detecting low populations of yeasts in beverage concentrates and carbonated beverages. *Food Microbiol.* 12: 165-172.
- Fung, D.Y.C. 1994. Rapid methods and automation in food microbiology : a review. *Food Rev. International* 10: 3,357-375.
- Huis in't Veld, J. and Hofstra, H. 1991. Biotechnology and the quality assurance of foods. *Food Biotechnol.* 5 (3): 313-322.
- Goldschmidt, M.C. 1993. Biosensors : blessing or bane ? J. Rapid Meth. Automat. *Microbiol.* 2: 9-15.
- ICMSF. 1986. Microorganisms in Foods 2. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), Univ. of Toronto Press : Canada.
- MacKenzie, N.M. and Pinder, A.C. 1987. Flow cytometry and its applications in veterinary medicine. *Research in Veterinary Science* 42:31-139.
- Mattila, T. 1987. Automated turbidometry - a method for enumeration of bacteria in food samples. *J. Food Prot.* 50: 640-642.
- McClure, P.J., Blackburn, C. de W., Cole, M.B., Curtis, P.S., Jones, J.E., Legan, D.E., Ogden, I.D., Peck, M.W., Roberts, T.A., Sutherland, J.P. and Walker, S.J. 1994. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods; the Food MicroModel approach. *Int. J. Food Microbiol.* 23(3/4): 265-275.
- Ogden, K. 1993. Practical experiences of hygiene control using ATP bioluminescence. *J. Inst. Brew.* 99: 389-393.
- Pettipher, G.L. 1983. The Direct Epifluorescent Filter Technique for the Rapid Enumeration of Microorganisms. *Research Studies Press Ltd.* Letchworth, England, 193 pp.
- Simpson, W.J., Hammond, J.R.M., Thurston P.A. and Kyriakides, A.L. 1989. Brewery process control and the role of "instant" microbiological techniques. *Proceedings of the European Brewery Convention, Zurich 1989*, IRL Press, 663pp.
- Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S. and Sjoberg, A.M. 1996. HACCP-based food quality and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control.* 7(6): 263-276.