

จุลชีววิทยาทางอาหารและการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
Food Microbiology and Microbiological Analysis

สุรีย์ นานาสมบัติ

ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2568

จุลชีววิทยาทางอาหารและการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
Food Microbiology and Microbiological Analysis

สุรีย์ นานาสมบัติ

ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2568

คำนำ

หนังสือจุลชีวินวิทยาทางอาหารและการวิเคราะห์ทางจุลชีวินวิทยาเล่มนี้ ผู้เขียนได้เรียบเรียงขึ้นเพื่อให้ประกอบการสอนบรรยายวิชานี้ให้กับนักศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาจุลชีวินวิทยาอุตสาหกรรม ชั้นปีที่ 3 เนื้อหาที่สำคัญของหนังสือเล่มนี้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในอาหาร ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์ การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ ก่อโรค การควบคุมคุณภาพอาหารทางจุลชีวินวิทยา การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารด้วยวิธีที่รวดเร็ว ระบบ HACCP เพื่อความปลอดภัยด้านอาหารและโพรไบโอติก พรีไบโอติกและโอสไบโอติก ซึ่งผู้เขียนได้รวบรวมเนื้อหาจากตำราจุลชีวินวิทยาทางอาหารที่ทันสมัยทั้งในและต่างประเทศ ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าหนังสือเล่มนี้จะเป็นประโยชน์ต่อนักศึกษาและผู้สนใจทั่วไป ความดีของหนังสือเล่มนี้ ผู้เขียนขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่และคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ให้กับผู้เขียน

สุริย์ นานาสมบัติ

มิถุนายน 2568

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 ความสำคัญ ประวัติและแหล่งของจุลินทรีย์ในอาหาร	1
บทที่ 2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร	25
บทที่ 3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์	63
บทที่ 4 จุลินทรีย์ในอาหารชนิดต่างๆ	97
บทที่ 5 การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารโดยวิธีทางกายภาพ.....	135
บทที่ 6 การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารโดยใช้สารถนอมอาหาร	179
บทที่ 7 โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร.....	227
บทที่ 8 การควบคุมคุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา	275
บทที่ 9 การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ในอาหารด้วยวิธีที่รวดเร็ว	285
บทที่ 10 ระบบ HACCP เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร.....	301
บทที่ 11 โพรไบโอติก พรีไบโอติกและโพสไบโอติก.....	339

บทที่ 1

ความสำคัญ ประวัติและแหล่งของจุลินทรีย์ในอาหาร

จุลชีววิทยา (Microbiology) คือวิทยาศาสตร์สาขาชีววิทยาที่ศึกษาเกี่ยวกับการมีอยู่และความสำคัญของจุลินทรีย์เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ ไวรัส โปรโตซัวและสาหร่าย จุลินทรีย์เป็นจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของห่วงโซ่อาหารที่ซับซ้อนของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ห่วงโซ่อาหารนี้เริ่มขึ้นที่ใดก็ตามที่มีสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้ร่วมกับการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเกลือแร่ในการสร้างสารอาหารโมเลกุลใหญ่เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ส่วนจุลชีววิทยาทางอาหาร (Food Microbiology) เป็นวิชาจุลชีววิทยาแขนงย่อยที่ศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารและอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่อจุลินทรีย์ในอาหาร ในช่วง 20 ปีที่ผ่านมา ได้พบจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารมากขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการนำระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP) มาใช้เพื่อควบคุมความปลอดภัยด้านอาหารตลอดกระบวนการผลิตเพื่อให้มั่นใจว่าอาหารที่ผลิตขึ้นมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และยังได้ใช้วิธีการตรวจหาจุลินทรีย์โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุศาสตร์และอิมมูโนวิทยา ร่วมกับการทดสอบทางชีวเคมี ทำให้ทราบผลได้เร็วขึ้น^{1, 2}

จุลินทรีย์มีอยู่บนและในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งสิ่งแวดล้อมโดยรอบ จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตชนิดแรกที่อาศัยอยู่บนโลก อาศัยอยู่พร้อมกับมนุษย์และสัตว์ และจะยังคงอยู่หลังจากที่มนุษย์และสัตว์ตายไปโดยจะเพิ่มจำนวนเซลล์ เปลี่ยนแปลงโมเลกุลต่าง ๆ ให้เป็นสารประกอบเพื่อการเจริญ จุลินทรีย์ช่วยควบคุมจำนวนสัตว์และพืชชั้นสูงโดยเข้าไปอาศัยอยู่และก่อให้เกิดโรค เมื่อพืชและสัตว์ตาย ไม่ช้าก็เร็วจะเน่าเปื่อย ถูกย่อยสลายให้สารโมเลกุลเล็กกว่าออกมาและถูกนำไปใช้อีกครั้งโดยพืช มนุษย์มีผลเล็กน้อยต่อวงจรการเจริญเติบโตและการเน่าเปื่อยผุพังของสิ่งมีชีวิต แต่มนุษย์ไม่สามารถอยู่ได้ถ้าไม่มีจุลินทรีย์ แบคทีเรียที่สังเคราะห์แสงได้จะช่วยตรึงคาร์บอนให้อยู่ในรูปที่นำไปใช้ได้และทำให้เกิดออกซิเจนปริมาณมาก *Rhizobium* species ช่วยตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้อยู่ในรูปของแอมโมเนียซึ่งสิ่งมีชีวิตนำไปใช้ได้ เอนไซม์ทำให้สัตว์เคี้ยวเอื้องย่อยเซลลูโลสได้ จุลินทรีย์ช่วยย่อยสลายสิ่งมีชีวิตที่ตายแล้วหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้โดยเปลี่ยนเป็นสารประกอบพื้นฐานของจุลินทรีย์เองซึ่งจะถูกนำไปใช้ซ้ำแล้วซ้ำอีก จุลินทรีย์ในลำไส้ของมนุษย์ช่วยย่อยอาหาร ผลิตวิตามินและป้องกันการเกาะติดของจุลินทรีย์ก่อโรค สรุปลักษณะชีวิตของพวกเราไม่ได้อยู่ในสภาวะปลอดภัย แต่อาศัยอยู่ในโลกของจุลินทรีย์²

1.1 ความสำคัญของจุลินทรีย์ในอาหาร

อาหารทุกชนิดส่วนใหญ่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน จุลินทรีย์ในอาหารรวมถึงจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในวัตถุดิบและจุลินทรีย์ที่เข้าสู่อาหารในระหว่างกระบวนการผลิตตั้งแต่การเก็บเกี่ยวหรือการฆ่าสัตว์ การแปรรูป การเก็บรักษาและการจำหน่าย ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในอาหารขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร การเข้าสู่อาหาร การเจริญเติบโต การอยู่รอด และการทำปฏิกิริยากับอาหาร จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารมีทั้งประเภทที่ให้โทษคือ ทำให้อาหารเสียและก่อให้เกิดโรคกับคน สัตว์และพืช และประเภทที่ให้ประโยชน์คือ ทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ต้องการเช่น มีบทบาทในการหมักอาหารและการถนอมอาหารทางชีวภาพ¹

1.1.1 การเสียของอาหาร (food spoilage)

การเสียของอาหารคือ กระบวนการที่อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจนกระทั่งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเช่น สีของอาหารเปลี่ยนไป เกิดเมือกที่ผิว เกิดโคโลนีของจุลินทรีย์เจริญขึ้น เกิดการสลายโครงสร้างของอาหาร เกิดการบวมของภาชนะที่บรรจุอาหารนั้น อาหารมีกลิ่นและรสชาติผิดปกติ การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดขึ้นได้จากการกระทำของจุลินทรีย์ในอาหารรวมทั้งเอนไซม์ที่ทนความร้อน อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการอาหารที่ผ่านการแปรรูปไม่มากนักและอาหารที่เก็บรักษาไว้ได้นาน การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างขั้นตอนการแปรรูปอาหารทำให้อาหารมีโอกาสเสียมากขึ้นและมีการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ชนิดใหม่ สิ่งเหล่านี้ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ¹

1.1.2 การก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (foodborne disease)

จุลินทรีย์ก่อโรคอาจปนเปื้อนลงในอาหารในระหว่างขั้นตอนการผลิต การแปรรูป การเก็บรักษา และการขนส่งอาหาร อาหารที่มาจากสัตว์มักก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษมากกว่าอาหารที่มาจากพืช สิ่งที่ทำให้มีโอกาที่จะเกิดการระบาดของโรคหรือเกิดจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดใหม่ ได้แก่ การผลิตอาหารปริมาณมาก การนำเทคโนโลยีใหม่ๆ มาใช้ในกระบวนการแปรรูปและการเก็บรักษา การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของการบริโภคและการส่งออกอาหารไปจำหน่ายยังต่างประเทศ¹

1.1.3 การแปรรูปอาหารทางชีวภาพ (food bioprocessing)

การผลิตอาหารหมัก ได้ทำกันมานานโดยอาศัยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์จากธรรมชาติในการหมักวัตถุดิบจากพืชและสัตว์ ปัจจุบันมีแนวโน้มที่จะผลิตอาหารหมักโดยการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อให้เกิดการหมักที่รวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ดีโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม มีการนำเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตอาหารและวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) และมีการใช้เทคนิคด้านพันธุศาสตร์เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่ดีจากแหล่งต่างๆ¹

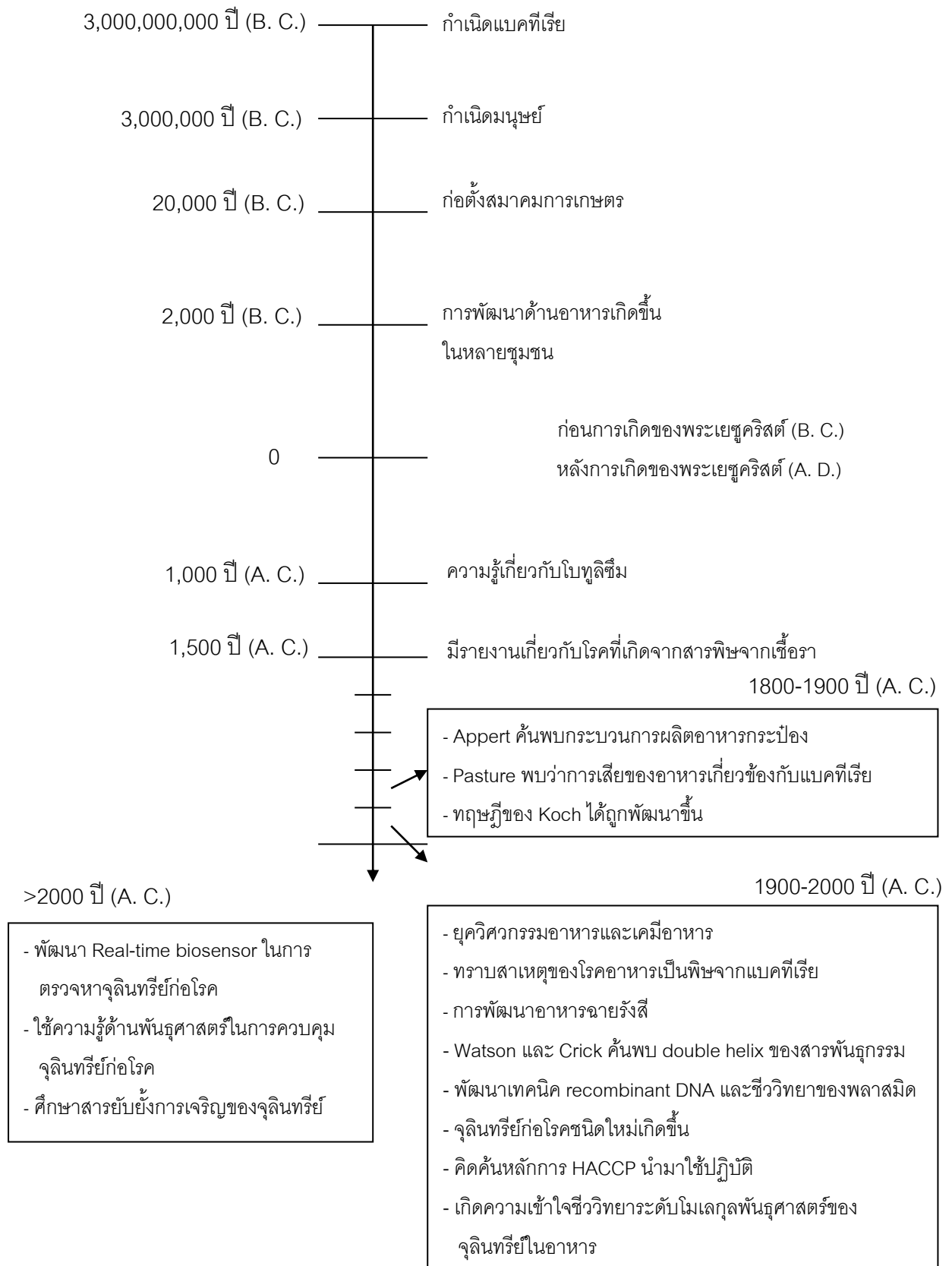
1.1.4 การถนอมอาหารทางชีวภาพ (food biopreservation)

การถนอมอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต้องกระทำเพื่อให้มีอาหารเพียงพอต่อประชากรของโลกที่เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะถ้าหากสามารถหาวิธีที่ทำให้เก็บถนอมอาหารไว้ได้นานโดยไม่เน่าเสีย ก็จะทำให้ประชากรโลกมีอาหารรับประทานมากขึ้น ปัจจุบันการถนอมอาหารทางชีวภาพเป็นการแก้ปัญหาการเน่าเสียของอาหารวิธีหนึ่งเช่น การนำสารยับยั้งที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในอาหารโดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย¹

1.2 ประวัติของจุลชีววิทยาทางอาหารตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (History of food Microbiology)

ประวัติความเป็นมาด้านจุลชีววิทยาทางอาหารเป็นเรื่องราวน่าสนใจ (รูปที่ 1.1) นักจุลชีววิทยาทางอาหารควรเข้าใจถึงวิวัฒนาการด้านวิทยาศาสตร์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มนุษย์ในสมัยก่อนได้เผชิญกับปัญหาการเน่าเสียของอาหารและการเกิดโรคอาหารเป็นพิษมานานแล้วตั้งแต่ยุคก่อนวิทยาศาสตร์ (prescientific era) ซึ่งก็คือยุคก่อนที่จะมีการค้นพบแบคทีเรีย ในยุคแรกเริ่มนี้อาจแบ่งได้เป็น 2 ช่วงเวลาคือ ช่วงเวลาที่มีการรวบรวมอาหาร (food-gathering period) และช่วงเวลาที่มีการผลิตอาหาร (food-producing period) ช่วงเวลาที่มีการรวบรวมอาหารเริ่มตั้งแต่ช่วงกำเนิดมนุษย์คือมากกว่า 1 ล้านปีจนถึง 8,000 ปีที่ผ่านมา ในช่วงเวลานี้คาดว่ามนุษย์กินเนื้อสัตว์เป็นอาหารต่อมาภายหลังจึงกินพืชเป็นอาหารและยังเป็นช่วงเวลาที่มนุษย์รู้จักการหุงต้มอาหารเป็นครั้งแรก³

การศึกษาค้นคว้าเพื่อหาว่าการผลิตอาหารเริ่มขึ้นเมื่อใดนั้นได้ดำเนินมาอย่างต่อเนื่อง จากหลักฐานทางโบราณคดีซึ่งมีอายุระหว่าง 18,300-17,000 ปี พบว่าในช่วงนั้นมีการปลูกข้าวบาร์เลย์ในหุบเขาไนล์ (Nile Valley) ใกล้เมืองอัสวาน (Aswan) ซึ่งมีแม่น้ำไนล์ (รูปที่ 1.2) ไหลผ่านประเทศอียิปต์ การเลี้ยงสัตว์ได้เริ่มขึ้นเมื่อช่วง 8,000-10,000 ปีที่ผ่านมา และมีหลักฐานว่าเมื่อประมาณ 3,000 ปีก่อนคริสตกาล ชาว Sumer (ปัจจุบันคือ อิรัก) ได้พัฒนาการเกษตรเช่น สร้างคลองชลประทานเพื่อการเพาะปลูกพืชและเป็นชนกลุ่มแรกที่ทำปศุสัตว์โดยได้เลี้ยงสัตว์ที่ให้น้ำนมและผลิตเนย (butter) ขึ้นเป็นครั้งแรก ชนกลุ่มนี้สามารถย้ายที่เลี้ยงสัตว์จากที่หนึ่งไปยังอีกที่หนึ่งได้และทำการฆ่าสัตว์ได้ตามต้องการ สมัยนั้นฝูงสัตว์มีค่ามากเปรียบเสมือนเงิน สามารถใช้แทนเงินได้เช่นเดียวกับเกลือ ช่วงเวลานี้มนุษย์มีความพยายามที่จะถนอมอาหาร เป็นช่วงที่เปลี่ยนจากยุคล่าและรวบรวมอาหารมาเป็นยุคเกษตร ในช่วงนี้เริ่มมีการผลิตขนมปัง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์และอาหารหมักอื่นๆ มีการถนอมเนื้อและปลาโดยการทำแห้งและเติมเกลือทำให้เก็บไว้ได้นาน มนุษย์เริ่มเข้าใจว่าควรเก็บอาหารไม่ให้สัมผัสกับอากาศ แสงและความชื้น แต่ไม่ทราบเหตุผลว่าทำไมควรทำเช่นนั้น อาหารบางชนิดได้ถูกถนอมรักษาไว้ให้เก็บได้นานโดยการเคลือบน้ำผึ้งหรือโคลน และต่อมาเก็บไว้ในน้ำมันมะกอก เกลือได้กลายเป็นสิ่งที่มีค่าเช่นเดียวกับเงินเนื่องจากสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์และมีประโยชน์ในการถนอมอาหาร^{3, 4}



รูปที่ 1.1 วิวัฒนาการด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร

ที่มา: Hartman (1997) ⁴

ช่วงเวลาที่มีการผลิตอาหารได้เริ่มขึ้นในช่วงประมาณ 8,000 ถึง 10,000 ปีที่ผ่านมา ปัญหาการเน่าเสียของอาหารและโรคอาหารเป็นพิษคาดว่าจะเกิดขึ้นในช่วงแรกของยุคนี้ ส่วนปัญหาการแพร่กระจายของเชื้อซึ่งมีสาเหตุมาจากการเก็บรักษาอาหารอย่างไม่เหมาะสมทำให้เกิดการเน่าเสียอย่างรวดเร็ว โดยพบเห็นการเน่าเสียของอาหารอย่างชัดเจนเมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อนคริสตกาลและในช่วงประมาณ 5,000 ปีก่อนคริสตกาลมนุษย์ได้ฝึกผลิตเครื่องปั้นดินเผา (รูปที่ 1.3 B) ขวาน (รูปที่ 1.3 A และ 1.3 C) โดยกลุ่มชนแถบตะวันออกใกล้ได้นำความรู้มาสู่ยุโรปตะวันตก เชื่อกันว่าหม้อหุงต้มใบแรกมีกำเนิดประมาณ 8,000 ปีก่อนคริสตกาล และในช่วงเวลานี้มนุษย์ได้เริ่มหุงต้มธัญชาติหมักเบียร์และเก็บรักษาอาหาร หลักฐานแรกที่แสดงถึงการผลิตเบียร์โดยกลุ่มชนบาบิโลเนียโบราณ (ancient Babylonia) พบว่าเกิดขึ้นประมาณ 7,000 ปีก่อนคริสตกาล ชาวอียิปต์ได้ใช้นม เนย และเนยแข็ง (cheese) เป็นอาหารกันมานานแล้วตั้งแต่ 3,000 ปีก่อนคริสตกาล ชาวยิวได้ใช้เกลือจากทะเล Dead sea (รูปที่ 1.4) ในการถนอมอาหารหลายชนิด ชาวจีนและชาวกรีกเริ่มรับประทานปลาเค็มเป็นอาหาร ชาวกรีกได้ถ่ายทอดความรู้นี้ให้กับชาวโรมันซึ่งทำเนื้อดองเกลือ (pickle meats) เป็นอาหาร ชาวจีนโบราณและชาวบาบิโลเนียโบราณได้ผลิตและรับประทานไส้กรอกหมัก วิธีการถนอมอาหารอีกวิธีหนึ่งที่เกิดขึ้นในระหว่างช่วงเวลานี้คือ การใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันงาในการถนอมอาหาร ชาวจีนได้รู้จักใช้หิมะในการเก็บรักษาผักสดและอาหารที่เน่าเสียง่ายชนิดอื่น มนุษย์ยังรู้จักใช้วิธีการรมควันช่วยในการถนอมอาหารประเภทเนื้อ และรู้จักการผลิตเนยแข็งและไวน์ในช่วงเวลานี้ แต่ก็ยังเป็นที่ยสงสัยว่ามนุษย์ในยุคนั้นเข้าใจเกี่ยวกับทฤษฎีการถนอมอาหารเหล่านี้หรือไม่ และยังคงสงสัยอีกว่ามนุษย์มีความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของอาหารในการแพร่กระจายเชื้อโรคหรือเข้าใจเกี่ยวกับอันตรายจากกินเนื้อสัตว์ที่ติดเชื้อโรคหรือไม่³



รูปที่ 1.2 แม่น้ำไนล์ที่ไหลผ่านเมืองอัสวาน ประเทศอียิปต์

แม่น้ำไนล์เป็นแม่น้ำที่ไหลไปทางเหนือของประเทศอียิปต์ไปลงทะเลเมดิเตอร์เรเนียน

(A)

(B)



(C)



รูปที่ 1.3 การประดิษฐ์ของมนุษย์ในยุคก่อนคริสตกาล

- (A) หินที่มนุษย์ยุคหินเอามาทำขวาน (Stone age ช่วง 40,000-10,000 ปีที่ผ่านมา)
- (B) เครื่องปั้นดินเผา ที่ผลิตในยุค Chalcolithic age ช่วง 4500-3300 ปีก่อนคริสตกาล
- (C) หินลักษณะต่างๆที่มนุษย์ยุคหินเอามาทำขวาน



รูปที่ 1.4 A-D ทะเลสาบเดดซี (Dead sea) หรือทะเลมรณะ

ภาพถ่ายเป็นทะเลสาบน้ำเค็มที่มองจากฝั่งประเทศจอร์แดน(รูปที่ 1.4 A) ด้านซ้ายแดนของประเทศจอร์แดนทางตะวันออก ฝั่งตรงข้ามด้านเวสต์แบงก์เป็นเขตประเทศอิสราเอลทางตะวันตก เป็นทะเลสาบที่มีความเค็มที่สุดในโลก มีความเข้มข้นของเกลือสูงกว่าร้อยละ 30 น้ำกว่ายน้ำสามารถลอยตัวได้ในน้ำทะเลเดดซี (รูปที่ 1.4 B) โดยไม่จม และเมื่อสังเกตจะเห็นคราบของเกลือปริมาณมากแห้งติดบนก้อนหินที่อยู่ริมชายฝั่ง (รูปที่ 1.4 C-D) ทำให้ไม่มีสิ่งมีชีวิตใดๆสามารถอยู่ในทะเลเดดซีได้ยกเว้นเชื้อราและแบคทีเรีย

ระยะต่อมาในช่วงที่มีการกำเนิดพระเยซูจนถึง ค.ศ. 1100 มนุษย์มีความเข้าใจกันมากขึ้นเกี่ยวกับการเกิดโรคอาหารเป็นพิษและการเน่าเสียของอาหาร จากนั้นต่อมาในยุคกลางได้เกิดโรค Ergot poisoning ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Claviceps purpurea* ที่เจริญบนข้าวไรน์และธัญชาติชนิดอื่นทำให้คนเสียชีวิตจำนวนมาก โดยเฉพาะในปี ค.ศ. 943 ประเทศฝรั่งเศสมีคนเสียชีวิตด้วยโรคนี้

จำนวนมากกว่า 40,000 คน แต่ในช่วงนั้นยังไม่ทราบว่าสารพิษที่ก่อโรคนี้นี้ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อรา สำหรับด้านเนื้อสัตว์ ในปี ค. ศ. 1248 ชาวสวิสเซอร์แลนด์ได้เริ่มตระหนักว่าเนื้อประเภทใดเป็นเนื้อที่สามารถจำหน่ายได้และประเภทใดเป็นเนื้อที่ไม่สามารถจำหน่ายได้ จากนั้นต่อมาในปี ค. ศ. 1276 ได้มีการออกกฎหมายข้อบังคับเกี่ยวกับการฆ่าสัตว์และสิ่งที่จะต้องถูกตรวจสอบเพื่อมาใช้ในเมือง Augsburg ประเทศเยอรมัน อย่างไรก็ตามช่วงศตวรรษที่ 13 นั้นแม้ว่าประชาชนจะทราบเกี่ยวกับคุณภาพของเนื้อสัตว์บ้าง แต่ก็ยังเป็นที่ยังสงสัยกันว่าประชาชนมีความรู้ในด้านความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของเนื้อสัตว์กับจุลินทรีย์หรือไม่³

บุคคลคนแรกที่ได้ชี้ให้เห็นถึงบทบาทของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการเสียของอาหารคือ พระที่มีชื่อว่า Athanasius Kircher ในปี ค.ศ. 1658 เขาได้ตรวจสอบซากสัตว์ เนื้อสัตว์ นํ้านมและสารอื่น ๆ ที่เน่าเปื่อยด้วยกล้องจุลทรรศน์ในยุคนั้น เขาได้สังเกตเห็นสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ มากมายซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เขาเรียกสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นว่า “หนอน (worm)” แต่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ที่เขาใช้ในสมัยนั้นต่ำมาก การอธิบายของเขาจึงไม่ชัดเจนทำให้ผลการสังเกตของเขาไม่ได้รับการยอมรับมากนัก ต่อมาในปี ค.ศ. 1765 Lazzaro Spallanzani ได้แสดงให้เห็นว่าการต้มเนื้อเป็นเวลาหลายชั่วโมงแล้วบรรจุและปิดผนึกในภาชนะปลอดเชื้อจะทำให้เนื้อไม่เกิดการเน่าเสีย การค้นพบของเขาได้ลบล้างทฤษฎีการเกิดขึ้นได้เองของสิ่งมีชีวิต (spontaneous generation of life) แต่คนที่เชื่อในทฤษฎีเกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตที่กำเนิดขึ้นได้เองนี้ไม่ยอมรับข้อสังเกตของ Spallanzani เขาได้โต้แย้งว่าสิ่งมีชีวิตต้องการอากาศ เป็นเพราะมือออกซิเจนไม่เพียงพอในภาชนะปลอดเชื้อที่ใช้บรรจุเนื้อจึงทำให้สิ่งมีชีวิตไม่สามารถเกิดขึ้นได้ตามทฤษฎี spontaneous generation จากนั้นใช้เวลาอีก 100 ปีต่อมา ทฤษฎีนี้จึงถูกพิสูจน์ว่าไม่จริงโดย Louis Pasteur ซึ่งเขาได้ทำการทดลองของ Spallanzani ซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยใช้ฟลาสก์ที่มีคอโค้งงอในการทดลอง ทำให้อากาศเข้าสู่ฟลาสก์ได้แต่จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าได้ และในปี ค.ศ. 1854 Schroeder ได้ทดลองให้อากาศผ่านได้โดยกรองอากาศด้วยสำลี การทดลองของบุคคลทั้งสองนี้ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้แม้แต่ในสภาพที่มีอากาศ²⁻⁴

ต่อมาในปี ค.ศ. 1795 ได้เกิดเหตุการณ์ที่นำไปสู่การค้นพบกรรมวิธีการผลิตอาหารกระป๋อง เมื่อรัฐบาลฝรั่งเศสได้เสนอรางวัล 12,000 ฟังก์ สำหรับผู้ที่ค้นพบเทคนิคใหม่ที่ใช้ได้ดีในการถนอมอาหารและบุคคลสำคัญในประวัติศาสตร์ของการค้นพบเทคนิคการทำอาหารกระป๋อง (canning process) ก็คือ Francois (Nicholas) Appert (ค. ศ. 1749-1841) ชาวฝรั่งเศสซึ่งทำงานในโรงผลิตไวน์ของบิดาของเขา Appert และพี่น้องอีก 2 คนได้ตั้งโรงผลิตเบียร์ขึ้นในปี ค. ศ. 1778 และในปี ค. ศ. 1784 เขาได้เปิดร้านขายขนมหวานขึ้นในกรุงปารีสต่อมาได้เปลี่ยนเป็นธุรกิจค้าส่ง เขาค้นพบกระบวนการถนอมอาหารในช่วงระหว่างปี ค.ศ. 1789-1793 ในปี ค. ศ. 1805 Appert ได้ประสบความสำเร็จในการถนอมเนื้อในขวดแก้วปากกว้างโดยการต้มในน้ำเดือด การค้นพบว่าอาหารจะไม่เน่าเสียถ้าให้ความร้อนในภาชนะที่ปิดสนิทนี้ได้ถูกเผยแพร่ในปี ค. ศ. 1810 เมื่อเขาได้จดลิขสิทธิ์

เกี่ยวกับวิธีการของเขา การค้นพบนี้ได้นำไปสู่การเริ่มต้นของเทคนิคการผลิตอาหารกระป๋องที่รู้จักกันดี และใช้กันอยู่ทุกวันนี้ และในปีเดียวกัน P. Durand จากประเทศอังกฤษได้จดลิขสิทธิ์การใช้กระป๋อง ดีบุกสำหรับการแปรรูปอาหารที่ผ่านความร้อน ขณะนั้นทั้ง Appert และ Durand ยังไม่ทราบเหตุผลว่าทำไมอาหารที่ผ่านความร้อนจึงไม่เน่าเสีย ต่อมา I. Solomon ผู้ผลิตกระป๋องชาวเมืองบัลติมอร์ได้ปรับปรุงกระบวนการผลิตอาหารกระป๋องของ Appert ในปี ค. ศ. 1860 ทำให้สามารถเพิ่มกำลังการผลิตอาหารป่องได้ 2,500-20,000 กระป๋องต่อวัน กระบวนการนี้ได้มีการเติมแคลเซียมคลอไรด์ในน้ำที่ให้ความร้อนกระป๋องจากอุณหภูมิน้ำเดือด (100°C) ถึง 116°C การเพิ่มอุณหภูมินี้ช่วยลดเวลาในการให้ความร้อนอาหารลงจาก 6 ชั่วโมงเหลือ 25-40 นาที จากนั้นในปี ค.ศ. 1853 R. Chevalier-Appert ได้จดลิขสิทธิ์การสเตอริไลซ์อาหารที่อุณหภูมิสูงภายใต้ความดันในหม้อหนึ่งอัดความดัน (autoclave) ต่อมาในปี ค. ศ. 1874 ได้มีการแนะนำให้ใช้หม้อหนึ่งฝาเพื่อใช้ในทางการค้าระดับอุตสาหกรรม (commercial retorts)^{3,4}

หลังจากการค้นพบเทคนิคการผลิตอาหารกระป๋องประมาณ 50 ปี Louis Pasteur ได้แสดงให้เห็นถึงบทบาทของจุลินทรีย์ในการเน่าเสียของไวน์ฝรั่งเศส ซึ่งเหตุการณ์นี้ได้ทำให้มีการค้นพบแบคทีเรียอีกครั้ง นับจากครั้งแรกที่ Antonie van Leeuwenhoek ชาวเนเธอร์แลนด์ที่ได้สังเกตเห็นแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในปี ค. ศ. 1683 แล้วนั้น Louis Pasteur เป็นคนแรกที่เข้าใจการมีจุลินทรีย์และบทบาทของจุลินทรีย์ในอาหาร ในปี ค.ศ. 1837 เขาได้แสดงให้เห็นว่าการเสียของน้ำนมมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ และต่อมาในปี ค.ศ. 1860 เขาได้ทดลองใช้ความร้อนเป็นครั้งแรกในการทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในไวน์และเบียร์ กระบวนการนี้ก็คือ กระบวนการพาสเจอร์ไรส์ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีในปัจจุบัน กระบวนการพาสเจอร์ไรส์ได้ถูกนำมาใช้ทางการค้าเป็นครั้งแรกระหว่างปี ค.ศ. 1867-1868 ในการให้ความร้อนไวน์เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และในปี ค. ศ. 1867 Martin ได้ค้นพบทฤษฎีการบ่มเนยแข็งโดยจุลินทรีย์²⁻⁴

ประวัติการพัฒนาเทคนิคทางจุลชีววิทยาได้เริ่มขึ้นในปี ค. ศ. 1854 เมื่อ Heinrich Schröder และ Theodore von Dusch ได้ใช้สาลีในการปิดหลอดทดลองและฟลasks เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในหลอดอาหารเหลวที่ผ่านความร้อน ต่อมาในปี ค.ศ. Louis Pasteur ได้พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวขึ้นเป็นครั้งแรกและในปี ค. ศ. 1876 Car Weigert ได้ใช้ methylene blue ในการย้อมสีแบคทีเรีย จากนั้นในปี ค. ศ. 1877 Ferdinand Cohn ได้แสดงให้เห็นการต้านทานความร้อนของเอนโดสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ต่อมา Joseph Lister ได้แยกเชื้อ *Streptococcus* (ปัจจุบันคือ *Lactococcus lactis*) ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการทำเจือจาง (serial dilution) และในช่วงปี ค. ศ. 1880-1889 Robert Koch ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าแบคทีเรียเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคโดย Koch เป็นคนแรกที่แยกเชื้ออหิวาต์ (*Vibrio cholera*) ได้ระหว่างการเกิดโรคระบาด เขาได้พิสูจน์ว่าแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเขาได้แยกแบคทีเรียที่สงสัยว่าก่อโรคจากสัตว์ที่เป็น

โรคจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำไปฉีดใส่ในร่างกายของสัตว์ที่แข็งแรงจนทำให้สัตว์ที่แข็งแรงนั้นป่วยเป็นโรค จากนั้นจึงแยกแบคทีเรียนี้ออกมาอีกครั้งจากสัตว์ที่ติดเชื้อ จุลชีววิทยาสภณานั้นจึงได้เน้นการศึกษาเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวในรูปของเชื้อบริสุทธิ์ นอกจากนี้ Robert Petri ผู้ช่วยในห้องปฏิบัติการของ Koch ได้ทำการประดิษฐ์จานเพาะเชื้อ (petri dish) และพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งขึ้นเป็นครั้งแรก ในช่วงนั้นผู้ที่ทำงานในห้องปฏิบัติการของ Koch พบปัญหาการไม่แข็งแรงของเจลาตินที่ใช้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการตรวจหาจุลินทรีย์ เจลาตินที่ใช้มักจะถูกทำให้เหลวโดยเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดเนื่องจากการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเจลาติน ดังนั้นนายแพทย์คนหนึ่งชื่อ Walter Hesse (ที่ได้ร่วมงานในห้องปฏิบัติการของ Koch เพื่อศึกษาแบคทีเรียในอากาศ) ได้แนะนำให้ทดลองใช้วุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากประสบการณ์ของเขาและภรรยาที่ได้ใช้วุ้นในการทำให้เย็มและเยลลี่ขึ้นขึ้น^{2, 5}

ในปี ค.ศ. 1896 E. van Ermengem ได้ค้นพบว่า *Clostridium botulinum* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคโบทูลิซึม (botulism) ที่ยังคงเป็นปัญหาจนกระทั่งถึงปี ค.ศ. 1920-1929 และในช่วงครึ่งแรกของศตวรรษที่ 20 ได้มีการค้นพบแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้แก่ *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ *Clostridium perfringens* และในระหว่างปี ค.ศ. 1930-1939 พบว่าไวรัสสามารถก่อให้เกิดโรคได้ ในช่วงกลางศตวรรษที่ 20 James Watson และ Francis Crick ได้ค้นพบโครงสร้างของ DNA ซึ่งทำให้มีการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลกันมาก สิ่งนี้ค้นพบนี้ทำให้เข้าใจกันมากขึ้นว่าแบคทีเรียก่อให้เกิดโรคได้อย่างไร ทำให้ค้นพบวิธีการตรวจหาแบคทีเรียโดยอาศัยปฏิกิริยาของแอนติบอดี (antibody-based detection method) การใช้ genetic fingerprints” เป็นเครื่องมือช่วยในการศึกษาด้านระบาดวิทยา และการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการดัดแปลงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเพื่อปรับปรุงคุณลักษณะให้เหมาะสมต่อการผลิตสารต่างๆ²

ระยะต่อมาในช่วงต้นศตวรรษที่ 20 ได้มีการศึกษาด้านจุลินทรีย์กันมากขึ้นเพื่อที่จะได้เข้าใจความเกี่ยวข้องและความสำคัญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร จึงทำให้มีการพัฒนาวิธีการที่จะใช้แยกเชื้อและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ และยังได้ตระหนักถึงความสำคัญของการสุขาภิบาลอาหารเพื่อที่จะลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาวิธีการป้องกันการเจริญ การทำลายแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรค และยังมีความเข้าใจที่จะแยกจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ออกมาเพื่อใช้ในการทำอาหารหมักโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมหมัก จากนั้นหลังจากช่วงปี ค.ศ. 1950-1959 นักจุลชีววิทยาอาหารก็ได้เข้าสู่ยุคใหม่ที่มีข้อมูลพื้นฐานด้านคุณลักษณะทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และคุณลักษณะทางด้านชีววิทยาอื่น ๆ ของอาหารหลายชนิด การกระทำของจุลินทรีย์ในอาหาร การศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ การศึกษาด้านชีวเคมี พันธุศาสตร์และอิมมูโนวิทยาทำให้จุลชีววิทยาทางอาหารเข้าสู่ยุคใหม่ของการวิจัยที่ทันสมัยหลาย ๆ ด้านดังนี้⁶

ก) ด้านการหมักอาหารได้แก่ 1) การพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเมแทบอลิกที่พึงประสงค์โดยการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ 2) การพัฒนาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนต่อแบคทีเรียเทอริโอฟลาสก์ 3) การพัฒนาวิธีการเพื่อใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในการขนส่งโปรตีนของระบบภูมิคุ้มกัน 4) การศึกษาลำดับยีนของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียเทอริโอฟลาสก์ 5) การศึกษาการถนอมอาหารทางชีวภาพโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์และสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ 6) การศึกษาเพื่อที่จะให้เข้าใจถึงคุณลักษณะที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกและ 7) การศึกษาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกล้าเชื้อสำหรับการใช้ในการแปรรูปอาหาร⁶

ข) ด้านการเสียของอาหารได้แก่ การจำแนกชนิดและการควบคุมเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียชนิดใหม่ที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหาร การศึกษาการเน่าเสียอันเนื่องมาจากเอนไซม์ในอาหารแช่แข็งและอาหารแช่เย็น การพัฒนาวิธีการในระดับโมเลกุล (นาโนเทคโนโลยี) ในการจำแนกชนิดของสารเมแทบอลิต์ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และการทำนายอายุการเก็บของอาหารและการศึกษาความสำคัญของสภาพเครียดจากสิ่งแวดล้อมต่อการต้านทานสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย⁶

ค) ด้านการก่อให้เกิดโรคของจุลินทรีย์ได้แก่ การศึกษาวิธีการเพื่อที่จะตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร การประยุกต์ใช้เทคนิคด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและสิ่งแวดล้อมด้วยวิธีที่รวดเร็ว การศึกษาวิธีการตรวจสอบและการควบคุมไวรัสที่มีในอาหาร การศึกษาศักยภาพในการแพร่เชื้อโรคจากสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารมาสู่คน การศึกษาความสำคัญของสภาพเครียดในสิ่งแวดล้อมต่อการตรวจสอบและการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่ต้านทานสารปฏิชีวนะในอาหาร การเกาะติดของจุลินทรีย์ก่อโรคบนอาหารและผิวหนังของอุปกรณ์ กลไกในการก่อโรคของจุลินทรีย์ วิธีการที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษและการควบคุมปรสิตที่ก่อโรคในอาหาร⁶

ง) การวิจัยด้านอื่นๆ ได้แก่ การใช้ประโยชน์ของ HACCP ในการแปรรูปและการถนอมอาหาร การใช้เทคโนโลยีใหม่ในการแปรรูปอาหาร การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารพร้อมรับประทานที่ไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนหรืออาหารที่ผ่านความร้อนต่ำ การควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารจากฟาร์มถึงโต๊ะอาหารหรือการจัดการด้านคุณภาพทั้งหมดและการใช้กฎข้อบังคับด้านความปลอดภัยของอาหาร⁶

ประวัติการพัฒนาด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร

ประวัติการพัฒนาด้านจุลชีววิทยาทางอาหารด้านการถนอมอาหาร การเสียของอาหาร และการเกิดโรคอาหารเป็นพิษโดยละเอียดตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันแสดงตามลำดับดังต่อไปนี้³

การถนอมอาหาร

ค.ศ. 1782 - นักเคมีชาวสวีเดนแนะนำการเทคนิคการทำน้ำส้มสายชูบรรจุกระป๋อง

- ค.ศ. 1810 - Appert ได้จดลิขสิทธิ์เทคนิคการถนอมอาหารโดยการบรรจุกระป๋องในประเทศฝรั่งเศส
- Peter Durand ได้จดลิขสิทธิ์การถนอมอาหารในขวดแก้ว กระป๋องดีบุกหรือโลหะชนิดอื่น
- ค.ศ. 1813 - Donkin Hall และ Gamble ได้แนะนำเทคนิคการปฏิบัติหลังการแปรรูปอาหารกระป๋อง
- ในระหว่างช่วงเวลานี้มีการเริ่มใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในการถนอมเนื้อ
- ค.ศ. 1825 - T. Kensett และ E. Daggett ได้รับทุน U.S. patent เพื่อถนอมอาหารในกระป๋องดีบุก
- ค.ศ. 1835 - Newton ได้ลิขสิทธิ์การทำนมระเหย (condensed milk) ในประเทศอังกฤษ
- ค.ศ. 1837 - Winslow เป็นคนแรกที่ทำข้าวโพดบรรจุกระป๋อง
- ค.ศ. 1839 - ได้มีการใช้กระป๋องดีบุกกันอย่างแพร่หลายในสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1840 - ได้เริ่มนำปลาและผลไม้มาบรรจุกระป๋อง
- ค.ศ. 1842 - H. Benjamin ได้จดลิขสิทธิ์การแช่แข็งอาหารโดยการจุ่มในน้ำแข็งและน้ำเกลือ
- ค.ศ. 1843 - มีการสเตอริไลส์ด้วยไอน้ำเป็นครั้งแรกโดย I. Winslow ในรัฐ Maine ของสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1845 - S. Elliott ได้แนะนำเทคนิคการบรรจุกระป๋องให้กับประเทศออสเตรเลีย
- ค.ศ. 1853 - R. Chevallier-Appert ได้ลิขสิทธิ์การสเตอริไลส์อาหารโดยใช้หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
- ค.ศ. 1854 - Pasteur เริ่มศึกษาไวน์ ได้มีการนำกระบวนการให้ความร้อนมาใช้ในการถนอมครั้งแรก
เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ
- ค.ศ. 1855 - Grimwade ในประเทศอังกฤษได้ผลิตนมผงเป็นครั้งแรก
- ค.ศ. 1856 - Gail Borden ได้จดลิขสิทธิ์การผลิตนมระเหยน้ำชนิดไม่หวานในสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1865 - ได้ทำการแช่แข็งปลาทางการค้าเป็นครั้งแรก
- ค.ศ. 1874 - เริ่มมีการใช้น้ำแข็งในการขนส่งเนื้อเป็นครั้งแรก และเริ่มมีการนำหม้อนึ่งความดันไอน้ำ
(steam pressure cookers หรือ retort) มาใช้
- ค.ศ. 1878 - ที่เก็บสินค้าสำหรับขนส่ง (cargo) อันแรกสำหรับเก็บเนื้อแช่แข็งได้ถูกส่งมาจากประเทศ
ออสเตรเลียไปยังประเทศอังกฤษและเมื่อปี ค.ศ. 1882 ที่เก็บสินค้าอันแรกได้ถูกส่งมา
จากประเทศนิวซีแลนด์ไปยังประเทศอังกฤษ
- ค.ศ. 1880 - การพาสเจอร์ไรส์นมได้เริ่มขึ้นในประเทศเยอรมัน
- ค.ศ. 1882 - Krukowitch เป็นคนแรกที่บันทึกผลของไอโซนในการทำลายแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสีย
- ค.ศ. 1889 - การพาสเจอร์ไรส์นมทางการค้าได้เริ่มขึ้นในสหรัฐอเมริกา และการแช่เย็นผลไม้ได้เริ่มขึ้น
ในเมือง Chicago
- ค.ศ. 1908 - สหรัฐอเมริกาได้ประกาศอย่างเป็นทางการให้โซเดียมเบนโซเอตเป็นสารถนอมอาหาร
ได้ในอาหารบางชนิด
- ค.ศ. 1916 - ชาวเยอรมันชื่อ R. Plank, E. Ehrenbaum และ K. Reuter ได้ประสบความสำเร็จในการ
แช่แข็งอย่างรวดเร็ว

- ค.ศ. 1928 - การเก็บรักษาแอปเปิ้ลโดยการควบคุมสภาพบรรยากาศได้เริ่มขึ้นทางการค้าเป็นครั้งแรกในยุโรป (ปี ค.ศ. 1940 ได้เริ่มขึ้นเป็นครั้งแรกในนิวยอร์ก สหรัฐอเมริกา)
- ค.ศ. 1954 - ได้มีการจดสิทธิบัตรให้ใช้นิซิน (nisin) ได้ในเนยแข็งแปรรูป (processed cheese) บางชนิดเพื่อควบคุมเชื้อ *Clostridium*
- ค.ศ. 1955 - ได้มีการยอมรับให้ใช้กรดซอร์บิก (sorbic acid) เป็นสารถนอมอาหาร
- ค.ศ. 1967 - ได้มีการออกแบบเครื่องมืออุปกรณ์สำหรับฉายรังสีอาหารในสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1988 - ในสหรัฐอเมริกาได้มีการบันทึกว่า ให้นิซินในอาหารได้อย่างปลอดภัย
- ค.ศ. 1990 - เนื้อสัตว์ปีกฉายรังสีอาหารได้รับการยอมรับในสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1997 - เนื้อวัวสดฉายรังสีสูงสุด 4.5 kGy และเนื้อแช่แข็งฉายรังสีสูงสุด 7.0 kGy ได้รับการยอมรับในสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1997 - องค์การอาหารและยาได้ประกาศให้ใช้ไอโซนในอาหารได้อย่างปลอดภัย
- การเน่าเสียของอาหาร
- ค.ศ. 1659 - Kircher ได้แสดงให้เห็นถึงการมีแบคทีเรียในนม
- ค.ศ. 1680 - Leeuwenhoek เป็นคนแรกที่เห็นเซลล์ยีสต์
- ค.ศ. 1780 - Scheele ได้ระบุว่ากรดแลคติกเป็นกรดชนิดหลักที่มีในนมเปรี้ยว
- ค.ศ. 1836 - Latour ได้ค้นพบการมีอยู่ของยีสต์
- ค.ศ. 1839 - Kircher ได้ตรวจสอบน้ำบีตรูต (beetroot) ที่เกิดเมือกและพบสิ่งมีชีวิตที่สร้างเมือกเมื่อนำมาเลี้ยงในสารละลายชูโครส
- ค.ศ. 1857 - Pasteur ได้แสดงให้เห็นว่าการเปรี้ยวของนมมีสาเหตุมาจากการเจริญของสิ่งมีชีวิต
- ค.ศ. 1873 - มีการรายงานครั้งแรกโดย Gayon เกี่ยวกับการเน่าเสียของไข่โดยจุลินทรีย์
- Lister เป็นคนแรกที่แยกเชื้อ *Lactococcus lactis* ให้อยู่ในรูปของเชื้อบริสุทธิ์
- ค.ศ. 1878 - Cienkowski ได้รายงานการศึกษาด้านจุลชีววิทยาเป็นครั้งแรกของเมือก (sugar slime) และได้แยก *Leuconostoc mesenteroides* จากเมือกนั้น
- ค.ศ. 1895 - Von Geuns ได้บันทึกครั้งแรกถึงการตรวจหาจำนวนแบคทีเรียในน้ำนมในเมืองอัมสเตอร์ดัม ประเทศเนเธอร์แลนด์
- ค.ศ. 1915 - B.W. Hammer ได้แยก *Bacillus coagulans* เป็นครั้งแรกจากน้ำนมที่เกิดเคิร์ด
- ค.ศ. 1917 - P.J. Donk ได้แยก *Geobacillus stearothermophilus* เป็นครั้งแรกจากซูปข้าวโพด
- ค.ศ. 1933 - Oliver และ Smith ในอังกฤษได้สังเกตการเน่าเสียของอาหารโดยการกระทำของ *Byssoschlamys fulva* ที่ได้ถูกอธิบายเป็นครั้งแรกโดย D. Maunder ในสหรัฐอเมริกา
- การเกิดโรคอาหารเป็นพิษ
- ค.ศ. 1820 - The German poet Justinus Kerner ได้อธิบายความเป็นพิษของไส้กรอก (ซึ่งมีความ

เป็นไปได้ที่จะเป็นโรค botulism) และทำให้มีอัตราการตายสูง

ค.ศ. 1857 - W. Taylor of Penrith ในประเทศอังกฤษได้พบว่าน้ำมันเป็นตัวแพร่กระจายไข้ไทฟอยด์

ค.ศ. 1888 - Gaertner เป็นคนแรกที่ได้แยก *Salmonella Enteritidis* จากเนื้อซึ่งเป็นสาเหตุของการป่วยเป็นโรคอาหารเป็นพิษของคนไข้ 57 คน

ค.ศ. 1894 - T. Denys ได้แยก *Staphylococcus* ที่เกี่ยวข้องกับโรคอาหารเป็นพิษเป็นครั้งแรก

ค.ศ. 1896 - van Ermengem เป็นคนแรกที่ได้ค้นพบ *Clostridium botulinum*

ค.ศ. 1904 - G. Landman เป็นคนแรกที่จำแนกชนิดของ *C. botulinum* Type A

ค.ศ. 1906 - ได้มีการพบโรคอาหารเป็นพิษจาก *Bacillus cereus*

ค.ศ. 1926 - Linden, Turner และ Thom ได้รายงานครั้งแรกเกี่ยวกับโรคอาหารเป็นพิษโดยเชื้อ *Streptococci*

ค.ศ. 1937 - L. Bier และ E. Hazen ได้จำแนกชนิดของ *C. botulinum* Type E
- ได้มีการพบโรค paralytic shellfish poisoning

ค.ศ. 1938 - ในรัฐ Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการพบว่าโรคระบาดจาก *Campylobacter enteritidis* มีสาเหตุมาจากน้ำมัน

ค.ศ. 1939 - Schleifstein และ Coleman ได้พบว่าโรค gastroenteritis มีสาเหตุมาจาก *Yersinia enterocolitica*

ค.ศ. 1945 - McClung เป็นคนแรกที่ได้พิสูจน์ว่าเชื้อ *Clostridium perfringens* (welchii) ก่อโรคอาหารเป็นพิษ

ค.ศ. 1951 - T. Fujino เป็นคนแรกที่ได้แสดงให้เห็นว่า *Vibrio parahaemolyticus* เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษในประเทศญี่ปุ่น

ค.ศ. 1955 - S. Thompson ได้พบความเหมือนกันของ cholera gastroenteritis กับ *Escherichia coli* gastroenteritis ในทารก
- ได้มีการพบโรค scombroid (histamine-associated) poisoning

ค.ศ. 1960 - Moller และ Scheibel ได้จำแนกชนิดของ *C. botulinum* Type F
- มีรายงานการสร้างอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) โดย *Aspergillus flavus* เป็นครั้งแรก

ค.ศ. 1965 - ได้มีการพบโรค giardiasis ที่มีอาหารเป็นสื่อ

ค.ศ. 1969 - C.L. Duncan และ D.H. Strong ได้พบเอนเทอโรทอกซินจาก *C. perfringens*
- Gimenez และ Ciccarelli ได้แยก *C. botulinum* Type G เป็นครั้งแรกในอาเจนตินา

ค.ศ. 1971 - ได้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *V. parahaemolyticus* ครั้งแรกในรัฐ Maryland ประเทศสหรัฐอเมริกา

- ได้มีการบันทึกครั้งแรกเกี่ยวกับโรคระบาดจากเชื้อ *E. coli* ในประเทศสหรัฐอเมริกา

- ค.ศ. 1975 - L.R. Koupal และ R.H. Deipel ได้พบ *Salmonella enterotoxin*
- ค.ศ. 1976 - ได้เกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษจาก *Y. enterocolitica* ครั้งแรกในรัฐ New York สหรัฐอเมริกา
- พบโรค botulism ในทารกครั้งแรกในรัฐ California ประเทศสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1977 - ได้มีการบันทึกครั้งแรกเกี่ยวกับการระบาดของ cyclosporiasis ใน Papua New Guinea
- ค.ศ. 1979 - ได้เกิดโรคอาหารเป็นพิษจาก *Vibrio cholerae* สายพันธุ์ non-O1 ในรัฐ Florida
- ค.ศ. 1981 - ได้เกิดการระบาดของโรค listeriosis จากอาหารเป็นสื่อในสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1982 - ได้เกิดการระบาดของโรค hemorrhagic colitis ครั้งแรกในสหรัฐอเมริกา
- ค.ศ. 1983 - Ruiz-Palacois และคณะ ได้อธิบาย *Campylobacter jejuni* enterotoxin
- ค.ศ. 1985 - ในสหรัฐอเมริกาได้มีการยอมรับให้ฉายรังสีเนื้อหมู 0.3-1.0 kGy เพื่อควบคุม *Trichinella spiralis*
- ค.ศ. 1986 - ได้มีการวินิจฉัย bovine spongiform encephalopathy ในโคกระบือเป็นครั้งแรกใน สหราชอาณาจักร

1.3 แหล่งของจุลินทรีย์ในอาหาร

ถึงแม้ว่าภายในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ที่แข็งแรงปกติจะปราศจากจุลินทรีย์ แต่ก็ยังปรากฏว่า ในอาหารดิบและอาหารแปรรูปมีเชื้อรา ยีสต์ แบคทีเรียและไวรัสปนเปื้อน จุลินทรีย์เข้าสู่อาหารโดยทั้งทางธรรมชาติ (ภายใน) และทางด้านนอกที่อาหารสัมผัสตั้งแต่ช่วงของการผลิตจนถึงการบริโภค แหล่งของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในพืชได้แก่ ผิวของผัก ผลไม้ ธัญชาติ และผู้ที่พืชห้วงบางชนิดเช่น หัวหอม ส่วนแหล่งของจุลินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติในสัตว์ได้แก่ ผิวหนัง นม ขน ทางเดินอาหาร ทางเดินปัสสาวะ หลอดลม ท่อน้ำนมในเต้านมของสัตว์ ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติผันแปรขึ้นกับชนิดของพืช และสัตว์ เช่นเดียวกับทำเลที่ตั้งและสภาพแวดล้อม นอกจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติแล้ว อาหารสามารถถูกปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันที่มาจากแหล่งภายนอก เช่น อากาศ ดิน น้ำเสีย น้ำ อาหาร คน สารถีปนอาหาร อุปกรณ์ และภาชนะบรรจุ จุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติอาจมีผลต่อคุณภาพเริ่มต้นของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหาร ชนิดของจุลินทรีย์และปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนสู่อาหารมีความผันแปรอย่างมากขึ้นกับสัณฐานลักษณะในการผลิต การแปรรูป การขนส่ง การจำหน่ายและเก็บรักษาอาหาร ความเข้าใจเกี่ยวกับแหล่งของจุลินทรีย์ในอาหารมีความสำคัญต่อการพัฒนาวิธีการที่จะควบคุมและทำลายจุลินทรีย์ในอาหาร การตรวจสอบคุณภาพ

ทางจุลินทรีย์ของอาหาร การตั้งมาตรฐานอาหารทางจุลชีววิทยาและการตั้งข้อกำหนดทางจุลินทรีย์ของอาหารและสารเจือปนอาหาร^{1,6}

จุลินทรีย์อาจปนเปื้อนสู่อาหารจากหลายแหล่งด้วยกันได้แก่ ดิน น้ำ อากาศ อาหารสัตว์ ปุ๋ย มนุษย์ สัตว์ ของเสีย ส่วนผสม วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ภาชนะบรรจุ วัตถุดิบ โดยทั่วไปจุลินทรีย์เข้าสู่อาหารเริ่มตั้งแต่วัตถุดิบในขั้นตอนการเก็บเกี่ยว การขนส่ง การแปรรูป การเก็บรักษา การแจกจ่ายหรือในขั้นการเตรียมเพื่อบริโภค จุลินทรีย์จากแหล่งหนึ่งสามารถปนเปื้อนสู่อีกแหล่งหนึ่งได้ ตัวอย่างเช่น จุลินทรีย์จากสัตว์ปนเปื้อนสู่ดินโดยทางมูลสัตว์ จากนั้นน้ำฝนก็ชะจุลินทรีย์ลงสู่แม่น้ำลำคลอง ซึ่งอาจนำน้ำนี้ไปใช้ในการเพาะปลูก โดยในที่สุดจุลินทรีย์ก็ปนเปื้อนสู่พืชที่ปลูกเพื่อใช้เป็นอาหาร ดังนั้นน้ำจึงเป็นตัวพาจุลินทรีย์ซึ่งมีกำเนิดมาจากสัตว์⁷

1.3.1 ดิน

ดินเป็นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของจุลินทรีย์หลายชนิด บริเวณหน้าดินมักมีจุลินทรีย์อยู่มากกว่าบริเวณที่ลึกลงไป ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ผันแปรตามชนิดของดิน (เช่น ดินทราย ดินเหนียว) และสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะความชื้นและอุณหภูมิ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในดินค่อนข้างจำกัด ส่วนใหญ่มักเจริญในบริเวณที่มีสารอินทรีย์ได้แก่ บริเวณราก บริเวณที่มีชิ้นส่วนพืชตกลงสู่ดิน บริเวณที่มีซากสัตว์ มูลสัตว์ และเชื้อจุลินทรีย์ที่ตายแล้ว นอกจากนี้ในดินยังมีหนอนที่ตาย แมลงและสัตว์เล็กอื่นๆ องค์ประกอบทางเคมีของวัสดุที่กำลังย่อยสลายและอัตราการย่อยสลายของวัสดุเหล่านี้รวมทั้งสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ไชมัน ชีวมัน และลิกนินอาจสะสมอยู่ในดินที่ละน้อยเนื่องจากสารเหล่านี้สามารถต้านทานการย่อยสลายได้ เรียกสิ่งสะสมอยู่ในนี้เรียกว่า ฮิวมัส (humus) จุลินทรีย์หลายชนิดจะใช้สิ่งตกค้างนี้ไปอย่างช้า ๆ ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ในดินคือ ปริมาณสารอาหารในดิน โดยทั่วไป สิ่งแวดล้อมในดินไม่ได้เป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับจุลินทรีย์แต่จุลินทรีย์ก็พยายามที่จะอยู่รอด⁷

จำนวนของจุลินทรีย์ในดินผันแปรตั้งแต่จำนวนเล็กน้อยในทรายและทะเลทรายไปจนถึง 10^{10} เซลล์ต่อกรัมในดินที่อุดมสมบูรณ์ ในบางครั้งเชื้อจุลินทรีย์ในดินอาจจะอยู่ในระยะพักตัวเนื่องจากสภาพแวดล้อมไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงพบสปอร์ของ *Bacillus* และ *Clostridium* ได้บ่อยในดิน จุลินทรีย์ที่มักพบในอาหารและพบในดินด้วยได้แก่ *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* และ *Streptomyces* ดินเป็นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของ *Clostridium botulinum* ชนิด A และชนิด B ส่วน *C. botulinum* ชนิด E ไม่พบตามพื้นที่เพาะปลูก จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงซึ่งสร้างสปอร์ได้ชนิดที่สามารถทำให้อาหารระบองเสียพบได้ในปริมาณน้อยในดิน ไวรัสปกติพบได้ในดินเช่นกัน ดินช่วยให้ไวรัสมีความต้านทานต่อการถูกทำลาย ยีสต์พบได้ในดินที่ปลูกผลไม้ และอาจพบสปอร์ของรา

ได้ในบางแห่ง สปอร์เหล่านี้ทนต่อสภาพแห้งและการผันแปรของอุณหภูมิได้ดี⁷ ดินเป็นแหล่งสะสม จุลินทรีย์หลายชนิด จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์คัดแยกได้จากดินเพื่อนำมาใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ เอนไซม์ กรดอะมิโน วิตามินและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ใช้ในทางเภสัชและในอุตสาหกรรมอาหาร¹

จุลินทรีย์ในดินสามารถแพร่กระจายสู่แหล่งอื่น ๆ ได้ เช่นอาจเข้าสู่บรรยากาศได้โดยการกระทำของลมและในที่สุดปนเปื้อนสู่ น้ำเมื่อฝนตก หรือน้ำฝนชะดินลงในแม่น้ำดังนั้นก็มักพบว่าแบคทีเรีย และเชื้อราหลายชนิดที่แยกได้จากดินและน้ำ มีลักษณะคล้ายกัน สัตว์น้ำสามารถสามารถซ่อนตัวอยู่ได้ในดินเมื่อเมฆก่อตัวและฝนตกตามมา จุลินทรีย์ในดินสามารถปนเปื้อนเข้าสู่รากหรือหัวของพืชได้ โดยการสัมผัสโดยตรง ลมและฝนพัดพาเอาสิ่งสกปรกลงสู่ดินและปนเปื้อนพืชที่เพาะปลูกเช่น สตรอเบอรี่ กระหล่ำปลีและถั่วต่าง ๆ ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์บนพืชขึ้นอยู่กับปริมาณการปนเปื้อนในดิน การเก็บเกี่ยวและการแตกหักเสียหายของพืชช่วยเพิ่มปริมาณการปนเปื้อนของจุลินทรีย์^{3,7}

1.3.2 น้ำ

น้ำเป็นแหล่งสำคัญของการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ในอาหาร น้ำอาจปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์จากน้ำฝนที่มีจุลินทรีย์จากอากาศและดิน สิ่งสกปรกที่ตกตะกอนอยู่ในน้ำทะเลนั้นมีปริมาณจุลินทรีย์ในช่วง 10^4 - 10^9 เซลล์ต่อกรัม บริเวณใกล้ชายฝั่งมหาสมุทรจะมีจุลินทรีย์หนาแน่นมากกว่าบริเวณที่ลึกซึ่งไกลออกไป แบคทีเรียที่พบในสิ่งสกปรกที่ตกตะกอนอยู่ในน้ำทะเลได้แก่ *Aeromonas*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas* และ *Vibrio* สิ่งสกปรกนี้เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ในน้ำและสัตว์น้ำ การปล่อยน้ำเสียจากครัวเรือนและจากคอกสัตว์ลงสู่แม่น้ำลำคลองเป็นผลให้มีจุลินทรีย์ในน้ำสูงขึ้นมากโดยเฉพาะแบคทีเรียในลำไส้ แบคทีเรียที่มีแนวโน้มเป็น normal flora ใน น้ำ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Alcaligenes*, *Bacillus* และ *Micrococcus* เชื้อ enteroviruses ค่อนข้างทนต่อการบำบัดน้ำเสียได้ดี บางครั้งจึงพบได้ในน้ำประปา⁷ *Escherichia coli* เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของมูลสัตว์ในน้ำ จุลินทรีย์ชนิดนี้จะตายอย่างรวดเร็วในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิที่ต่ำ สภาพแวดล้อมที่มีแสงแดดและสารเคมีอันตราย รวมทั้งการขาดสารอาหาร น้ำเป็นตัวพาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร ถ้าน้ำที่ใช้ในการเพาะปลูกเกิดการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์แล้ว ผักผลไม้ที่ปลูกนั้นก็จะเป็นอาหารที่ไม่ปลอดภัยด้วยเนื่องจากถูกปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์⁷ จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเป็นสาเหตุของการติดเชื้อโรคได้รวมทั้งแบคทีเรีย ไวรัสและปรสิต เช่นอหิวาตกโรคเป็น waterborne disease ชนิดหนึ่งที่เคยระบาดทั่วโลก⁸

1.3.3 พืช

โดยปกติในเนื้อเยื่อของพืชมักจะปราศจากจุลินทรีย์ ยกเว้นในผักที่มีรูพรุนเช่น หัวหอม และ หัวแรดิช (radishes) และใบผักเช่น กะหล่ำปลีและถั่วงอก พืชบางชนิดมีสารยับยั้งจุลินทรีย์ตามธรรมชาติทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ปริมาณจำกัดในพืชชนิดนั้น ผักและผลไม้อาจเป็นแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์บนพืชผันแปรขึ้นกับสภาพของดิน ชนิดของปุ๋ยและน้ำที่ใช้ ตลอดจนคุณภาพของอากาศ จุลินทรีย์ที่อาจพบได้แก่ เชื้อรา ยีสต์ แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในสกุล *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Erwinia*, *Bacillus*, *Clostridium* และ *Enterobacter* จุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะ enteric bacteria อาจพบได้บนพืชถ้าหากดินที่ใช้เพาะปลูกปนเปื้อนด้วยน้ำเสียที่ไม่ได้ผ่านการบำบัด ปัจจัยหลายประการที่ทำให้พืชมีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นได้แก่ การที่พืชเป็นโรค ผิดถูกทำลายและถูกทิ้งไว้นานเกินไประหว่างการเก็บเกี่ยว การใช้สภาพที่ไม่เหมาะสมระหว่างขนส่งและเก็บรักษา ดังนั้นการใช้วิธีการที่เหมาะสมระหว่างเพาะปลูกพืชสามารถช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มาจากพืชได้ เช่น การใช้น้ำที่ผ่านการบำบัด การใช้ปุ๋ยที่ไม่ได้ผลิตจากมูลสัตว์ การลดการถูกทำลายของพืชระหว่างการเก็บเกี่ยว การใช้น้ำคุณภาพดีในการชะล้างพืช และการเก็บรักษาพืชไว้ที่อุณหภูมิต่ำทั้งก่อนและหลังการแปรรูป⁶

1.3.4 สัตว์

อาหารที่มาจากสัตว์และสัตว์ปีกปกติมีจุลินทรีย์หลายชนิดปนเปื้อนภายในทางเดินอาหาร ทางเดินหายใจ ทางเดินปัสสาวะ ท่อน้ำนมในเต้านม รวมทั้งผิวหนัง ส่วนที่เป็นกระดูกแข็งบริเวณเท้า สัตว์ ผสม และขน การที่สัตว์กินอาหารก็เป็นการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร จุลินทรีย์ที่อยู่รอดจะสามารถปนเปื้อนส่วนนอกของตัวสัตว์ ถ้าอาหารสัตว์ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น *Salmonella* ก็อาจบุกรุกเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ และปนเปื้อนสู่ชิ้นเนื้อที่ได้จากการชำแหละในระหว่างการฆ่าสัตว์ สัตว์อาจเป็นพาหะของเชื้อก่อโรคเช่น *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* และ *Listeria monocytogenes* โดยที่ไม่แสดงอาการ สัตว์ปีกอาจเป็นพาหะของ *Salmonella* Enteritidis ในรังไข่และปนเปื้อนสู่ไข่แดงระหว่างการตกไข่⁶

กล้ามเนื้อของสัตว์ที่แข็งแรงปกติปลอดเชื้อจุลินทรีย์แต่เมื่อสัตว์เป็นโรค แบคทีเรียอาจเข้าสู่กล้ามเนื้อ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่เข้าสู่เนื้อเยื่อสัตว์คาดว่ามาจากผิวหนังสัตว์หรือจากลำไส้ของสัตว์หรือปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมในกระบวนการแปรรูป ในลำไส้ของสัตว์มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่มากมายหลายชนิด นอกจากนี้แหล่งของจุลินทรีย์ภายในร่างกายสัตว์แหล่งหนึ่งอยู่ที่ต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) ต่อมน้ำเหลืองนี้จะกรองแบคทีเรียจากระบบน้ำเหลืองในร่างกายสัตว์ ได้เคยมีผู้รายงานว่าพบแบคทีเรียหลายชนิดในต่อมน้ำเหลืองของสัตว์โดยมีจำนวนประมาณ 10^5 เซลล์ต่อกรัม นอกจากนี้บนผิวหนังของสัตว์อาจมีจำนวนจุลินทรีย์ระหว่าง 10^5 ถึงมากกว่า 10^9 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งแหล่งของการปนเปื้อนบนชิ้นเนื้อได้ระหว่างการแปรรูป³

1.3.5 คนที่สัมผัสอาหาร

ในระหว่างที่มีการผลิตจนถึงการบริโภคอาหาร อาหารอาจถูกสัมผัสโดยคนหลายคน ไม่เพียงแต่เฉพาะคนที่ทำงานในฟาร์มและในโรงงานแปรรูปอาหารเท่านั้น ยังรวมถึงคนที่ทำงานในภัตตาคาร ห้องอาหาร ร้านขายปลีกและที่บ้านด้วย คนเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคหลายชนิดที่อาจปนเปื้อนสู่อาหารโดยเฉพาะอาหารพร้อมรับประทาน และก่อโรคอาหารเป็นพิษในเวลาต่อมา จุลินทรีย์ที่พบเป็น normal flora บนผิวหนังส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *Staphylococcus*, *Corynebacterium* และ *Propionibacterium* จุลินทรีย์ที่อยู่บนมือและเสื้อผ้าของคนบ่งบอกได้ถึงสิ่งแวดล้อมและนิสัยของคนแต่ละคนด้วย จุลินทรีย์จากอากาศ ดินและน้ำที่อยู่บนผิวหนังของคนอาจปนเปื้อนสู่อาหารและอุปกรณ์ได้จากการสัมผัสโดยตรงถ้าหากล้างมืออย่างไม่เหมาะสม การมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดีเช่น การไม่รักษาความสะอาดของเสื้อผ้า ผมนและอื่นๆ อาจเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์จากคนปนเปื้อนสู่อาหารได้ จุลินทรีย์ที่อยู่ตามผิวหนัง จมูก ลำคอ และทางเดินอาหารของคนอาจปนเปื้อนสู่อาหารจากการที่คนนั้นมีสุขลักษณะส่วนบุคคลที่ไม่ดี จมูกและลำคอของคนมีเยื่อเมือกซึ่งเป็นแหล่งสะสมจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดเช่น *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่ทนความร้อนได้ดี ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ นอกจากนี้ถ้าหากผู้ประกอบอาหารมีบาดแผลที่มือและผิวหนังส่วนอื่นหรือเป็นโรคได้แก่ ไข้หวัด เจ็บคอ ตับอักเสบ (hepatitis A) ในระยะแรกก็อาจเป็นสาเหตุให้จุลินทรีย์ปนเปื้อนสู่อาหารได้^{1, 6}

1.3.6 อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบอาหาร

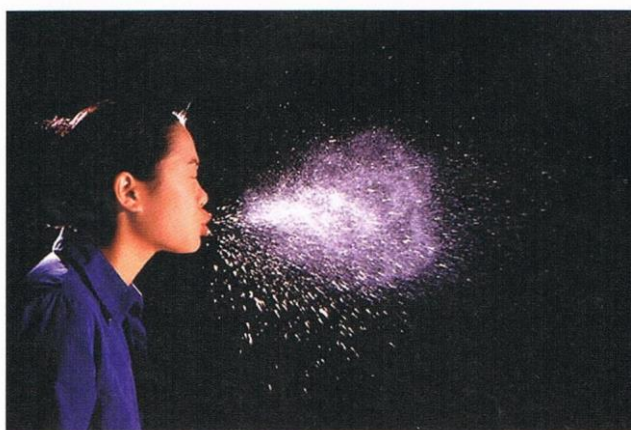
ภาชนะบรรจุที่ใช้ในระหว่างการเก็บเกี่ยวพืช การฆ่าสัตว์ การขนส่ง การแปรรูปและการเก็บรักษาอาจปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์จากผิวของอาหาร และเช่นเดียวกันจุลินทรีย์จากอากาศ อาหารดิบ น้ำและคนก็สามารถปนเปื้อนสู่ภาชนะ อุปกรณ์ และปนเปื้อนสู่อาหารในที่สุด ตัวอย่างเช่นเชียง มีด และเครื่องบดเนื้อสัตว์อาจปนเปื้อนจุลินทรีย์จากเนื้อสัตว์และเป็นแหล่งสะสมจุลินทรีย์ นอกจากนี้เมื่ออุปกรณ์ถูกใช้ติดต่อกันเป็นเวลานาน จุลินทรีย์ที่มีอยู่เริ่มต้นสามารถที่จะเพิ่มจำนวนและเป็นแหล่งของการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องลงในผลิตภัณฑ์ อุปกรณ์บางชนิดอาจมีส่วนที่การทำความสะอาดเข้าไม่ถึง จุดนั้นสามารถเป็นแหล่งสะสมจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียได้ นอกจากนี้ถ้าหากทำความสะอาดอุปกรณ์อย่างไม่เหมาะสม อุปกรณ์นั้นก็อาจเป็นแหล่งของการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ของจุลินทรีย์สู่อาหารได้ ตัวอย่างเช่นแบคทีเรีย *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Clostridium*, *Bacillus* ยีสต์ และเชื้อราอาจปนเปื้อนจากอุปกรณ์สู่อาหารได้ ดังนั้น

การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้ออุปกรณ์อย่างเหมาะสมในช่วงพักระหว่างการปฏิบัติงานจึงมีความสำคัญต่อการลดระดับการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ในอาหาร⁶

1.3.7 อากาศและฝุ่น

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอากาศมาจากหลายแหล่งด้วยกัน โดยแขวนลอยอยู่ในฝุ่นละอองและหยดน้ำเล็กๆ ที่ลอยอยู่ในอากาศ ลมพัดพาจุลินทรีย์หรือสปอร์ของจุลินทรีย์สู่อากาศ การฉีดน้ำลงบนพื้นและการใช้ระบบกำจัดน้ำเสียอาจทำให้เกิดละอองน้ำเล็กๆ เรียกว่า แอโรซอลหรือละอองลอย (aerosol) สิ่งที่ปนเปื้อนในอากาศรวมถึงแบคทีเรียและไวรัสที่ก่อโรคในคน และยังมีสารพิษที่แพร่กระจายทางอากาศซึ่งสามารถเป็นได้ทั้งองค์ประกอบบางส่วนของเซลล์ หรือตัวเซลล์ทั้งหมด สิ่งมีชีวิตที่ปนเปื้อนในอากาศเรียกว่า ไบโอบีโอสอล (bioaerosol) หรือละอองลอยชีวภาพที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อน ซึ่งจะมีผลเสียต่อสุขภาพของคนส่วนใหญ่หากหายใจเข้าไป จุลินทรีย์จะมาสะสมบริเวณจมูกและ เคลื่อนต่อไปเข้าระบบทางเดินหายใจ อาการที่เกิดขึ้นคือ หน้าที่เกี่ยวกับปอด (pulmonary function) ลดลง ไอเรื้อรัง หลอดลมอักเสบ (bronchitis) และเป็นหืด (asthmatic attack)⁹

จุลินทรีย์ไม่เจริญในอากาศ นอกจากนี้คนยังสามารถแพร่เชื้อสู่อากาศได้ขณะที่พูด ไอและจาม กล่าวโดยสรุปก็คือ จุลินทรีย์เข้าสู่อากาศตามขั้นตอนดังนี้ 1) การเริ่มเข้ามาของไบโอบีโอสอลสู่อากาศ (launching) 2) การขนส่ง (transport) ต่อไป โดยการแพร่และกระจายของอนุภาคเหล่านี้ 3) การตกลงสู่พื้นผิวที่ใดที่หนึ่ง (deposition) ตัวอย่างเช่นวิถีของละอองลอยที่เป็นของเหลวที่มีไวรัสก่อโรคหวัด (influenza virus) เริ่มเข้าสู่อากาศจากการไอ จามหรือแม้แต่การพูด แล้วถูกขนส่งโดยอากาศและหายใจเข้าไปแล้วตกลงสู่ปอดของบุคคลที่อยู่ใกล้ๆ ซึ่งอาจเป็นผู้ที่ติดเชื้อมาใหม่ (รูปที่ 1.2) การตกลงสู่พื้นผิวที่ใดที่หนึ่งของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและการติดเชื้อมาเป็นผลตามมามีได้รับความสนใจมาก

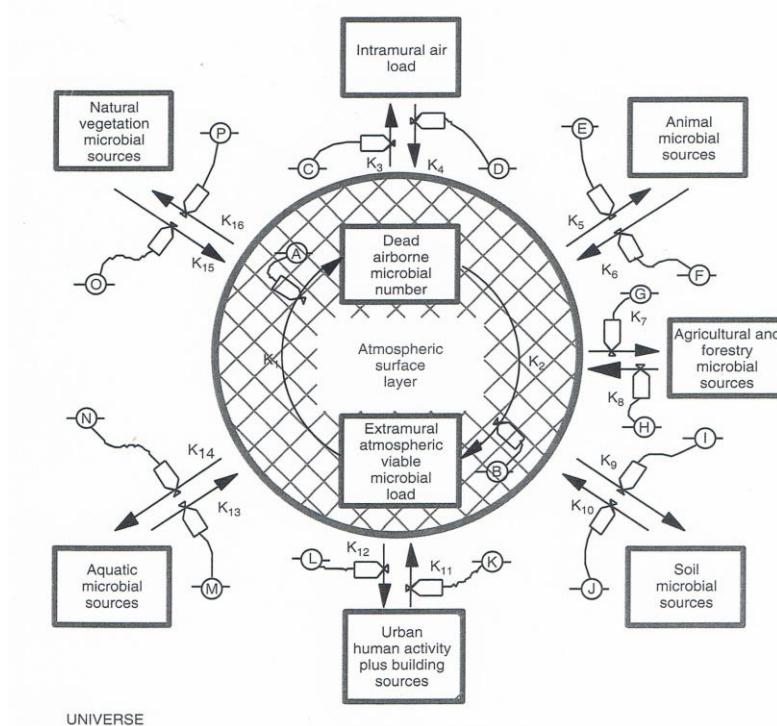


รูปที่ 1.2 การไอหรือจามเป็นทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคเริ่มเข้าสู่อากาศ
ใครก็ตามที่อยู่ใกล้ๆ อาจหายใจเอาจุลินทรีย์ก่อโรคนี้เข้าไป
ที่มา: Pepper and Dowd⁹

จำนวนเชื้อในอากาศขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้น ขนาดและปริมาณของอนุภาคฝุ่น โดยทั่วไปอากาศแห้งที่มีอุณหภูมิสูงและมีปริมาณฝุ่นน้อยจะมีจำนวนจุลินทรีย์ต่ำ ในฤดูร้อนอากาศในชนบทอาจมีสปอร์ของเชื้อราเฉลี่ย 10,000 สปอร์ต่อลูกบาศก์เมตร ในระหว่างการเก็บเกี่ยวผลผลิตปริมาณสปอร์อาจสูงถึง 10^8 สปอร์ต่อลูกบาศก์เมตร ในอากาศอาจพบสปอร์ของเชื้อราได้มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น สปอร์ของ *Penicillium* และ *Aspergillus* แพร่กระจายไปทุกหนทุกแห่ง สปอร์ของ *Penicillium* มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเพียง 2-3 ไมโครเมตรซึ่งเล็กมากและเบาพอที่จะกระจายไปทั่วในอากาศโดยอาศัยลม *Fusarium* สร้างสปอร์ที่แพร่ไปในอากาศทางหยดน้ำเล็กๆ โดยแพร่กระจายไปอย่างรวดเร็วจากจุดที่ฝนตกถึงแปลงเพาะปลูกพืช นอกจากนี้อาจพบสปอร์ของ *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. และเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกเช่น *Micrococcus* spp. และ *Sarcina* spp. รวมทั้งเซลล์ของยีสต์ ถ้าหากสิ่งแวดล้อมโดยรอบเป็นแหล่งของจุลินทรีย์ก่อโรคอาจพบจุลินทรีย์ก่อโรคและไวรัสแพร่กระจายทางอากาศ^{1, 6}

จุลินทรีย์ที่มีชีวิต (ร้อยละ 0.1-10 ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด) และจุลินทรีย์ที่ตายแล้วเข้าสู่บรรยากาศในรูปของเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มโดยติดมากับชิ้นส่วนของพืช ฝุ่นผงจากดิน ในที่สุดก็จากตกลงมาที่พื้นโดยอาศัยแรงโน้มถ่วง จุลินทรีย์ปะปนมากับฝุ่นที่พัดมากับพายุจากระยะทางไกลร่วมผสมกับจุลินทรีย์ในท้องถิ่นเรียกว่า microbial background population ขณะที่กิจกรรมของมนุษย์ทำให้เกิด microbial air pollution ในที่สุดประชากรจุลินทรีย์เหล่านี้เข้าสู่อากาศได้ชั่วคราวตามสภาวะการเปลี่ยนแปลงของบรรยากาศของโลก มีรายงานว่าประชากรของแบคทีเรียและเชื้อราผันแปรตามความแตกต่างของมวลอากาศ จุลินทรีย์ก่อโรคพืชหลายชนิดแพร่กระจายในอากาศ (ตารางที่ 1.1) ร้อยละ 70 ของจุลินทรีย์ก่อโรคพืชทั้งหมดเป็นเชื้อราเช่น wheat rust ซึ่งสามารถแพร่กระจายได้ในอากาศ การแพร่โดยอากาศสามารถทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคพืชกระจายไปไกลได้หลายพันกิโลเมตร⁹

จุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดที่แพร่กระจายในอากาศก่อโรคติดต่อในสัตว์ (ตารางที่ 1.2) ตัวอย่างเช่น ไวรัสโรคเท้าและปาก (foot-and-mouth disease virus) ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นไวรัสชนิดนี้เป็นเชื้อที่แพร่กระจายทางอากาศ ในปี ค.ศ. 1967 โรคเท้าและปากระบาดในประเทศอังกฤษเป็นเวลา 4 เดือนมีผลกระทบต่อฟาร์มจำนวน 2,300 ฟาร์ม ทำให้สูญเสียสัตว์จำนวน 450,000 ตัว สุดท้ายมนุษย์ก็สามารถติดเชื้อโรคที่แพร่กระจายทางอากาศได้เช่น *Legionella pneumonia*, *Mycobacterium tuberculosis* และอื่นๆ Coccidioidomycosis (รู้จักกันในชื่อของ valley fever) เป็นโรคที่มีสาเหตุจากการหายใจเอาสปอร์ของเชื้อรา *Coccidioides immitis* ซึ่งอยู่ในพื้นที่แถบร้อน เชื้อรานี้สามารถเคลื่อนจากทางเดินหายใจไปสู่ผิวหนัง กระดูกและระบบประสาทส่วนกลางทำให้เกิดการติดเชื้อและตายในที่สุด



รูปที่ 1.3 แผนภาพจำลองแหล่งของจุลินทรีย์ในบรรยากาศ

ตารางที่ 1.1 จุลินทรีย์ก่อโรคพืชที่แพร่กระจายทางอากาศ

โรคพืชจากเชื้อรา (Fungal plant disease)	ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค
Dutch Elm disease	<i>Ceratocytis ulmi</i>
Potato late blight	<i>Phytophthora infestans</i>
Leaf rust	<i>Puccinia recondite</i>
Loose smut of wheat	<i>Ustilago tritici</i>
Downy mildew	<i>Pseudoperonospora humuli</i>
Maize rust	<i>Puccinia sorghi</i>
Powdery mildew of barley	<i>Erysiphe graminis</i>
Southern corn leaf blight	<i>Helminthosporium maydis</i>

ที่มา: Pepper และ Dowd⁹

ตารางที่ 1.2 จุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์ที่แพร่กระจายทางอากาศ

โรคในสัตว์ (Animal disease)	ชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรค
โรคจากแบคทีเรีย (bacterial disease)	
Tuberculosis	<i>Mycobacterium bovis</i>
Brucellosis	<i>Brucella</i> spp.
โรคจากเชื้อรา (fungal disease)	
Aspergillosis	<i>Aspergillus</i> spp.
Coccidioidomycosis	<i>Coccidioides immitis</i>
โรคจากไวรัส (viral disease)	
Influenza	Influenza virus
Rabies	<i>Rhabdoviridae</i>
Foot-and-mouth disease	<i>Aphthovirus</i>

ที่มา: Pepper และ Dowd⁹

เอกสารอ้างอิง

1. Adams, M.R., Moss, M.O. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
2. Montville, T.J., Matthews, K. 2005. Food Microbiology: an Introduction. ASM Press, Washington, DC.
3. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.
4. Hartman, P.A. 1997. The evolution of food microbiology, pp. 1-12. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Monville, T.J. (Eds.). Food Microbiology: Fundamental and Frontiers. ASM Press, Washington, DC.
5. Bonnet, M., Lagier, J.C., Raoult, D., Khelaifia, S. 2020. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. New Microbe and New Infect. 34: 100622.
6. Ray, B. 2013. Fundamental Food Microbiology, 5th ed. Taylor & Francis, Boca Roca, USA.
7. Banwart, G.J. 1989. Basic Food Microbiology, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

8. Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D. 2015. Brock Biology of Microorganisms, Global Edition. Pearson Education Limited, Essex, England.
9. Pepper, I.L., Dowd, S.E. 2009. Aeromicrobiology, pp. 83-102. In: Maier, R.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P. (Eds.). Environmental Microbiology, Elsevier Inc., Burlington, MA, USA.

บทที่ 2

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

เนื่องจากอาหารที่มนุษย์รับประทานผลิตมาจากพืชและสัตว์ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องรู้และเข้าใจเกี่ยวกับชนิดของจุลินทรีย์ รวมทั้งหลักการด้านชีววิทยาของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับพืชและสัตว์ ในแหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ โดยทั่วไปอาหารจากแหล่งธรรมชาติที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการใดๆ มีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด ถึงแม้ว่าบางครั้งดูเหมือนว่าจุลินทรีย์พยายามที่จะทำลายแหล่งอาหารของมนุษย์โดยการบุกรุกเข้าทำลายพืชและสัตว์รวมทั้งร่างกายของมนุษย์เอง แต่สิ่งที่จุลินทรีย์ได้กระทำนั้นก็เป็นบทบาทของจุลินทรีย์เองตามธรรมชาติ ในธรรมชาติสิ่งมีชีวิตที่สร้างอาหารเองได้ (autotroph) และสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารอาหารจากภายนอก (heterotroph) จะดำเนินปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารอินทรีย์ทั้งหมดเช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมันและอื่นๆ ไปเป็นพลังงานและสารอนินทรีย์ เช่น ไนโตรเจน ซัลเฟตและอื่นๆ ซึ่งแน่นอนสิ่งเหล่านี้เกี่ยวข้องกับวัฏจักรไนโตรเจนและวัฏจักรของสารอื่นๆ ในกรณีการเน่าเสียของอาหารอาจพิจารณาอย่างง่าย ๆ ว่าเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในอาหารนั้น ๆ กำลังพยายามที่จะดำเนินการตามบทบาทหลักของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งการที่จุลินทรีย์จะกระทำสิ่งนี้อย่างต่อเนื่อง ปฏิกิริยาเคมีที่ซับซ้อนต้องสามารถเกิดขึ้นได้ในเซลล์ของจุลินทรีย์โดยจุลินทรีย์ต้องได้รับสารอาหารจากอินทรีย์วัตถุซึ่งบางอย่างก็เป็นวัตถุดิบที่มนุษย์ใช้เป็นอาหาร¹

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารที่ผลิตจากพืชและสัตว์ทำให้สามารถที่จะทำนายได้ถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่อาจพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดนั้นๆ จากการรายงานผลการวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการหลาย ๆ แห่งได้แสดงให้เห็นว่า อาหารที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการใด ๆ อาจมีแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ผันแปรในปริมาณต่างๆ กันซึ่งทำให้เกิดข้อสงสัยเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารนั้น อย่างไรก็ตามสิ่งที่ต้องการทราบต่อไปก็คือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารนั้น ซึ่งสำคัญที่จะต้องทราบถึงการกระจายของจุลินทรีย์ในธรรมชาติว่าจุลินทรีย์ชนิดใดบ้างที่เกี่ยวข้องและชนิดใดบ้างที่ปกติจะไม่พบในอาหารชนิดนั้นๆ¹

ความสำคัญของจุลินทรีย์ในอาหารขึ้นอยู่กับจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของอาหาร ขั้นตอนในกระบวนการแปรรูปและเก็บรักษาอาหารรวมทั้งคนที่รับประทานอาหารนั้น เชื้อจุลินทรีย์ประเภทแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์หลายชนิดมีความสำคัญในอาหาร มีบทบาทในการทำให้อาหารเน่าเสีย ก่อให้เกิดโรคกับคนและสัตว์ แบคทีเรียเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดเนื่องจากเจริญได้เร็วและมีความสำคัญมากต่อการเสียของอาหารและการก่อโรคอาหารเป็นพิษ การเสียของอาหารเป็นผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของอาหารไปในทางที่ไม่พึงปรารถนาเช่น อาหารจะมีกลิ่นรส ลักษณะเนื้อสัมผัสและลักษณะปรากฏเปลี่ยนแปลงไปหรืออาจเกิดการเจริญขึ้นเป็นฟิล์มในอาหารเหลว เกิดเมือก

ที่ผิวหน้าอาหาร ทำให้อาหารชุ่ม จุลินทรีย์บางชนิดอาจไม่ได้เป็นสาเหตุการเสียของอาหารโดยตรง แต่อาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีอยู่ในอาหารนั้นจนกระทั่งจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้อาหารเสียเจริญขึ้นได้ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์บางชนิดมีประโยชน์ในการผลิตอาหารหมักและส่วนผสมของอาหารโดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถทำให้อาหารเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ต้องการเช่น จุลินทรีย์ที่ใช้ในการบ่มเนยแข็ง จุลินทรีย์ที่ใช้หมักน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์และหมักกะหล่ำปลีสดไปเป็นกะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) ในการทำหน้าที่ที่มีประโยชน์ไม่จำเป็นต้องมีตัวเซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ถ้าหากสามารถแยกเอนไซม์ของจากจุลินทรีย์ชนิดนั้นออกมาได้ ก็อาจนำเอนไซม์นั้นไปใช้ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ต้องการได้ หน้าที่อีกประการหนึ่งคือ การผลิตโปรตีนเซลล์เดียว ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นอาหารได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์คล้ายกันในแง่ของการทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง² จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอาหารได้แก่

2.1 แบคทีเรีย

2.1.1 แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (Gram-Positive Cocci)

แบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมนี้รวมถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (aerobe) และกลุ่มของแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีอากาศและสภาพที่ไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ในวงศ์ (family) Micrococcaceae และวงศ์ Streptococcaceae²

2.1.1.1 Micrococcaceae ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Micrococcus* และ *Staphylococcus*

ก) *Micrococcus*

Micrococcus เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (strict aerobes) เซลล์อาจอยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่เป็นคู่ หรืออาจเกาะเป็นกลุ่มเนื่องจากแบ่งตัวหลายระนาบหรือเกาะกัน 4 เซลล์ (tetrad) หรือเกาะกัน 8 เซลล์คล้ายลูกบาศก์ (sarcinae) สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase positive) บางชนิดสร้างเมดิสีซึ่งมีสีชมพูไปจนถึงสีส้มแดงขณะที่บางชนิดไม่สร้างเมดิสี ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือสูงเช่น สภาพที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 5 และส่วนใหญ่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesotroph) เชื้อจุลินทรีย์สกุลนี้พบได้ในดิน น้ำ ฝุ่น บนผิวหนังของคนและสัตว์ นอกจากนี้ยังพบในอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะในนมและผลิตภัณฑ์นม เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ มีความสำคัญต่อการเสียของอาหาร²

ข) *Staphylococcus*

เซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ไม่เคลื่อนที่ อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่หรือเกาะกันเป็นกลุ่ม ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง เจริญได้ทั้งสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สร้างคะตะเลส ส่วนใหญ่เจริญได้ในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 7.5-15 ค่อนข้างไว (ได้รับอันตรายได้ง่าย) ต่อคลอรีน

คลอรามิน (chloramines) ไอโอดีนและไอโอดิฟลอร์ (iodophors) สามารถต้านทานรังสีได้ปานกลาง แต่ไม่ทนความร้อน เชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* พบได้บ่อยบนผิวหนังและเยื่อเมือกของคนและสัตว์เลือดอุ่นชนิดอื่น เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้ยังพบ staphylococci ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด โดยทั่วไปเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ไม่ดีนัก *S. aureus* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญในการก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจากเชื้อชนิดนี้สร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่ทนความร้อนได้ดี เชื้อชนิดนี้อาจพบตามสัว จมูกและบาดแผลที่ติดเชื้อของคนและอาจปนเปื้อนสู่อาหารได้ง่ายจากผู้ประกอบอาหาร *Staphylococcus carnosus* เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตไส้กรอกหมัก²

2.1.1.2 Streptococcaceae

แบคทีเรียวงศ์นี้ได้แก่ *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียที่เรียกว่า แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกันทั้งในด้านการทำหน้าที่และลักษณะทางพันธุกรรม ชื่อของกลุ่มแบคทีเรียนี้ไม่ได้มีฐานอย่างเป็นทางการในระบบการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย แต่ตั้งขึ้นเพื่อความสะดวกในการเรียกชื่อเท่านั้น คำว่า “แบคทีเรียกรดแลคติก” ใช้เรียกจุลินทรีย์ที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยว สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่บริสุทธิ์ชนิดแรก คือ *Bacterium lactis* (อาจเป็น *Lactococcus lactis*) การพัฒนาที่สำคัญในการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดขึ้นเมื่อพบความคล้ายคลึงกันระหว่างแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวและแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกชนิดอื่นจากแหล่งอื่น ต่อมาผู้ใช้คุณลักษณะพื้นฐานที่สำคัญในการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกเช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การหมักน้ำตาล การเจริญที่อุณหภูมิที่สำคัญเช่น 10°C และ 45°C การทนเกลือและการทนพีเอชที่ระดับต่าง ๆ เป็นต้น^{3,4}

โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกหมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากการหมัก ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและรูปร่างท่อน แบคทีเรียกลุ่มนี้มีคุณสมบัติทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพและลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกันแต่มีความแตกต่างกับแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นที่สร้างกรดแลคติกได้ ส่วนใหญ่ไม่สร้างคะตะเลส (catalase negative) ทนกรด (acid tolerant) ทนอากาศ (aerotolerant) และเจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobes) เมื่อพิจารณาถึงความต้องการคาร์บอนและพลังงาน สามารถจัดแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นพวก heterotrophic chemoorganotrophs ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการคาร์บอนที่อยู่ในรูป preformed organic carbon ซึ่งใช้เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน แบคทีเรียกรดแลคติกต้องการสารอาหารที่มีความซับซ้อน บางชนิดสามารถเจริญได้เฉพาะเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์เท่านั้นภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่ก็มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกอีกหลายชนิดที่ต้องการสารอาหารค่อนข้างหลายชนิดขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่

เจริญ และยังสามารถเจริญได้ค่อนข้างดีในสภาวะที่มีสารอาหารน้อย นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเช่น ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก สิ่งนี้สะท้อนให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีแหล่งที่อยู่ที่หลากหลายไม่เพียงแต่จะพบบนพืชผัก น้ำนมและเนื้อสัตว์เท่านั้นแต่ยังพบได้ในน้ำเกลือ อาหารที่มีพีเอชต่ำและสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ สมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของสารอาหาร เป็นเหตุผลหลักในการนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมัก เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเมแทบอลิซึมน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกและกรดชนิดอื่นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย วิธีการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติกแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ วิธีการหมักแบบโฮโมเฟอริเมนเททิฟ (homofermentative) และวิธีการหมักแบบเฮเทอโรเฟอริเมนเททิฟ (heterofermentative) สำหรับกระบวนการหมักแบบโฮโมเฟอริเมนเททิฟนั้นซับสเตรตที่เป็นน้ำตาลประมาณร้อยละ 90 จะเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ส่วนกระบวนการหมักแบบเฮเทอโรเฟอริเมนเททิฟจะเกิดกรดแลคติกเพียงร้อยละ 50 มีกรดแอซิดิก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ในสัดส่วนที่สมดุล⁴

ก) *Streptococcus*

แบคทีเรียสกุล *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียรูปกลมหรือรูปไข่ เซลล์อาจอยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสาย ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ไม่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ หมักกลูโคสให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (homofermentative) มีหลายชนิดอาศัยอยู่ในหลายๆ แหล่งเช่น อากาศ ดิน น้ำ น้ำเสีย บนพืช ในช่องปาก ในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ บางสายพันธุ์ทนต่อความร้อนได้โดยสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที บางชนิดก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์และบางชนิดทำให้อาหารเสีย ถึงแม้ว่า *Streptococcus* บางชนิดจะให้โทษ แต่ก็มีควมสนใจที่จะใช้แบคทีเรียสกุลนี้เป็นสิ่งบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย (fecal contamination) และใช้เป็นกล่าเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตอาหารหมัก²

เมื่อ 50 ปีก่อน *Streptococcus* ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลัก ๆ คือ pyogenic, enterococcus, viridians และ lactic การจัดกลุ่มของ *Streptococcus* ซึ่งทำโดยอาศัยหลักการของ Sherman (Sherman scheme ซึ่งตีพิมพ์ในปี ค. ศ. 1937) นั้นได้มีการแก้ไขภายหลัง แต่โดยทั่วไปเป็นวิธีหลักที่ใช้ในการจัดกลุ่มของแบคทีเรีย Streptococcal species เริ่มตั้งแต่ปี ค. ศ. 1984 ได้มีการเปลี่ยนแปลงแก้ไขการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสกุลนี้ 2 ครั้ง ครั้งแรก *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* และ *Streptococcus durans* ได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุลใหม่คือ *Enterococcus* ต่อมาในปี ค. ศ. 1985 แบคทีเรีย 2 ชนิดซึ่งเดิมทราบกันดีว่าเป็น lactic streptococci คือ *Streptococcus lactis* และ *Streptococcus cremoris* ได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุลใหม่คือ *Lactococcus* ดังนั้นในปัจจุบัน *Streptococcus thermophilus* จึงเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวที่เป็นสมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* ที่ใช้ในการหมักอาหารเช่น โยเกิร์ตและเนยแข็ง⁴

S. thermophilus สามารถที่จะปรับตัวได้ดีโดยจะหมักแลคโตสในนมได้อย่างรวดเร็วให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. thermophilus* อยู่ในช่วง 40°C ถึง 42°C ส่วนอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้คือ 52°C และสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากกว่า 60°C แต่แบคทีเรียชนิดนี้ต้องการสารอาหารสำคัญที่ช่วยในการเจริญค่อนข้างมากกว่าสารอาหารที่ *Lactococcus* ต้องการ เนื่องจาก *S. thermophilus* สามารถย่อยสลายโปรตีนได้น้อย (weakly proteolytic) ดังนั้นจึงต้องการ pre-formed amino acid ความสามารถในการทนเกลือ ไม่ทนน้ำดีและความหลากหลายของเมแทบอลิซึมเป็นคุณลักษณะของ *S. thermophilus*⁴

การหมักคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียสกุลนี้ให้กรดแลคติกซึ่งเป็นที่ต้องการในการทำอาหารหมัก แต่การหมักนี้ไม่เป็นที่ต้องการในน้ำนมดิบที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อน *Streptococcus* ยังสามารถใช้น้ำตาลในระหว่างการหมักแอลกอฮอล์เป็นผลทำให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำ และได้กรดปริมาณมากเกินไปเกินความต้องการ บางสายพันธุ์ใช้กรดซิตริกได้และให้สารแอซีโทอิน (acetoin) และไดแอซีทิล (diacetyl) ออกมา ความสามารถในการผลิตไดแอซีทิลเป็นที่ต้องการในการทำผลิตภัณฑ์นมหมักเช่น ครีมเปรี้ยว (cultured sour cream) บัตเตอร์มิลค์หมัก (cultured buttermilk) และเนย²

ข) *Enterococcus*

เซลล์กลมมีลักษณะคล้าย *Streptococcus* เซลล์อยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile) ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* มีกระบวนการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททิฟและในกระบวนการหมักกลูโคสจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดแลคติกชนิดแอล (L(+)) lactic acid เป็นส่วนใหญ่ สามารถสร้างกรดไขมันสายยาวได้โดยเฉพาะประเภทอิ่มตัวสายตรง (straight - chain saturated fatty acid) หรือประเภทไม่อิ่มตัวซึ่งมีพันธะคู่ 1 พันธะ (monounsaturated fatty acid) ไม่สร้างคะตะเลส แต่พบว่ามีบางสายพันธุ์สามารถสร้างซูโดคะตะเลส (pseudo-catalase) ได้⁵ บางสายพันธุ์ทนต่ออุณหภูมิของการพาสเจอร์ไรส์ได้ แหล่งที่อยู่อาศัยตามปกติคือ ลำไส้ของคนและสัตว์ นก และในสิ่งแวดล้อม บางครั้งใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย (fecal contamination) ถ้าพบในอาหารแสดงว่าอาหารนั้นผ่านการผลิตมาอย่างไม่ถูกสุขลักษณะเช่น ถ้าพบในเนยสดก็แสดงว่าเนยนั้นผ่านการผลิตมาอย่างไม่ถูกสุขลักษณะ แต่ถ้าพบในเนยแข็งบอกอะไรไม่ได้มากนักเพราะไม่ทราบว่าเชื้อที่พบปริมาณมากนั้นเพิ่มจำนวนมาจากเซลล์เพียงจำนวนน้อยหรือปนเปื้อนมาจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่สะอาดเช่น อุปกรณ์ต่างๆ¹

สมบัติของเชื้อ *Enterococcus* ที่สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้เกี่ยวกับมลภาวะของน้ำคือ 1) โดยทั่วไปจะไม่เพิ่มจำนวนในน้ำโดยเฉพาะถ้ามีปริมาณสารอินทรีย์น้อย 2) พบ *Enterococcus* ในอุจจาระของคนน้อยกว่า *Escherichia coli* มาก ถ้าน้ำมีอัตราส่วนของฟีคอลโคลิฟอร์ม (fecal coliforms) ต่อเชื้อ enterococci ≥ 4.0 แสดงว่าน้ำนั้นถูกปนเปื้อนด้วยสิ่งขับถ่ายของมนุษย์และ

3) enterococci จะค่อย ๆ ตายในน้ำในอัตราที่ช้ากว่าโคลิฟอร์ม นอกจากนี้ enterococci ยังมีความแตกต่างจากโคลิฟอร์มทั่วไปคือ มีความจำเพาะน้อยกว่าในการอยู่อาศัยในลำไส้โดยพบภายนอกลำไส้มากกว่า สามารถทนต่อสภาวะไม่เหมาะสมได้ดีกว่าเช่น สามารถทนต่อสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 6.5 และค่อนข้างทนต่อการแช่แข็งได้ดี Enterococcus บางชนิดเช่น *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* ค่อนข้างทนต่อความร้อนได้ดีและอาจอยู่รอดในระหว่างการพาสเจอร์ไรส์นม พบมากในผักสด เชื้อชนิดที่มีความสำคัญต่อการเสียของอาหาร ได้แก่ *Enterococcus faecalis*¹

ค) *Lactococcus*

เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ อยู่เดี่ยวๆ อยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นสายสั้น ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase negative) เป็นพวกที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ ใกล้เคียง 30°C สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10°C แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45°C หมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (homofermentative) โดยเฉพาะ L-lactic acid ใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นมหมัก^{1,4}

Lactococcus lactis เป็นชนิดที่มีความสำคัญมากที่สุดในบรรดาแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการหมักอาหารโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมนม นิยมใช้เป็นก้ำเชื้อในการผลิตเนยแข็งและผลิตภัณฑ์นมประเภทอื่นๆ แบ่งออกได้เป็น 3 subspecies คือ *L. lactis* subsp. *lactis* (เดิมคือ *Streptococcus lactis* subsp. *lactis*), *L. lactis* subsp. *cremoris* (เดิมคือ *Streptococcus cremoris* หรือ *S. lactis* subsp. *cremoris*) และ *L. lactis* subsp. *hordinae* ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมัก⁴ *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* พบได้ในน้ำนมดิบนำมาใช้เป็นก้ำเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมัก *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* เปลี่ยนชนิดไปเป็นไดแอซีทิลให้กลิ่นที่ดีในผลิตภัณฑ์นมแต่ไม่เป็นที่ต้องการในเบียร์ *L. lactis* subsp. *cremoris* มีความแตกต่างกับ *L. lactis* subsp. *lactis* ตรงที่ *L. lactis* subsp. *cremoris* ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°C ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือร้อยละ 4 ไม่สามารถไฮโดรไลส์อาร์จินีน ไม่สามารถหมักไรโบสได้ ซึ่งจากการศึกษา DNA-DNA homology และการเปรียบเทียบลำดับของ 16S rRNA ของ *L. lactis* subsp. *lactis* และ *L. lactis* subsp. *cremoris* พบว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรม เชื้อนี้หลายสายพันธุ์สามารถสร้างแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพ (food biopreservative)³

ง) *Leuconostoc*

เซลล์กลม อยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ เป็นพวกที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและเป็นเฮเทอโรเฟอโรเมนเทฟคือ หมักกลูโคสให้กรดดี-แลคติก (D-lactic acid) และสารอื่นๆ เช่น เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และอื่นๆ ไม่ผลิตแอมโมเนียจาก

อาร์จีนิน แบคทีเรียสกุลนี้บางชนิดถูกย้ายไปอยู่ในสกุลอื่นเช่น แบคทีเรียที่เดิมชื่อ *Leuconostoc oenos* ได้ถูกเปลี่ยนชื่อเป็น *Oenococcus oeni* และแบคทีเรียที่เดิมชื่อ *Leuconostoc paramesenteroides* ได้ถูกย้ายไปอยู่สกุลใหม่คือ *Weissella*¹

Leuconostoc เป็นแบคทีเรียในวงศ์เดียวกับแบคทีเรียในสกุลที่ใกล้เคียงกันคือ แบคทีเรีย *Weissella* และ *Oenococcus* เชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc* ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) และมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ อุณหภูมิ 18°C ถึง 25°C บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°C มีรูปร่างกลม (coccoid) หรือมีลักษณะคล้ายรูปร่างท่อน (rod-like) โดยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและรูปแบบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (อาหารเหลวหรืออาหารแข็ง) *Leuconostoc* แตกต่างกับ *Lactococcus* และ *Streptococcus* ตรงที่เป็นพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟอย่างแท้จริง (obligately heterofermentative) ถึงแม้ว่า *Leuconostoc* นี้จะสามารถเจริญได้ในบรรยากาศปกติ แต่โดยทั่วไปสภาวะที่ไม่มีอากาศจะส่งเสริมการเจริญเติบโต พลาสมิดพบบ่อยในแบคทีเรียชนิดนี้ และเมื่อมีพลาสมิดอาจช่วยกำกับการทำหน้าที่สำคัญรวมถึงเมแทบอลิซึมของน้ำตาลแลคโตส ซิเตรตและการผลิตแบคเทอริโอซิน *Leuconostoc* สายพันธุ์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงของอาหารแช่เย็นที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ⁴

แบคทีเรียสกุลนี้โดยมากสัมพันธ์กับถิ่นที่อยู่อาศัย วัสดุจากพืช ผัก นมและสภาพแวดล้อมของนมและผลิตภัณฑ์เนื้อ บางชนิดทำให้อาหารเน่าเสีย (เช่น *Leuconostoc gasiformitatum*) ส่วน *Leuconostoc* ชนิดอื่นใช้ในการหมักเช่น *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* และ *Leuconostoc lactis* ใช้ในการหมักนม *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc kimchii* และ *Leuconostoc fallax* ใช้ในการผลิตผักดอง โดยทั่วไปถิ่นที่อยู่อาศัยของสายพันธุ์เหล่านี้สะท้อนให้เห็นถึงชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่แบคทีเรียเหล่านี้ใช้ในการหมัก สายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับพืช เช่น เชื้อ *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* หมักน้ำตาลในพืชได้เช่น ฟรุคโตส อะราบินอส ซูโครสและทรีฮาโลส ส่วนสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับนมเช่น *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* และ *L. lactis* น่าจะหมักน้ำตาลแลคโตส กาแลคโตสและกลูโคสได้ เชื้อชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสียเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ซึ่งทำให้เกิดเมือก *Leuconostoc* หลายสายพันธุ์สร้างแบคเทอริโอซินได้⁴

๑) *Pediococcus*

Pediococcus หมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ เชื้อ *Pediococci* ไม่เคลื่อนที่ แบ่งตัว 2 ระบาย ซึ่งมีการเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ (tetrad) เซลล์อาจมีการเรียงตัวเป็นคู่แต่ไม่มีการเรียงตัวเป็นสายเหมือนกับ *Lactococci*, *Streptococci* และ *Leuconostocs* เชื้อ *Pediococcus* เหมือนกับแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มอื่นคือ เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25°C ถึง 40°C แต่บางชนิดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50°C ทนต่ออุณหภูมิที่ใช้พาสเจอร์ไรส์ได้ *Pediococcus* ต่างจากแบคทีเรีย

กรดแลคติกกลุ่มอื่นคือ สามารถทนต่อสภาพที่มีกรดสูงได้ (เจริญได้ที่พีเอช 4.2) และทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีเกลือสูงเช่น เจริญได้ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 บางสายพันธุ์ให้ผลิตอาหารหมัก หรือทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์เสีย พบบนผักและในอาหารหมักเช่น ผักดอง กะหล่ำปลีดอง เบียร์ไวน์ และอื่นๆ *Pediococcus* หลายชนิดมีความสำคัญในการหมักอาหาร⁴

Pediococcus acidilactici และ *Pediococcus pentosaceus* พบได้ตามธรรมชาติในผักสด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการหมักกะหล่ำปลีดอง และผักดองชนิดอื่นและยังสามารถใช้เติมลงในเนื้อสัตว์เพื่อผลิตเป็นไส้กรอกหมัก ถึงแม้ว่าแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้ จะไม่สามารถหมักแลคโตสได้แต่ก็พบบ่อยในเนยแข็งโดยมีส่วนร่วมในการบ่มเนยแข็ง *Pediococcus* ยังมีความสำคัญต่อการเสียของอาหารหมักโดยเฉพาะเบียร์ ไวน์ และไซเดอร์ (cider) ซึ่งเชื้อ *Pediococcus damnosus* ก่อให้เกิดปัญหาในเบียร์โดยสร้างไดอะซีทิล (diacetyl) ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการในเบียร์ *Pediococcus* หลายสายพันธุ์สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้⁴

พลาสมิดพบได้บ่อยใน *Pediococci* ยีนบนพลาสมิดเหล่านี้อาจกำกับการทำหน้าที่ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการใช้น้ำตาลแรฟฟิโนส (raffinose) ซูโครส และการผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้ในเนื้อสัตว์ ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium botulinum* คุณสมบัติในการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียในกลุ่ม *Pediococci* มีความสำคัญ ดังนั้นมีการนำไปใช้เป็นกล่าเชื้อในการผลิตไส้กรอกหมักซึ่งอาจช่วยในการถนอมอาหารได้ดีขึ้น⁴

ฉ) *Vagococcus*

Vagococcus เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase negative) เจริญได้ที่ 10°C แต่ไม่เจริญที่ 45°C เจริญในสภาพที่มีเกลือร้อยละ 4 แต่ไม่เจริญในสภาพที่มีเกลือร้อยละ 6.5 และไม่เจริญที่พีเอช 9.6 มีลักษณะคล้าย lactococci แต่ทนเกลือได้ดีกว่า พบในปลาและอาหารทะเลชนิดอื่น พบในน้ำและสิ่งขับถ่ายจากสัตว์

2.1.2 แบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนแบบปกติและไม่สร้างสปอร์ (Nonspore Forming Gram-Positive Regular Rod)

2.1.2.1 Lactobacillaceae

ก) *Lactobacillus*

แบคทีเรียสกุลนี้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ อยู่เดี่ยวๆ หรือต่อกันเป็นสายสั้น แต่ *Lactobacillus* บางชนิดมีรูปร่างท่อนสั้น (coccobacilli) คือ ยาวน้อยกว่า 1.5 ไมโครเมตร แต่บางชนิดอาจยาวถึง 5-10 ไมโครเมตรและอาจมีลักษณะบาง โค้งงอ ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งก็มีความหลากหลาย บางสายพันธุ์มีโคโลนีลักษณะกลมใหญ่ เล็กหรือมีรูปร่างไม่ปกติ มีหลาย

ชนิดและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมากกว่าแบคทีเรียสกุลอื่น แต่แบคทีเรียกลุ่มนี้มี ความหลากหลายมากที่สุดในทางนิเวศวิทยา ทางกายภาพและทางชีวเคมี เป็นพวกที่เจริญได้ทั้ง สภาพที่มีและไม่มีอากาศ ส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แต่บางชนิดเจริญได้ที่ อุณหภูมิต่ำ ไม่สร้างคะตะเลส ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) แต่อีกหลายชนิดไม่ ต้องการอากาศอย่างแท้จริงเช่น ชนิดที่พบในลำไส้และสิ่งขับถ่ายของมนุษย์ ในธรรมชาติพบได้ใน สิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลาย *Lactobacillus* บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในพืช ผักและยังพบ ได้บ่อยในนมและเนื้อสัตว์ น้ำผลไม้ เครื่องดื่มหมัก ธรรมชาติและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ นอกจากนี้ยัง พบเชื้อชนิดนี้ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์รวมทั้งกระเพาะอาหารและปาก⁴

ถึงแม้ว่าแบคทีเรียสกุลนี้จะมีประโยชน์ในกระบวนการผลิตอาหารหมักโดยเฉพาะเนยแข็ง ผัก ดอง ได้กรอกหมัก การสร้างกรดแลคติกมีประโยชน์ในการผลิตอาหารหมักแต่ไม่เป็นผลดีถ้าพบใน อาหารชนิดอื่นเนื่องจากจะทำให้อาหารนั้นเสีย *Lactobacilli* บางชนิดสร้างเมือกทำให้น้ำตาลเสีย ทำให้ได้กรอกเปลี่ยนสีเป็นสีเขียว ทำให้เนื้อที่บรรจุในสภาพสุญญากาศเกิดเปรี้ยวขึ้น ทำให้กะหล่ำปลี ดองเน่าเสีย ทำให้อาหารที่เก็บถนอมไว้ด้วยน้ำส้มสายชูเน่าเสียเช่น ซอสมะเขือเทศและมายองเนส²

ความสามารถของ *Lactobacilli* ในการเจริญและทนต่อสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายได้ สะท้อนให้เห็นถึงคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ถึงแม้ว่า *Lactobacilli* ส่วนใหญ่จะชอบ เจริญที่อุณหภูมิปานกลางแต่ก็มีบางชนิดที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic) ทนความร้อน (thermoduric) หรือชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophilic) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญผัน แปรในช่วงที่กว้างคือ 30-45°C *Lactobacillus* บางชนิดทนเกลือ ทนต่อสภาพความดันออสโมติก (osmotic pressure) สูงและสภาพที่มีน้ำอิสระ (water activity) ปริมาณน้อยได้ดี ความสามารถในการทนต่อกรดเป็นคุณลักษณะของ *Lactobacilli* ซึ่งมีหลายสายพันธุ์ที่ชอบสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด และบางชนิดทนต่อเอทานอลหรือเกลือน้ำดี⁴ ดังเช่นการรายงานของ Nanasombat และคณะ⁶ ได้ แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสดและแฮมปลาโดยพบว่า ในจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้งหมด 30 ไอโซเลตที่คัดเลือกมีเพียง 2 ไอโซเลตคือ แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 ที่สามารถทนต่อกรดแลคติก (พีเอช 2.9 และ 3.2) กรดไฮโดรคลอริก (พีเอช 2.2) โซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 6) และเกลือน้ำดี (ร้อยละ 5.25) ในอาหารเหลว MRS ได้ดีที่สุด และเมื่อจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 คือเชื้อ *Lactococcus lactis* และ ไอโซเลต 13IS4 คือเชื้อ *Lactobacillus sakei*

นอกจากนี้ *Lactobacillus* ส่วนใหญ่ยังสามารถทนต่ออากาศ ในขณะที่ *Lactobacillus* ชนิดอื่นต้องการสภาพที่ไม่มีอากาศอย่างแท้จริงในการเจริญ (strictly anaerobic) *Lactobacilli* เหมือนกับ แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นคือ มีคุณสมบัติในการหมัก แต่มีความหลากหลายของเมแทบอลิซึม

มากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลอื่นโดยสามารถที่จะแบ่งกลุ่มของ *Lactobacillus* ออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ตามวิธีการหมักน้ำตาลได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 คือ obligate homofermentative กลุ่มที่ 2 คือ facultative heterofermentative และกลุ่มที่ 3 คือ obligate heterofermentative⁴

เมแทบอลิซึมแบคทีเรียสกุลนี้มีหลากหลาย บางชนิดต้องการอาหารจำเพาะสำหรับการเจริญและหลายชนิดต้องการสารอาหารสมบูรณ์ *Lactobacilli* ไม่ใช่แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนและไขมันได้ดี ดังนั้นจึงต้องการกรดอะมิโน เปปไทด์และกรดไขมันสำหรับการเจริญที่รวดเร็ว บางสายพันธุ์ต้องการวิตามินหลายชนิด นิวคลีโอไทด์ และสารอาหารชนิดอื่นๆ รวมทั้งต้องการคาร์โบไฮเดรตที่สามารถหมักได้ซึ่งขึ้นอยู่แหล่งที่อยู่อาศัยกับสภาวะแวดล้อม แบคทีเรียกลุ่มนี้หมักน้ำตาลได้หลายชนิดซึ่งไม่เพียงหมักน้ำตาลปกติที่ใช้บ่อย (เช่น กลูโคส ฟรุคโตส แลคโตส) เท่านั้นยังหมักคาร์โบไฮเดรตจากพืชได้เช่น เซลโลไบโอส (cellobiose) อะไมดาลิน (amygdalin) และทรีฮาโลส (trehalose) และบางชนิดยังสามารถหมักสตาร์ชได้ *Lactobacillus* หลายชนิดเกี่ยวข้องกับการหมักอาหารและบางชนิดใช้เป็นก้ำเชื้อในการผลิตอาหารหมัก เชื้อนี้หลายชนิดมีอยู่แล้วในวัตถุดิบหรือบนผิวของอุปกรณ์ซึ่งมีผลต่อการผลิตหรือสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหารหมักทางอ้อม *Lactobacilli* มีความหลากหลายทางพันธุกรรม พลาสทิดในเชื้อกลุ่มนี้พบได้บ่อย พบว่ายีนในพลาสทิดหนึ่งเกี่ยวข้องกับการใช้น้ำตาลแลคโตสและยังเกี่ยวข้องกับการสร้างแบคเทอริโอซินและการต้านทานสารปฏิชีวนะ⁴

ข) *Carnobacterium*

Carnobacterium มีหลายลักษณะที่คล้ายกับเซลล์ของ *lactobacilli* เป็นพวก facultative anaerobe ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและเป็นพวกเฮเทอโรเฟอโรเมนเททิฟ เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (psychrotroph) ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 0°C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45°C *Carnobacterium* แตกต่างจาก *lactobacilli* ตรงที่ไม่สามารถเจริญได้บน acetate medium และสามารถสังเคราะห์กรดโอเลอิก (oleic acid) ได้ เจริญได้ในอาหารโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เนื้อที่บรรจุในสภาพสุญญากาศและเก็บในตู้เย็นจึงพบในผลิตภัณฑ์ประเภทนี้รวมทั้งปลาและสัตว์ปีก ตัวอย่างของแบคทีเรียสกุลนี้ได้แก่ *Carnobacterium piscicola*¹

ค) *Brochothrix*

Brochothrix เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนไม่สร้างสปอร์ มีความเกี่ยวพันอย่างใกล้ชิดกับ *Lactobacillus* และ *Listeria* มีหลายลักษณะที่คล้ายกับเชื้อ *lactobacilli* เช่นเดียวกัน เซลล์ในระยะ exponential มีรูปร่างท่อนและเมื่อแก่จะเป็นรูปกลม เป็นพวก facultative anaerobe และเป็นพวกโฮโมเฟอโรเมนเททิฟ ไม่เคลื่อนที่ พบบ่อยในเนื้อ สามารถเจริญในเนื้อสดและเนื้อแปรรูปที่เก็บในภาชนะบรรจุที่อากาศเข้าไม่ได้และเก็บในตู้เย็น ตัวอย่างเช่น *Brochothrix thermosphacta* และ *Brochothrix campestris*¹

ง) *Listeria*

Listeria เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ อยู่เดี่ยวๆ หรือต่อกันเป็นสายสั้น เคลื่อนที่ได้เป็นพวก facultative anaerobe สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 1°C เซลล์ถูกทำลายโดยการพาสเจอร์ไรส์ *Listeria* เกี่ยวพันอย่างใกล้ชิดกับ *Brochothrix* หลายชนิดแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมและแยกได้จากอาหารหลายชนิด ชนิดที่เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญ ได้แก่ *Listeria monocytogenes*¹

2.1.3 แบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนแบบไม่ปกติและไม่สร้างสปอร์ (Nonspore Forming Gram-Positive Irregular Rod)

ก) *Corynebacterium*

แบคทีเรียสกุลนี้บางชนิดเป็นปรสิตและก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ บางชนิดก่อให้เกิดโรคในพืชและบางชนิดไม่ก่อโรค เซลล์ของแบคทีเรียสกุลนี้มีหลายรูปร่าง (pleomorphic) อาจมีรูปร่างท่อนตรงไปจนถึงท่อนโค้ง โดยทั่วไปไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศ แต่ในสภาพที่ไม่มีอากาศก็สามารถเจริญได้ ส่วนใหญ่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางถึงแม้ว่าจะมีชนิดที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำบ้างก็ตาม พบทั่วไปตามธรรมชาติเช่น ในน้ำ ดิน พืช และสัตว์ อาจพบในอาหารที่มาจากพืชและสัตว์ บางครั้งเกี่ยวข้องกับการเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อและผัก²

ข) *Arthrobacter*

Arthrobacter เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างได้หลายแบบตั้งแต่รูปกลม รูปไข่ หรือค่อนข้างยาวเล็กน้อย เมื่อแบคทีเรียรูปกลมถูกย้ายไปยังอาหารใหม่จะมีท่อยาวงอกออกมา 1-3 ท่อ ท่อนี้จะพัฒนาไปเป็นเซลล์รูปท่อนที่มีขนาดและรูปร่างต่างกัน และเมื่อแก่เซลล์รูปท่อนจะเปลี่ยนไปเป็นเซลล์รูปกลม แบคทีเรียสกุลนี้พบในดิน เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์นม ของเสียจากโรงงานแปรรูปนม activated sludge เปียร์และเมือกบนตัวปลา²

ค) *Brevibacterium*

เซลล์สามารถเปลี่ยนจากรูปท่อนไปเป็นรูปกลมได้ ต้องการอากาศในการเจริญ ไม่เคลื่อนที่ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง ชนิดที่สำคัญได้แก่ *Brevibacterium linens* และ *Brevibacterium casei* ช่วยทำให้เกิดกลิ่นในเนยแข็งหลายชนิดที่ผ่านการบ่มที่ผิว เนื่องจากเกิดการสร้างสารประกอบซัลเฟอร์ เช่น มีเทนไทออล (methanethiol) นอกจากนี้ยังทำให้อาหารที่มีโปรตีนสูงเน่าเสียเช่น เป็นสาเหตุการเสียของปลา พบได้ในน้ำนมดิบและเนยแข็งหลายชนิด⁷

ง) *Propionibacterium*

Propionibacterium เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อนหลายแบบ (pleomorphic rod) อาจกลม ยาวแตกแขนง ส่วนใหญ่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ บางชนิดทนต่อแก๊สออกซิเจนได้ดี ไม่เคลื่อนที่ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง พบในลำไส้ของคนและสัตว์ สร้างกรดไพรูวิกและกรดแอซิติกในระหว่างการหมัก สร้างกรดอินทรีย์ชนิดอื่นได้ในปริมาณน้อย เชื้อแบคทีเรียสกุลนี้ชนิดที่สำคัญคือ

Propionibacterium freudenreichii ssp. *shermani* ใช้ในการผลิต Swiss cheese เนื่องจากสร้างกรดโพรพิโอนิกและคาร์บอนไดออกไซด์ได้จึงทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีและทำให้เกิดตา (eyes) ในเนยแข็ง นอกจากนี้เชื้อนี้ยังสร้างวิตามินบี 12 ปริมาณมากและใช้ในการผลิตกรดโพรพิโอนิก²

จ) *Bifidobacterium*

Bifidobacterium มีรูปร่างท่อนหลายแบบ อาจอยู่เดี่ยว ๆ หรือต่อเป็นสาย อาจจัดตัวเป็นรูปตัววีหรือรูปดาว ไม่เคลื่อนที่ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางในสภาพไร้อากาศ หมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลคติกและกรดอะซิติก พบในลำไส้ใหญ่ของคน สัตว์ และนก บางชนิดใช้เป็นโพรไบโอติกเช่น *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* และ *Bifidobacterium adolescentis*⁷

2.1.4 แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนและสร้างสปอร์ (Spore Forming Gram-Positive Rod)

ก) *Bacillus*

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างสปอร์ได้ ขนาดของเซลล์ผันแปรมากตั้งแต่เล็ก กลางไปจนถึงใหญ่ ($0.5-1 \times 2-10$ ไมโครเมตร) ต้องการอากาศในการเจริญแต่บางชนิดเป็นพวก facultative anaerobe เมื่อแก่อาจติดสีแกรมลบ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ สร้างเอนไซม์อะไมเลส สร้างกรดจากการหมักกลูโคสแต่ไม่สร้างแก๊ส ส่วนใหญ่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แต่มีบางชนิดชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำและที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญจึงผันแปรตั้งแต่ -5°C จนถึงประมาณ 45°C และอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญเท่ากับ $25^{\circ}\text{C} - 75^{\circ}\text{C}$ pH ต่ำสุดสำหรับการเจริญผันแปรจาก pH 2.0 (สำหรับ *Bacillus acidocaldarius*) จนถึง pH 7.5 – 8.0 (สำหรับ *Bacillus alcalophilus*) ทนเกลือได้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 หรือน้อยกว่าสำหรับเชื้อบางชนิด แต่บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 25^{2, 7}

Bacillus พบในดิน น้ำ สิ่งขับถ่าย วัสดุเน่าเปื่อย และในอาหารหลายชนิด ส่วนผสมอาหารที่อาจเป็นแหล่งของ *Bacillus* ได้แก่ แป้งและน้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งของสปอร์ *Bacillus* ซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนในไส้กรอกหมัก ขนมอบ และอาหารกระป๋อง การที่สปอร์สามารถทนต่อสารต่าง ๆ ได้ดีทำให้เชื้อ *Bacillus* มีความสำคัญต่อการเน่าเสียของอาหาร *Bacillus* ที่สามารถย่อยสลายสารเพคตินและพอลิแซ็กคาไรด์ในเนื้อเยื่อและเป็นสาเหตุการเสียของผักสดได้แก่ *Bacillus subtilis* ส่วนเชื้อ *Bacillus stearothermophilus* ทำให้อาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำเน่าเสียและ *Bacillus coagulans* ทำให้ผลิตภัณฑ์นมเชื้อเทศเน่าเสีย สำหรับเชื้อ *Bacillus* ที่ก่อโรคมะเร็ง 2 ชนิดได้แก่ *Bacillus anthracis* ก่อโรคแอนแทรกซ์ (anthrax) และ *Bacillus cereus* ก่อโรคอาหารเป็นพิษ²

ข) *Clostridium*

Clostridium เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สร้างสปอร์รูปไข่หรือรูปกลมอยู่ที่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์ เป็นเชื้อที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างมาก (strict anaerobe) มีเพียงบางชนิด

ที่ทนออกซิเจนได้ ไม่สร้างเอนไซม์อะตาเลส ทนเกลือได้ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.5 – 6.5 ความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรดที่ยับยั้งเชื้อนี้คือ ร้อยละ 0.5 – 1.0 และความเข้มข้นของคลอรีนที่ทำลายเชื้อนี้คือ 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีทั้งพวกที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง ชอบอุณหภูมิต่ำและชอบอุณหภูมิสูงในการเจริญ แพร่กระจายมากในธรรมชาติ แหล่งของ *Clostridium* คือดิน และยังพบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์ ในน้ำเสียและพบในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่มาจากพืชและสัตว์ บางชนิดใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ในการไฮโดรไลส์คาร์โบไฮเดรตและโปรตีนสำหรับการแปรรูปอาหาร บางชนิดก่อโรคในคนเช่น เชื้อ *Clostridium perfringens* ก่อโรคอาหารเป็นพิษและ *Clostridium botulinum* ก่อโรคโบทูลิซึม (botulism) สปอร์ของเชื้อนี้ทนความร้อนได้ดีถ้าหากอยู่รอดจากการให้ความร้อนในการผลิตอาหารกระป๋องก็อาจก่อ เจริญ ทำให้อาหารเสียและสร้างสารพิษ^{1,2}

ค) *Sporolactobacillus*

Sporolactobacillus เป็นแบคทีเรียรูปท่อนขนาดกลาง (1×4 ไมโครเมตร) เคลื่อนที่ได้ ชอบเจริญในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) หมักกลูโคสให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ สร้างเอนโดสปอร์ที่ทนความร้อนได้น้อยกว่าสปอร์ของเชื้อ *Bacillus* พบในดินและอาหารไก่เช่น *Sporolactobacillus inulinus*⁷

2.1.5 แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนและสร้างสปอร์ (Spore Forming Gram – Negative Rod)

ก) *Desulfotomaculum*

Desulfotomaculum เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน สร้างเอนโดสปอร์ เคลื่อนที่ได้ ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophile) ในสภาพที่ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) รีดิวซ์สารประกอบซัลเฟอร์ได้แก่ ซัลเฟต และอื่น ๆ ไปเป็นไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำให้อาหารกระป๋องเสียโดยอาหารจะมีสีดำ กลิ่นเหม็น ตัวอย่าง เช่น *Desulfotomaculum nigrificans*²

2.1.6 แบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนและรูปกลม ต้องการอากาศในการเจริญ (Aerobic Gram-Negative Rod and Cocci)

2.1.6.1 Pseudomonadaceae

ก) *Pseudomonas*

Pseudomonas มีรูปร่างเป็นท่อนตรงถึงท่อนโค้ง เคลื่อนที่ได้ แพร่กระจายอยู่ตามธรรมชาติ ในพืชและสัตว์บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคพืช บางชนิดทำให้เกิดโรคในมนุษย์ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* มีกิจกรรมทางชีวเคมีค่อนข้างเด่นคือ สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์ได้หลายชนิด สร้างเอนไซม์อะตาเลส และเอนไซม์ออกซิเดสได้ ต้องการอากาศในการเจริญ สร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลมอลโตส แบคทีเรียสกุลนี้บางชนิดสร้างเม็ดสี pyoverdine หรือ fluorescein ซึ่งเป็นเม็ดสีที่เรืองแสงและละลายน้ำได้ มักมีสีเหลือง-เขียวหรืออาจ

เห็นเป็นสีฟ้าหรือส้มแล้วแต่ชนิดของแบคทีเรีย ชื่อ *Pseudomonas* แพร่กระจายมากในอาหารสด โดยเฉพาะผัก เนื้อสัตว์ สัตว์ปีกและอาหารทะเล แบคทีเรียสกุลนี้ผลิตเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาย่อยสลาย โปรตีนและไขมัน ทำให้เนื้อที่แช่เย็นเน่าเสีย บางชนิดผลิตเอนไซม์ย่อยเพคติน (pectolytic enzyme) ทำให้ผักสดเน่าเสียและชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (เป็นพวก psychrotroph) จึงเจริญได้ในอาหารแช่เย็น และอาหารแช่แข็ง เป็นเชื้อที่ไม่ทนความร้อน ดังนั้นจึงไม่พบในอาหารที่ผ่านความร้อนมาแล้ว ยกเว้นอาหารที่ปนเปื้อนหลังจากให้ความร้อน เชื้อสกุลนี้ไม่ทนต่อการทำแห้งและไม่ทนต่อรังสีแกมมา แต่เชื้อแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ทนต่อสารเคมีที่ใช้ทำความสะอาดชนิดที่เรียกว่า quaternary ammonium compounds ได้ดี ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดที่เคยจัดให้อยู่ในสกุลนี้ได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุลใหม่ อย่างน้อย 13 สกุล ได้แก่ *Acidovorax*, *Aminobacter*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Delftia*, *Devosia*, *Herbaspirillum*, *Hydrogenophaga*, *Marinobacter*, *Ralstonia*, *Sphingomonas*, *Telluria* และ *Wautersia*^{1,2}

ข) *Xanthomonas*

Xanthomonas มีลักษณะส่วนใหญ่คล้ายกับ *Pseudomonas* รูปร่างท่อนตรง เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ (polar flagellum) สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase positive) ทำให้เกิดโรคในพืช ดังนั้นจึงเกี่ยวข้องกับการเน่าเสียหลายแบบของผลิตภัณฑ์จากพืช ชนิดที่มีประโยชน์ใช้ในการผลิตแซนแทนกัม (xanthan gum) คือ *Xanthomonas campestris*²

ค) *Shewanella*

Shewanella สร้างเอนไซม์หลายชนิดเร่งปฏิกิริยาทำให้อาหารเสีย เป็นเชื้อที่ไม่ทนความร้อนพบทั่วไปในดินน้ำและบนพืช ตัวอย่างเช่น *Shewanella putrefaciens* เดิมคือ *Pseudomonas putrefaciens* ต่อมาเปลี่ยนเป็น *Alteromonas putrefaciens* สามารถสร้างออกซิเดสได้ (oxidase positive) รูปร่างท่อนตรงหรือท่อนโค้ง นอกจากนั้นยังมีแบคทีเรียอีก 3 ชนิดในสกุลนี้ได้แก่ *Shewanella hanedai*, *Shewanella benthica* และ *Shewanella colwelliana* ทั้งหมดเกี่ยวข้องกับแหล่งน้ำ hydrostatic pressure ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *S. benthica*¹

2.1.6.2 Halobacteriaceae

ง) *Halobacterium* และ *Halococcus*

Halobacterium และ *Halococcus* ชอบเกลืออย่างมาก (extreme halophile) ต้องการเกลือความเข้มข้นร้อยละ 15 เพื่อการเจริญ พบในเกลือที่ได้จากการระเหยน้ำออกจากน้ำทะเล ไม่เจริญในอาหารทั่วไป แต่จะเจริญได้ในอาหารที่ถนอมไว้ด้วยเกลือ สร้างเม็ดสีที่มีสีแดงเรียกว่า bacteriorubrin ความเข้มข้นของเกลือในระดับสูงจำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในเชื้อชนิดนี้ จำเป็นต่อความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ ไรโบโซมและจำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเชื้อชนิดนี้ ในสภาพที่ความเข้มข้นของเกลือระดับต่ำ *Halobacterium* จะเปลี่ยนจากรูปท่อนไปเป็นรูปกลม²

2.1.6.3 Acetobacteriaceae

ก) *Acetobacter*

Acetobacter เป็นแบคทีเรียรูปไข่และอาจมีรูปท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อย เมื่ออ่อนติดสีแกรมลบ แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจติดสีแกรมบวก เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) หรือบางชนิดอาจไม่เคลื่อนที่ แบคทีเรียสกุลนี้เปลี่ยนเอทานอลให้เป็นกรดแอซิติก ออกซิไดส์แอซิเตตและแลคเตตให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ พบบนผักและผลไม้ เกี่ยวข้องกับการเสียของน้ำผลไม้ เบียร์ไวน์ โดยทำให้เปรี้ยว ชนิดที่สำคัญคือ *Acetobacter aceti*²

ข) *Gluconobacter*

Gluconobacter เป็นแบคทีเรียรูปไข่จนถึงรูปท่อน ติดสีแกรมลบแต่เมื่อแก่อาจติดสีแกรมบวก เซลล์อยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นสาย ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (strict aerobes) สามารถออกซิไดส์เอทานอลให้เป็นกรดแอซิติกเช่น *Gluconobacter oxydans* พบในอาหารหลายชนิดเช่น ในผัก ผลไม้ ยีสต์ขนมปัง เบียร์ไวน์ น้ำส้มสายชู เกี่ยวข้องกับการเสียของผักผลไม้²

2.1.6.4 Neisseriaceae

ก) *Acinetobacter*

Acinetobacter มีรูปร่างท่อนสั้นหรือท่อนเกือบกลม (coccobacilli) พบอยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นสายสั้น ชอบเจริญในสภาพมีอากาศ (strict aerobe) ไม่รีดิวซ์ไนเตรต ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) ไม่สร้างออกซิเดส (oxidase negative) พบแพร่กระจายทั่วไปในดินและน้ำ อาจพบในอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะอาหารสดแช่เย็น ทำให้อาหารเสีย¹

ข) *Alcaligenes*

Alcaligenes มีรูปร่างท่อนหรือท่อนเกือบกลม เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella ชอบเจริญในสภาพมีอากาศ สร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ พบตามธรรมชาติในดิน น้ำ นานมดืบ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ปีก สิ่งเน่าเปื่อยผุพังและในทางเดินอาหารของสัตว์ เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหารที่มีโปรตีนเช่น ไข่และผลิตภัณฑ์นม^{1,2}

ค) *Alteromonas*

Alteromonas เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ ต้องการอากาศในการเจริญ (strict aerobe) ต้องการโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์สำหรับการเจริญที่ดี มีหลายลักษณะคล้าย *Pseudomonas* ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ พบในสิ่งแวดล้อมในทะเลรวมทั้งอาหารทะเล เชื้อสกุลนี้สำคัญต่อการเสียของปลา^{1,2}

ง) *Brucella*

Brucella มีรูปร่างท่อนเกือบกลม (coccobacilli) หรือท่อนสั้น ไม่เคลื่อนที่ ส่วนใหญ่อยู่เดี่ยวๆ หลาย species ทำให้เกิดโรคในสัตว์เช่น *Brucella melitensis* ทำให้เกิดโรคในแพะและแกะ *Brucella abortus* ทำให้เกิดโรคในโคกระบือ เชื้อ *Brucella suis* ทำให้เกิดโรคในหมู อาจก่อให้เกิด

โรคบูเซลโลซิส (brucellosis) ในคนได้ด้วย เชื้อชนิดนี้ไม่ทนความร้อน ปนเปื้อนมาจากน้ำนมดิบ เนื้อและไข่กรอกที่ไม่ได้ผ่านความร้อน²

จ) *Flavobacterium*

Flavobacterium มีรูปร่างท่อน ไม่เคลื่อนที่ สร้างเมือกที่ห่อหุ้มเซลล์ ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30°C แต่มีบางสายพันธุ์เจริญได้ที่ 37°C พบในดิน น้ำ คน สัตว์ และอาหารหลายชนิดเช่น ผักสด ผักแช่แข็งที่ทำให้ละลายแล้ว ปลาและหอยแช่เย็น บนเนื้อสัตว์ สัตว์ปีก และสิ่งแวดล้อมในโรงงานอาหารกระป๋อง บางชนิดปัจจุบันได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุลใหม่ 5 สกุลได้แก่ *Empedobacter*, *Chryseobacterium*, *Myroides*, *Sphingomonas* และ *Sphigobacterium*^{1,2}

2.1.7 แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อนและเป็น Facultative Anaerobe (Gram – Negative Facultative Anaerobic Rod)

2.1.7.1 Enterobacteriaceae

แบคทีเรียในวงศ์นี้แยกได้จากทางเดินอาหารของสัตว์ได้แก่ *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia*, *Edwardsiella*, *Proteus* และ *Yersinia* บางสกุลทำให้เกิดโรคได้แก่ *Salmonella*, *Yersinia* และ *E. coli* โดยทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ส่วนใหญ่เป็นพวก facultative anaerobe ไม่สร้างออกซิเดส เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมอื่นที่ไม่ใช่ทางเดินอาหารของสัตว์เช่น ถ้าพบอยู่ในอาหารไม่ได้หมายความว่าอาหารนั้นจะปนเปื้อนมาจากสิ่งขับถ่ายเสมอไป อาจปนเปื้อนมาจากแหล่งอื่นก็ได้ เช่น *Enterobacter* พบบ่อยบนผักสด *Citrobacter* และ *Klebsiella* พบบ่อยในน้ำนม ถ้าต้องการที่จะทราบว่าการปนเปื้อนนั้นมาจากสิ่งขับถ่ายหรือไม่ก็สามารถทำได้ ในกรณีที่ตัวอย่างที่จะตรวจสอบเป็นตัวอย่างน้ำ เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) เช่น *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* มักไม่พบในน้ำสะอาด ยกเว้นเมื่อมีการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายจึงจะตรวจหาโคลิฟอร์ม ส่วนการพบแบคทีเรียโคลิฟอร์มในอาหารไม่ได้บ่งบอกถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย (faecal contamination) แต่บ่งบอกถึงการมีสิ่งผิดปกติในกระบวนการผลิตซึ่งทำให้เชื้อรอดชีวิตหรือบ่งบอกถึงการปนเปื้อนหลังกระบวนการผลิต^{1,2}

ก) *Escherichia*

Escherichia มีรูปร่างท่อนตรง เคลื่อนที่ได้หรือบางชนิดเคลื่อนที่ไม่ได้ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง เป็นเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์มซึ่งบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่าย ชนิดที่สำคัญคือ *E. coli* เชื้อชนิดนี้บางสายพันธุ์ทำให้อาหารเสียและบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค หลายสายพันธุ์ไม่ก่อโรค พบในดิน น้ำ บนพืช ในทางเดินอาหารของคน สัตว์เลือดอุ่น นก และในอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะอาหารจำพวกผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีการสัมผัสโดยคน เชื้อนี้ไม่ทนความร้อน การที่พบ *E. coli* ในอาหารที่ผ่านความร้อนโดยการพาสเจอร์ไรส์หรือทำให้สุกแล้ว ชี้ให้เห็นถึงการปนเปื้อนอีกครั้ง

หลังผ่านความร้อน (recontamination) ดังนั้นจึงใช้ *E. coli* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มฟีคอลโคลิฟอร์ม (fecal coliform) เป็นจุลินทรีย์ดัชนี (indicator organism) บ่งชี้ถึงสุขลักษณะที่ดีในการผลิตอาหาร²

ข) *Salmonella*

Salmonella มีรูปร่างท่อนขนาดกลาง ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ (peritrichous flagella) ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง พบมากกว่า 2,400 ซีโรไทป์ (serotypes หรือ serovars) สร้างคะตะเลส และออกซิเดสได้ มีเมแทบอลิซึมของการหายใจและการหมัก (ไม่หมักแลคโตส) เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาที่ประกอบด้วยกลูโคส สารประกอบไนโตรเจนอินทรีย์และเกลือแร่ พบทั่วไปทั้งในดิน น้ำ น้ำเสีย คน สัตว์ อุปกรณ์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหาร อาหารสัตว์และอาหารหลายชนิด แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติคือ ลำไส้ของคนและสัตว์ ในบางประเทศอาจพบเชื้อ *Salmonella* ซีโรไทป์เฉพาะของบริเวณนั้น ๆ *Salmonella* ก่อให้เกิดโรคกับคนและสัตว์ ซีโรไทป์ที่เป็นสาเหตุสำคัญของโรคอาหารเป็นพิษมีหลายซีโรไทป์ได้แก่ *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* และอื่นๆ²

ค) *Shigella*

แบคทีเรียสกุล *Shigella* มี 4 สปีชีส์ได้แก่ *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* และ *Shigella sonnei* มีรูปร่างขนาดกลาง ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แหล่งที่อยู่อาศัยตามปกติคือ ลำไส้ของคนและสัตว์จำพวก primates แทบจะไม่พบในสัตว์ที่ไม่ใช่ primate ก่อโรคทางเดินอาหารที่เรียกว่าชิเจลโลซิส (shigellosis) การเจ็บป่วยจากเชือนี้พบไม่มากนัก แต่ถ้าป่วยก็จะมีอาการรุนแรง ตัวอย่างเช่น *Shigella dysenteriae*²

ง) *Citrobacter*

Citrobacter มีรูปร่างท่อนตรง อาจอยู่เดี่ยวหรืออยู่เป็นคู่ เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella ชอบอุณหภูมิปานกลาง ใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ ส่วนใหญ่หมักแลคโตสได้ เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติคือ ลำไส้ของคนและสัตว์ พบในอาหารหลายชนิดโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคนและทำให้อาหารเสีย ชนิดที่สำคัญคือ *Citrobacter freundii*²

จ) *Klebsiella*

Klebsiella เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อน ไม่เคลื่อนที่ สร้างแคปซูลได้ พบบนเมล็ดธัญชาติ อาหารสดและอาหารแช่แข็ง เป็นสมาชิกในกลุ่มของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร (gastroenteritis)²

ฉ) *Enterobacter*

Enterobacter คล้ายกับ *Klebsiella* ต่างกันที่ *Enterobacter* เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella พบในดิน น้ำ น้ำเสีย ในลำไส้ของคนและสัตว์ ในสิ่งแวดล้อมและในอาหารหลายชนิด เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ใช้บ่งชี้ถึงการเสียของอาหาร²

ช) *Erwinia*

Erwinia มีรูปร่างท่อนตรง มักจะอยู่เดี่ยวๆ ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ด้วย peritrichous flagella เป็นพวก facultative anaerobe สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและคะตะเลสได้ ทำให้เกิดโรคในพืช ตัวอย่างเช่น *Erwinia carotovora* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญที่ทำให้ผักที่เก็บไว้เน่าเสีย²

ซ) *Serratia*

Serratia มีรูปร่างท่อน เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella มีความสำคัญในการทำให้อาหารเสีย ตัวอย่างเช่น *Serratia marcescens* ผลิตเมดสีแดง²

ฅ) *Edwardsiella*

Edwardsiella มีรูปร่างท่อน ขนาดเล็ก เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella พบในลำไส้ของสัตว์เลือดเย็นและในน้ำ สร้างอินโดล (indole) จากทริปโตเฟน (tryptophan) และสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ในอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) ยังไม่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับโรคที่มีสาเหตุมาจากอาหารเป็นสื่อ (foodborne disease)²

ญ) *Proteus*

Proteus เป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella รูปร่างท่อน อยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นสาย พบได้ทั่วไป แหล่งที่อยู่อาศัยตามปกติคือ ในทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังพบในน้ำทิ้ง ดิน สัตว์ที่เน่าเปื่อยและในอาหารหลายชนิด ทำให้อาหารเสีย²

ฎ) *Yersinia*

Yersinia มีรูปร่างท่อนถึงรูปท่อน ตัวอย่างเช่น *Yersinia enterocolitica* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารของคน พบในอาหารหลายชนิดเช่น เนื้อ ไก่ สัตว์น้ำเปลือกแข็ง ผัก นม และไอศกรีม²

2.1.7.2 Vibrionaceae

ก) *Vibrio*

Vibrio มีรูปร่างท่อนสั้น โค้งหรือตรง สร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase positive) บางสายพันธุ์ไม่เจริญถ้าไม่มีเกลือ ความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ ร้อยละ 3 เชื้อ *Vibrio costicola* ทนเกลือได้ถึงร้อยละ 23 พบในผลิตภัณฑ์เนื้อที่ถนอมไว้ด้วยเกลือ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารในคน *V. cholerae* พบในลำไส้ของคนและสัตว์ ในน้ำ และบางครั้งพบในอาหาร *V. parahaemolyticus* พบในสิ่งแวดล้อมในทะเล อาหารทะเลและลำไส้ของคนที่ยังมีชีวิต²

ข) *Aeromonas*

Aeromonas มีรูปร่างท่อน ปลายมน เคลื่อนที่ได้ด้วย polar flagella สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและคะตะเลสได้ แหล่งที่อยู่อาศัยหลักคือ ในน้ำ บางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค enteritis ในคน พบในปลาและอาหารทะเล ทำให้ปลาและอาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์เน่าเสีย²

2.1.8 แบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างโค้งงอ เคลื่อนที่ได้ (Aerobic/Microaerophilic, Motile, Helical/Vibroid Gram – Negative Bacteria)

ก) *Campylobacter*

Campylobacter เป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้ด้วย flagella ที่ขั้วเซลล์ข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้ง 2 ข้าง สร้างเอนไซม์ออกซิเดส สิ่งที่แตกต่างกันกับแบคทีเรียทั่วไปคือ *Campylobacter* ใช้กรดอะมิโนหรือ tricarboxylic acid intermediates แทนที่จะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน ชนิดที่ทำให้เกิดโรคคือ *Campylobacter jejuni* ²

2.1.9 Rickettsias

ก) *Coxiella*

Coxiella เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่ ขนาดของเซลล์เล็กมาก (0.2×0.5 ไมโครเมตร) เจริญบน host cells เชื้อนี้ค่อนข้างทนต่ออุณหภูมิสูงแต่ถูกทำลายโดยการพาสเจอร์ไรส์ *Coxiella burnetii* ทำให้เกิดโรคกับโคกระบือและทำให้เกิดโรค Q fever ในคน จากการดื่มน้ำนมดิบ ⁷

2.2 เชื้อรา

เชื้อรา (mold) เป็นเชื้อราที่มีเส้นใย (filamentous fungi) สามารถเจริญจนได้มวลเซลล์หรือ ไมซีเลียม (mycelium) ปริมาณมากซึ่งแผ่ขยายอย่างรวดเร็วปกคลุมพื้นที่ระยกว่าหลายนิ้วภายในระยะเวลา 2-3 วัน ไมซีเลียมของเชื้อราเป็นกระจุกของเส้นใยที่เรียกว่า ไฮฟี (hyphae) เชื้อรามีความสำคัญในอาหารเนื่องจากสามารถเจริญได้แม้แต่ในสภาพที่แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้เช่น ในสภาพที่มี pH ต่ำ สภาพที่มี a_w ต่ำและสภาพที่มีความดันออสโมติกสูง เชื้อราหลายชนิดที่มีความสำคัญต่ออาหารสามารถเพิ่มจำนวนโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) ไชโกสปอร์ (zygospore) หรือคอนิเดีย (conidia) แอสโคสปอร์ของเชื้อราบางสกุลทนความร้อนได้ดีมาก เชื้อราบางกลุ่มสร้างอาร์โทสปอร์ (arthrospore) ซึ่งเป็นผลมาจากการแตกหักของไมซีเลียม เชื้อราหลายชนิดสามารถสร้างสปอร์ได้และหลายชนิดใช้ในการแปรรูปอาหาร ¹

การจำแนกชนิดของเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับอาหารตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 จนกระทั่งถึงปัจจุบันยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก แต่สิ่งที่เปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนก็คือ การค้นพบระยะของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual state หรือ perfect state) ของเชื้อราบางชนิดที่รู้จักดี ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเรียกว่า teleomorph นักวิทยาศาสตร์เชื่อว่ามีค่าความสำคัญมากกว่าระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศซึ่งเรียกว่า anamorph (imperfect state หรือ conidial state) คำว่า holomorph ชี้ให้เห็นว่าเชื้อรานั้นเป็นที่รู้จักกันดีทั้งระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัย

เพศ แต่ชื่อของเชื้อราในระยะ teleomorph เป็นชื่อที่ใช้เรียกเชื้อราชนิดนั้น¹ เชื้อราที่มีความสำคัญในอาหารมีดังนี้

2.2.1 ศักดิ์ (Division): Zygomycota

ชั้น (Class): Zygomycetes (เส้นใยไม่มีผนังกัน สืบพันธุ์โดยสร้าง sporangiospores เจริญเร็ว)

ลำดับ (Order): Mucorales

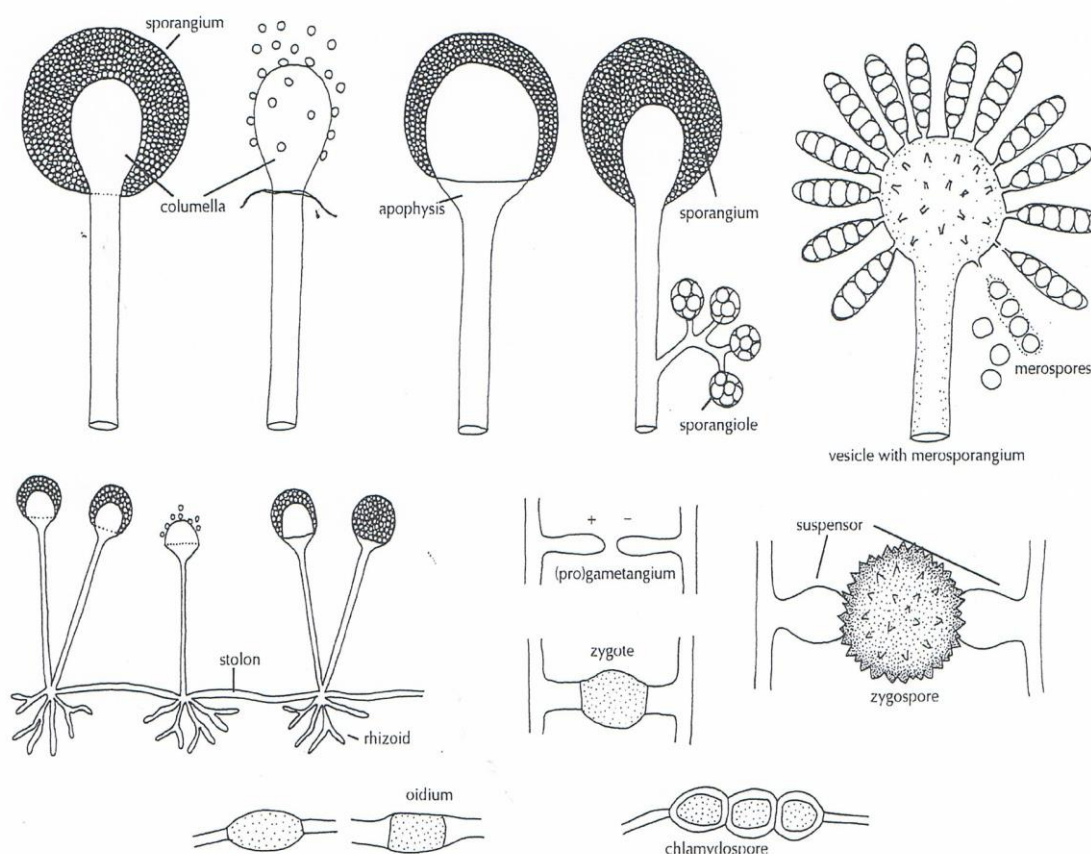
วงศ์ (Family): Mucoraceae และ Thamniaceae

2.2.1.1 Zygomycetes

เชื้อราในกลุ่มนี้สร้างเส้นใยที่ไม่มีผนังกัน (coenocytic hyphae) แต่เมื่อแก่อาจมีผนังกัน แต่การสร้างผนังกันจะพบเฉพาะในส่วนที่แยกเป็นโครงสร้างพิเศษออกจากเส้นใยเท่านั้น เช่น อับสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (sporangia) และไซโกสปอร์ (zygospores) หรือสปอร์แบบอาศัยเพศ บางครั้งผนังกันอาจเกิดในเส้นใยส่วนที่สมบูรณ์ เชื้อรานี้สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (sporangiospore หรือ single cell aplanospore) ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นภายในอับสปอร์ (sporangia) ที่มีลักษณะกลมหรือรี อาจมีหรือไม่มีคอลลิเมลลา (columella ซึ่งเป็นตุ่มเล็ก ๆ หรือเป็นแกนกลางที่อยู่ภายในอับสปอร์และอยู่ต่อกับก้านชูอับสปอร์) หรืออยู่ใน merosporangia ซึ่งเป็นอับสปอร์รูปทรงกระบอก (cylindrical sporangium) ซึ่งจะแตกออกเป็นแถวของ merospore เชื้อราบางชนิดสร้าง sporangioles เป็นอับสปอร์ที่มีขนาดเล็ก โดยปกติมีรูปร่างรีและภายในมีสปอร์เพียงหนึ่งสปอร์หรือ 2-3 สปอร์เท่านั้นและมี columella ขนาดเล็ก (รูปที่ 2.1)⁹

เชื้อราในกลุ่ม Zygomycetes บางสกุลถูกจำแนกชนิดโดยอาศัยการมี apophysis ซึ่งเป็นส่วนที่พองออกของก้านชูอับสปอร์ (อยู่ใต้อับสปอร์ตรงส่วนของโคนก้านชูอับสปอร์) อาจเกิดเส้นใยพิเศษที่เจริญขึ้นบนพื้นผิวซึ่งเรียกว่า สโตลอน (stolon) โดยจะไม่มีส่วนของก้านชูอับสปอร์เกิดขึ้นในส่วนของสโตลอน สโตลอนอาจอยู่ติดกับสารตั้งต้น (substrate) โดยอาศัยส่วนของไรซอยด์ (rhizoids) หรือโครงสร้างที่คล้ายราก เชื้อราบางชนิดผลิตคลาไมโดสปอร์ (chlamydospores) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีผนังหนาหรือมีโออิดี (oidia) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีผนังบาง โดยทั่วไปมีลักษณะรูปร่างกลมรี ส่วนของ sporangiospore คลาไมโดสปอร์และโออิดีจะงอกเป็นเส้นใยใหม่ (รูปที่ 2.1)⁹

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในกลุ่มนี้เกิดจากการรวมกันของเส้นใย 2 เส้น (ซึ่งมีหลายนิวเคลียส) ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์ (multinucleate gametangia) เป็นผลทำให้เกิดไซโกสปอร์ (zygospores) ที่มีผนังหนา (รูปที่ 2.1) ที่มีสีเหลืองจนถึงน้ำตาลหรือดำ ซึ่งส่วนใหญ่จะถูกปกคลุมด้วยหนามหรือสิ่งที่ยื่นออกมา ส่วนของเส้นใย 2 เส้นที่ค้ำจุนส่วนปลายของไซโกสปอร์แต่ละด้านจะเรียกว่า suspensor โดย suspensor อาจจะมีรูปร่างและขนาดเท่ากันหรือไม่เท่ากันก็ได้ บางครั้งอาจจะมีรูปแบบเป็นแขนง (appendages) เช่น ใน *Absidia* บางชนิด⁹



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของ Zygomycetes

ที่มา: Samson และคณะ⁹

สมาชิกของเชื้อราในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยซากพืชซากสัตว์ที่ตายแล้ว เชื้อราชนิดที่สำคัญในอาหารอยู่ในลำดับ (order) Mucorales วงศ์ (family) Mucoraceae ได้แก่ เชื้อราในสกุล *Mucor* และ *Rhizopus* ส่วนวงศ์ Thamnidaceae ได้แก่ *Thamnidium*

ก) *Mucor*

Mucor เป็นเชื้อราสกุลที่สามารถพัฒนาเป็นเซลล์กลมเดี่ยวซึ่งเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อเหมือนกับยีสต์หรืออาจเจริญเป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกัน สร้างก้านชูอับสปอร์ สปอร์ไม่มีสี รูปร่างกลมถึงรูปไข่ ผนังสปอร์เรียบ ไม่สร้างไรซอยด์และสโตลอน มักสร้างโคโลนีเป็นปุยคล้ายสำลี พบได้ในดิน ผัก ผลไม้ เมล็ดธัญชาติ อาหารหมักและอาหารอื่นๆ *Mucor* ทำให้ผลไม้ประเภทเบอรี่ (berries) เน่าเสีย *Mucor* บางชนิดทำให้เนื้อวัวเกิดสภาพที่เรียกว่า “Whiskers” และเกิดจุดดำบนเนื้อแกะแช่แข็ง *M. miehei* สร้างไลเปส พบในอาหารหมัก เบคอนและผักหลายชนิด *M. pusillus* สร้างโปรติเอส^{1,8}

ข) *Rhizopus*

Rhizopus เป็นเชื้อราสกุลที่สร้างเส้นใยที่ไม่มีผนังกัน สร้างไรซอยด์และสปอร์อน sporangiospore มักพัฒนาขึ้นเป็นกลุ่มจากปลายสปอร์อนที่จุดเริ่มต้นของไรซอยด์ *R. stolonifer* เป็นชนิดที่พบได้บ่อยในอาหาร บางครั้งเรียกว่าราขนมปัง (bread mold) สร้างเอนไซม์ย่อยเพคติน (pectinolytic enzyme) ทำให้เกิด soft rot ในพืชหลายชนิดเช่น แอปเปิ้ล แพร์ (pear) องุ่น มะเดื่อ (fig) และผลไม้พวก stone fruits บางชนิดเป็นสาเหตุของจุดดำบนเนื้อวุ้นและเนื้อแกะแซ่แข็ง อาจพบบนเบคอนและผลิตภัณฑ์เนื้อแปรรูปบางชนิด เชื้อ *R. oligosporus* มีความสำคัญในการผลิตเทมเป้ (tempeh) และอาหารหมักชนิดอื่น¹

ค) *Thamnidium*

เชื้อราสกุลนี้สร้างอับสปอร์ (sporangia) ขนาดเล็กบนเส้นใยที่แตกแขนงมากมาย พบในดิน และบนเนื้อสัตว์ *Thamnidium elegans* เป็น *Thamnidium* ชนิดเดียวที่รู้จักกันดี เจริญบนเนื้อแช่เย็น ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า “Whiskers”¹

2.2.2 ศักดิ์ (Division): Ascomycota

ชั้น (Class): Plectomycetes (เส้นใยมีผนังกัน สร้าง ascospore อยู่ใน ascus)

ลำดับ (Order): Eurotiales

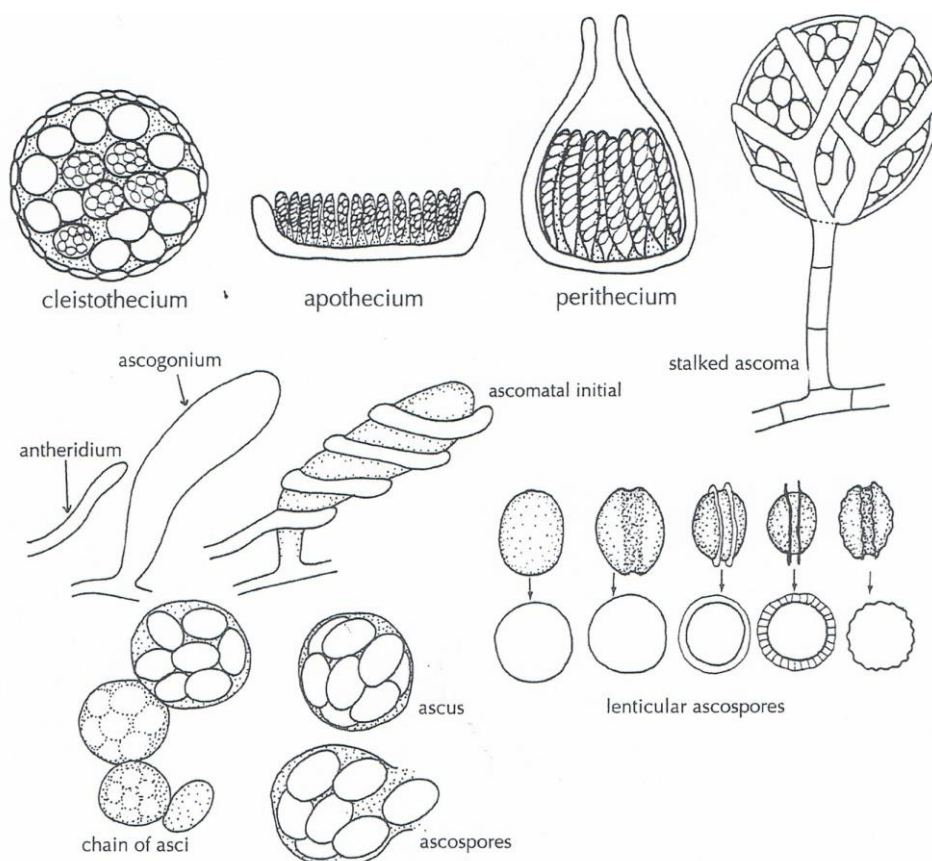
วงศ์ (Family): Trichomomaceae

สกุล (Genus): *Byssosclamyces*, *Emericella*, *Eurotium*, *Eupenicillium*, *Claviceps*, *Neurospora* และอื่นๆ

2.2.2.1 Ascomycetes

เส้นใยของเชื้อรา Ascomycetes เป็นเส้นใยที่มีผนังกันและเป็นแบบ haploid การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นโดยอาศัยโครงสร้างที่เรียกว่า แอสไซ (asci) ซึ่งสร้างขึ้นโดยคาริโอแกรมมี (karyogamy) ของ 2 นิวเคลียสจากเซลล์สืบพันธุ์ที่แตกต่างกัน (เพศผู้เรียกว่าแอนเทอริเดียม (antheridium) เพศเมียเรียกว่าแอสโคโกเนียม (ascogonium))⁹

ส่วนใหญ่มีแอสโคสปอร์ (ascospore) 8 แอสโคสปอร์ บางครั้งมี 2 หรือ 4 แอสโคสปอร์ถูกสร้างขึ้นในถุงหุ้มสปอร์ (แอสไซ) หลังจากระยะไมโอซิส (meiosis) แอสไซมักจะถูกห่อหุ้มด้วยแอสโคมาตา (ascomata) หรือแอสโคคารพ (ascocarp) ซึ่งก็คือโครงสร้างฟรุตบอดี้ (fruit-bodies) ที่เกิดขึ้นเดี่ยวหรือรวมกันอยู่ในสโตรมา (stroma) (มวลของเส้นใย) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟรุตบอดี้มีความสำคัญมากในการจำแนกชนิด เราสามารถแยกความแตกต่างของอะโพเทเซีย (apothecia) คริสโทเทเซีย (cleistothecia) หรือเพอริเทเซีย (perithecia) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายขวดรูปชมพู่ (รูปที่ 2.2) ⁹

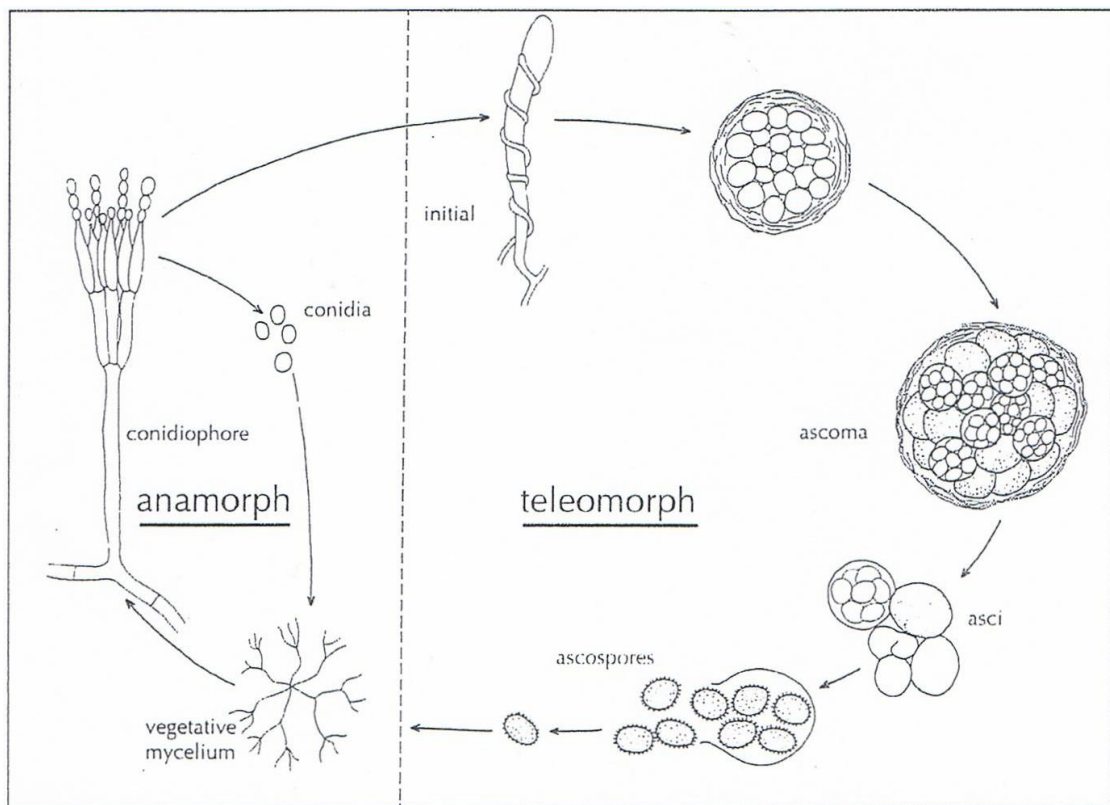


รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของ Ascomycetes

ที่มา: Samson และคณะ⁹

ระยะแอสซีเกอร์รัส (ascigerous state หรือระยะเทเลมอร์ฟ (telemorph)) คือ ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ มักจะควบคู่ไปกับระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 1 หรือมากกว่า 1 ระยะซึ่งเรียกว่า ระยะอะนาเมอร์ฟ (anamorph) (รูปที่ 2.3) ส่วนใหญ่เชื้อราในกลุ่ม Deuteromycetes (fungi imperfecti) มีวงจรชีวิตในระยะอะนาเมอร์ฟของแอสโคไมซีต (ascomycetes)⁹

ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราเพื่อการจำแนกชนิด ควรจะเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม *Byssochlamys*, *Monascus*, *Emericella*, *Talaromyces* และ *Neosartorya* สร้างสปอร์ได้ดีที่สุดบนอาหาร MEA (Malt Extract agar และ OA (Oatmeal agar) ที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส *Eurotium* เจริญขึ้นบนอาหารทั้งสองและจะไม่เกิดการสร้างฟรุตบอดี้ (fruit-bodies) ในอาหารเหล่านี้ สำหรับการสร้างสปอร์อย่างเหมาะสม ควรเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Eurotium* บนอาหาร MEA หรือ Cz (Czapek agar) ที่เติมซูโครสเพิ่ม (ร้อยละ 20-40) หรือโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 10-30) สำหรับการตรวจสอบหาเชื้อราชนิดนี้ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 (Dichloran 18% Glycerol agar)⁹



รูปที่ 2.3 วงจรชีวิตของ Eurotiales: แสดงความสัมพันธ์ของ teleomorph และ anamorph
ที่มา: Samson และคณะ⁹

ฟังไจกลุ่มนี้มีทั้งเชื้อราและยีสต์ซึ่งจะมีการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศที่เรียกว่า แอสโคสปอร์ ในถุงหุ้มสปอร์ที่เรียกว่าแอสคัส นอกจากนี้ยังมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศด้วย ฟังไจในกลุ่มนี้มีหลายชนิด ชนิดที่สำคัญในอาหารได้แก่

ก) *Byssochlamys*

เชื้อราสกุลนี้เป็น teleomorph ของ *Paecilomyces* บางชนิด เชื้อรา *Byssochlamys* สามารถเจริญในสภาพที่มี pH ค่อนข้างต่ำและทนความร้อนได้ดีจึงมักเป็นสาเหตุการเสียของอาหารกระป๋องที่มีกรดสูง สามารถทนต่อสภาพที่มีความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน (Eh) ต่ำ ชนิดที่สำคัญคือ *B. fulva* และ *B. nivea* สร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อน เป็นสาเหตุการเสียของผลไม้กระป๋อง *B. fulva* มีค่า D ที่อุณหภูมิ 90°C ในช่วง 1-2 นาที และมีค่า Z ที่อุณหภูมิ 6-7°C¹

ข) *Emericella* และ *Eurotium*

เมื่อ cleistothecia ที่มีแอสโคสปอร์พัฒนาขึ้นใน *Aspergillus* ใน division Deuteromycota ดังนั้น perfect stage (ระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ) ก็คือ *Emericella*, *Eurotium*, *Hemicarpaceales* และ *Sartorya* เจริญในอาหารหลายชนิด การจำแนกชนิดอาศัยการมีหรือไม่มี cleistothecia การพิจารณาลักษณะโครงสร้างและลักษณะของโคโคนี สีของ conidiospore) และ conidia¹

ค) *Eupenicillium*

เมื่อ cleistothecia ที่มีแอสโคสปอร์พัฒนาขึ้นใน *Penicillium* ซึ่งเป็นเชื้อราใน division Deuteromycota ดังนั้น perfect stage (ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ) ก็คือ *Eupenicillium* หรือ *Talaromyces* การจัดจำแนกทำได้โดยอาศัยลักษณะโครงสร้างและลักษณะโคโคนี⁸

ง) *Claviceps*

Claviceps ชนิดที่นักจุลชีววิทยาทางอาหารให้ความสนใจก็คือ *Claviceps purpurea* เนื่องจากสร้างสารอัลคาลอยด์ที่เป็นพิษบนเมล็ดธัญชาติ สารนี้จะทำให้เกิดอาการหลายอย่างโดยเฉพาะทำให้เกิดภาพหลอน²

จ) *Neurospora*

Neurospora อาจพบในสิ่งแวดล้อมที่ชื้นและอุ่น *Neurospora crassa* และ *Neurospora sitophila* เป็นชนิดที่รู้จักกันดี แอสโคสปอร์ของ *N. crassa* อยู่รอดได้หลายปี การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 20 นาทีช่วยให้เกิดการงอกของสปอร์ *Neurospora sitophila* เป็นปัญหาในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เป็นราขนมปังสีแดงหรือชมพูและใช้ในการผลิตอาหารหมักจากถั่วลิสง²

2.2.3 ศักดิ์ (Division): Deuteromycota

ชั้น (Class): Coelomycetes

สกุล (genus): *Colletotrichum*

ชั้น (Class): Hypomycetes (สร้าง conidia)

ลำดับ (Order): Hyphomycetales

วงศ์ (Family): Moniliaceae

สกุล (genus): *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium* (*pullularia*), *Botrytis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Helminthosporium*, *Monilia*/ *Sclerotinium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* และ *Trichothecium*

Deuteromycetes หรือ fungi imperfecti เป็นเชื้อราที่ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (พบเฉพาะในรูป anamorph หรือ conidial state ซึ่งเป็นระยะที่พบเพียงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ) ได้แก่ เชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารและอากาศ เชื้อราหลายชนิดสามารถสร้างสารพิษจากกระบวนการ

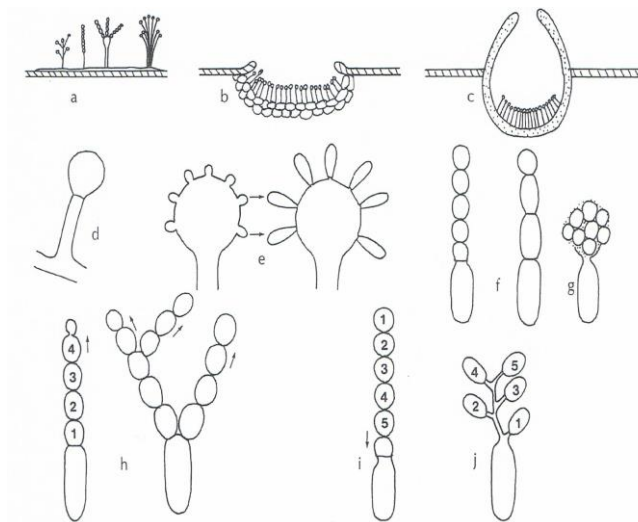
เมแทบอลิซึม แต่เชื้อราในรูปที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งก็คือ ascomycetous teleomorphs หรือ basidiomycetous teleomorphs (ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือ perfect state) มีความสัมพันธ์กับเชื้อราหลายชนิด Deuteromycetes แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยพื้นฐานของการสร้างสปอร์ (conidium formation)⁹

1. Coelomycetes: คอนิไดโอฟอร์ถูกสร้างขึ้นอยู่ภายในฟรุตบอดี้ (conidiomata) แบ่งออกเป็น
 - Melanconiales: คอนิไดโอฟอร์อยู่ใน acervuli ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ในต้นพืชที่เชื้อราเข้าไปอาศัย มีลักษณะคล้ายถ้วยแบนปากกว้าง (flattened fructication) มักถูกปกคลุมด้วย cuticle หรือ epidermis
 - Sphaeropsidales : คอนิไดโอฟอร์อยู่ใน pycnidia ซึ่งมีลักษณะคล้ายคนโท
2. Hyphomycetes หรือ Moniliales: คอนิไดโอฟอร์เกิดขึ้นบนเส้นใยปกติ หรือเส้นใยที่รวมตัวกัน (aggregated hyphae) (รูปที่ 2.4)

หลักเกณฑ์ในการจำแนก Deuteromycetes อาศัยการพิจารณารูปแบบของการสร้างคอนิเดีย (conidiogenesis) ในการขยายพันธุ์ของเชื้อรา Deuteromycetes นี้ จะเกิดขึ้นโดยอาศัยคอนิเดีย (conidia) ซึ่งเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและเคลื่อนที่ได้ คอนิเดียไม่ได้เกิดขึ้นแบบเดียวกับการเกิด sporangiospores คอนิเดียมีรูปร่างและสีหลายแบบและอาจเกิดเดี่ยวๆ อย่างอิสระ หรืออาจเกิดพร้อมๆ กันเป็นสายโซ่หรืออาจเกิดเป็นหัวที่ปกคลุมด้วยเมือก (slimy head) โดยจะเกิดขึ้นบนเซลล์พิเศษที่เรียกว่า คอนิไดโอจีนัสเซลล์ (conidiogenous cells) ซึ่งเซลล์ชนิดนี้สามารถเกิดขึ้นโดยตรงภายในหรือเกิดจากเส้นใย (vegetative hypha) หรือเกิดบนโครงสร้างที่ช่วยค้ำจุนเส้นใย⁹

คอนิเดียสามารถเกิดได้หลายรูปแบบดังนี้

1. acropetal chain หมายถึง conidiogenous loci (บริเวณที่คอนิเดียโผล่ขึ้น) จำนวนหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่ง ถูกสร้างขึ้นที่ปลายของคอนิเดียแต่ละอัน คอนิเดียที่มีอายุน้อยที่สุดจะอยู่บนสุด
2. basipetal succession หมายถึง คอนิเดียที่มีอายุน้อยที่สุดจะถูกสร้างขึ้นที่ฐานล่าง
3. sympodial succession หมายถึง คอนิเดียที่เกิดขึ้นใหม่แต่ละคอนิเดียจะเคลื่อนย้ายไปอยู่ที่ด้านปลาย (รูปที่ 2.4)⁹



รูปที่ 2.4 a-j ลักษณะของคอนิโดฟอร์ คอนิโดโอจีนัสเซลล์และการสร้างคอนิเดีย

รูป a. ตัวอย่างคอนิโดฟอร์อย่างง่าย หรือคอนิโดฟอร์บนเส้นใยที่รวมกัน รูป b. acervulus

รูป c. pycnidium รูป d. solitary conidiogenous cells รูป e. synchronous development

รูป f. chain รูป g. slimy head รูป h รูป i และรูป j การเกิดคอนิเดียแบบ acropetal

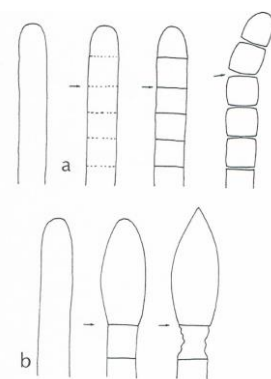
succession, basipetal succession และ sympodial succession ตามลำดับ

ที่มา: Samson และคณะ⁹

รูปแบบของการสร้างคอนิเดีย

1. การพัฒนาทาลลิก (Thallic development)

คอนิเดียจะถูกสร้างขึ้นในรูปแบบใดเดียวหรือเป็นสายโซ่ (arthroconidia) จากส่วนของเส้นใย เซลล์แยกออกจากกันโดยการสร้างผนังกัน และเปลี่ยนไปเป็นคอนิเดีย เช่น *Geotrichum* เป็นต้น (รูปที่ 2.5) เชื้อราบางสกุลเช่น *Moniliella* จะเกิดทั้งทาลลิกคอนิเดีย (thallic conidia) และบลาสติคคอนิเดีย (blastic conidia)⁹



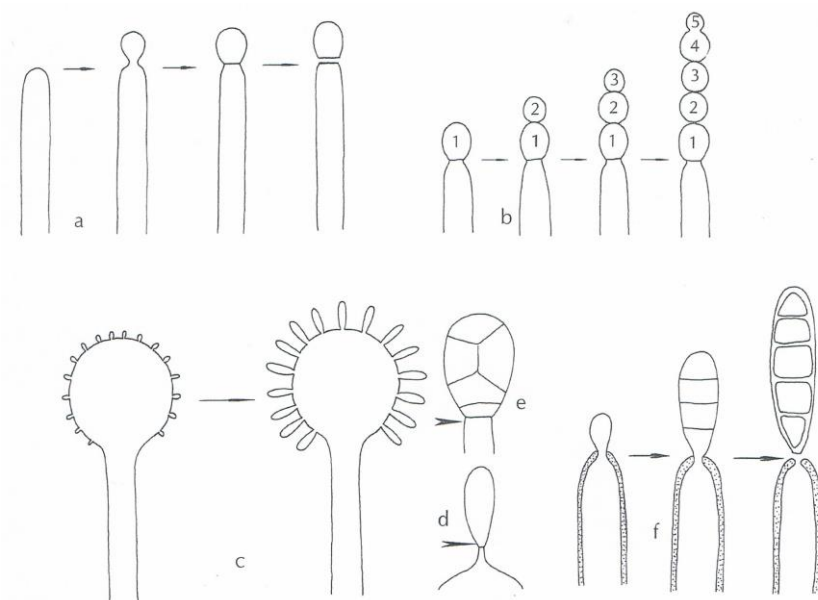
รูปที่ 2.5 a-b การพัฒนาของธาลลิก: รูป a. ในสายโซ่ รูป b. แบบใดเดียว

ที่มา: Samson และคณะ⁹

2. การพัฒนาบลาสติค (Blastic development)

ผนังของคอนิไดโอจีนีสเซลล์เริ่มมีความยืดหยุ่น และฉีกขาดออกไปเพื่อให้เกิดการสร้างผนังของคอนิเดีย (conidial wall) คอนิเดียจะสามารถถูกผลิตขึ้นเดี่ยวๆ หรือผลิตพร้อมๆ กัน (เช่น *Botrytis*, *Aureobasidium*) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (aeropetal chains เช่น *Cladosporium*) บางชนิดอาจมีฐานแคบ (เช่น *Botrytis*) หรือ ฐานกว้าง (เช่น *Epicoccum*) (รูปที่ 2.6)⁹

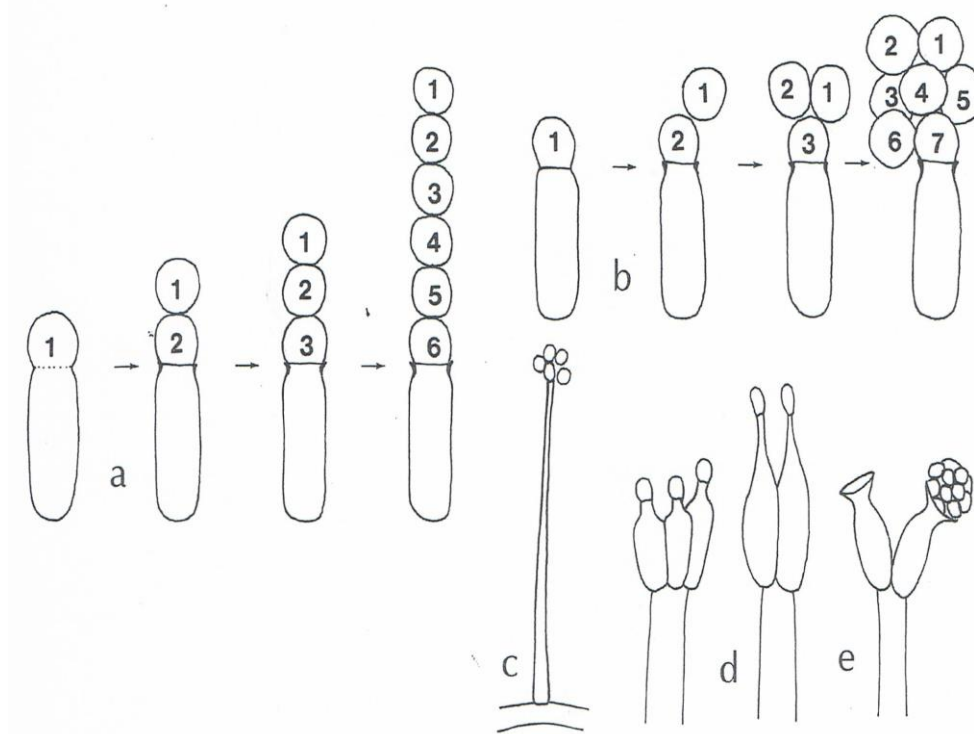
เชื้อในบางสกุลสามารถจำแนกได้โดยอาศัยลักษณะของ poroconidia หรือ tetric development รูปแบบการสร้างคอนิเดียจะคล้ายกับแบบบลาสติค แต่จะมีความแตกต่างกันตรงที่คอนิไดโอจีนีสเซลล์จะเข้มมากกว่า และมีผนังหนาที่มีเม็ดสีที่เข้มกว่า หลังจากคอนิเดียหลุดออกมาจะสังเกตเห็นเป็นรู เช่น *Alternaria* และ *Ulocladium*⁹



รูปที่ 2.6 a-f การพัฒนาบลาสติค: รูป a. บลาสติคแบบโดดเดี่ยว รูป b. แบบโซ่ รูป c. แบบ synchronous รูป d. แบบฐานแคบ รูป e. แบบฐานกว้าง รูป f. Poroconidia
ที่มา: Samson และคณะ⁹

Phialidic conidiogenesis

คอนิเดียจะถูกผลิตขึ้นแบบ basipetal succession จากการเปิดของเซลล์พิเศษที่เรียกว่า Phialide ซึ่งอาจจะมีรูปทรงคล้ายสว่าน ขวดรูปخمพู่ หรือรูปทรงอื่น (รูปที่ 2.7) บางครั้งมีรูปทรง collarette (โครงสร้างรูปถ้วยบริเวณ apex) คอนิเดียจะถูกผลิตขึ้นต่อกันเป็นสายโซ่ (ตัวอย่างเช่น เชื้อ *Penicillium*, *Aspergillus* และ *Paecilomyces*) หรือจะรวมกันอยู่ในส่วนหัวที่ปกคลุมด้วยเมือกหรือมีความชื้น (ตัวอย่างเช่น *Trichoderma*, *Phialophora*, *Stachybotrys*, *Acremonium*, *Verticillium*)⁹

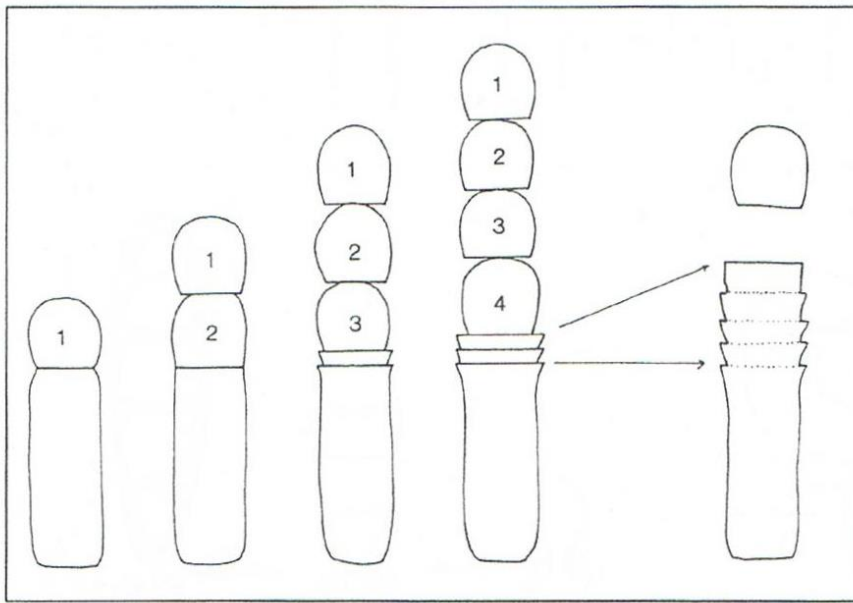


รูปที่ 2.7 a-e. การพัฒนา Phialidic: รูป a. สายโซ่โคนินเดีย รูป b. ส่วนหัวของโคนินเดีย
รูป c. รูปร่างแบบขวาน รูป d. รูปร่างแบบฟลัสก์ รูป e. Phialide ที่มี Phialide typical
ที่มา: Samson และคณะ⁹

Annellidic conidiogenesis

โคนินเดียจะถูกสร้างขึ้นจากชุดของโคนินเดียที่สร้างขึ้นต่อ ๆ กัน (annellation) บนเซลล์ที่ให้กำเนิดโคนินเดียที่เรียกว่า annellide การสังเกต annellide ค่อนข้างยากถ้าใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแต่จะเห็นความแตกต่างได้เด่นชัดเมื่อมีความยาวของยอดโคนินเดียเพิ่มขึ้น คือบริเวณที่โคนินเดียถูกสร้างขึ้นต่อ ๆ กันระหว่างการสร้างสปอร์ (รูปที่ 2.8) ⁹

เชื้อรา Deuteromycetes ส่วนมากจะสร้างสปอร์ได้ดีบน MEA ความเข้มข้นร้อยละ 2 การเตรียมสไลด์ที่ได้นั้นจำเป็นสำหรับการตรวจสอบการสร้างโคนินเดีย ซึ่งส่วนใหญ่จะเตรียมสไลด์โดยหยดกรดแลคติกผสมกับสีย้อม aniline blue หรือ cotton blue อาจใช้น้ำก็ได้สำหรับโครงสร้างที่เปราะบางของ *Botrytis* และ *Cladosporium* การเตรียมสไลด์โดยใช้เทปกาวชิ้นเล็ก ๆ ช่วยจะเป็นประโยชน์ในการเตรียมสไลด์หรืออาจตัดชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่โปร่งใสวางบนสไลด์ก็ได้ การสร้างโคนินเดียหรือ slimy head สังเกตได้ดีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายต่ำ อย่างไรก็ตามควรหลีกเลี่ยงการสูดดมสารระเหยที่สร้างโดยเชื้อราและโคนินเดีย⁹



รูปที่ 2.8 การพัฒนาของ Annelidic: แสดงโครงสร้างส่วนยอดของโคนิเดีย (truncate conidia) และส่วนที่ยึดออกของเซลล์โคนิไดโอจีเนียส

ที่มา: Samson และคณะ⁹

เชื้อรากลุ่มนี้สร้างเส้นใยที่มีผนังกัน (septate hyphae) และสร้างโคนิเดีย (conidia) หรือสเคโรเทีย (sclerotia) พบเฉพาะระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สกุลที่สำคัญในอาหารได้แก่

2.2.3.1 Coelomycetes

ก) *Colletotrichum*

เชื้อราชนิดนี้สร้างโคนิเดียอยู่ภายใน acervuli (disc shaped) ที่มีสีเข้ม โคนิไดโอฟอร์สั้น *Colletotrichum gloeosporioides* เป็นชนิดที่เกี่ยวข้องกับอาหารทำให้เกิดโรค anthracnose (จุดน้ำตาล/ดำ) บนผลไม้บางชนิดโดยเฉพาะผลไม้เมืองร้อนเช่น มะม่วงและมะละกอ¹

2.2.3.2 Hypomycetes

ก) *Alternaria*

Alternaria สร้างไมซีเลียมที่มีผนังกัน สร้างโคนิเดียใหญ่สีน้ำตาล โคนิเดียมีหลายรูปร่าง สร้างผนังกันทั้งแนวยาวและแนวขวาง เชื้อราชนิดนี้เป็นสาเหตุของโรคเน่าดำ (black rot) ของผลไม้พวกที่มีเมล็ดแข็ง (stone fruits) แอปเปิ้ลและมะเดื่อ (fig) โรค stem-end rot และเน่าดำของผลไม้ตระกูลส้มมีสาเหตุมาจากเชื้อราบางชนิดในสกุลนี้และเจริญบนข้าวสาลี นอกจากนี้ยังพบบนเนื้อสัตว์อีกด้วย บางชนิดสามารถสร้างสารพิษ (mycotoxin) ได้¹

ข) *Aspergillus*

Aspergillus เป็นเชื้อราที่สำคัญในอาหาร เส้นใยมีผนังกัน สร้างโคนิเดียสีดำ ต่อกันเป็นสาย เชื้อราที่พบในอาหารสร้าง cleistothecia ที่มีแอสโคสปอร์ (ascospores) ซึ่งเป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์ แบบอาศัยเพศ (perfect stage) ได้แก่ *Emericella*, *Eurotium* และ *Neosartorya* เชื้อรา *Eurotium* เป็นชื่อเดิมของ *Aspergillus glaucus* group ซึ่งสร้าง cleistothecia สีเหลืองสว่างและทุกชนิดชอบสภาพแห้ง (xerophilic) เคยพบ *Eurotium herbariorum* เป็นสาเหตุการเสียของแยมและเยลลี่ *Emericella* สร้าง cleistothecia สีขาว และ *Emericella nidulans* เป็น teleomorph ของ *Aspergillus nidulans* เชื้อรา *Neosartorya* สร้าง cleistothecia สีขาวและสร้างแอสโคสปอร์ไม่มีสี *Neosartorya fischeri* ทนความร้อน และการต้านทานความร้อนของสปอร์เชื้อราชนิดนี้คล้ายกับการต้านทานความร้อนของสปอร์ของเชื้อ *Byssochlamys* เชื้อรา *Aspergillus* ปรากฏเป็นสีเหลืองถึงเขียว และดำบนอาหารหลายชนิด *Aspergillus glaucus* กลุ่ม *Aspergillus restrictus* ซึ่งได้แก่ storage fungi เจริญบนเมล็ดถั่วเหลืองและถั่วชนิดอื่น ๆ ได้ *Aspergillus* เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหารหลายชนิดเช่น แยม แยม เบคอน ถั่วต่างๆ ผักและผลไม้ *Aspergillus* เมื่อขึ้นบนอาหารจะปรากฏเป็นสีเหลืองถึงเขียวถึงดำ บางชนิดสร้างสารพิษเช่น *Aspergillus flavus* สร้างอะฟลาทอกซิน หลายชนิดใช้ในการแปรรูปอาหารและผลิตส่วนผสมอาหาร เช่น *Aspergillus oryzae* และ *S. sojae* ใช้ในการผลิตโคจิและซ็ว *Aspergillus niger* ใช้ผลิตกรดซิตริกจากซูโครสและผลิตเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) อินเวอร์เทส (invertase) ไลเปสและเพคติเนส^{1, 10}

ค) *Aureobasidium (Pullularia)*

เชื้อราสกุลนี้สร้างโคโคนีที่มีลักษณะคล้ายยีสต์ในตอนเริ่มต้น ต่อมาแผ่ขยายและสร้างจุดดำ (black patches) *Aureobasidium pullulans* (*Pullularia pullulans*) แพร่กระจายมากที่สุดในอาหาร พบในกุ้ง เกี่ยวข้องกับการเกิดจุดดำในเนื้อที่เสียและพบบ่อยบนผักผลไม้¹

ง) *Botrytis*

Botrytis สร้างก้านชูอัสสปอร์ที่พอม ยาวและแตกแขนง มีการพัฒนามาจากสเคลอโรเทียม (sclerotium) โคนิเดียมีสีเทา *Botrytis cinerea* พบได้บ่อยในอาหาร เป็นสาเหตุของ gray mold rot ใน แอปเปิ้ล แพร์ (pear) องุ่น ราสเบอร์รี่ (raspberries) สตรอเบอร์รี่ บลูเบอร์รี่ (blueberries) ผลไม้ตระกูลส้มและผลไม้ที่มีเมล็ดแข็ง (stone fruits) บางชนิด¹

จ) *Cladosporium*

Cladosporium สร้าง budding conidia สีเข้ม แตกแขนงเหมือนต้นไม้ เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเขียวมะกอกถึงดำ บางโคนิเดียมีรูปกลม *Cladosporium herbarum* ทำให้เกิดจุดดำบนเนื้อวัวและเนื้อแกะแช่แข็ง บางชนิดทำให้เนยและมาการีนเน่าเสีย บางชนิดเป็นสาเหตุการเสียของ

องุ่นและ stone fruits เจริญบนเมล็ดข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลี *C. herbarum* และ *Cladosporium cladosporioides* เป็นเชื้อราที่แพร่กระจายมากบนผลไม้และผัก¹

จ) *Fusarium*

Fusarium สร้างกลุ่มไมซีเลียมแผ่ขยายเป็นปุย มีสีต่าง ๆ เล็กน้อยได้แก่ สีชมพู แดง ม่วง หรือน้ำตาล โคนิเดียหลายรูปแบบเช่น รูปโค้งคล้ายเคียวตัดหญ้า เป็นสาเหตุของโรคเน่าสีน้ำตาล (brown rot) ของสับปะรดและผลไม้ตระกูลส้มและ soft rot ในมะเดื่อ เจริญบนเมล็ดข้าวบาร์เลย์และข้าวสาลี บางชนิดสร้างสารพิษได้แก่ สารซีราเรโนน (zearalenone) ฟูโมนิซิน (fumonisins) และไตรโคเทซิน (trichothecenes)¹

ข) *Geotrichum*

Geotrichum เป็นเชื้อราที่คล้ายยีสต์ (yeast-like fungi) ครั้งหนึ่งมีชื่อว่า *Oidium lactis* และ *Oospora lactis* เส้นใยมีผนังกัน สร้างอาร์โทโคนิเดีย (arthroconidia) จาก vegetative hyphae อาร์โทโคนิเดียมีปลายแบน *Geotrichum candidum* เป็น anamorph ของ *Dipodascus geotrichum* เป็นชนิดที่สำคัญที่สุดในอาหาร อาจเรียกว่า “dairy mold” เพราะมีส่วนในกลิ่นและรสของเนยแข็ง บางครั้งเรียกว่า “machinery mold” เพราะเจริญบนอุปกรณ์ที่ใช้ในโรงงานแปรรูปอาหารเช่นโรงงานมะเขือเทศบรรจุกระป๋อง เป็นสาเหตุของโรคเน่า (sour rot) ในผลไม้ตระกูลส้มและลูกพีช (peaches) และเป็นสาเหตุการเสียของครีมจากนม แพร่กระจายทั่วไป เคยพบในเนื้อสัตว์และพืชหลายชนิด¹

ค) *Helminthosporium*

Helminthosporium สร้างเส้นใยสีเข้ม สร้างผนังกันเทียม (pseudoseptate) สีน้ำตาล สร้างโคนิเดียจากอูฐที่อยู่ได้ผนังกัน (septa) *Helminthosporium* ทำให้ผักเน่าเสียและทำให้เกิดโรคในพืช⁸

ณ) *Monilia/ Sclerotium*

เชื้อราสกุลนี้สร้างโคนิเดียสีชมพู เทาหรือแทน (tan) เชื้อรา *M. sitophila* เป็น conidial stage ของ *Neurospora intermedia* ส่วน conidial state ของ *Monilinia fructicola* ทำให้เกิดโรคเน่าสีน้ำตาล (brown rot) ของผลไม้เมล็ดแข็งเช่น พีช¹

ง) *Penicillium*

เมื่อโคนิดิโอฟอร์และโคนิเดียเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์เดียวที่พบในเชื้อราชนิดนี้ ดังนั้นจึงจัดให้ *Penicillium* อยู่ในกลุ่ม Deuteromycota และจะถูกย้ายไปอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes เมื่อ cleistothecia ที่มี ascospores ถูกสร้างขึ้นโดยจะจัดอยู่ในสกุล *Talaromyces* หรือ *Eupenicillium* สกุลใดสกุลหนึ่งใน 2 teleomorphic genera นี้ *Talaromyces* สำคัญมากที่สุดในอาหาร *T. flavus* เป็น teleomorph ของ *P. dangeardii* และเกี่ยวข้องกับการเสียของน้ำผลไม้เข้มข้น เชื้อรานี้สร้างสปอร์ที่ทนความร้อน เมื่อโคนิเดียถูกสร้างขึ้นก็就会被ปลดปล่อยออกจาก Phialides เชื้อราสกุลนี้เมื่อเจริญบนอาหารจะมีสีน้ำเงินจนถึงน้ำเงินเขียว โรคเน่าจากเชื้อราสีน้ำเงิน

และเขียว (blue and green mold rot) ที่เกิดขึ้นกับผลไม้ตระกูลส้มและโรคเน่าจากเชื้อราสีน้ำเงิน (blue moldrot) ในแอปเปิ้ล องุ่น แพร์ และผลไม้เมล็ดแข็งมีสาเหตุมาจากเชื้อบางชนิดในสกุลนี้ *Penicillium roqueforti* ใช้ในการผลิต blue cheese บางชนิดผลิตสารพิษซิทรินิน (citrinin) โอคลาทอกซินเอ (ochratoxin A) รูบราทอกซินบี (rubratoxin B) และสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ¹

ฎ) *Stachybotrys*

Stachybotrys เป็นเชื้อราที่สร้างโคนิไดโอฟอร์อย่างง่าย ในตอนแรก hyaline มีสีเข้มแต่ต่อมา มีลักษณะหยาบตามอายุที่มากขึ้น สร้างโคนิเดียรูปไข่ สร้างเอนไซม์เซลลูเลสและสร้างสารพิษได้⁸

ฐ) *Trichothecium*

Trichothecium สร้างโคนิไดโอฟอร์ที่ผสม ยาว มีผนังกัน มีสีสดใส โคนิเดียรูปไข่ อยู่เป็นกลุ่มหรือต่อเป็นสายโดยมีเมือกช่วยในการเกาะติดกัน ตัวอย่างเช่น *Trichothecium roseum* มีสีดอกกุหลาบ เป็น saprophyte บนผลไม้ เชื้อราชนิดนี้สร้างสารพิษไตรโคเทซิน (trichothecene toxin)⁸

2.3 ยีสต์

ยีสต์เป็นฟังไจที่มีเซลล์เดียว (unicellular fungi) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราซึ่งเป็นฟังไจหลายเซลล์ (multicellular fungi) แต่ก็ไม่ใช่คำจำกัดความที่ตรงนักเพราะฟังไจหลายชนิดที่ถูกเรียกว่ายีสต์ก็สร้างเส้นใยได้เหมือนกัน ยีสต์แตกต่างจากแบคทีเรียที่มีเซลล์ขนาดใหญ่ มีเซลล์เป็นรูปไข่ รูปกลมหรือยาว ปกติยีสต์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 5-8 ไมโครเมตรบางชนิดใหญ่กว่านี้ เชื้อยีสต์ที่แกมีแนวโน้มที่จะมีขนาดเซลล์เล็กลง ส่วนใหญ่ยีสต์ที่สำคัญในอาหารสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งเป็นสอง (fission)¹

ยีสต์เจริญได้ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดค่อนข้างกว้าง และเจริญได้ในสภาพที่มีแอลกอฮอล์สูงถึงร้อยละ 18 หลายชนิดเจริญได้ในสภาพที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 55-60 ยีสต์มีหลายสปีตั้งแต่สีครีม ชมพู แดง ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาการจัดจำแนกยีสต์ได้ใช้ระบบใหม่ได้แก่ การใช้ 5S rRNA องค์ประกอบของ DNA และ coenzyme Q profiles เนื่องจากยีสต์มีขนาดของยีนที่ใหญ่กว่าจึงอาศัยการวิเคราะห์ลำดับยีนของ 5S rRNA ดังนั้นจึงได้มีการเปลี่ยนหลายครั้งซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการใช้ระบบใหม่เช่น ยีสต์ในสกุล *Torulopsis* เดิมได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Candida* และยีสต์บางชนิดที่เดิมอยู่ในสกุล *Saccharomyces* ได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Torulaspora* และ *Zygosaccharomyces* ยีสต์ที่สกุลที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับอาหารสรุปได้ดังต่อไปนี้¹

2.3.1 ศักดิ์ (Division): Ascomycotina

วงศ์ (Family): Saccharomycetaceae (สร้างแอสโคสปอร์และอาร์โทสปอร์ สืบพันธุ์ (vegetative reproduction) โดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งเป็นสอง (fission)

วงศ์ย่อย (subfamily): Nadsonioideae

สกุล (Genus): *Hanseniaspora*

วงศ์ย่อย (subfamily): Saccharomycotoideae

สกุล (Genus): *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* และอื่นๆ

วงศ์ย่อย (subfamily): Schizosaccharomycetoideae

สกุล (Genus): *Schizosaccharomyces*

ก) *Citeromyces*

Citeromyces สืบพันธุ์แบบแตกหน่อรอบเซลล์ แอสคัส (ascus) มีผนังหนา มีเพียง 1 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส ตัวอย่างเช่น *Citeromyces matritensis* มีความสามารถในการหมัก สามารถใช้ในเตาอบได้และชอบน้ำตาลความเข้มข้นสูง จึงมักพบในนมชั้นหวาน บางครั้งแยกได้จากผลไม้ดอง^๖

ข) *Debaryomyces*

Debaryomyces แตกหน่อได้รอบเซลล์ (multilateral budding) ใน 1 แอสคัสมี 1 หรือ 2 แอสโคสปอร์ ไม่ใช้ในเตาอบ หมักน้ำตาลได้ช้าหรือไม่หมักเลย *Debaryomyces hansenii* เป็นยีสต์ที่ทนเกลือความเข้มข้นสูงได้ สามารถเจริญได้ในสภาวะละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 15-24 มักแยกได้จากอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง *Debaryomyces hansenii* สร้างเมือกบนผลิตภัณฑ์เนื้อบางชนิด เช่น เบคอนที่เก็บในสภาพมีอากาศ^๖

ค) *Hanseniaspora*

Hanseniaspora เป็นระยะที่มีการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore stage) และ anamorph ของยีสต์ชนิดนี้คือ *Kloeckera* spp. มีการแตกหน่อที่ขั้วเซลล์ทั้งสองข้าง (bipolar budding) มีเซลล์เป็นรูปผลเลมอน แอสโคสปอร์เป็นรูปหมวก ภายใน 1 แอสคัสมี 2-4 แอสโคสปอร์ ทำให้เกิดการหมักอย่างรุนแรง แต่มีความต้านทานต่อแอลกอฮอล์ต่ำ (ประมาณร้อยละ 4-6) ยีสต์สกุลนี้ทุกชนิดต้องการอินซิทอล (inositol) และเพนโทเทเนต (pantothenate) สำหรับการเจริญ^{1, 2, 8}

ง) *Hansenula*

Hansenula สืบพันธุ์แบบแตกหน่อรอบเซลล์ (multilateral budding) อาจสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) และเส้นใยแท้ (true mycelium) แอสโคสปอร์เป็นรูปหมวก บางครั้งเห็นเป็นรูปทรงกลมหรือรูปทรงกลมมีวงแหวนล้อมรอบคล้ายดาวเสาร์ (saturn-shaped spore) แอสโคสปอร์มักถูกปล่อยออกหลังจากโตเต็มที่ การใช้ในเตาอบและการหมักน้ำตาลมีความผันแปร *Hansenula* บาง

ชนิดปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่มที่ผ่านการหมัก บางชนิดสร้างฟิล์ม (pellicle) ที่ผิวของของเหลว และบางชนิดย่อยสลายเพคตินได้ ปัจจุบัน *Hansenula* และ *Pichia* บางชนิดที่มีสปอร์รูปดาวเสาร์⁸ ถูกจัดให้อยู่ในสกุลใหม่คือ *Williopsis*⁸

จ) *Issatchenkia*

Issatchenkia สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อแบบ multilateral budding สร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) ใน 1 แอสคัสมี 1-4 แอสโคสปอร์ที่มีรูปทรงกลม ไม่ใช่ในเตรต ส่วนการหมักน้ำตาลมีความผันแปร สร้างฟิล์มที่ผิวของอาหารเหลว ยีสต์ในสกุลนี้มีเพียง 4 ชนิด (species) ซึ่งเดิมจัดให้อยู่ในสกุล *Pichia* พบ coenzyme Q-7 ubiquinone ในระบบการขนส่งอิเล็กตรอนของเซลล์⁸

ฉ) *Kluveromyces*

Kluveromyces สืบพันธุ์แบบโดยการแตกหน่อแบบ multilateral budding อาจสร้างเส้นใยเทียม แอสโคสปอร์เป็นรูปกลม อาจมี 1 หรือมากกว่า 1 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส ไม่ใช่ในเตรต ต้องการวิตามินจากแหล่งภายนอก หมักน้ำตาลได้ดี มีโคเอนไซม์ Q-6 ในระบบการขนส่งอิเล็กตรอน ชนิดที่หมักแลคโตสได้แก่ *Kluveromyces marxianus* มี 2 สายพันธุ์ ซึ่งแต่เดิมจัดเป็น *Kluyveromyces* (หรือ *Saccharomyces*) *fragilis* และ *K.* (หรือ *S.*) *lactis* ยีสต์ชนิดนี้เคยแยกได้จากหลายแหล่งเช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ของเสียจากโรงงานน้ำตาล มีความสามารถในการใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีจึงมีความสำคัญต่อการหมักและการเสียของผลิตภัณฑ์นม^{8,11}

ช) *Lodderomyces*

Lodderomyces สืบพันธุ์แบบ multilateral budding สร้างเส้นใยเทียม สร้างแอสโคสปอร์ที่ใหญ่มาก 1-2 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส หมักกลูโคสได้ช้าและไม่ใช้ในเตรต ชนิดที่มีรายงานว่าเคยมีการปนเปื้อนในเครื่องดื่ม (soft drink) คือ *Lodderomyces elongisporus*⁸

ซ) *Pichia*

Pichia สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อแบบ multilateral budding มักสร้างเส้นใยเทียม แอสโคสปอร์เป็นรูปกลม รูปหอก หรือรูปดาวเสาร์ มีจำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส ไม่ใช่ในเตรต และมีความผันแปรในการหมักน้ำตาล *Pichia* หลายชนิดสร้างฟิล์มที่ผิวหน้าอาหารเหลว ก่อนหน้านี้ *Pichia* หลายชนิดได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุล *Issatchenkia* เช่น *Pichia terricola*, *P. kudriavzevii* และ *P. scutulata* ซึ่งเป็นยีสต์สำคัญที่สร้างฟิล์มได้ ส่วน *P. polymorpha* และ *P. pseudopolymorpha* ได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Debaryomyces* ส่วนสายพันธุ์ที่สร้างแอสโคสปอร์รูปดาวเสาร์ได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุล *Williopsis*⁸

ณ) *Saccharomyces*

Saccharomyces มีการแตกหน่อแบบ multilateral budding อาจสร้างเส้นใยเทียม ส่วนใหญ่เซลล์เป็น diploid แอสโคสปอร์มีจำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อ 1 แอสคัส สปอร์รูปวงกลม ไม่ใช่

โนเตรตและแลคโตส หมักน้ำตาลได้ดีมาก ยีสต์สกุลนี้มีทั้งกลุ่มที่เซลล์เป็น diploid และ haploid ชนิดที่เซลล์เป็น diploid ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ยีสต์ชนิดนี้สายพันธุ์ต่าง ๆ ใช้ในการหมักไวน์ เบียร์ แคมเปญและขนมปัง เมื่อก่อนยีสต์ที่ใช้หมักเบียร์จัดอยู่ในชนิด *Saccharomyces uvarum* และ *S. carlsbergensis* แต่ปัจจุบันจัดเป็นชนิดเดียวกับ *S. cerevisiae* ส่วนยีสต์ที่เซลล์เป็น haploid ได้แก่ osmophilic yeast สมัยก่อนได้แก่ เชื้อ *Saccharomyces bailii* var. *osmophilus*, *Saccharomyces bisporus* var. *mellis* และ *Saccharomyces rouxii* แต่ปัจจุบันได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุล *Zygosaccharomyces* ส่วนพวก haploid อีกชนิดหนึ่งคือ *Saccharomyces rosei* ได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Torulaspora*⁸

ฎ) *Schizosaccharomyces*

ยีสต์ (ascosporogenous yeast) ชนิดนี้แบ่งเซลล์โดยการเกิด fission ซึ่งจะมีการสร้างผนังกันและอาจสร้างเส้นใยแท้จริง (true hyphae) และอาร์โทสปอร์ (arthrospore) ใน asci มีแอสโคสปอร์ 4-8 แอสโคสปอร์และไม่มีการแตกหน่อ *Schizosaccharomyces pombe* เป็นชนิดที่แพร่กระจายมากซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนต่อความดันออสโมติกสูงได้ดีและต้านทานต่อวัตถุกั้นเสีย¹

ฎ) *Torulaspora*

ยีสต์ชนิดนี้แตกหน่อได้รอบเซลล์ (multilateral budding) ใน asci มีแอสโคสปอร์รูปร่างกลม เป็นชนิด three haploid species เดิมอยู่ในสกุล *Saccharomyces* ปัจจุบันจัดอยู่ในสกุลนี้ ยีสต์สกุลนี้หมักน้ำตาลได้ดีประกอบด้วยโคเอนไซม์ Q-6 ยีสต์ *Torulaspora delbrueckii* เป็นชนิดที่แพร่กระจายมาก¹

ฐ) *Zygosaccharomyces*

ยีสต์สกุลนี้มีการแตกหน่อรอบเซลล์ (multilateral budding) แอสโคสปอร์มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว โดยทั่วไปอยู่อย่างอิสระใน asci ส่วนใหญ่มีโครโมโซมแบบ haploid และหมักน้ำตาลได้ดี ชนิดที่แพร่กระจายมากที่สุดคือ *Zygosaccharomyces rouxii* สามารถเจริญได้ในสภาพที่มี a_w ต่ำมากถึง 0.62 รองจากเชื้อรา *Xeromyces bisporus* ซึ่งเจริญได้ที่ระดับ a_w ต่ำมากที่สุด ยีสต์สกุลนี้บางชนิดเกี่ยวข้องกับการหมักอาหารที่เรียกว่า shoyu และ miso บางชนิดทำให้มายองเนสและน้ำสลัดเน่าเสียโดยเฉพาะ *Zygosaccharomyces bailii* ซึ่งสามารถเจริญได้ที่พีเอช 1.8¹

2.3.2 ศักดิ์ (Division): Deuteromycotina

วงศ์ (Family): Cryptococcaceae (ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ)

สกุล (Genus): *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* และ *Trichosporon*

ก) *Brettanomyces*

Brettanomyces เป็น perfect stage ของ *Dekkera* เป็น asporogenous yeast ที่มี ogival cells และ terminal budding สร้างกรดแอซีติกจากกลูโคสภายใต้สภาวะมีอากาศ ชนิดที่แพร่กระจายมากคือ *Brettanomyces intermedius* ยีสต์ชนิดนี้สามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำถึง 1.8 ทำให้เบียร์ ไวน์ เครื่องดื่ม (soft drink) และผักดองเน่าเสีย¹

ข) *Candida*

ยีสต์สกุลนี้เป็น asporogenous yeast ที่แตกหน่อแบบ mutilateral budding สร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) เส้นใยแท้จริงและคลาโมโดโคนิเดีย (chlamydoconidia) แพร่กระจายทั่วไปเช่น พบในดิน น้ำ อากาศ พืช แมลง คน สัตว์ ของเสีย อุปกรณ์การแปรรูปอาหารและในผลิตภัณฑ์อาหาร มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการเสียของอาหารหลายชนิดเช่น ได้รอกแฟรงเฟอ์เทอร์ ผักและผลไม้สด ผลิตภัณฑ์นม น้ำเกลือและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ หลายสายพันธุ์ที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ *Candida* เป็นยีสต์สกุลใหญ่เคยมีรายงานการพบ *Candida* spp. ไปถึง 200 ชนิด^{2,8}

ค) *Cryptococcus*

ยีสต์สกุลนี้เป็น asporogenous yeast ที่แตกหน่อแบบ mutilateral budding ปกติไม่สร้างเส้นใยเทียม สามารถใช้อินซิทอล (inositol) ได้ แต่การใช้ในเตรตมันแปร ไม่หมักน้ำตาล ส่วนใหญ่สร้างแคปซูล อาจสร้างรงควัตถุแคโรทีนอยด์ (carotenoid pigment) ปริมาณน้อย ปกติพบบนพืชและในดิน⁹

ง) *Rhodotorula*

ยีสต์สกุลนี้แตกหน่อแบบ mutilateral budding บางสายพันธุ์สร้างเส้นใยเทียม แต่ไม่พบแอสโคสปอร์หรือบอลลิสโตสปอร์ (ballistospore) อาจใช้ในเตรตแต่ไม่หมักน้ำตาล ไม่ใช้อินซิทอล สร้างรงควัตถุสีแดงถึงเหลือง ส่วนใหญ่สร้างโคโลนีสีส้มหรือสีชมพูคล้ายสีของปลาแซลมอน อาจทำให้อาหารเสียโดยเห็นได้ด้วยตาเปล่าเนื่องจากทำให้สีของอาหารผิดปกติไป *Rhodotorula* หลายสายพันธุ์ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำซึ่งอาจพบได้ในอาหารแช่แข็งและอาหารแช่เย็น⁹

จ) *Trichosporon*

ยีสต์ชนิดนี้ไม่สร้างแอสโคสปอร์ (nonascospore-forming oxidative yeast) เพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อและสร้างอาร์โทโคนิเดีย สร้างเส้นใยแท้จริง (true mycelium) ไม่หมักน้ำตาลหรือหมักได้น้อยมาก เกี่ยวข้องในการหมักเมล็ดโกโก้และเคยถูกแยกได้จากกุ้ง เนื้อสัตว์ปีก เนื้อแกะแช่แข็งและอาหารอื่นๆ *T. pullulans* เป็นชนิดที่แพร่กระจายมากที่สุด สร้างเอนไซม์ไลเปสได้¹

เอกสารอ้างอิง

1. Jay, J. M., Loessner, M, J., Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.
2. Banwart, G. 1989. Basic Food Microbiology. Van Nostrand Reinhold, New York.
3. Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria : classification and physiology, pp. 1-66. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouveland, A. (Eds.). Advance in Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, New York.
4. Hutkins, R.W. 2006. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Blackwell publishing, Iowa.
5. Devriese, L.A., Pot, B. 1995. The Genus *Enterococcus*, pp. 327-367. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W. H. (Eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
6. Nanasombat, S., Phunpruch, S., Sriwong, N., Jaichalad, T., Onnom, W., Odthon, S. 2008. Characterization of the antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from raw fish and Nham-Plaa. Kasetsart Journal Natural Science. 42(4): 747-757.
7. Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology, 3rd ed. CRC Press, New York.
8. Beneke, E.S., Stevenson, K. E. 1987. Classification of food and beverage fungi, pp. 1-50. In: Beuchat, L.R. (Ed.). Food and Beverage Mycology. Van Nostand Reinhold, New York.
9. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. 2004. Introduction to Food and Airborne Fungi, 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
10. Barzee, T.J., Cao, L., Pan, Z., Zhang, R. 2021. Fungi for future foods. Journal of Future Foods. 1-1: 25-37.
11. Karim, A., Gerliani, N., Aider, M. 2020. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. International Journal of Microbiology. 333: 108818.

บทที่ 3

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์สามารถเจริญหรือเพิ่มจำนวนเมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสมเช่น ในอาหาร การเจริญของจุลินทรีย์เป็นผลทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในคนและสัตว์รวมทั้งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารในระหว่างกระบวนการหมัก การเพาะเลี้ยงให้จุลินทรีย์เจริญมีความสำคัญต่อการแยกจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ซึ่งได้แก่ จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย จุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการหมัก นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมีและลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อหาวิธีการควบคุมหรือการกระตุ้นการเจริญในอาหาร ทำลาย หรือปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป¹

3.1 หลักการทั่วไปเกี่ยวกับการเจริญของจุลินทรีย์

การเพิ่มขึ้นของมวลเซลล์ของจุลินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราแบ่งออกถึงการเจริญของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น แบคทีเรียสืบพันธุ์โดยการแบ่งตัวเป็นสองเซลล์ที่เรียกว่า binary fission ยีสต์และเชื้อราสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ กระบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ ภายในเซลล์ของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาเคมีมากมาย ปฏิกิริยาเคมีบางชนิดเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงพลังงาน ปฏิกิริยาอื่นๆ เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารโมเลกุลเล็กเพื่อสร้างสารโมเลกุลใหญ่รวมทั้งโคแฟกเตอร์และโคเอนไซม์ที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ ปฏิกิริยาหลัก ๆ ของการสังเคราะห์ของเซลล์ก็คือ ปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไลเซชัน (polymerization reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีการสังเคราะห์สารพอลิเมอร์จากมอนอเมอร์ เมื่อมีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ขึ้นเซลล์จะมีการรวมสารโมเลกุลใหญ่ มีการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์และโครงสร้างของเซลล์เช่นผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ แฟลกเจลลา ไรโบโซมและอินคูลชัน¹

3.1.1 Generation Time

การเจริญของจุลินทรีย์หมายถึง การเพิ่มจำนวนเซลล์ขึ้นจำนวนมากจนเป็นประชากรเซลล์ซึ่งสามารถวัดได้เรียกว่า มวลของจุลินทรีย์ (microbial mass) และสามารถวัดอัตราการเจริญ (growth rate) ได้ซึ่งก็คือการเปลี่ยนแปลงของจำนวนมวลเซลล์ต่อหน่วยเวลา ในระหว่างวงจรของการแบ่งเซลล์ องค์ประกอบของเซลล์จะเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า ช่วงเวลาที่เกิดการแบ่งเซลล์จาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์เรียกว่า generation และระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์เป็นสองนี้เรียกว่า

generation time บางครั้งเรียกว่า doubling time ในจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด เซลล์ทุกเซลล์ไม่ได้แบ่งตัวที่เวลาเดียวกันและในอัตราเร็วเดียวกัน เมื่ออยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญแบคทีเรียมี generation time สั้นที่สุดตามด้วยยีสต์และเชื้อรา เช่นเดียวกันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียต่างชนิดและต่างสายพันธุ์ก็มี generation time ที่ผันแปรมาก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Vibrio parahaemolyticus* มี generation time สั้นเพียง 10-12 นาที โดยปกติจุลินทรีย์ในอาหารมี generation time ยาวนานกว่า generation time ของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ ปกติแบคทีเรียส่วนใหญ่มี generation time น้อยกว่า 1 ชั่วโมง generation time ของประชากรจุลินทรีย์สามารถคำนวณได้จากความแตกต่างของจำนวนเซลล์ในระยะเวลาหนึ่ง เนื่องจากจุลินทรีย์มีจำนวนมากดังนั้นการคำนวณจึงใช้ในรูปแบบของลอการิทึม ($\log_{10}$) ตามสูตรดังนี้¹

$$G = \frac{0.3t}{\log_{10}Z - \log_{10}X}$$

เมื่อ G	=	generation time (นาที) หรือ doubling time (t_d) (ชั่วโมง)
0.3	=	ค่าคงที่ (คือค่าของ $\log_{10}2$ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า)
t	=	ระยะเวลาที่ศึกษา (นาที)
X	=	จำนวนเซลล์เริ่มต้น (Colony-Forming Units หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร)
Z	=	จำนวนเซลล์เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาที่ศึกษา (CFU ต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างเช่น ถ้าในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญ แบคทีเรียชนิดหนึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและเพิ่มจำนวนเป็น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรภายใน 120 นาที ดังนั้นคำนวณหา generation time ของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ดังนี้¹

$$G = \frac{0.3 \times 120}{6 - 4} = 18 \text{ นาที}$$

3.1.2 Specific Growth Rate

การเจริญของจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่เรียกว่า autocatalytic process การเจริญจะไม่เกิดขึ้นถ้าไม่มีเซลล์ที่มีชีวิตอย่างน้อย 1 เซลล์ อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณชีวมวลที่เพิ่มขึ้น² อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างระยะเอ็กโพเนนเชียล (exponential growth phase) หาได้โดยการวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600nm})

หามวลเซลล์ (น้ำหนักเปียกหรือน้ำหนักแห้ง) หรือหาปริมาณองค์ประกอบของเซลล์ เช่น โปรตีน RNA หรือ DNA ถ้า N_0 และ N_t คือปริมาณขององค์ประกอบเหล่านี้ที่เวลา t_0 และที่เวลา t ตามลำดับ ดังนั้นอัตราการเจริญของจุลินทรีย์หาได้โดยสมการต่อไปนี้

$$N_t = N_0 e^{\mu(t - t_0)}$$

เมื่อ μ คือ specific growth rate ในหน่วยของเวลา (เช่น ชั่วโมง⁻¹ หรือ h⁻¹) สมการในรูปลอการิทึมมีดังนี้

$$\begin{aligned} \ln \frac{N_t}{N_0} &= \mu (t - t_0) \\ \log N_t - \log N_0 &= \frac{\mu}{2.3} (t - t_0) \\ \mu &= \frac{2.3 (\log N_t - \log N_0)}{t - t_0} \end{aligned}$$

ค่า μ (h⁻¹) ผันแปรขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อมในการเจริญ ปกติยีสต์และเชื้อรา มีค่า μ ประมาณ 0.2 ส่วนแบคทีเรียที่เจริญเร็วภายใต้สภาพเหมาะสมอาจมีค่า μ ประมาณ 2.5 หรือสูงกว่า ในสภาพที่ไม่เหมาะสมค่า μ (h⁻¹) อาจอยู่ระหว่าง 0.02-0.2 สำหรับค่า doubling time (t_d) สามารถหาได้จากค่า μ โดยอาศัยความสัมพันธ์ดังนี้¹

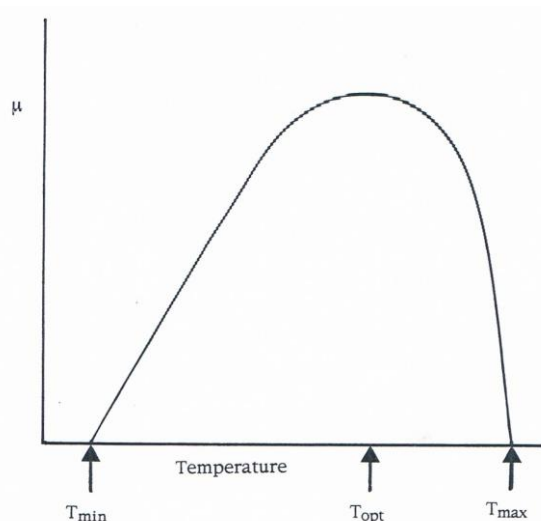
$$\frac{t_d}{h} = \frac{0.69}{\mu}$$

เมื่อ $0.69 = \ln 2$ สมการนี้สำคัญสำหรับการทำนายอัตราการเจริญและจำนวนประชากรเซลล์หรือปริมาณองค์ประกอบเซลล์ในการหมักอาหารและทำนายอายุการเก็บของอาหาร¹

3.1.3 การเจริญที่เหมาะสม (Optimum Growth)

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมของอาหารเช่น อุณหภูมิที่เก็บรักษา ความเป็นกรดต่าง ปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) ค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidation-Reduction (O-R) potential หรือ Eh) และสารอาหารมีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ถ้าให้ปัจจัยหนึ่ง (เช่น

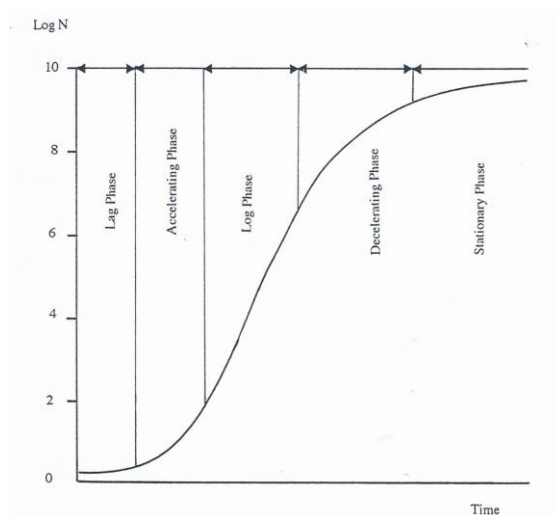
อุณหภูมิ) ผันแปรส่วนปัจจัยอื่น ๆ ควบคุมให้คงที่ในระหว่างที่จุลินทรีย์เจริญ เมื่อวัดอัตราการเจริญ จะพบว่าอัตราการเจริญจะสูงที่สุดและ generation time จะสั้นที่สุดที่อุณหภูมิเฉพาะระดับหนึ่งซึ่งที่อุณหภูมิระดับนี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นภายใต้สภาวะที่กำหนด จากรูปที่ 3.1 ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ อัตราการเจริญจะลดลงเรื่อย ๆ จนกระทั่งหยุดเจริญ พื้นที่ภายใต้กราฟระหว่างทั้งสองด้านที่มีการเจริญต่ำสุดนั้นคือช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์จะเจริญได้ (growth temperature range) เมื่อเซลล์ของจุลินทรีย์เผชิญต่อสภาพที่รุนแรงเหนือช่วงที่เจริญได้ เซลล์จะหยุดเจริญและอาจเกิดการบาดเจ็บหรือสูญเสียการมีชีวิตโดยขึ้นอยู่กับสภาพความรุนแรงที่จุลินทรีย์เผชิญ ช่วงที่จุลินทรีย์จะเจริญได้รวมทั้งช่วงที่มีการเจริญเหมาะสมภายใต้ปัจจัยเฉพาะเป็นข้อมูลที่มีประโยชน์มากสำหรับการยับยั้ง การลดจำนวนและการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร¹



รูปที่ 3.1 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์
ที่มา: Adams และ Moss²

3.1.4 กราฟการเจริญของจุลินทรีย์

อัตราการเจริญและคุณลักษณะในการเจริญของประชากรจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่กำหนด หาได้โดยการตรวจนับจำนวนเซลล์หรือวัดค่า optical density ของสารแขวนลอยเซลล์โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นค่าหนึ่ง (มากกว่า 300 นาโนเมตร โดยมักจะวัดที่ 600 นาโนเมตร) ถ้าหาจำนวนเซลล์ได้ที่เวลาของการเจริญต่างกันก็สามารถนำค่าลอการิทึมของจำนวนเซลล์ ($\log_{10}$ CFU) มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ของ $\log_{10}$ CFU กับเวลาได้ดังรูปที่ 3.2¹



รูปที่ 3.2 กราฟการเจริญของจุลินทรีย์

ที่มา: Adams และ Moss ²

กราฟการเจริญมีหลายลักษณะ ในระยะแรก (lag phase) ประชากรเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงหรือเปลี่ยนแปลงน้อยมากเช่น เมื่อเริ่มถ่ายเซลล์แบคทีเรียไปสู่อาหารใหม่ ระยะที่จำนวนเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงนี้เรียกว่าระยะ lag phase ในช่วงเวลานี้เซลล์มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมแต่จะยังไม่มีการแบ่งเซลล์ เซลล์จะรับโมเลกุลของสารอาหารหลายชนิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่เซลล์ เซลล์จะมีกิจกรรมทางชีวเคมีเกิดขึ้นมากโดยเฉพาะการสังเคราะห์โปรตีน เอนไซม์ DNA และ RNA สร้างพลังงานปริมาณมากเก็บไว้ในรูปของ ATP และมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ในระยะนี้ ช่วงเวลาของ Lag phase ขึ้นอยู่กับหลาย ๆ ปัจจัยได้แก่ คุณสมบัติของการบ่ม ส่วนประกอบของอาหาร ค่า pH ความต่างศักย์ของออกซิเดชัน - รีดักชัน (Eh) และสภาพทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ นอกจากนี้เมื่อถ่ายเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหนึ่งที่เซลล์เจริญแบ่งตัวได้ดีไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบคล้ายๆ กันจะไม่มีช่วง lag phase หรือมีเล็กน้อยและถ้าจุลินทรีย์เผชิญต่อสภาวะเครียดจนได้รับบาดเจ็บ เช่น จากการให้ความร้อนหรือการแช่แข็ง ระยะ lag phase จะยาวนานขึ้นหรือนานจนไม่สิ้นสุด ^{1,2}

หลังจากระยะ lag phase จำนวนเซลล์เริ่มที่จะเพิ่มจำนวนในขั้นแรกอย่างรวดเร็วและเพิ่มเร็วมากขึ้นในเวลาต่อมา เริ่มแรกประชากรเซลล์มีอัตราเมแทบอลิซึมต่างกัน มีเพียงบางเซลล์เท่านั้นที่แบ่งตัวและต่อมาเกือบทุกเซลล์แบ่งตัว ระยะนี้เรียกว่า exponential phase หรือ logarithmic phase ระยะนี้จะดำเนินต่อไปจนกระทั่งที่ไม่มีปัจจัยมาจำกัดการเจริญ เซลล์ในระยะนี้ไวต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม การฉายรังสีและการใช้สารต้านจุลินทรีย์เช่น เพนนิซิลินอาจมีผลยับยั้งการเจริญ อัตราการเจริญในระยะ exponential phase สามารถใช้หา generation time ดังกล่าว¹

หลังจากระยะ exponential phase อัตราการเจริญจะช้าลงและเข้าสู่ stationary phase ในที่สุด ระยะนี้จะมีการขาดสารอาหารและสะสมของเสีย บางเซลล์จะตายแต่บางเซลล์ยังคงแบ่งตัว

อัตราการเกิดของเซลล์ใหม่เท่ากับอัตราการตายของเซลล์เก่าทำให้จำนวนเซลล์เริ่มคงที่ หลังจากนั้นประชากรเซลล์จะเข้าสู่ death phase ซึ่งอัตราการตายจะสูงกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง บางเซลล์อาจยังคงมีชีวิตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อม ข้อมูลนี้สำคัญในการหามาตรฐานหรือข้อกำหนดทางจุลินทรีย์ของอาหาร โดยเฉพาะในการควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค¹

3.2 ปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกของอาหารที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

เนื่องจากแหล่งอาหารที่สำคัญมาจากพืชและสัตว์ จึงควรศึกษาคุณลักษณะของเนื้อเยื่อพืชและสัตว์รวมทั้งสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ปกติพืชและสัตว์มีกลไกป้องกันการบุกรุกทำลายของจุลินทรีย์ การศึกษากลไกธรรมชาติเหล่านี้ทำให้สามารถหาวิธีป้องกันหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร³

3.2.1 ปัจจัยภายในอาหาร (Intrinsic Parameters) ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณความชื้น ค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน ปริมาณสารอาหาร สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์และโครงสร้างทางชีวภาพของอาหาร

3.2.1.1 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

เมื่อวัด pH ด้วย glass electrode ค่า pH จะมีค่าเท่ากับ $-\log [H^+]$ หรือค่าลบของ log ของความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (หรือความเข้มข้นของโปรตอน) มีค่าระหว่าง 0-14 ซึ่งมีค่า 7.0 เป็นค่า pH เป็นกลาง ในระบบความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน $[H^+]$ อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของกรดที่มีอยู่¹

$$pH = -\log (a_H) = \log \frac{1}{a_H} \approx \log \frac{1}{[H^+]}$$

เมื่อ a_H = hydrogen ion activity และ $[H^+]$ = ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน

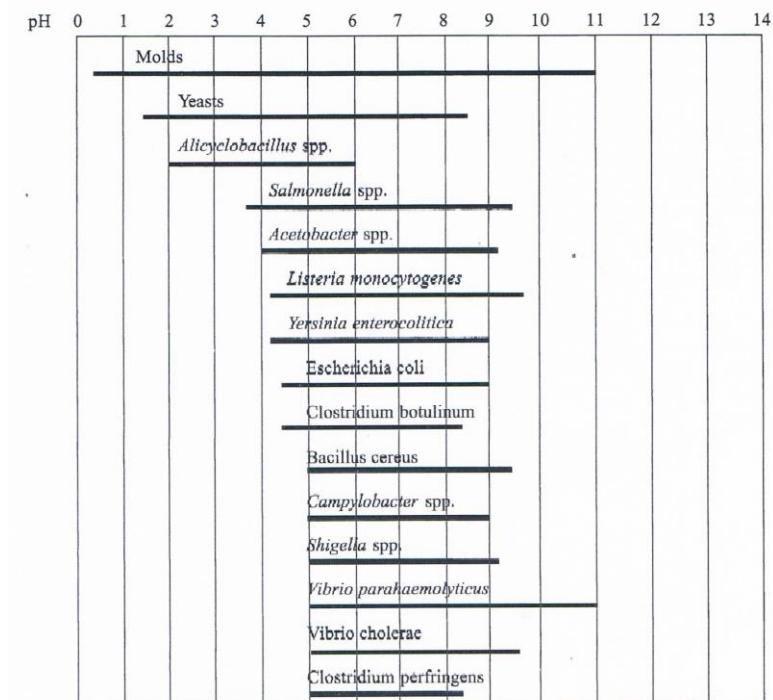
ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย ค่า pH เท่ากับ 7 คือค่า pH ที่เป็นกลาง เนื่องจากในสภาพที่มีน้ำ $[H^+][OH^-] = 10^{-14}$ ค่า pH ต่ำกว่า 7 เป็นกรด มากกว่า 7 เป็นด่าง เนื่องจากค่า pH คือความแตกต่างของ logarithmic scale ของ pH ดังนั้นหน่วยของ pH ที่เท่ากับ 1, 2 และ 3 จะเท่ากับความแตกต่างของความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนเป็น 10, 100 และ 1000 เท่าตามลำดับ²

ในสภาพของสิ่งแวดล้อมที่มีค่า pH เป็นกรดหรือเป็นด่างจะมีผลต่อกิจกรรมและความคงตัวของสารโมเลกุลใหญ่เช่น เอนไซม์ ดังนั้นค่า pH จึงมีอิทธิพลต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของจุลินทรีย์กับค่า pH จะได้กราฟรูประฆังคว่ำที่มีความสมมาตร โดยทั่วไปแบคทีเรียเจริญได้เร็วในช่วง pH เท่ากับ 6.0-8.0 ยีสต์เจริญได้เร็วที่ pH ในช่วง 4.5-6.0 และเชื้อราที่มีเส้นใยเจริญได้เร็วที่ pH ในช่วง 3.5-4.0 แต่ก็ยังมีข้อยกเว้น เช่น ในแบคทีเรียหลายชนิดที่สร้างกรดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วง 5.0-6.0²

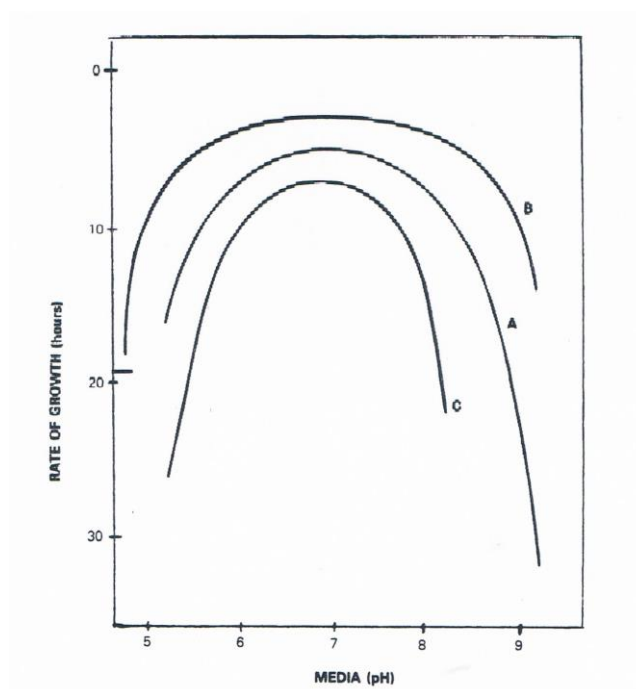
ก) ค่า pH กับการเจริญของจุลินทรีย์

เป็นที่ทราบกันดีว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่สุดที่ค่า pH ประมาณ 7.0 (6.5-7.5) ขณะที่จุลินทรีย์น้อยชนิดที่จะเจริญได้ที่ระดับ pH ต่ำกว่า 4.0 แบคทีเรียมีแนวโน้มที่จะเจริญได้ในช่วง pH ค่อนข้างจำกัดหรือมีความจู้ (fastidious) ในด้าน pH มากกว่าเชื้อราและยีสต์ แบคทีเรียก่อโรคยิ่งต้องการช่วง pH จำกัดมากที่สุด (รูปที่ 3.3) อย่างไรก็ตามช่วง pH ที่จุลินทรีย์จะเจริญได้อาจผันแปรขึ้นอยู่กับการปัจจัยอื่น ๆ ในการเจริญด้วย เช่น ค่า pH ต่ำสุดที่ *Lactobacillus* จะเจริญได้ มีรายงานว่าขึ้นอยู่กับการชนิดของกรดที่ใช้ การใช้กรดซิตริก กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอสฟอริก และกรดทาร์ทริกทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ที่ pH ต่ำกว่าการใช้กรดแอซีติกและกรดแลคติก ยีสต์และเชื้อรามีแนวโน้มที่จะเจริญได้ดีในช่วง pH เป็นกรดมากกว่า ระดับ pH ต่ำสุดที่ยีสต์และเชื้อราจะเจริญได้คือ pH ประมาณ 1-2 แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้มากนักที่ pH ต่ำกว่า 4.5-5.0 ดังนั้นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียจึงค่อนข้างแคบ ดังนั้นเมื่อ pH เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยอัตราการเจริญของแบคทีเรียจะลดลงอย่างมาก (รูปที่ 3.4) สิ่งนี้สำคัญต่อการถนอมอาหารเช่น เนื้อสัตว์ที่ได้จากสัตว์ที่พักผ่อนเพียงพอจะเสียช้ากว่าเนื้อสัตว์ที่ได้จากสัตว์ที่อ่อนเพลียหรือถูกทรมาน ก่อนฆ่าเนื่องจากไกลโคเจนในกล้ามเนื้อของเนื้อสัตว์ที่พักผ่อนเพียงพอ (ประมาณร้อยละ 1) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติกทำให้ค่า pH ของเนื้อสัตว์ลดลงจาก 7.4 เหลือประมาณ 5.6 ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ ระยะนี้เป็นระยะที่เรียกว่าระยะเกร็งตัว (rigor mortis)³

โดยปกติเนื้อปลาจะเน่าเสียเร็วกว่าเนื้อวัวและเนื้อหมูภายใต้สภาพอุณหภูมิแช่เย็น ในกรณีของเนื้อวัวหลังระยะการเกร็งตัวมีค่า pH ต่ำสุดเป็น 5.1 และค่า pH สูงสุดเป็น 6.2 ปกติอยู่ที่ pH 5.6 ส่วนเนื้อหมูมีค่า pH ต่ำสุดหลังระยะการเกร็งตัวเป็น 5.3 (อาจต่ำถึง 5.0) และค่า pH สูงสุดเป็น 6.9 และเนื้อลูกแกะมีค่า pH ต่ำสุดหลังระยะการเกร็งตัวเป็น 5.4 และค่า pH สูงสุดเป็น 6.7 เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อปลาแล้ว เนื้อวัว เนื้อลูกแกะและเนื้อหมูจะเก็บได้นานกว่าเพราะ เนื้อปลามีค่า pH เป็น 6.2-6.5 ซึ่งสูงกว่าค่า pH ของเนื้อวัวและเนื้อหมู ยกเว้นปลา halibut ที่มี pH ต่ำได้ถึง 5.6 แบคทีเรียที่ไวต่อ pH คือ *Shewanella* (เดิมชื่อ *Alteromonas*) มีบทบาทสำคัญต่อการเสียของปลา^{2,3}



รูปที่ 3.3 ช่วง pH ที่จุลินทรีย์จะเจริญได้
ที่มา: Jay และคณะ³



รูปที่ 3.4 ผลของ pH ต่ออัตราการเจริญของ *Alcaligenes faecalis* ใน: A = เปปโตนร้อยละ 1;
B = NaCl 0.2 โมลาร์และ C = เปปโตนร้อยละ 1 + โซเดียมซิเตรต 0.2 โมลาร์

ที่มา: Jay และคณะ³

ข) ค่า pH ของอาหาร

ความเป็นกรดต่างของผลิตภัณฑ์อาหารมีผลต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเจริญได้ และมีผลต่ออัตราการเน่าเสียและลักษณะการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์นั้น เมื่อพิจารณาค่า pH ของอาหาร (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) จะทำให้ทราบได้ว่าจุลินทรีย์ชนิดใดที่สามารถเจริญได้ในอาหารนั้น ๆ จะเห็นได้ว่าผลไม้ เครื่องดื่ม (soft drink) น้ำส้มสายชูและไวน์มีค่า pH ต่ำกว่าค่า pH ที่แบคทีเรียปกติจะเจริญได้ ค่า pH ที่ต่ำของอาหารเหล่านี้ช่วยให้สามารถเก็บอาหารไว้ได้นาน เป็นที่สังเกตว่าผลไม้ไม่ค่อยเสียโดยเชื้อราและยีสต์ ทั้งนี้ก็เนื่องจากเชื้อราและยีสต์สามารถเจริญได้ที่ pH ต่ำกว่า 3.5 ซึ่งต่ำกว่าค่า pH ต่ำสุดที่แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียและแบคทีเรียก่อโรคจะเจริญได้มาก (ตารางที่ 3.2) ผักส่วนใหญ่มีค่า pH ต่ำกว่าค่า pH ของผลไม้ ดังนั้นผักจึงมักจะเน่าเสียโดยแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา³

ตารางที่ 3.1 ค่า pH ของผักและผลไม้

ชนิดของผัก	ค่า pH	ชนิดของผลไม้	ค่า pH
หน่อไม้ฝรั่ง (asparagus)	5.7-6.1	แอปเปิ้ล (apple)	2.9-3.3
ถั่วงอกยาว (string bean)	4.6-6.5	แอปเปิ้ลไซเดอร์ (apple cider)	3.6-3.8
บรอกโคลี (broccoli)	6.5	น้ำแอปเปิ้ล (apple juice)	3.3-4.1
กะหล่ำดาว (brussels sprout)	6.3	กล้วย (banana)	4.5-4.7
กะหล่ำปลี (green cabbage)	5.4-6.0	มะเดื่อ (fig)	4.6
แครอท (carrot)	4.9-5.2; 6.0	น้ำเกรปฟรุต (grapefruit juice)	3.0
ดอกกะหล่ำ (cauliflower)	5.6	องุ่น (grape)	3.4-4.5
ขึ้นฉ่าย (celery)	5.7-6.0	มะนาว (lime)	1.8-2.0
ข้าวโพดหวาน (sweet corn)	7.3	เมลอน (melons เช่น honeydew)	6.3-6.7
แตงกวา (cucumber)	3.8	น้ำส้ม (orange juice)	3.6-4.3
มะเขือยาว (eggplant)	4.5	พลัม (plum)	2.8-4.6
ผักกาดหอม (lettuce)	6.0	แตงโม (watermelon)	5.2-5.6
มะกอก (olive)	3.6-3.8		
หัวหอมแดง (red onion)	5.3-5.8		
ผักชีฝรั่ง (parsley)	5.7-6.0		
มันฝรั่ง (potato)	5.3-5.6		
ฟักทอง (pumpkin)	4.8-5.2		
ผักโขม (spinach)	5.5-6.0		
มะเขือเทศ (tomato)	4.2-4.3		

ที่มา: Jay และคณะ³

ตารางที่ 3.2 ค่า pH ต่ำสุดที่จุลินทรีย์จะเจริญได้

ชนิดของจุลินทรีย์	ค่า pH ต่ำสุด (minimum pH)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6.0
<i>Asaia siamensis</i>	3.0
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	2.0
<i>Bacillus cereus</i>	4.9
<i>Botrytis cinerea</i>	2.0
<i>Clostridium botulinum</i> , Group I	4.6
<i>C. botulinum</i> , Group II	5.0
<i>C. perfringens</i>	5.0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	4.5
<i>Gluconobacter</i> spp.	3.6
<i>Lactobacillus brevis</i>	3.16
<i>L. plantarum</i>	3.34
<i>L. sakei</i>	3.0
<i>Lactococcus lactis</i>	4.3
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.1
<i>Penicillium roqueforti</i>	3.0
<i>Propionibacterium cyclohexanicum</i>	3.2
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	4.5
<i>Pseudomonas fragi</i>	5.0
<i>Salmonella</i> spp.	4.05
<i>Shewanella putrefaciens</i>	5.4
<i>Shigella flexneri</i>	5.5-4.75
<i>S. sonnei</i>	5.0-4.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.8
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4.18
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	1.8

ที่มา: Jay และคณะ³

เนื้อสัตว์และอาหารทะเลส่วนใหญ่มีค่า pH สูงกว่าหรือเท่ากับ 5.6 (ตารางที่ 3.3) สิ่งนี้ทำให้เนื้อสัตว์และอาหารทะเลเสียโดยแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ได้ง่าย อาหารบางชนิดมีคุณสมบัติต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลง pH ได้ดี อาหารที่มีคุณสมบัติเช่นนี้เรียกว่า อาหารนั้นมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) โดยทั่วไปอาหารที่มีโปรตีนสูงเช่น เนื้อสัตว์มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์มากกว่าอาหารที่มีโปรตีนต่ำเช่น ผัก ดังนั้นเนื้อสัตว์จึงต้านทานต่อการเปลี่ยนแปลง pH ได้ดีกว่าผัก และค่า pH ของผักจึงเปลี่ยนแปลงได้ง่ายระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ สำหรับค่า pH ที่ต่ำของผลไม้ก็เป็นทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ ผลไม้โดยทั่วไปมีค่า pH ต่ำกว่าระดับ pH ที่จุลินทรีย์หลายชนิดที่ทำให้อาหารเสียจะเจริญได้ นอกจากค่า pH ที่เป็นกรดที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แล้ว ค่า pH ที่เป็นด่างประมาณ 12-13 ก็เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *Listeria monocytogenes* และจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นในอาหารสดบางชนิดสามารถถูกทำลายได้โดยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เพื่อให้ได้ค่า pH ในระดับที่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์³

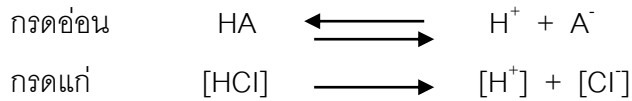
ตารางที่ 3.3 ค่า pH ของผลิตภัณฑ์นม เนื้อสัตว์ สัตว์ปีกและปลา

ชนิดของอาหาร	ค่า pH	ชนิดของอาหาร	ค่า pH
<u>ผลิตภัณฑ์นม</u>		<u>ปลาและหอย</u>	
เนย (butter)	6.1-6.4	ปลา (ส่วนใหญ่)	6.6-6.8
บัตเตอร์มิลค์ (buttermilk)	4.5	หอย (clam)	6.5
นํ้านม	6.3-6.5	ปู	7.0
ครีม	6.5	หอยนางรม	4.8-6.3
เนยแข็ง (cheese)	4.9, 5.9	ปลาทูน่า	5.2-6.1
<u>เนื้อสัตว์และสัตว์ปีก</u>		กุ้ง (shrimp)	6.8-7.0
เนื้อวัวบด	5.1-6.2	ปลาแซลมอน	6.1-6.3
แฮม	5.9-6.1	ปลาขาว(white fish)	5.5
เนื้อลูกวัว	6.0		
เนื้อไก่	6.2-6.4		
ตับ	6.0-6.4		

ที่มา: Jay และคณะ³

ค) ผลของ pH ต่อจุลินทรีย์

กรดแก่ที่ใช้ในอาหารเช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) แตกตัวอย่างสมบูรณ์ ส่วนกรดอ่อนแตกตัวได้แต่ไม่สมบูรณ์ ยังคงอยู่ในรูปที่แตกตัวผสมกับรูปที่ไม่แตกตัว



(ค่า pH ของกรด HCl ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัลเท่ากับ 1.1)

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

เมื่อ K_a = ค่าคงที่ที่ภาวะสมดุล (equilibrium constant)

สัญลักษณ์ [] หมายถึงความเข้มข้น

$$\frac{1}{[\text{H}^+]} = \frac{1}{K_a} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

เมื่อใส่ log ฐาน 10 จะได้สมการดังนี้

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

สมการนี้คือสมการ Henderson – Hasselbach equation แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ของสารละลายของกรดและความมากน้อยของการแตกตัว เมื่อ pH เท่ากับค่า pK_a ของกรด จะมีกรดครึ่งหนึ่งที่ยังไม่แตกตัว (เพราะ $[\text{A}^-]$ เท่ากับ $[\text{HA}]$ ดังนั้น $\log 1$ เท่ากับ 0) และเมื่อ pH เพิ่มขึ้น กรดที่แตกตัวก็จะเพิ่มขึ้นเพื่อว่าเมื่อ $\text{pH} = \text{pK}_a + 1$ แล้วจะมีกรดที่แตกตัวมากกว่ากรดที่ไม่แตกตัวถึง 10 เท่า เช่นกันเมื่อ pH ลดลงต่ำกว่าค่า pK_a สัดส่วนของกรดที่ไม่แตกตัวจะเพิ่มขึ้น²

กรดอ่อนที่แตกตัวเพียงบางส่วนเช่น กรดแอสซิดิก มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ แม้ว่ากรดแก่จะมีผลต่อ pH มาก แต่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้น้อยกว่ากรดอ่อนที่ค่า pH เดียวกัน ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยกรดอ่อนไม่ได้ขึ้นอยู่กับค่า

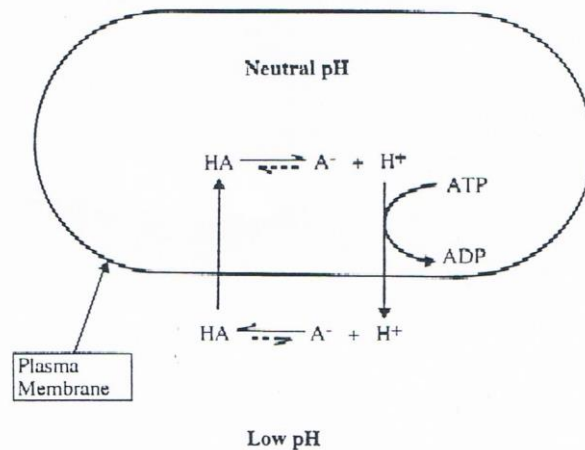
มีความเข้มข้นของโปรตอน $[H^+]$ สูงภายนอกเซลล์แต่เกี่ยวข้องโดยตรงกับความเข้มข้นของกรดที่ไม่แตกตัว (รูปที่ 3.5)²

pH ที่ไม่เหมาะสมมีผลต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ 2 ประการคือ มีผลต่อหน้าที่ของเอนไซม์และการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติค่อนข้างไม่ยอมให้ H^+ และ OH^- ผ่านได้ง่าย ดังนั้นความเข้มข้นของ H^+ และ OH^- ในไซโทพลาสซึมจึงค่อนข้างคงที่ทั้งๆ ที่มีการเปลี่ยนแปลง pH ค่อนข้างมากในสิ่งแวดล้อมเช่น ภายในเซลล์ของยีสต์ขนมปังขณะหมักกลูโคสมีค่า pH เท่ากับ 5.8 ขณะที่ภายนอกเซลล์มี pH ค่อนข้างเป็นกรดสูงกว่า ค่า pH ภายในเซลล์จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ค่อนข้างเป็นกลาง ยกเว้น *Sulfolobus* and *Methanococcus*³

เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มี pH ต่ำหรือสูงกว่า pH 7.0 ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการแบ่งตัวขึ้นกับความสามารถของจุลินทรีย์ในการที่จะทำให้ค่า pH ของสภาวะแวดล้อมกลับสู่สภาพเหมาะสม และเมื่อเซลล์อยู่ในสภาพที่เป็นกรด เซลล์ต้องกันไม่ให้ H^+ เข้าสู่เซลล์หรือไล่ H^+ ออกเร็วเท่าๆ กับที่ H^+ เข้าสู่เซลล์เพราะสารประกอบในเซลล์เช่น DNA และ ATP ต้องการความเป็นกลาง เมื่อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกรด เซลล์จะมีกิจกรรมเมแทบอลิกซึ่งเป็นผลให้อาหารหรือสารตั้งต้นเป็นกรดน้อยลงคือ pH สูงขึ้น แต่ถ้าเซลล์เจริญในสภาพที่มี pH สูงกิจกรรมเมแทบอลิกของเซลล์จะทำให้ค่า pH ของสภาพแวดล้อมลดลงเช่นเมื่อแบคทีเรีย *Clostridium acetobutylicum* เจริญในสภาพที่เป็นกรด แบคทีเรียชนิดนี้จะช่วยเพิ่ม pH ของสารตั้งต้นโดยการรีดิวซ์กรดบิวทิริกไปเป็นสารบิวทานอล (butanol) ขณะที่เชื้อ *Enterobacter aerogenes* ผลิตแอสिटोन (acetoin) จากกรดไพรูวิก (pyruvic acid) ซึ่งช่วยเพิ่มค่า pH ของสิ่งแวดล้อม เมื่อกรดอะมิโนถูกดีคาร์บอกซิเลต (decarboxylate) การเพิ่ม pH จะเกิดขึ้นจากเอมีน (amines) ที่เกิดขึ้นและเมื่อเซลล์เจริญในสภาพที่มี pH เป็นด่าง กลุ่มของเอนไซม์อะมิโนดีอะมิเนส (amino acid deaminase) ซึ่งมีกิจกรรมที่เหมาะสมที่ pH 8.0 จะเป็นสาเหตุให้เกิดการปรับ pH ตามธรรมชาติสู่สภาวะที่เป็นกลางซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากกรดอินทรีย์ที่สะสมอยู่³

หน้าที่สำคัญของเซลล์เช่น การสังเคราะห์ ATP ในเซลล์ของแบคทีเรีย การขนส่งสารอาหาร การควบคุมปฏิกิริยาต่าง ๆ ในไซโทพลาสซึมเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ แต่จะมีพลังงานเก็บไว้ในเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปของแรงขับเคลื่อนโปรตอน (Proton motive Force, PMF) แรงขับเคลื่อนโปรตอนนี้ผลิตโดยกระบวนการ active translocation ของโปรตอนจากภายในเซลล์ไปยังภายนอกเซลล์ ในการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เซลล์ของแบคทีเรียมีแนวโน้มที่จะมีประจุลบ โมเลกุลของกรดที่ชอบไขมันซึ่งไม่แตกตัว (undissociated lipophilic acid molecules) สามารถผ่านจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่มี pH ต่ำเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างอิสระโดยโมเลกุลที่ไม่แตกตัวนี้จะผ่านเข้าสู่ไซโทพลาสซึมที่มี pH สูง (~ 7.5) ในสภาพที่มี pH สูงนี้ สมดุลก็จะเบี่ยงเบนไปในทางด้านที่แตกตัว กรดจะแตกตัวให้โปรตอนซึ่งมีผลทำให้ไซโทพลาสซึมเป็นกรด ขณะนั้นเซลล์จะพยายามจะรักษาสภาพ pH ภายในโดย

การขับไล่โปรตอนที่เข้ามา สิ่งที่เกิดขึ้นนี้มีผลทำให้เซลล์เจริญช้าลงเพราะเซลล์ได้ใช้พลังงานที่จะต้องใช้ในการเจริญให้หมดไป แต่ถ้า pH ภายนอกเซลล์ต่ำมากหรือความเข้มข้นของกรดภายนอกเซลล์สูง เซลล์จะไม่สามารถทนได้ เนื่องจากค่า pH ของไซโทพลาสซึมจะลดลงถึงระดับที่เซลล์ไม่สามารถเจริญได้และเซลล์จะตายในที่สุด²



รูปที่ 3.5 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยกรดอ่อน
ที่มา: Adams และ Moss²

3.2.1.2 ปริมาณน้ำอิสระ (water activity)

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาพแห้ง แต่ไม่สามารถมีกิจกรรมเมแทบอลิกได้ตามปกติหรือไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในสภาพที่ไม่มีน้ำ จุลินทรีย์สามารถเจริญในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายแต่ไม่สามารถเจริญในน้ำบริสุทธิ์หรือสภาพที่ไม่มีน้ำ เนื่องจากปฏิกิริยาเคมีต่างๆที่เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมของเซลล์จะเกิดขึ้นในสภาพที่มีน้ำ ไซโทพลาสซึมถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ที่อาจยอมให้โมเลกุลของน้ำผ่านได้อย่างอิสระจากไซโทพลาสซึมไปยังสิ่งแวดล้อมภายนอกและจากสิ่งแวดล้อมภายนอกเข้ามายังไซโทพลาสซึม น้ำเป็นตัวทำละลายสารต่าง ๆ ได้มากกว่าตัวทำละลายชนิดอื่น น้ำจึงช่วยในการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์และขับของเสียออกจากเซลล์ น้ำเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีในการย่อยสลายสารต่าง ๆ ปฏิกิริยาเหล่านี้รวมถึงปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของพันธะเปปไทด์ในโปรตีน พันธะเอสเทอร์ในไขมันและการย่อยสลายพันธะในพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้มอนแซ็กคาไรด์ โมเลกุลของน้ำยังให้ไฮโดรเจนไอออนช่วยในการควบคุมค่า pH และอุณหภูมิภายในเซลล์^{2,4}

น้ำทั้งหมด (total water หรือ moisture) ที่มีอยู่ในอาหารแบ่งเป็น 2 รูปแบบคือ 1) น้ำที่จับอยู่กับอนุภาคอาหารเรียกว่า bound water ซึ่งเป็นส่วนของน้ำที่ใช้ในการไฮเดรต (hydrate) โมเลกุลที่ชอบน้ำ (hydrophilic molecules) และใช้ในการละลายที่มีอยู่ ยตัวถูกละลาย (solute) ซึ่งไม่อยู่ในรูปที่จะเอาใช้ทำหน้าที่ทางชีวภาพได้ ดังนั้นจุลินทรีย์จึงไม่สามารถใช้น้ำชนิดนี้ในกิจกรรมเมแทบอลิก และ

2) น้ำอิสระเรียกว่า free water หรือ available water หรือ water activity จุลินทรีย์ทุกชนิดต้องการน้ำในรูปของน้ำอิสระ น้ำจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับโดยทั่วกันว่า ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ประโยชน์ควรกล่าวในรูปของปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) ปริมาณน้ำหรือปริมาณความชื้น (moisture content) ในอาหารอาจไม่ได้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีถึงปริมาณน้ำอิสระเช่น ถั่วที่มีน้ำมันสูงมีปริมาณน้ำร้อยละ 4-9 ถั่วที่มีโปรตีนสูงมีปริมาณน้ำร้อยละ 9-13 และผลไม้แห้งที่มีน้ำตาลสูงมีปริมาณน้ำร้อยละ 18-25 อาหารทั้งสามชนิดล้วนมีค่า a_w ประมาณ 0.7 ซึ่งค่อนข้างคงตัวคือ จะไม่เน่าเสียโดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ทำให้อาหารเสีย¹⁻³

Water activity (a_w) มีค่าเท่ากับอัตราส่วนของความดันไอของน้ำในอาหารต่อความดันไอของน้ำบริสุทธิ์ในบรรยากาศที่ภาวะสมดุลที่อุณหภูมิเดียวกัน

$$a_w = \frac{P}{P_o} = \frac{n_1}{n_1 + n_2}$$

เมื่อ P คือ ความดันไอของสารละลาย n_1 = จำนวนโมลของตัวทำละลาย

P_o คือ ความดันไอของตัวทำละลาย n_2 = จำนวนโมลของตัวถูกละลาย

ความดันไอ (vapor pressure) ของน้ำบริสุทธิ์ขึ้นอยู่กับอัตราการระเหยของโมเลกุลของน้ำออกจากผิว การระเหยของโมเลกุลของน้ำออกจากอากาศวัดได้ในรูปของความชื้นสัมพัทธ์ที่สภาวะสมดุล (Equilibrium Relative Humidity, ERH) ดังนั้นความดันไอจึงเกี่ยวข้องกับความชื้นสัมพัทธ์ที่สภาวะสมดุล เมื่อเติมตัวถูกละลาย (solute) เช่น เกลือหรือน้ำตาลลงไปใ้น้ำบริสุทธิ์ ปริมาณน้ำอิสระจะลดลงและอัตราการระเหยของโมเลกุลของน้ำออกจากผิวจะลดลง ดังนั้นปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ของสารละลายอาจหาได้โดยสมการดังนี้⁴

$$a_w = \frac{p}{P_o} = \frac{\text{ERH}}{100}$$

ค่า a_w ของน้ำบริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 1.00 ดังนั้น ERH จะมีค่าเท่ากับ 100% และในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 22 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีค่า a_w เท่ากับ 0.86 และสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัวมีค่า a_w เท่ากับ 0.75 ดังตารางที่ 3.4 และ 3.5 ค่า a_w ของอาหารอยู่ในช่วง 0 ถึง 1 หรือที่ถูกต้องกว่าก็คือ > 0 ถึง < 1 เพราะไม่มีอาหารชนิดใดที่จะมีค่า a_w เท่ากับ 0.00 หรือ 1.00^{1,3}

ตารางที่ 3.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง water activity กับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

ค่า a_w	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	
	Molal	ร้อยละ (น้ำหนักโดยปริมาตร)
0.995	0.15	0.9
0.99	0.30	1.7
0.98	0.61	3.5
0.96	1.20	7.0
0.94	1.77	10.0
0.92	2.31	13.0
0.90	2.83	16.0
0.88	3.33	19.0
0.86	3.81	22.0

ที่มา: Jay และคณะ³ตารางที่ 3.5 ค่า a_w ของสารละลายเกลืออิ่มตัวที่อุณหภูมิ 25°C

ชนิดของสารละลายเกลืออิ่มตัว	a_w
ลิเทียมคลอไรด์ ($\text{LiCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.11
ซิงค์ไนเตรต ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.31
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.32
โพแทสเซียมคาร์บอเนต ($\text{K}_2\text{CO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.43
โซเดียมโบรไมด์ ($\text{NaBr} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.57
ลิเทียมแอสิตเตต	0.68
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.75
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.86
โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3)	0.93
น้ำบริสุทธิ์	1.00

ที่มา: Banwart⁴

n) Water activity กับ การเจริญของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์มีค่า a_w สูงสุด ค่า a_w ที่เหมาะสมและค่า a_w ต่ำสุดที่จะเจริญได้ เนื่องจากน้ำบริสุทธิ์มีค่า a_w เท่ากับ 1.00 จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำบริสุทธิ์ ดังนั้นค่า a_w สูงสุดที่เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญได้จะมีค่าต่ำกว่า 1.00 อย่างไรก็ตามอาหารบางชนิดมีค่า a_w มากกว่า 0.995 หรือประมาณ 1.00 จุลินทรีย์ก็สามารถเจริญได้ในอาหารเหล่านี้⁴

การป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญที่นักจุลชีววิทยาทางอาหารจะต้องศึกษา ค่า a_w ต่ำสุดที่จุลินทรีย์จะเจริญได้เป็นสิ่งที่น่าสนใจ เมื่อพิจารณาค่า a_w ต่ำสุดที่จุลินทรีย์จะเจริญได้ดังตารางที่ 3.6 จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียโดยทั่วไปต้องการ a_w สำหรับการเจริญสูงกว่ายีสต์และยีสต์ต้องการ a_w สูงกว่าเชื้อรา แบคทีเรียแกรมลบต้องการ a_w สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียส่วนใหญ่ไม่เจริญที่ค่า a_w ต่ำกว่า 0.91 แต่เชื้อราที่ทำให้อาหารเสียสามารถเจริญได้ที่ a_w ต่ำถึง 0.80 ส่วนแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษเช่น *Staphylococcus aureus* เจริญได้ในสภาพที่มี a_w ต่ำถึง 0.86 ขณะที่ *Clostridium botulinum* ไม่เจริญที่ระดับ a_w ต่ำกว่า 0.94 เชื้อราและยีสต์สามารถเจริญได้ในช่วง a_w ที่กว้างกว่าช่วง a_w ที่แบคทีเรียจะเจริญได้ ค่า a_w ต่ำที่สุดที่มีรายงานว่าแบคทีเรียจะเจริญได้คือ 0.75 แบคทีเรียชนิดที่เจริญได้ที่ a_w ต่ำระดับนี้เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือซึ่งเรียกว่า halophilic ("salt-loving") bacteria (ตารางที่ 3.6) ขณะที่ xerophilic ("dry-loving") mold (เชื้อราที่ชอบสภาพแห้ง) และ osmophilic yeast (ยีสต์ที่ชอบสภาพที่มีความดันออสโมติกสูง) สามารถเจริญได้ที่ a_w ต่ำถึง 0.65 และ 0.61 ตามลำดับ^{3,4}

อย่างไรก็ตาม ตัวถูกละลายที่ใช้ในการลดค่า a_w มีผลต่อค่า a_w ต่ำสุดที่จุลินทรีย์จะเจริญได้เช่น การใช้น้ำตาลในการลดค่า a_w มีผลทำให้จุลินทรีย์ที่ทนต่อความดันออสโมติกสูงเจริญได้ที่ระดับ a_w ต่ำกว่าการใช้เกลือในการลดค่า a_w นอกจากนี้ค่า a_w ยังมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิและสารอาหาร ประการแรก ที่อุณหภูมิใด ๆ เมื่อ a_w ลดลงความสามารถของจุลินทรีย์ที่จะเจริญได้จะลดลง ประการที่สอง ช่วง a_w ที่จุลินทรีย์จะเจริญได้จะกว้างที่สุดถ้าจุลินทรีย์อยู่ในสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และประการที่สาม ในสภาพที่มีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ ช่วง a_w ที่จุลินทรีย์อยู่รอดได้จะกว้างขึ้น³

ขีดจำกัดของค่า a_w สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ใดๆ คือประมาณ a_w 0.60 การเน่าเสียของอาหารที่มีค่า a_w ที่ระดับต่ำกว่านี้จะไม่เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์แต่อาจจะเกิดขึ้นโดยแมลงเข้าไปทำลายหรือเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาเคมีเช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ระดับ a_w เท่ากับ 0.60 ไฮโดรฟอสฟอรัสของเซลล์จะสะสมตัวถูกละลายที่เหมาะสมในความเข้มข้นที่สูงมาก สารโมเลกุลใหญ่เช่น DNA จะไม่สามารถทำงานได้ การเจริญของเซลล์จะหยุดในที่สุด อย่างไรก็ตามแม้ว่าเซลล์จะไม่สามารถเจริญได้แต่ก็อาจอยู่รอดได้ในสภาพที่มี a_w ต่ำมาก บ่อยครั้งมีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแบบนี้²

ตารางที่ 3.6 ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญในอาหาร

ชนิดของจุลินทรีย์	ค่า a_w ต่ำสุด	ชนิดของจุลินทรีย์	ค่า a_w ต่ำสุด
<u>กลุ่ม</u>		<u>กลุ่ม</u>	
แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียส่วนใหญ่	0.90	Halophilic bacteria	0.75
แบคทีเรียแกรมลบส่วนใหญ่	0.97	Xerophilic mold	0.61
แบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่	0.90	Osmophilic yeast	0.61
ยีสต์ที่ทำให้อาหารเสียส่วนใหญ่	0.88		
เชื้อราที่ทำให้อาหารเสียส่วนใหญ่	0.80		
<u>ชนิดของจุลินทรีย์</u>		<u>ชนิดของจุลินทรีย์</u>	
<i>Clostridium botulinum</i> , type E	0.97	<i>Candida scottii</i>	0.92
<i>Pseudomonas</i> spp.	0.97	<i>Trichosporon pullulans</i>	0.91
<i>Acinetobacter</i> spp.	0.96	<i>Candida zeylanoides</i>	0.90
<i>Escherichia coli</i>	0.96	<i>Geotrichum candidum</i>	~ 0.90
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.95	<i>Trichothecium</i> spp.	~0.90
<i>Bacillus subtilis</i>	0.95	<i>Byssoschlamys nivea</i>	~0.87
<i>Clostridium botulinum</i> , type E	0.94	<i>Candida utilis</i>	0.94
<i>Clostridium botulinum</i> , type B	0.94	<i>Alternaria citri</i>	0.84
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86	<i>Penicillium patulum</i>	0.81
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	<i>Eurotium repens</i>	0.72
<i>Botrytis cinerea</i>	0.93	<i>Aspergillus glaucus</i>	0.70
<i>Rhizopus stolonifera</i>	0.93	<i>Aspergillus conicus</i>	0.70
<i>Mucor spinosus</i>	0.93	<i>Aspergillus echinulatus</i>	0.64
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.61	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0.62

ที่มา: Jay และคณะ³

ข) ค่า a_w ของอาหาร

โดยทั่วไปสามารถแบ่งกลุ่มของอาหารตามค่า a_w ของอาหารได้เป็น 5 กลุ่ม² คือ

กลุ่มที่ 1 อาหารที่มีค่า a_w ระหว่าง 0.98 ถึงมากกว่า 0.99 ได้แก่อาหารสดชนิดต่าง ๆ เช่น ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก ไข่ ปลา นํ้านม เครื่องดื่ม จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค

กลุ่มที่ 2 อาหารที่มีค่า a_w ระหว่าง 0.98 ถึง 0.93 ได้แก่ นํ้านมระเหยยวชสมะเชื้อเทศ ปลา และเนื้อที่ไม่เค็มมาก ได้กรอกหมัก ได้กรอกสุก processed cheese และ gouda cheese เป็นต้น จุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด สามารถเจริญได้

กลุ่มที่ 3 อาหารที่มีค่า a_w 0.93 ถึง 0.85 ได้แก่ เนื้อแห้ง ได้กรอกหมักแห้ง แฮมดิบ cheddar cheese ที่ผ่านการบ่มและนมข้นหวาน เชื้อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อราหลายชนิดที่สร้างสารพิษสามารถเจริญได้

กลุ่มที่ 4 อาหารที่มีค่า a_w 0.85 ถึง 0.60 อาหารกลุ่มนี้เรียกว่าอาหารกึ่งแห้ง (Intermediate Moisture food, IMF) ได้แก่ แป้ง ธัญชาติ ผลไม้แห้ง แยม เยลลี่ นํ้าผึ้ง ปลาเค็มที่มีเกลือเข้มข้นสูงและอาหารอื่น ๆ จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาพที่แห้งหรือในสภาพที่มีเกลือหรือนํ้าตาลความเข้มข้นสูงสามารถเจริญได้ในอาหารเหล่านี้

กลุ่มที่ 5 อาหารที่มีค่า a_w ต่ำกว่า 0.60 จัดเป็นอาหารแห้งเช่น ไข่ผง นมผง ผักแห้ง บิสกิต ช็อคโกแลต และขนมหวานต่าง ๆ จุลินทรีย์จะไม่เจริญในอาหารเหล่านี้แต่อาจมีชีวิตรอดได้นาน

เมื่อพิจารณาค่า a_w ต่ำสุดที่จุลินทรีย์จะเจริญได้และค่า a_w ของอาหารแล้วทำให้สามารถคาดคะเนได้ว่า อาหารแต่ละชนิดจะเสียโดยจุลินทรีย์ประเภทใด เนื่องจากในสภาพที่มี a_w สูง อัตราการเจริญของแบคทีเรียจะสูงกว่าอัตราการเจริญของเชื้อราและยีสต์ ดังนั้นอาหารที่มีค่า a_w สูง จึงมักพบว่าแบคทีเรียเป็นสาเหตุการเสีย เนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้เร็วเพิ่มจำนวนได้มากกว่าเชื้อราและยีสต์ แต่สภาพที่มี a_w ต่ำสามารถจำกัดการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อราจึงเจริญได้มากกว่า นอกจากนี้สภาพที่มีกรดเช่น ในผลไม้ก็ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย สำหรับอาหารที่มีนํ้าตาลสูงเช่น แยม เยลลี่ นํ้าผึ้งและผลไม้แช่อิ่มมักเสียโดย osmophilic yeast หรือ osmotolerant yeast ขณะที่อาหารที่มีเกลือสูงมักเสียโดย halotolerant (halophilic) bacteria แต่สำหรับ halobacteria ชนิดที่ชอบเกลืออย่างแท้จริงจะไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่ไม่มีเกลือเช่นแบคทีเรียในสกุล *Halobacterium* และ *Halococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม archaeobacteria มีการสะสมโพแทสเซียมคลอไรด์ซึ่งเป็น compatible solute ภายในเซลล์ มักพบในทะเลสาบที่มีเกลือความเข้มข้นสูง แบคทีเรียเหล่านี้เป็นสาเหตุการเสียของปลาเค็ม ส่วนอาหารแห้งทั่วไปที่มีค่า a_w ต่ำกว่า 0.75 เป็นอาหารที่เก็บไว้ได้นาน แต่ถ้าจะให้เก็บไว้ได้นานจริง ๆ อาหารนั้นควรมี a_w 0.70 หรือต่ำกว่า^{2,4}

ค) ผลของ a_w ต่าจลินทรีย์

การลดระดับ a_w ของอาหารให้ต่ำกว่าระดับ a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จะทำให้ระยะเวลาของช่วง lag phase ของการเจริญเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลง ทั้งนี้เป็นผลมาจากอิทธิพลของปริมาณน้ำที่ลดลงต่อกิจกรรมเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ เนื่องจากปฏิกิริยาเคมีทั้งหมดภายในเซลล์ต้องการสภาพที่มีน้ำ³ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์บางชนิดมีกลไกการป้องกันตนเองจากสภาพเครียดอันเนื่องมาจากความดันออสโมติก (osmotic pressure)

สภาพเครียดต่อความดันออสโมติก (osmotic stress) หมายถึงสภาพเครียดของการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมที่มีความดันออสโมติกสูง (high osmolality) สภาพเครียดต่อความดันออสโมติกมีผลต่อการเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียซึ่งเกี่ยวข้องกับค่า a_w ภายนอกเซลล์ ค่า $a_w = P/P_0 = n_1/(n_1+n_2)$ เมื่อ P คือความดันไอของสารละลาย และ P_0 คือความดันไอของตัวทำละลาย (น้ำบริสุทธิ์) n_1 คือจำนวนโมลของตัวทำละลาย และ n_2 คือจำนวนโมลของตัวถูกละลายในอุดมคติ การลดต่ำลงของความดันไอเป็นคุณสมบัติหนึ่งของสารละลายเช่นเดียวกับการลดต่ำลงของจุดเยือกแข็ง การเพิ่มขึ้นของจุดเดือด และการเพิ่มขึ้นของความดันออสโมติก ความดันออสโมติกก็คือความดันอุทกสถิต (hydrostatic pressure, มีหน่วยเป็นเมกกาปาสคาล) ความเข้มข้นตัวถูกละลายที่แท้จริง (actual solute) แสดงในรูปของความเข้มข้นของตัวถูกละลายในอุดมคติ (ideal solute) ที่ให้ค่า a_w ระดับเดียวกันและมีหน่วยเป็น osmolal (osM) ความสัมพันธ์ระหว่าง a_w และความดันออสโมติกแสดงได้ดังสมการดังนี้คือ $a_w = x/(x+c)$ ซึ่ง c หมายถึงความเข้มข้นของตัวถูกละลายมีหน่วยเป็น osM และ x คือจำนวนโมลของน้ำต่อลิตรซึ่งมีจำนวนโมลประมาณ 55.6⁵

ความดันออสโมติกหมายถึง ความดันอุทกสถิตที่เกิดขึ้นในเซลล์ สมมติว่าเซลล์ถูกแบ่งออกเป็นสองช่องเหมือนกัน ซึ่งเปิดสู่สภาพบรรยากาศโดยแยกแต่ละช่องออกจากกันด้วยเยื่อหุ้มที่ยอมให้สารบางชนิดผ่านได้ตามแนวขวาง ถ้าเติมน้ำบริสุทธิ์ลงในช่องที่ 1 ในขณะเดียวกันเติมน้ำในปริมาณเท่ากันที่มีตัวถูกละลายที่ไม่สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มได้ลงในช่องที่ 2 เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำในช่องที่ 2 น้อยกว่าน้ำในช่องที่ 1 ทำให้โมเลกุลของน้ำแพร่ผ่านเยื่อหุ้มจากช่องที่ 1 ไปยังช่องที่ 2 การเคลื่อนย้ายของน้ำนี้เป็นสาเหตุทำให้ระดับน้ำในช่องที่ 1 ลดลงและระดับน้ำในช่องที่ 2 เพิ่มขึ้นเกิดความดันอุทกสถิตขึ้น การแพร่ของน้ำจากช่อง 1 ไปยังช่องที่ 2 นี้จะดำเนินไปอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเกิดความสมดุลของน้ำ⁶

จากตัวอย่างข้างต้นถ้าเติมน้ำที่บรรจุในช่องที่ 1 สามารถแพร่สู่อีกช่องหนึ่งได้อย่างอิสระและเยื่อหุ้มที่กั้นระหว่าง 2 ช่องนั้นไม่สามารถยึดหยุ่นได้ทำให้ปริมาตรของสารละลายในช่องที่ 2 ไม่สามารถขยายได้ทำให้เกิดความดันในช่องที่ 2 เพิ่มขึ้นโดยถ้าเป็นเซลล์ของแบคทีเรียและพืชซึ่งมีผนังเซลล์ที่แข็งแรงอยู่รอบ ๆ เยื่อหุ้มเซลล์ น้ำที่แพร่เข้าสู่เซลล์จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สามารถขยายได้เพียง

พื้นที่ด้านในของผนังเซลล์เท่านั้นและเมื่อน้ำแพร่เข้าสู่เซลล์มากขึ้นจะทำให้เกิดแรงดันของเยื่อหุ้มเซลล์ดันไปที่ผนังเซลล์ ซึ่งแรงดันนี้เรียกว่าแรงดันเต่ง (turgor pressure) ⁶

- กลไกการควบคุมความดันออสโมติกของเซลล์จุลินทรีย์

เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีคุณสมบัติยอมให้น้ำผ่านได้ ขณะเดียวกันก็เป็นตัวกั้นอย่างมีประสิทธิภาพต่อตัวถูกละลายส่วนใหญ่ทั้งในไซโทพลาสซึมและในสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยทั่วไปเซลล์ของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่มีผนังเซลล์สามารถรักษาความเข้มข้นของน้ำภายในเซลล์ให้อยู่ที่ระดับหนึ่งซึ่งต่ำกว่าภายนอกเซลล์เพื่อให้เซลล์สามารถทำงานได้ตามปกติ จากความแตกต่างของค่า a_w ภายในเซลล์และ a_w ภายนอกเซลล์นี้ ทำให้มีแนวโน้มที่น้ำจะไหลเข้าสู่เซลล์ซึ่งเป็นผลมาจาก hydrostatic pressure หรือแรงดันเต่ง (turgor pressure) ที่สะสมเพิ่มขึ้น เมื่อแรงดันเต่งเพิ่มขึ้นเยื่อหุ้มเซลล์จะดันผนังเซลล์ทำให้เซลล์ขยายออก ปริมาตรของเซลล์จะเพิ่มขึ้น และกลับกันถ้าแรงดันเต่งลดลงปริมาตรของเซลล์จะลดลงเช่นกัน ดังนั้นในขณะที่ปริมาตรของเซลล์เปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ แรงตึงผิว และความเข้มข้นของตัวถูกละลายในไซโทพลาสซึมจะเปลี่ยนแปลงด้วย⁷

กลไกการควบคุมความดันออสโมติก (osmoregulatory mechanisms) เป็นกลไกที่ช่วยรักษาแรงดันเต่งไว้ให้อยู่ในระดับที่เซลล์สามารถทนได้ แรงดันเต่งสามารถถูกควบคุมได้โดยการปรับความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายในไซโทพลาสซึม ในสภาพที่มีตัวถูกละลายภายนอกเซลล์สูงหรือปริมาณน้ำภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์ (hyperosmotic condition) ถ้าหากไม่มีกลไกการควบคุมนี้ น้ำภายในเซลล์จะไหลออกสู่ภายนอกอย่างรวดเร็วทำให้เกิดการสูญเสียแรงดันเต่ง เป็นผลให้ความเข้มข้นของสารเมแทบอลิซึมทั้งหมดภายในเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งทำให้ค่า a_w ภายในเซลล์ลดลง เซลล์จะเหี่ยว (plasmolysis) หรือปริมาตรไซโทพลาสซึม (cytoplasmic volume) ลดลง เยื่อหุ้มเซลล์จะหดออกจากผนังเซลล์ ผลที่ตามมาก็คือตัวถูกละลายภายในเซลล์ซึ่งมีความเข้มข้นสูงอาจยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในเซลล์ และเมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำให้เสียหายก็ไม่สามารถจะทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านของสารที่อยู่ในเซลล์และในสิ่งแวดล้อม ผลที่ตามมาก็คือก็จะเกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เซลล์อาจตายในที่สุด ในทางตรงข้ามถ้าหากภายนอกเซลล์มีตัวถูกละลายอยู่น้อยหรือมีปริมาณน้ำมาก (hypoosmotic condition) น้ำภายนอกก็จะเข้าสู่เซลล์ทำให้แรงดันเต่งและปริมาตรของเซลล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อที่เซลล์จะอยู่รอดได้ในสภาพเครียดอันเนื่องมาจากความดันออสโมติก เซลล์จำเป็นต้องปรับตัวโดยการสะสมตัวถูกละลายบางชนิดภายใต้สภาพ hyperosmotic และปล่อยออกในสภาพ hypoosmotic ตัวถูกละลายนี้เรียกว่า “compatible solute” เนื่องจากสามารถช่วยลดค่า a_w ภายในเซลล์ได้โดยการสะสมอยู่ในเซลล์ในระดับความเข้มข้นสูง ตัวถูกละลายนี้จะไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่ยับยั้งเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์ เซลล์อาจได้รับตัวถูกละลายนี้จากการสังเคราะห์ขึ้นเองหรือได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ตัวถูกละลายที่ช่วยรักษาสสมดุลของความดันออสโมติกได้แก่ โพแทสเซียมไอออน (K^+) กรดอะมิโน (เช่น กลูตาเมต และโพรลีน) อนุพันธ์ของ

กรดอะมิโน (เช่น เปปไทด์ และ N-acetylated amino acids) quaternary amines (เช่น glycine betaine และ carnitine) น้ำตาล (ซูโครส ทรีฮาโลส และ tetrahydropyrimidine เช่น ectoines)⁶

ตัวถูกละลายภายในเซลล์หลายชนิดช่วยให้เอนไซม์คงตัวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งไม่เพียงแต่จะช่วยป้องกันเซลล์ต่อสภาพความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงเท่านั้นและยังช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพที่มีอุณหภูมิสูง สภาพการแช่แข็งและการทำให้ละลายรวมทั้งการทำแห้งอีกด้วย แต่ตัวถูกละลายบางชนิดเช่น โพลีเทสเซียมอออนและกลูตาเมตถ้ามีมากเกินไปอาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ แต่ที่ความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.25 osM) ช่วยควบคุม osmolality ของไซโทพลาสซึม เซลล์บางชนิดสะสม neutral compatible solutes ความเข้มข้นสูงเช่น ทรีฮาโลส (O- α -D-glucosyl [1 $\rightarrow$ 1]- α -glucoside) โพรลีน และ switterionic quaternary ammonium compounds รวมทั้ง glycine betaine (N,N,N-trimethylglycine) พบมากใน enteric bacteria⁷

โพลีเทสเซียมอออน (K^+) เป็นอออนบวกที่มีมากที่สุดในไซโทพลาสซึมของแบคทีเรีย จึงเป็นตัวถูกละลายในเซลล์ที่ช่วยรักษาความดันเต่งไว้ ความเข้มข้นของ K^+ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่าความดันออสโมติก (osmolality) ของอาหารเลี้ยงเชื้อและความเข้มข้นของ K^+ ในเซลล์มีความสัมพันธ์กับความสามารถของแบคทีเรียในการทนต่อสภาพที่มี osmolality สูง ระดับ a_w ของสภาพแวดล้อมเป็นสิ่งที่บ่งบอกถึงปริมาณ K^+ ที่จะเข้าสู่เซลล์เพื่อรักษาความดันเต่งไว้ที่ระดับเหมาะสม การขนส่ง K^+ มี 2 ระบบคือ Trk (low affinity for K^+) ซึ่งจะถูกระงับในสภาพ hyperosmotic shock และ Kdp (high affinity for K^+) ถูกกระตุ้นในสภาพ hyperosmotic shock เช่นเดียวกับ Trk⁶

ความเข้มข้นของกลูตาเมตเพิ่มขึ้นในโพรคาริโอตส่วนใหญ่เมื่ออยู่ในสภาพที่มี osmolality สูง ในแบคทีเรียแกรมลบความเข้มข้นของกลูตาเมตอาจเพิ่มถึง 10 เท่า ในสภาพที่มี osmolality สูง และระดับของกลูตามีนก็เพิ่มขึ้นแต่มีปริมาณต่ำกว่ากลูตาเมตมาก กลูตามีนเป็น precursor ของกลูตาเมต การเพิ่มขึ้นของกลูตามีนอาจเกิดจากการสังเคราะห์กลูตาเมต การเพิ่มขึ้นของกลูตาเมตในแบคทีเรียแกรมลบจะน้อยและช้ากว่าในแบคทีเรียแกรมลบมาก⁶ วิธีการสังเคราะห์กลูตาเมตแสดงดังรูปที่ 3.6

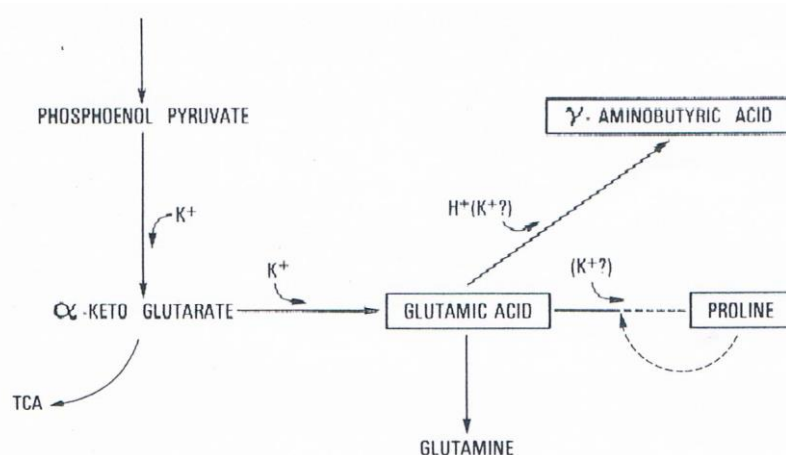
ในการตอบสนองต่อสภาพเครียดจากความดันออสโมติกในเซลล์ของแบคทีเรียหลายชนิดเป็นผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ γ -aminobutyrate ภายในเซลล์ แต่จากรายงานการวิจัยยังไม่พบการสะสมของ γ -aminobutyrate ใน enteric bacteria ที่เจริญใน minimal medium ดังนั้นการสะสม γ -aminobutyrate บางครั้งอาจเนื่องมาจากเซลล์ได้รับสารนี้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้มีรายงานการสังเคราะห์ทรีฮาโลสในแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้ง *E. coli* ในการตอบสนองต่อสภาพเครียดจากความดันออสโมติก⁵

Escherichia coli และ *Salmonella Typhimurium* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความดันออสโมติกสูงจะมี osmolality ของไซโทพลาสซึมเพิ่มขึ้นโดยการสะสมโพลีเทสเซียมอออน กลูตาเมต

และทรีฮาโลส การปรับตัวของเซลล์นี้ช่วยให้เซลล์สามารถเจริญต่อไปได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า osmolality อย่างน้อย 2 osM อย่างไรก็ตาม การทนต่อสภาพที่มี osmolality สูงภายนอกเซลล์อาจเพิ่มขึ้นได้ถ้าหากมีสารอินทรีย์ที่ช่วยป้องกันเซลล์จากความดันออสโมติกสูง (osmotic protectants) อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สารนี้ช่วยบรรเทาผลการยับยั้งการเจริญอันเนื่องมาจากความดันออสโมติก จากการรายงานการวิจัยทำให้ทราบว่า การเติมสารโพรลีน (proline) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยให้ *Samonella* spp. ทนต่อสภาพที่มี osmolality สูงได้ดียิ่งขึ้น โพรลีนจำเป็นต่อการเจริญของ *S. Oranienburg* ใน defined medium ที่มีค่า a_w ต่ำกว่า 0.97 หรือประมาณ 1.7 osM ดังนั้นโพรลีนจึงเป็นสาร osmotic protectant ที่ช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ในอาหารที่มีความดันออสโมติกสูง เช่นเดียวกับ glycine betaine ซึ่งเป็นสาร osmotic protectant ใน *E. coli* และ *S. Typhimurium* จากการวิจัยพบว่า *S. Typhimurium* ที่เจริญใน minimal medium ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.8 โมลาร์ มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นจาก 0.10 ต่อชั่วโมงเป็น 0.17 ต่อชั่วโมงถ้าอาหารนั้นมีโพรลีนอยู่ด้วย แต่ถ้าเติม glycine betaine ลงไป อัตราการเจริญจะเพิ่มเป็น 0.30 ต่อชั่วโมง⁵

- การปรับตัวในสภาพที่มีความออสโมติกสูง

เมื่อเซลล์อยู่ในสภาพที่มีตัวถูกละลายภายนอกเซลล์สูง เซลล์จะเหี่ยวเนื่องจากการสูญเสีย น้ำและสูญเสีย K^+ ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ถ้าไม่กลับสู่สภาพเดิม (deplasmolyzed) ระดับของ K^+ ภายในเซลล์ถูกควบคุมโดยกระบวนการทางสรีรวิทยา การเคลื่อนที่ของ K^+ อยู่ภายใต้การควบคุมของ Trk และ Kdp ซึ่งได้รับสัญญาณจากการสูญเสียแรงดันเต่ง การสะสม K^+ จึงเริ่มขึ้นจากการที่ Trk ถูกกระตุ้นและในขณะเดียวกันจะมีการสังเคราะห์สารเมแทบอลิต์ภายในเซลล์เช่น กลูตาเมต จากนั้นทรีฮาโลส betaine หรือ proline อาจถูกสังเคราะห์ขึ้นและมีระบบขนส่งกรดอะมิโนคือ ProP และ ProU สิ่งเหล่านี้จะช่วยให้ค่า a_w ภายในเซลล์ลดลง⁷



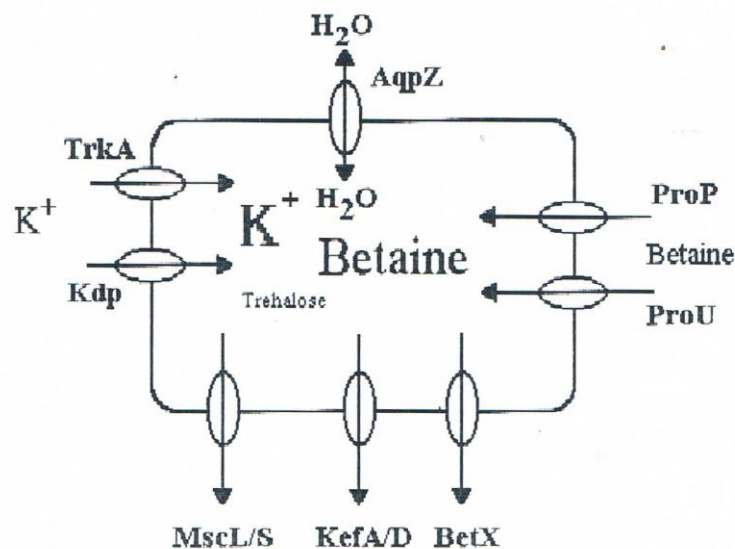
รูปที่ 3.6 การสังเคราะห์กรดอะมิโนในการควบคุมความดันออสโมติก

ที่มา: Troller⁸

ตารางที่ 3.7 ตัวถูกละลายที่สะสมในเซลล์ของจุลินทรีย์จากการตอบสนองของค่า a_w ที่ลดลง

ชนิดของจุลินทรีย์	ตัวถูกละลายที่สะสม
Eubacteria	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	glycine betaine, proline, glutamate
<i>Klebsiella pneumonia</i>	glycine betaine, proline
<i>Streptococcus faecalis</i>	γ -aminobutyric acid, proline
Yeasts	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Glycerol
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glycerol
<i>Debaryomyces hansenii</i>	glycerol, arabitol
Molds	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glycerol
<i>Aspergillus chevalieri</i>	glycerol, sorbitol

ที่มา: Csonka⁶ ; Yancey และคณะ⁹

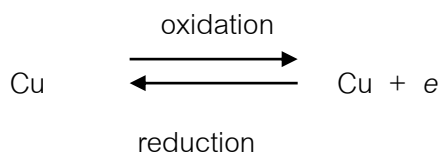


รูปที่ 3.7 ระบบขนส่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม compatible solutes ใน *E. coli*
 แผนภาพนี้เกี่ยวข้องกับระบบการขนส่งโพแทสเซียมและบีเทน (betaine) เนื่องจากสิ่งเหล่านี้
 เป็นกิจกรรมการขนส่งหลักที่ถูกควบคุม (major osmotically regulated transport activities)

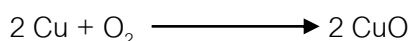
ที่มา: Booth¹⁰

3.2.1.3 ความต่างศักย์ของออกซิเดชันและรีดักชัน

เป็นที่ทราบกันดีว่า จุลินทรีย์มีความผันแปรในด้านความไวต่อความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน (Oxidation - reduction potential หรือ O/R potential) ซึ่งก็คือศักยภาพของสารในการลดหรือเพิ่มอิเล็กตรอน ปฏิกิริยารีดอกซ์ (oxidation-reduction (redox) reaction) ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างอะตอมหรือโมเลกุล เมื่อธาตุหรือสารประกอบสูญเสียอิเล็กตรอน กล่าวได้ว่าธาตุหรือสารประกอบนั้นถูกออกซิไดส์ แต่เมื่อธาตุหรือสารประกอบได้รับอิเล็กตรอน ก็อาจกล่าวได้ว่าธาตุหรือสารประกอบนั้นถูกรีดิวซ์ ดังสมการต่อไปนี้³



ออกซิเดชันอาจเกิดขึ้นได้จากการเติมออกซิเจนดังสมการ



ดังนั้นสารที่พร้อมที่จะให้อิเล็กตรอนจึงเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดี และสารที่พร้อมที่จะรับอิเล็กตรอนจึงเป็นตัวออกซิไดส์ที่ดี เมื่อเกิดการถ่ายอิเล็กตรอนจากสารประกอบชนิดหนึ่งไปยังสารประกอบอีกชนิดหนึ่งจะมีความต่างศักย์เกิดขึ้น ซึ่งวัดได้ด้วยเครื่องมือสำหรับวัดค่าความต่างศักย์ ผลที่ได้แสดงในหน่วยมิลลิโวลต์ (millivolts, MV) ถ้าหากสารใดมีความสามารถในการออกซิไดส์ได้สูงมากเท่าใด ค่าศักยภาพของอิเล็กตรอน (electrical potential) ก็จะมีค่าเป็นบวกมากขึ้นเท่านั้น ในทางตรงกันข้าม ถ้าหากสารใดมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงมากขึ้นเท่าใด ค่าศักยภาพของอิเล็กตรอน ก็จะมีค่าเป็นลบมากขึ้นเท่านั้น และเมื่อความเข้มข้นของตัวออกซิไดส์เท่ากับความเข้มข้นของตัวรีดิวซ์ ศักยภาพของอิเล็กตรอนจะมีค่าเป็นศูนย์ ค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชันและรีดักชัน แสดงในรูปของสัญลักษณ์ Eh (redox potential) จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobes) ต้องการค่า Eh เป็นบวก (สภาพออกซิไดส์) ขณะที่จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (anaerobes) ต้องการค่า Eh เป็นลบ (สภาพรีดิวซ์) ดังรูปที่ 3.8 สารประกอบที่มีอยู่ในอาหารซึ่งช่วยรักษาสภาพรีดิวซ์ของอาหารได้แก่ อาหารที่หมู่ซัลไฟด์ริล (-SH) ซึ่งพบในเนื้อสัตว์ กรดแอสคอร์บิก และน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) ที่มีในผักและผลไม้³

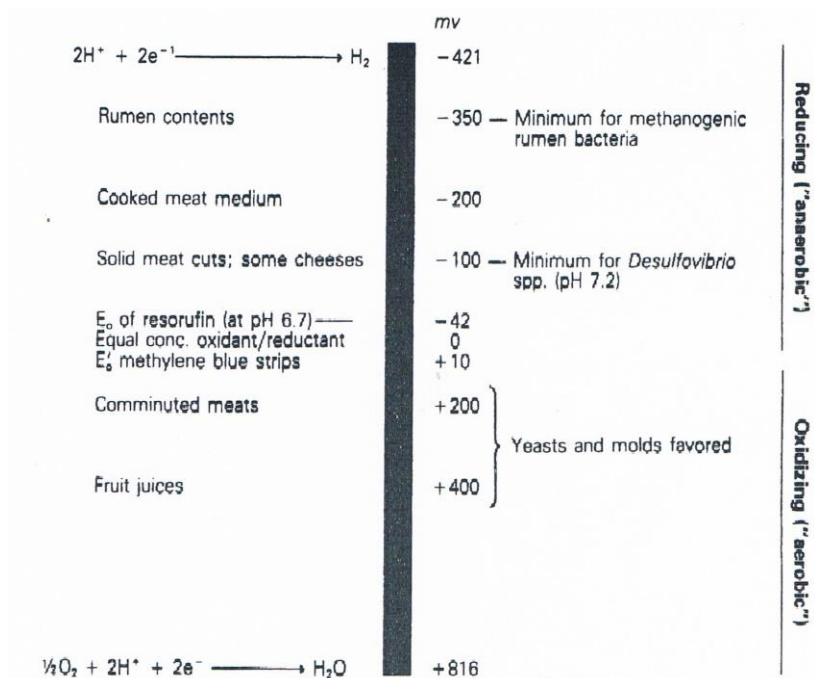
ก) ความต้องการ Eh ของจุลินทรีย์

เมื่อคำนึงถึงความต้องการ Eh จุลินทรีย์จะพบว่า แบคทีเรียบางชนิดต้องการสภาพรีดิวซ์เพื่อเริ่มต้นการเจริญเช่น ต้องการ Eh ประมาณ -200 mv ขณะที่แบคทีเรียชนิดอื่นต้องการ Eh เป็นบวกสำหรับการเจริญ แบคทีเรียที่ต้องการสภาพ Eh เป็นลบในการเจริญได้แก่ แบคทีเรียที่ไม่

ต้องการอากาศเช่น *Clostridium* ส่วนแบคทีเรียที่ต้องการสภาพ Eh เป็นบวกได้แก่ แบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเช่น *Bacillus* แบคทีเรียบางชนิดที่ต้องการอากาศเจริญได้ดีภายใต้สภาพรีดิวซ์เพียงเล็กน้อย (slightly reduced condition) แบคทีเรียกลุ่มนี้คือพวก microaerophile เช่น *Lactobacillus* และ *Campylobacter* แต่แบคทีเรียบางชนิดเจริญได้ทั้งสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศซึ่งจัดเป็นพวก facultative anaerobe ยีสต์และเชื้อราที่เจริญบนอาหารส่วนใหญ่เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ แต่มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่เป็นพวก facultative anaerobe³ รายละเอียดเกี่ยวกับจุลินทรีย์เหล่านี้มีดังนี้

- จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริง (Obligate หรือ Strict aerobe)

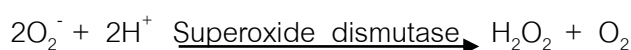
จุลินทรีย์ประเภทนี้หายใจปล่อยพลังงานส่วนใหญ่จากกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชัน (oxidative phosphorylation) โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ดังนั้นจุลินทรีย์กลุ่มนี้จึงต้องการออกซิเจนและสภาพที่มี Eh สูง ซึ่งจะเจริญเด่นบนผิวของอาหารที่สัมผัสกับอากาศ เช่น *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งเจริญได้ที่สภาพ Eh +100 mv ถึง +500 mv และแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนชนิดอื่นๆ ที่สร้างเมือกและกลืนติดปกติดบนผิวของเนื้อ *Bacillus subtilis* เจริญที่สภาพ Eh ประมาณ -100 mv ถึง +135 mv เชื้อชนิดนี้จะทำให้ขนมปังเสียและ *Acetobacter* ที่เจริญที่ผิวของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์สามารถออกซิไดส์เอทานอลไปเป็นกรดแอซีติกทำให้น้ำส้มสายชูเสีย²



รูปที่ 3.8 ความสัมพันธ์ของความต่างศักย์ของออกซิเดชันและรีดักชันกับการเจริญของจุลินทรีย์
ที่มา: Jay และคณะ³

- จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริง (Obligate anaerobe)

จุลินทรีย์ประเภทนี้เจริญในสภาพที่มีความต่างศักย์ของออกซิเดชันและรีดักชันต่ำ ซึ่งไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ให้พลังงานออกมาน้อยกว่าการหายใจของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศจึงชอบสภาพรีดิวซ์ซึ่งเป็นสภาพที่สามารถลดการสูญเสียพลังงานออกจากเซลล์ได้ การมีออกซิเจนจะเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศ การที่จุลินทรีย์ประเภทนี้ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพมีอากาศเกี่ยวข้องกับความสามารถกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นจากออกซิเจนเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และที่สำคัญคืออนุมูลอิสระของซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion radical หรือ O_2^-) ที่เกิดขึ้นจากการที่ออกซิเจนสูญเสียอิเล็กตรอนไป 1 อะตอม เนื่องจากจุลินทรีย์ประเภทนี้ไม่มีเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dimutase) ที่จะไปแตกสลายอนุมูลอิสระของซูเปอร์ออกไซด์และไม่มีคะตะเลสในการแตกสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์²



จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริงโดยเฉพาะ *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคโบทูลิซึม (botulism) มีความสำคัญทางด้านจุลชีววิทยาทางอาหารมาก เนื่องจากสามารถเจริญได้ในสภาพใดก็ตามที่ไม่มีอากาศเช่น ในเนื้อเยื่อของสัตว์ อาหารสด เนื้ออาหารที่บรรจุในสภาพสุญญากาศและอาหารกระป๋อง²

- จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศแต่สามารถทนออกซิเจนได้ (aerotolerant anaerobe)

จุลินทรีย์ประเภทนี้ไม่สามารถมีกระบวนการหายใจได้ แต่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิด จุลินทรีย์กลุ่มนี้ปล่อยพลังงานจากการบวนการหมักได้ แต่ไม่มีเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส แต่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนเนื่องจากมีกลไกในการทำลายซูเปอร์ออกไซด์จากการสะสมแมงกานีส²

ข) ค่า Eh ของอาหาร

เมื่อพิจารณาถึงค่า Eh ของอาหาร อาหารที่ทำจากพืชโดยเฉพาะน้ำผักและผลไม้มีแนวโน้มที่จะมีค่า Eh ระหว่าง 300-400 ดังนั้นจึงไม่ต้องสงสัยเลยว่า แบคทีเรียและเชื้อราที่ต้องการอากาศมักเป็นสาเหตุการเสียของอาหารชนิดนี้ แต่ในก้อนเนื้อมีค่า Eh ประมาณ -200 mv ขณะที่ในเนื้อสดจะมีค่า Eh ประมาณ +200 mv ส่วนในเนยแข็งมีการรายงานว่ามีค่า Eh ระหว่าง -20 mv ถึง -200 mv ในเนื้อของสัตว์ที่เพิ่งถูกฆ่าใหม่ในระยะก่อนการเกร็งตัว จะมีค่า Eh เป็นบวก จากนั้น

เมื่อเวลาผ่านไปจนถึงระยะหลังการเกร็งตัว ค่า Eh จะลดลงเช่น ในเนื้อผ้าที่เพิ่งถูกฆ่าใหม่ ๆ จะมีค่า Eh ประมาณ 250 mv ซึ่งแบคทีเรีย *Clostridium* ยังเจริญไม่ได้ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมงหลังฆ่า เนื้อผ้าจะมีค่า Eh ลดลงเป็น -130 mv สภาพนี้ยังไม่มีแบคทีเรียเจริญ จากการรายงานพบว่า *Clostridium* เริ่มเจริญได้เมื่อค่า Eh ลดลงเป็น -36 mv³

ค) ผลของค่า Eh ต่อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์มีผลต่อค่า Eh ของสิ่งแวดล้อมที่จุลินทรีย์เจริญเช่นเดียวกับค่า pH โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ จุลินทรีย์ที่เจริญในสภาพมีอากาศสามารถลดค่า Eh ของสิ่งแวดล้อมได้ ในขณะที่จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญไม่สามารถลดค่า Eh ของสิ่งแวดล้อม เมื่อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเจริญ ออกซิเจนในอาหารที่จุลินทรีย์เจริญจะลดลงทำให้ค่า Eh ลดลงเช่น ลดลงจาก 400 mv เมื่อมีอากาศอิ่มตัว ลงเหลือ 60 mv เมื่อ partial pressure ของออกซิเจนลดลง 10 เท่า การลดลงของค่า Eh นี้เป็นผลให้อาหารมีสภาพออกซิไดส์น้อยลงหรือมีสารที่มีสภาพเป็นตัวรีดิวซ์มากขึ้น นอกจากนี้ค่า Eh ของอาหารอาจลดลงโดยการกระทำของจุลินทรีย์ที่ผลิตสารบางชนิดจากกิจกรรมเมแทบอลิซึมเช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ สารนี้สามารถลดค่า Eh ลงถึง -300 mv เนื่องจากไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนทำให้มีการสะสมไฮโดรเจนซัลไฟด์ในสภาพไร้อากาศ^{2,3}

ค่า Eh ขึ้นอยู่กับค่า pH ของซัสเพนเดนต์ ความสำคัญโดยตรงของปัจจัยทั้งสองประการนี้คือค่า rH (rH value) ดังสมการ³

$$Eh = \frac{2.303 RT}{F} (rH - 2pH)$$

เมื่อ R = 8.315 joules F = 96,500 coulombs และ T = absolute temperature ดังนั้นเมื่อกล่าวถึงค่า Eh ควรบอกค่า pH ของซัสเพนเดนต์ด้วย³

การลดลงของค่า Eh ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ใช้เป็นหลักการในการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารด้วยวิธีที่รวดเร็วโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมเช่น การตรวจหาจุลินทรีย์ด้วยวิธี dye reduction test จะใช้สีย้อม (redox dye) เช่น เมทิลีนบลู (methylene blue) เรซาซูลิน (resazurin) ในการบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงค่า Eh ซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนจุลินทรีย์ และเมทิลีนบลูยังใช้ในการตรวจหาจำนวนเซลล์ของยีสต์ที่มีชีวิตในการหมักเบียร์ เซลล์ยีสต์ที่ย้อมสีด้วยเมทิลีนบลูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตซึ่งมี reducing cytoplasm จะรีดิวซ์เมทิลีนบลูได้ทำให้เซลล์ไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะไม่สามารถรีดิวซ์สีเมทิลีนบลูจึงติดสีน้ำเงินของเมทิลีนบลู

3.2.1.4 ปริมาณสารอาหาร

จุลินทรีย์ก็เช่นเดียวกับมนุษย์ที่ต้องการสารอาหารเป็นแหล่งพลังงานเพื่อที่การเจริญของ จุลินทรีย์และหน้าที่ต่าง ๆ ขององค์ประกอบเซลล์จะดำเนินไปได้ตามปกติ จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญใน อาหารต้องการสิ่งต่างๆ เหล่านี้ได้แก่ น้ำ แหล่งพลังงาน แหล่งไนโตรเจน วิตามิน ปัจจัยการเจริญ และแร่ธาตุชนิดต่างๆ จุลินทรีย์อาจใช้น้ำตาล แอลกอฮอล์และกรดอะมิโน จุลินทรีย์บางชนิดใช้สาร คาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนได้แก่ สตาร์ชและเซลลูโลสเป็นแหล่งพลังงานโดยย่อยสลายให้เป็นน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยวก่อน ไขมันถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานเช่นกันโดยจุลินทรีย์จำนวนน้อยในอาหาร³

กรดอะมิโนเป็นสารชนิดแรกที่จะถูกใช้โดยจุลินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ก็มีสาร ไนโตรเจนจำนวนมากที่จะถูกใช้โดยจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น นิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนอิสระ เชื้อ จุลินทรีย์บางชนิดอาจใช้เปปไทด์และโปรตีน โดยทั่วไปกรดอะมิโนจะถูกใช้โดยจุลินทรีย์เกือบทั้งหมด ก่อนที่จะใช้สารประกอบอื่นที่ซับซ้อนกว่าเช่น โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งการให้พอลิแซ็กคาไรด์ และไขมันก็เป็นดังนี้เช่นกัน³

จุลินทรีย์อาจต้องการวิตามินบีในปริมาณน้อย อาหารโดยธรรมชาติเกือบทั้งหมดมีปริมาณ วิตามินบีอุดมสำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์สารที่จำเป็นได้ โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมบวก สามารถสังเคราะห์สารที่จำเป็นได้น้อยจึงต้องได้รับสารจำเป็นก่อนที่จะเจริญ ขณะที่แบคทีเรียแกรม ลบและเชื้อราสามารถสังเคราะห์สารที่จำเป็นส่วนใหญ่ที่ต้องการได้ จึงมักพบจุลินทรีย์สองกลุ่มนี้ใน อาหารที่มีวิตามินบีต่ำ ดังนั้นการที่ผลไม่มีปริมาณวิตามินบีต่ำกว่าเนื้อสัตว์ มีค่า pH ต่ำ และมีค่า Eh เป็นบวก ผลไม่จึงเสียโดยเชื้อรามากกว่าแบคทีเรีย³

3.2.1.5 สารต้านการเจริญของจุลินทรีย์

การที่อาหารบางชนิดมีความคงตัวต่อการเข้าทำลายโดยจุลินทรีย์ อาจเนื่องมาจากอาหาร นั้นมีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยธรรมชาติ พืชบางชนิดมีน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ที่ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เช่น กานพลูมียูจีนอล (eugenol) กระเทียมมีอัลลิซิน (allicin) อบเชยมีซินนามัลดีไฮด์ (cinnamic aldehyde) และยูจีนอล มัสตาร์ด (mustard) มีอัลลิลไอโซไทโอ ไซยาเนต (allyl isothiocyanate) sage มียูจีนอลและไทมอล (thymol) ออริกาโน (oregano) มีสาร คาวาครอล (carvacrol หรือ isothymol) และไทมอล ในน้ำมันม้วนประกอบด้วยสารยับยั้งหลายชนิด ได้แก่ แลคโตเฟอริน (lactoferrin) คอนกลูตินิน (conglutinin) และระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase system) มีรายงานว่าน้ำมันม้วนมีสารยับยั้งไวรัส (rotavirus inhibitor) ซึ่งสามารถ ยับยั้งไวรัสได้สูงถึง 10^6 pfu (plaqueforming units) ต่อมิลลิลิตร สารยับยั้งนี้จะถูกทำลายโดยการ พาสเจอร์ไรส์ เคซีนในนมรวมทั้งกรดไขมันอิสระบางชนิดก็มีรายงานว่าสามารถต้านจุลินทรีย์ได้ในบาง สภาวะ³

ไซมิโลไซม์เช่นเดียวกับในน้ำมัน เอนไซม์นี้กับคอนอัลบูมินช่วยให้ไฮสดมีระบบต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ในผักผลไม้ ชา กาคน้ำตาล (molasses) และพืชชนิดอื่นๆ มีอนุพันธ์ของกรดไฮดรอกซีซินนามิก (hydroxycinnamic acid derivatives) เช่น กรดพาราคูมาริก (p-coumaric acid) กรดฟีรูริก (feruric acid) กรดคาเฟอิก (caffeic acid) และกรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเชื้อรา แลคโตเพอรินเป็นสารไกลโคโปรตีนที่จับอยู่กับเหล็กซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในอาหารจำนวนมาก โอวทรานสเฟอริน (ovotransferrin) เป็นสารยับยั้งในไข่ขาวดิบที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella Enteritidis* แวกคิวโอล (vacuole) ภายในเซลล์ของผักบางชนิดเช่น กะหล่ำปลี ถั่วดอก บรอกโคลี (broccoli) มีสารกลูโคซิโนเลต (glucosinolate) เมื่อเซลล์ของผักได้รับความเสียหายจะให้ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อราและแบคทีเรีย³

ระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดส เป็นระบบการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในน้ำมันวัวซึ่งประกอบไปด้วย แลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ไทโอไซยาเนต (thiocyanate) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ องค์ประกอบทั้งสามชนิดนี้จำเป็นต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แบคทีเรียแกรมลบเช่น *Pseudomonas* ค่อนข้างไวต่อระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดส ปริมาณแลคโตเปอร์ออกซิเดสที่ต้องการคือ 0.5-1.0 ppm ขณะที่ในน้ำมันวัวมี 30 ppm ถึงแม้ว่าไทโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะเกิดขึ้นตามธรรมชาติในน้ำมัน แต่ปริมาณค่อนข้างผันแปรสำหรับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จำเป็นต้องมีความเข้มข้น 100 อนุตต่อมิลลิลิตรเพื่อการยับยั้ง แต่ในน้ำมันปกติมีเพียง 1-2 อนุตต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณไทโอไซยาเนตที่มีประสิทธิภาพคือ ประมาณ 0.25 มิลลิโมลาร์ แต่ในน้ำมันมีปริมาณสารนี้ผันแปรระหว่าง 0.02-0.25 มิลลิโมลาร์ จากการศึกษาพบว่าเมื่อกระตุ้นระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดสโดยเติมไทโอไซยาเนตลงไปในน้ำมันดิบให้ได้ 0.25 มิลลิโมลาร์และเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อีกเล็กน้อย ปรากฏว่าช่วยเพิ่มอายุการเก็บของน้ำมันดิบเป็น 5 วันเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันดิบชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมไทโอไซยาเนต และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพิ่มลงไปซึ่งเก็บได้เพียง 48 ชั่วโมง ระบบนี้มีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิ 30°C มากกว่าที่อุณหภูมิ 4°C ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นตามความเป็นกรด เยื่อหุ้มเซลล์เป็นเป้าหมายที่จะถูกทำให้เสียหาย การเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จากภายนอกสามารถทำได้โดยการเติมกลูโคสและกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) สามารถใช้ระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดสในการถนอมน้ำมันดิบในชนบทที่ขาดแคลนเครื่องทำความเย็น การเติมไทโอไซยาเนต 12 ppm และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 8 ppm ไม่มีอันตรายต่อผู้บริโภค³

3.2.1.6 โครงสร้างทางชีวภาพของอาหาร

เปลือกที่ปกคลุมอาหารตามธรรมชาติ ช่วยป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียได้เป็นอย่างดี เช่น เปลือกผลไม้ เปลือกถั่วต่าง ๆ เปลือกไข่ รวมทั้งหนังสัตว์เช่น หนังปลา หนังหมู หนังวัวและอื่น ๆ เปลือกถั่วมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าของจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี ถ้าหากเปลือกแตกออกเมล็ดถั่วนั้นก็อาจเสียโดยเชื้อรา เปลือกไข่และเยื่อหุ้มป้องกันการเข้าของจุลินทรีย์ได้เกือบทุกชนิดถ้าเก็บในสภาพที่มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสม ผักและผลไม้ที่มีผิวแตกเสียหาย จะเกิดการเน่าเสียได้เร็วกว่าผักผลไม้ที่ไม่ได้รับความเสียหาย ปลาและสัตว์เช่นหมูและวัวที่มีหนังหุ้มอยู่สามารถช่วยป้องกันการปนเปื้อนและการเน่าเสียได้³

ปัจจัยภายในอาหารทั้ง 6 ประการนี้ช่วยป้องกันอาหารประเภทพืชและสัตว์จากการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ เมื่อทราบว่าปัจจัยชนิดใดมีในอาหารชนิดใดบ้าง ก็สามารถที่จะทำนายชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเจริญในอาหารนั้นได้ หรือสามารถจะประเมินความคงตัวของอาหารชนิดนั้นได้

3.2.2 ปัจจัยภายนอกอาหาร (Extrinsic Parameters) ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ปัจจัยภายนอกอาหารเป็นคุณสมบัติของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อทั้งอาหารและจุลินทรีย์ ปัจจัยภายนอกที่มีความสำคัญได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา ความชื้นสัมพัทธ์ของสิ่งแวดล้อม แก๊ส และความเข้มข้นของแก๊สในสิ่งแวดล้อมและการมีจุลินทรีย์ชนิดอื่น

3.2.2.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาอาหาร

จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ดังนั้นจึงสามารถใช้ช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์จะเจริญได้ช่วยในการเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาอาหารชนิดต่างๆ สำหรับอุณหภูมิต่ำสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้ มีรายงานว่าต่ำถึง -34°C ส่วนอุณหภูมิสูงสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้นั้นมีรายงานว่า สูงกว่า 100°C เราสามารถจำแนกประเภทของจุลินทรีย์ตามช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์จะเจริญได้ ออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ 1) จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำเรียกว่า ไสโครโทรฟ (psychrotroph) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 7°C หรือต่ำกว่าและมีอุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการเจริญที่ $20-30^{\circ}\text{C}$ 2) จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางหรือมีโซไฟล์ (mesophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ $20-45^{\circ}\text{C}$ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่ $30-40^{\circ}\text{C}$ และ 3) จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง หรือเทอร์โมไฟล์ (thermophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45°C หรือสูงกว่า มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญระหว่าง $55-65^{\circ}\text{C}$ ³

แบคทีเรียที่จัดเป็นไซโครโทรฟได้แก่ แบคทีเรีย *Alcaligenes*, *Shewanella*, *Brochothrix*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Enterococcus* และอื่นๆ จุลินทรีย์เหล่านี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิแช่เย็น และเป็นสาเหตุการเสียของเนื้อสัตว์ ปลา สัตว์ปีก ไข่และอาหารอื่นๆ ที่เก็บที่อุณหภูมิ $5-7^{\circ}\text{C}$

ส่วนจุลินทรีย์กลุ่มมีไซโพลีอาจพบได้ในอาหารที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำโดยจะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำ แต่จะเจริญขึ้นถ้าอยู่ในสภาพที่เหมาะสมหรือเมื่ออาหารมีอุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงอุณหภูมิปานกลาง

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญในช่วง 0°C ถึงมากกว่า 40°C เช่น *Enterococcus faecalis* สำหรับแบคทีเรียที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงที่มีความสำคัญในอาหารได้แก่ เชื้อ *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, *Alicyclobacillus* และ *Thermoanaerobacter* ³

เชื้อรา นอกจากจะเจริญได้ในช่วงของพีเอช ความดันออสโมติก และปริมาณสารอาหารที่ค่อนข้างกว้างแล้ว ก็ยังสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้างด้วยเช่นเดียวกับแบคทีเรีย เชื้อราหลายชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิของการแช่เย็นซึ่งอาจพบเชื้อรา *Aspergillus*, *Cladosporium* และ *Thamnidium* บางสายพันธุ์เจริญบนไข่ เนื้อ และผลไม้ ส่วนยีสต์เจริญได้ทั้งในช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์กลุ่มไซโครโทรฟและช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์กลุ่มมีไซโพลีเจริญได้ แต่โดยทั่วไปจะไม่เจริญในช่วงอุณหภูมิที่จุลินทรีย์เทอร์โมไฟล์เจริญ³

ในการเลือกอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาอาหารควรคำนึงถึงคุณภาพของอาหารด้วย ถึงแม้ว่าอาหารส่วนใหญ่เหมาะสมที่จะเก็บที่อุณหภูมิของการแช่เย็น แต่อาจไม่เหมาะสมกับอาหารบางชนิดเช่น กล้วย ควรเก็บที่อุณหภูมิ $13-17^{\circ}\text{C}$ ดีกว่าที่อุณหภูมิ $5-7^{\circ}\text{C}$ ผักหลายชนิดเช่น มันฝรั่ง ผักชีล้อม กะหล่ำปลีและอื่นๆ ควรเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 10°C ในทุกกรณีของการเก็บรักษาควรคำนึงถึงความชื้นสัมพัทธ์และการมีหรือไม่มีแก๊สเช่น คาร์บอนไดออกไซด์และโอโซนด้วย³

3.2.2.2 ความชื้นสัมพัทธ์ของสิ่งแวดล้อม

ความชื้นสัมพัทธ์ของสิ่งแวดล้อมสำคัญในแง่ของ a_w ของอาหารและการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผิวของอาหารเช่น ถ้าอาหารมีค่า a_w 0.60 ก็ควรเก็บอาหารภายใต้สภาพความชื้นสัมพัทธ์ระดับนั้นเพื่ออาหารจะได้ไม่ดูดความชื้นจากสิ่งแวดล้อมจนทำให้ค่า a_w ที่ผิวและใต้ผิวของอาหารเพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่จุลินทรีย์จะเจริญได้ ดังนั้นถ้าอาหารที่มีค่า a_w ต่ำถูกเก็บรักษาไว้ในสภาพความชื้นสัมพัทธ์สูงอาหารจะได้รับความชื้นจนกระทั่งถึงจุดสมดุล ในทางตรงข้ามถ้าอาหารมีค่า a_w สูง อาหารก็จะสูญเสียความชื้นให้กับสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ในการเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับรักษาอาหารควรคำนึงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นสัมพัทธ์กับอุณหภูมิ ปกติสภาพที่มีอุณหภูมิสูงความชื้นสัมพัทธ์จะต่ำและในทางตรงข้าม สภาพอุณหภูมิต่ำความชื้นสัมพัทธ์จะสูง³

อาหารที่มีแนวโน้มจะเน่าเสียโดยเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิดควรเก็บไว้ในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เนื้อที่ห่ออย่างไม่เหมาะสมเช่น ไก่ทั้งตัวและชิ้นเนื้อวัวที่ตัดแต่งแล้วมักจะเกิดการเน่าเสียที่ผิวก่อนที่จะเกิดการเน่าเสียในส่วนของเนื้อเยื่อที่ลึกลงไป สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะในตู้เย็นตามปกติมักจะมีอุณหภูมิสูงและจุลินทรีย์ที่ทำให้เนื้อเน่าเสียต้องการอากาศในการเจริญ แม้ว่าจะมีโอกาสน้อยที่จะเก็บอาหารไว้ในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ แต่ก็ควรจะทราบด้วยว่าภายใต้สภาพความชื้นสัมพัทธ์ต่ำอาหารจะสูญเสียความชื้นสู่บรรยากาศ ทำให้เกิดลักษณะปรากฏที่ไม่เป็นที่พึง

ปรารถนา ดังนั้นในการเลือกสภาพความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาอาหารจะต้องคำนึงถึงทั้งความเป็นไปได้ที่จุลินทรีย์จะเจริญที่ผิวและคุณภาพที่ดีของอาหาร การปรับสภาพของแก๊สในบรรยากาศเป็นไปได้อาจจะช่วยยับยั้งการเน่าเสียที่ผิวของอาหารโดยที่ไม่ต้องลดระดับความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศ³

3.2.2.3 แก๊สและความเข้มข้นของแก๊สในสิ่งแวดล้อม

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแก๊สที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการควบคุมจุลินทรีย์ในอาหาร แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน เป็นแก๊สสองชนิดที่สำคัญที่สุดที่ใช้ในอาหารที่เก็บรักษาในสภาพปรับสภาพบรรยากาศ (modified atmosphere packaged (MAP) food) นอกจากนี้อาจใช้โอโซน (O₃) ในการเก็บรักษาอาหารเนื่องจากโอโซนเป็นแก๊สที่มีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ แต่โอโซนเป็นสารออกซิไดส์ที่แรง ดังนั้นไม่ควรใช้กับอาหารที่มีไขมันสูงเนื่องจากจะช่วยเร่งปฏิกิริยาการหืน จากการรายงานการใช้โอโซนในการควบคุมการเจริญของ *Escherichia coli* O157:H7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า โอโซนที่ความเข้มข้น 3-18 ppm สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้ภายใน 20-50 นาที ประเทศออสเตรเลีย ฝรั่งเศส ญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้โอโซนได้ในอาหารและมีความปลอดภัย ได้มีรายงานว่า โอโซนที่ความเข้มข้น 0.15-5.00 ppm ในอากาศสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์บางชนิดที่ทำให้อาหารเสียได้³

3.2.2.4 การมีจุลินทรีย์ชนิดอื่น

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถยับยั้งหรือกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ในธรรมชาติรวมทั้งในผลิตภัณฑ์อาหารมีจุลินทรีย์หลายชนิดอาศัยอยู่ปะปนกัน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งที่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้แก่ สารปฏิชีวนะ แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์^{3, 4}

เอกสารอ้างอิง

1. Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology, 3rd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
2. Adams, M.R., Moss, M.O. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
3. Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.
4. Banwart, G.J. 1989. Basic Food Microbiology, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

5. Ingraham, J.L., Marr, A.G. 1996. Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth, pp. 1570-1578. In: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H.E. (Eds.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. ASM Press. Washington, DC.
6. Csonka, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology Reviews*. 53: 121-147.
7. Csonka, L.M., Epstein, W. 1996. Osmoregulation, pp. 1210-1223. In: Neidhardt, F. C., (Ed.). *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
8. Troller, J.A. 1987. Adaptation and growth of microorganisms in environments with reduced water activity, pp. 101-117. In: Rockland, L.B., Beuchat, L.R. (Eds.). *Water Activity: Theory and Application to Food*. Marcel Dekker, Inc., USA.
9. Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R. D., Somero, G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*. 1214-1222.
10. Booth, I.R. 1996. Bacterial responses to osmotic stress: diverse mechanisms to achieve a common goal, pp. 456-485. In: Reid, D.S. (Ed.). *The Properties of Water in Foods ISOPOW 6*. Blackie Academic & Professional, London, UK.

บทที่ 4

จุลินทรีย์ในอาหารชนิดต่างๆ

4.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อภายในของสัตว์ที่แข็งแรงปกติจะปราศจากจุลินทรีย์ก่อนที่สัตว์จะถูกฆ่า แต่หลังจากการฆ่าสัตว์ ตัดแต่งซากและการกระทำอื่นๆ จนกระทั่งนำเนื้อสัตว์มาขายปลีกจะพบจุลินทรีย์หลายชนิดปนเปื้อนจำนวนมาก แหล่งที่มาของการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์มีดังนี้¹

ก) มีดที่ใช้แทงคอ: หลังจากการทำให้สลบและการแขวนซากวัวหนุ่ม (steers) จะใช้มีดแทงคอเอาเลือดออก ถ้าหากมีดที่ใช้ไม่ปลอดเชื้อ จุลินทรีย์จะปนเปื้อนเข้าสู่กระแสเลือดทำให้แพร่กระจายไปทั่วซากสัตว์

ข) หนังสัตว์: ผิวหนังของสัตว์ที่ใช้กินเนื้อทุกชนิดจะเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ต่างๆ จำนวนมาก นำไปสู่การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์จากหนังสัตว์เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนสู่ซากสัตว์ผ่านมีดที่ใช้ จุลินทรีย์อาจสะสมอยู่บนซากที่เอาขนสัตว์ออกแล้วหรือผิวของเนื้อสดที่เพิ่งตัดแต่ง จุลินทรีย์จากหนังสัตว์บางกลุ่มอาจแพร่กระจายโดยลอยไปในอากาศและตกลงบนซากที่ตัดแต่งแล้ว ตัวอย่างเช่นที่ผิวหนังมีจำนวนจุลินทรีย์สูงถึง 10^6 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร

ค) ทางเดินอาหารของสัตว์: การเจาะแทงสัตว์จะทำให้องค์ประกอบในลำไส้สัตว์ที่มีจุลินทรีย์จำนวนมากเกิดการปนเปื้อนบริเวณที่ผิวซากในขั้นตอนการตัดแต่งซากโดยเฉพาะบริเวณกระเพาะหรือลำไส้ของสัตว์ซึ่งปกติมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียประมาณ 10^{10} เซลล์ต่อกรัม แบคทีเรียก่อโรคจะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับมูลสัตว์และปนเปื้อนอยู่ในคอก ซึ่งอาจจะถูกสัตว์นำเข้าไปทางปากและเกิดการติดเชื้ออีกครั้งหนึ่งได้เป็นเหตุให้มีเชื้อประจำถิ่นอาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ตั้งแต่วัยอ่อน

ง) มือของผู้ปฏิบัติงาน: มือของผู้ที่ทำการฆ่าสัตว์ ตัดแต่งซากและปฏิบัติงานอื่นๆ เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ก่อโรคจากมนุษย์ที่จะปนเปื้อนสู่เนื้อสัตว์ที่เพิ่งจะผ่านการฆ่าใหม่ ๆ การสวมถุงมือจะช่วยป้องกันการปนเปื้อนเชื้อที่มาจากบาดแผลบนมือของคนงานแต่ละคนได้ และในพื้นที่ที่มีการตัดแต่งเนื้อถ้าไม่สะอาดอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนข้าม (cross - contamination) ของจุลินทรีย์บริเวณนั้นไปยังเนื้อสัตว์ที่ตัดแต่งแล้ว โดยสามารถปนเปื้อนจากซากหนึ่งไปยังอีกซากหนึ่งได้

จ) ภาชนะที่ใช้บรรจุเนื้อสด: ชิ้นเนื้อที่ถูกตัดออกและวางลงในภาชนะที่ไม่สะอาดอาจถูกปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในภาชนะซึ่งเป็นแหล่งของการปนเปื้อนที่สำคัญในเนื้อสด

ฉ) สภาพแวดล้อมในการขนส่งและเก็บรักษา: อากาศที่หมุนเวียนเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์เกิดการปนเปื้อนที่บริเวณผิวของเนื้อสัตว์ที่ถูกฆ่าทุกชนิด

ข) ต่อม้ำเหลือง (lymph nodes): ในกรณีของเนื้อแดง ต่อม้ำเหลืองซึ่งมักจะฝังอยู่ในไขมันบ่อยครั้งจะมีจุลินทรีย์อยู่ภายในเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะแบคทีเรีย ถ้าปะปนอยู่ในเนื้อบดก็คาดได้ว่าเนื้อบดนั้นอาจมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูง

การปนเปื้อนของเนื้อสัตว์เกิดขึ้นในระหว่างการฆ่าสัตว์และการตัดแต่งเนื้อสัตว์ ซึ่งจุลินทรีย์ภายในร่างกายของสัตว์ ผิวหนังสัตว์ อุจจาระ จุลินทรีย์ที่ปากและสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการจับสัมผัสซาก อาจเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามมายังเนื้อสัตว์ที่ปราศจากเชื้อในระหว่างการตัดแต่งซาก หนังสัตว์ประเภทโค กระบือ และแกะ เป็นแหล่งของการปนเปื้อนหลักๆ ซึ่งปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์จากดิน อุจจาระ น้ำ และจุลินทรีย์ที่ปากในระหว่างการเลี้ยงดูสัตว์ ซึ่งการทำความสะอาดหนังสัตว์และขนสัตว์ก่อนการตัดแต่งซากอาจช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ แต่จากหลายการศึกษาไม่สามารถยืนยันได้ว่าวิธีนี้สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ได้จริง แต่ในทางตรงกันข้ามการใช้ความร้อนกับซากหมูสามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบได้ โดยที่แบคทีเรียแกรมบวกยังมีชีวิตรอดอยู่ได้ ภายหลังการกำจัดขนออกจากซากหมูจะเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียแกรมลบอีกซึ่งปนเปื้อนมาจากเศษซากและน้ำที่ถูกหมูนเวียนมาใช้ อีก นอกจากจะพบเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียบนหนังสัตว์ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Acinetobacter* และ *Moraxella* ยังพบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* และ *Aeromonas hydrophila* อีกด้วย²

4.1.1 การเน่าเสียของเนื้อสดโดยจุลินทรีย์

การศึกษาการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่ทำในเนื้อวัว ส่วนการเน่าเสียของเนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อลูกวัวอาจเกิดขึ้นในทำนองเดียวกัน ในบรรดาอาหารทั้งหมดเนื้อสัตว์เป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่ายที่สุดเนื่องจากเหตุผลบางประการดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งกล่าวถึงองค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลังฆ่า เนื้อสัตว์อุดมไปด้วยสารอาหารทั้งหมดที่แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราต้องการสำหรับการเจริญเติบโตโดยมีในปริมาณที่เพียงพอในเนื้อสดในรูปที่จะเอาไปใช้ได้ องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ ผันแปรดังตารางที่ 4.2

แบคทีเรียสกุลที่พบบ่อยในเนื้อสดตามตารางที่ 4.3 เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่เน่าเสียจะพบแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราเพียงบางสกุลเท่านั้น โดยส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรีย 1 สกุลหรือมากกว่า 1 สกุล การมีจุลินทรีย์หลายชนิดบนเนื้อที่ยังไม่เน่าเสียยังไม่อาจทราบได้ว่าเป็นจุลินทรีย์จากแหล่งใดเช่นเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในผลิตภัณฑ์หรือเป็นจุลินทรีย์ที่มาจากการปนเปื้อนในระหว่างการแปรรูป การปฏิบัติงาน การบรรจุและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์^{1, 2}

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่โตเต็มวัยหลังระยะเกร็งตัว ก่อนที่เนื้อสัตว์จะเสื่อมสภาพ

องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อสัตว์	ปริมาณ (% w/w)
น้ำ	75.5
โปรตีน	18.0
โปรตีนไมโอไฟบริลลา (myofibrillar protein)	
ไมโอซิน โทรโพนิน (tropomyosin) และ x protein	7.5
แอกติน (actin)	2.5
โปรตีนซาโคพลาสมิก (sarcoplasmic protein)	
ไมโอเจน (myogen) โกลบูลิน (globulins)	5.6
ไมโอโกลบิน (myoglobin)	0.36
ฮีโมโกลบิน (hemoglobin)	0.04
Mitochondrial – cytochrome C	0.002
ซาโคพลาสมิกเรติคิวลัม (sarcoplasmic reticulum) คอลลาเจน อีลาสติน (elastin)	2.0
เรติคิวติน (reticulin) เอนไซม์ที่ไม่ละลาย เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue)	
ไขมัน	3.0
สารประกอบที่ละลายได้ซึ่งไม่ใช่โปรตีน	3.5
สารประกอบไนโตรเจน	
ครีเอติน (creatin)	0.55
อินโนซีนมอโนฟอสเฟต (inosine monophosphate)	0.30
ไดฟอสโฟไพรูวินนิวคลีโอไทด์และไตรฟอสโฟไพรูวินนิวคลีโอไทด์	0.07
กวอดอะมีน	0.35
คาร์โนซีน (carnosine) และแอนซีรีน (anserine)	0.30
คาร์โบไฮเดรต	
กรดแลคติก	0.90
กลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose-6-phosphate)	0.17
ไกลโคเจน	0.10
กลูโคส	0.01
สารอนินทรีย์	
ฟอสฟอรัสที่ละลายได้ทั้งหมด	0.20
โพแทสเซียม	0.35
โซเดียม	0.05
แมกนีเซียม	0.02
แคลเซียม	0.007
สังกะสี	0.005
ไกลโคไลติกอินเทอร์มีเดียตเล็กน้อย (traces of glycolytic intermediates)	
โลหะ วิตามินและอื่นๆ	ประมาณ 0.10

ที่มา : Jay และคณะ¹

ตารางที่ 4.2 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ

ชนิดของเนื้อ	ปริมาณ (ร้อยละ)				
	น้ำ	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
เนื้อวัว (แฮมเบอร์เกอร์)	55.0	0	16.0	28.0	0.8
เนื้อวัว (เนื้อส่วนสะโพก)	69.0	0	19.5	11.0	1.0
ไส้กรอกโบโลญญา (Bologna)	62.4	3.6	14.8	15.9	3.3
เนื้อไก่	71.2	0	20.2	7.2	1.1
ไส้กรอกแฟรงเฟิร์ต	60.0	2.7	14.2	20.5	2.7
เนื้อแกะ	66.3	0	17.1	14.8	0.9
ตับวัว	69.7	6.0	19.7	3.2	1.4
เนื้อหมู	42.0	0	11.9	45.0	0.6
เนื้อไก่งวง	58.3	0	20.1	20.2	1.0

ที่มา : Jay และคณะ¹

การพบแบคทีเรียบางชนิดในเนื้อสัตว์ที่เน่าเสียเกี่ยวข้องกับปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยเฉพาะในเนื้อสดเช่น เนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อแกะ เนื้อไก่ และอาหารทะเลสดและเนื้อที่ผ่านกระบวนการแปรรูป ซึ่งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วงที่จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเจริญเติบโต นอกจากนี้สารอาหารและความชื้นก็เพียงพอสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ถึงแม้ว่าค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชันรีดักชัน (O/R potential) ของเนื้อจะต่ำ แต่สภาวะความต่างศักย์ที่ผิวของเนื้อก็มีค่าสูงพอที่จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง (strict aerobes) และจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobes) รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง (strict anaerobes) จะสามารถหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญได้ ด้านปัจจัยภายนอกเช่นอุณหภูมิในการเก็บรักษามีความสำคัญในการควบคุมชนิดของจุลินทรีย์ที่จะเจริญได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์เนื้อเหล่านี้ปกติจะเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นการศึกษาทั้งหมดเกี่ยวกับการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ สัตว์ปีก และอาหารทะเลที่ได้ทำกันในช่วง 50 ปีที่ผ่านมาจึงทำในผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิต่ำทั้งสิ้น¹

การเจริญของจุลินทรีย์ในเนื้อเกิดขึ้นในน้ำที่อยู่ในเนื้อเยื่อ เนื่องจากในน้ำนี้มีสารอาหารที่มีคุณค่าซึ่งจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่เป็นกลูโคสและไกลโคเจน หลังจากที่ถูกกลูโคสถูกใช้หมดไป จุลินทรีย์จะเริ่มใช้กรดอะมิโนเพื่อสร้างพลังงานและเกิดสารประกอบที่ระเหยได้ ซึ่งทำให้เกิดกลิ่นเน่าเสีย²

ตารางที่ 4.3 ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบบ่อยในเนื้อสัตว์

ชนิดของจุลินทรีย์	การติดสีแกรม	เนื้อสด	ชนิดของจุลินทรีย์	การติดสีแกรม	เนื้อสด
แบคทีเรีย			<i>Pseudomonas</i>	-	XX
<i>Achromobacter</i>	-	X	<i>Psychrobacter</i>	-	XX
<i>Acinetobacter</i>	-	XX	<i>Salmonella</i>	-	X
<i>Aeromonas</i>	-	XX	<i>Serratia</i>	-	X
<i>Alcaligenes</i>	-	X	<i>Shewanella</i>	-	X
<i>Alteromonas</i>	-	X	<i>Staphylococcus</i>	+	X
<i>Bacillus</i>	+	X	<i>Weissella</i>	+	X
<i>Brochothrix</i>	+	X	<i>Yersinia</i>	-	X
<i>Campylobacter</i>	-	X	ยีสต์		
<i>Carnobacterium</i>	+	X	<i>Candida</i>		XX
<i>Citrobacter</i>	-	X	<i>Cryptococcus</i>		X
<i>Clostridium</i>	+	X	<i>Debaryomyces</i>		X
<i>Corynebacterium</i>	+	X	<i>Hansenula</i>		X
<i>Enterobacter</i>	-	X	<i>Pichia</i>		X
<i>Enterococcus</i>	+	XX	<i>Rhodotorula</i>		X
<i>Escherichia</i>	-	X	<i>Torulopsis</i>		XX
<i>Flavobacterium</i>	-	X	<i>Trichosporon</i>		X
<i>Hafnia</i>	-	X	เชื้อรา		
<i>Klebsiella</i>	-	X	<i>Acremonium</i>		X
<i>Kluyvera</i>	-	X	<i>Alternaria</i>		X
<i>Kocuria</i>	+	X	<i>Aspergillus</i>		X
<i>Kurthia</i>	+	X	<i>Aureobasidium</i>		X
<i>Lactobacillus</i>	+	X	<i>Chrysosporium</i>		X
<i>Lactococcus</i>	+	X	<i>Cladosporium</i>		XX
<i>Leuconostoc</i>	+	X	<i>Fusarium</i>		X
<i>Listeria</i>	+	X	<i>Geotrichum</i>		XX
<i>Microbacterium</i>	+	X	<i>Monascus</i>		X
<i>Micrococcus</i>	+	X	<i>Monilia</i>		X
<i>Moraxella</i>	-	XX	<i>Mucor</i>		XX
<i>Paenibacillus</i>	+	X	<i>Neurospora</i>		X
<i>Pentoea</i>	-	X	<i>Penicillium</i>		X
<i>Pediococcus</i>	+	X	<i>Rhizopus</i>		XX
<i>Proteus</i>	-	X	<i>Sporotrichum</i>		XX
<i>Providencia</i>	-	X	<i>Thamnidium</i>		XX

X หมายถึงแบคทีเรียที่เคยพบในเนื้อสด

XX หมายถึงแบคทีเรียที่แยกได้บ่อยที่สุดในเนื้อสด

ที่มา: Marshall และ Bal' A²

แบคทีเรียที่สร้างแอมโมเนียในระหว่างการย่อยสลายกรดอะมิโน ได้แก่ *Pseudomonas* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ในผลิตภัณฑ์เนื้อที่เน่าเสียมีพีเอชสูงขึ้น ส่วนแบคทีเรียแกรมลบจะพบได้ในการเน่าเสียในสภาพมีอากาศและปกติจะทำให้เกิดกลิ่นเน่าบูดและกลิ่นกำมะถัน แบคทีเรียชนิดอื่นนอกจาก *Pseudomonas* จะสร้างสารประกอบที่ระเหยได้และมีกลิ่นเหม็น ได้แก่ *Shewanella (Alteromonas) putrefaciens*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Hafnia* และ *Serratia* กลิ่นเน่าเสียที่พบในเนื้อสัตว์จากการสลายของกรดอะมิโนสามารถทำให้เกิดซ้ำลงได้โดยการเติมกลูโคสลงไป เนื้อ กลูโคสจะช่วยชะลอการใช้กรดอะมิโนของแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสีย ทำให้เนื้อสัตว์เกิดการเปลี่ยนแปลงซ้ำลงในด้านคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของการเน่าเสีย แบคทีเรียแกรมลบที่ต้องการอากาศที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4°C ได้แก่ *Pseudomonas* เช่น *P. fragi*, *P. fluorescens* และ *P. lundensis* จะพบในเนื้อวัว เนื้อแกะและเนื้อหมู นอกจากนี้อาจจะพบแบคทีเรีย *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Moraxella* และจุลินทรีย์ในกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *Hafnia alvei*, *Serratia liquefaciens* และ *Enterobacter agglomerans* แต่พบในจำนวนที่ต่ำกว่า *Pseudomonas* ²

จากการศึกษาการเน่าเสียของเนื้อสดโดยเฉพาะเนื้อวัวได้เคยมีรายงานว่าพบเชื้อราหลายชนิด *Thamnidium*, *Mucor* และ *Rhizopus* ทำให้เกิดตำหนิที่เรียกว่า “whiskers” บนเนื้อวัว *Cladosporium* เป็นสาเหตุของการเกิดจุดสีดำ (black spot) ส่วน *Penicillium* ทำให้รอยสีเขียว *Sporotrichum* และ *Chrysosporium* ทำให้เกิดจุดสีขาว (white spot) บนเนื้อ โดยทั่วไปเชื้อราจะไม่เจริญเติบโตบนเนื้อถ้าเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5°C แต่อาจพบยีสต์ในบรรดาเยีสต์สกุลที่แยกได้จากเนื้อวัวแช่เย็นที่เน่าเสียพบยีสต์สกุล *Candida* และ *Rhodotorula* มากโดยเฉพาะ *C. lipolytica* และ *C. zeylanoides* ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดที่พบบ่อยมากที่สุดในเนื้อวัวบดที่เน่าเสีย¹

การเน่าเสียของเนื้อวัวบดหรือเนื้อบดที่ใช้ทำแฮมเบอร์เกอร์ต่างจากการเน่าเสียของซากเนื้อวัวสดคือ การเน่าเสียของเนื้อวัวบดหรือเนื้อแฮมเบอร์เกอร์เกิดจากแบคทีเรียทั้งหมดโดยพบแบคทีเรียสกุลที่สำคัญได้แก่ *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* และ *Aeromonas* แบคทีเรียสกุลที่เป็นสาเหตุหลักของการเน่าเสียคือ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* – *Moraxella* spp. ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นมีบทบาทน้อยกว่า ในช่วงตลอดระยะเวลา 70 ปีที่ผ่านมาพบว่า *Pseudomonas* spp. เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสด เนื้อสัตว์ปีก และอาหารทะเลแช่เย็น แต่ยังพบแบคทีเรียอย่างน้อย 40 ชนิดที่ถูกย้ายไปอยู่ในสกุลใหม่มากกว่า 10 สกุล จากการจัดจำแนกเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้จัดให้แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* อยู่ใน gamma-subclass ของ *Proteobacteria* ซึ่งรวมถึง *P. fluorescence*, *P. fragi*, *P. aeruginosa* และ *Pseudomonas* ชนิดอื่นด้วย สำหรับ *Pseudomonas* บางชนิดซึ่งเดิมอยู่ในสกุลนี้ได้ถูกย้ายไปอยู่ใน alpha-subclass ของ *Proteobacteria* (*Brevundimonas*, *Devosia*, และ *Sphingomonas*)

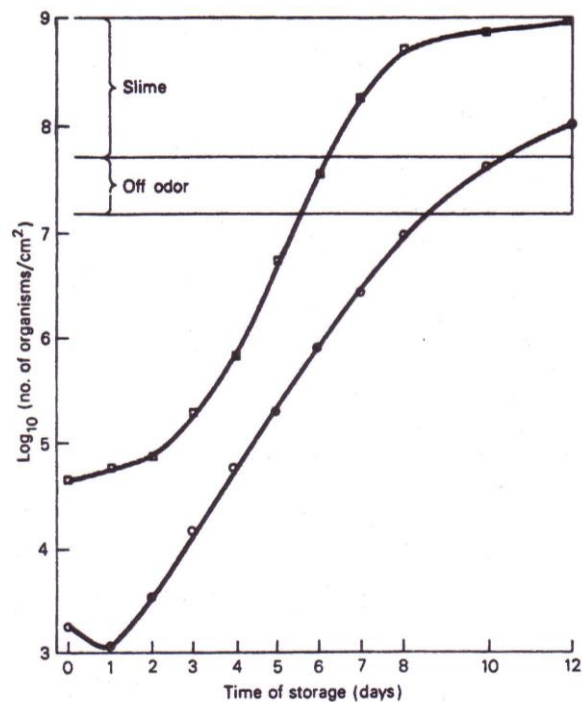
ขณะที่ (*Acidovorax*, *Comamonas* และ *Telluria*) ปัจจุบันจัดอยู่ใน beta – subclass และยังคงมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่เดิมจัดให้อยู่ในสกุล *Pseudomonas* ซึ่งยังคงต้องวิเคราะห์กันต่อไปว่าแท้จริงแล้วเป็นแบคทีเรียสกุลใด อย่างไรก็ตามสำหรับ *Pseudomonas* ทุกชนิดกล่าวในที่นี้และในบทต่อไปได้จำแนกตาม Bergey's Manual ซึ่งตีพิมพ์ในปี ค. ศ. 1986¹

Davison และคณะ³ ได้ศึกษาแบคทีเรียแกรมลบจากเนื้อวัว เนื้อแกะ เนื้อหมูและไส้กรอกสดพบว่าแบคทีเรียรูปท่อนที่มีแฟลกเจลลาอยู่ที่ขั้วเซลล์ทั้งหมด 231 ไอโซเลตเป็น *Pseudomonas* ส่วนแบคทีเรียในจำนวนอีก 110 ไอโซเลตซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile organisms) นั้นพบว่า 61 ไอโซเลตเป็น *Moraxella* และอีก 49 ไอโซเลตเป็น *Acinetobacter*

ในเนื้อวัวส่วนของสะโพก (round) เป็นส่วนที่เน่าเสียลึกลงไป ปกติมักจะเสียถึงจุดที่ใกล้กับกระดูกโดยเฉพาะกระดูกสะโพก การเน่าเสียชนิดนี้เรียกว่า “bone taint” หรือ “sours” เชื่อที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเน่าเสียประเภทนี้ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Clostridium* และ *Enterococcus*¹

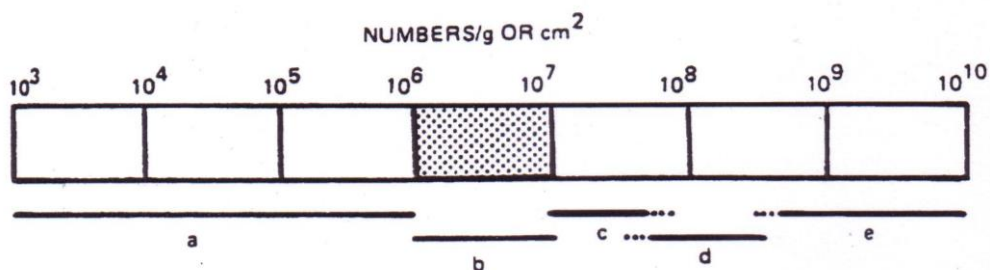
นอกจากนี้คุณสมบัติของการบ่มเป็นเหตุผลแรกที่ทำให้พบแบคทีเรียเพียงไม่กี่สกุลในเนื้อที่เน่าเสียซึ่งต่างกับแบคทีเรียที่พบในเนื้อสด จากการศึกษาหนึ่งได้พบว่า จากจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด 9 สกุลที่พบในเนื้อวัวสดพบแบคทีเรียในจำนวนนี้เพียง 4 สกุลหลังจากที่เนื้อเกิดการเน่าเสียอย่างแท้จริงที่อุณหภูมิต่ำ และมีผู้รายงานว่ามากกว่าร้อยละ 80 ของแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในเนื้อสดบดอาจเป็น chromogenic bacteria เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ และหลังจากการเน่าเสียจะพบเพียงแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนสั้น ๆ ซึ่งเป็น nonchromogenic เท่านั้น¹

ชิ้นส่วนของเนื้อวัวที่ได้จากการตัดแต่งซากซึ่งนำมาทำเนื้อสติกหรือเนื้อย่างมีแนวโน้มที่จะเน่าเสียตรงบริเวณผิวหนัง จุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียจะเป็นแบคทีเรียหรือเชื้อราทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความชื้นเนื้อสดที่ผ่านการตัดแต่งใหม่ ๆ เมื่อนำมาเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีความชื้นสูงจะเกิดการเน่าเสียโดยแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา โดยจะเกิดเมือกขึ้นที่ผิวหนังของเนื้อและมักจะพบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสีย ส่วนในสภาพที่มีความต่างศักย์ของออกซิเดชัน – รีดักชันสูง (high O/R potential) มีความชื้นและในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Pseudomonas* ในบางครั้งก็อาจเป็นไปได้ที่จะเห็นความแตกต่างของโคโลนีแบคทีเรียบนผิวของเนื้อวัว โดยเฉพาะถ้าเกิดการปนเปื้อนในระดับต่ำ ชั้นของเมือกที่เหนียวบนผิวของเนื้อที่เน่าเสียเกิดจากการรวมตัวของโคโลนีของแบคทีเรียบนผิวของเนื้อ มีรายงานว่าจะได้กลิ่นของเนื้อเน่าเมื่อแบคทีเรียมีจำนวนอยู่ในช่วง log 7.0 ถึง log 7.5 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรตามด้วยการตรวจพบเมือกบนผิวของเนื้อเมื่อมีจำนวนแบคทีเรียอยู่ในช่วง log 7.5 ถึง log 8.0 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (รูปที่ 4.1 และ 4.2)¹



รูปที่ 4.1 การเกิดกลิ่นผิดปกติและเมือกบนเนื้อไก่ (□) และเนื้อวัว (○) ที่ตัดแต่งแล้วระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5°C

ที่มา : Jay และคณะ¹



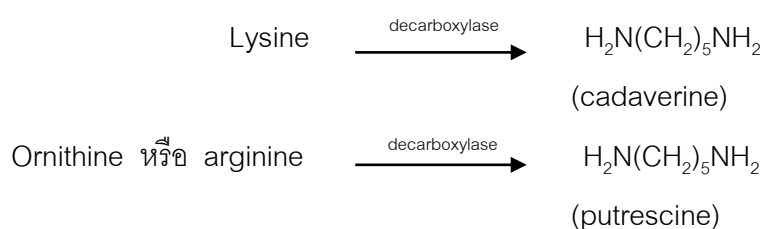
รูปที่ 4.2 ความสำคัญของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์อาหารในฐานะของตัวบ่งชี้ของการเน่าเสีย (a) การเน่าเสียโดยจุลินทรีย์ยังไม่ปรากฏยกเว้นในน้ำมันดิบซึ่งอาจเกิดการเปรี้ยวได้ถ้ามีจุลินทรีย์อยู่ในช่วง $10^5 - 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (b) ผลิตภัณฑ์บางชนิดเริ่มจะเน่าเสีย เนื้อที่บรรจุในสภาพสุญญากาศมักจะมีกลิ่นไม่ดีและอาจเน่าเสีย (c) กลิ่นผิดปกติมักเกิดขึ้นกับเนื้อและผักที่การเก็บรักษาในสภาพที่มีอากาศ (d) ผลิตภัณฑ์อาหารเกือบทั้งหมดเกิดการเน่าเสียอย่างชัดเจนโดยเกิดเมือกบ่อบนเนื้อที่เก็บไว้ในสภาพที่มีอากาศ (e) เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผลิตภัณฑ์อย่างแน่นอนในขั้นนี้

ที่มา : Jay และคณะ¹

เชื่อว่ามีความโน้มเอียงที่จะเจริญเด่นในการเน่าเสียของชิ้นเนื้อสัตว์เมื่อผิวของเนื้อแห้งเกินกว่าที่แบคทีเรียจะเจริญได้หรือเมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะเช่น เตตราไซคลิน (tetracyclines) ในเนื้อสัตว์ เชื้อราแทบจะไม่เจริญขึ้นบนเนื้อสัตว์ที่มีแบคทีเรียอยู่อย่างอิสระ ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียสามารถเจริญได้เร็วกว่าเชื้อราและใช้ออกซิเจนที่ผิวของเนื้อซึ่งเชื้อราต้องการใช้ในการทำกิจกรรม เชื้อราที่เจริญบนเนื้อสัตว์แตกต่างกับกรณีที่เจริญบนชิ้นเนื้อสัตว์ โดยการเจริญของเชื้อราที่เห็นได้จะไม่เกิดขึ้นจริงบนเนื้อสัตว์บด ยกเว้นเมื่อมีการใช้สารต้านการเจริญของแบคทีเรียหรือเมื่อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนตามปกติถูกทำให้ลดจำนวนลงโดยการแช่แข็งเป็นเวลานาน ในการเน่าเสียของเนื้อสัตว์บดเริ่มแรก จะเกิดกลิ่นที่ผิดปกติ (off-odors) ตามด้วยการเกิดลักษณะเหนียวเล็กน้อยที่ผิวซึ่งชี้ให้เห็นถึงการมีเมือกที่เกิดจากแบคทีเรีย (bacterial slime) โดยชั้นเมือกที่เกิดขึ้นบนเนื้อสด เนื้อไก่ และอาหารทะเลขณะเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำในตู้เย็นเรียกว่า ไบโอฟิล์ม (biofilm) สำหรับบทบาทที่เด่นชัดของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์ขณะนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างถูกต้องสมบูรณ์ แต่ก็มีคำถามว่าในการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ โดยกลไกการเน่าเสียของเนื้อสามารถตรวจหาได้โดยใช้หลายเทคนิคด้วยกันดังตารางที่ 4.4¹

4.1.1.1 กลไกการเน่าเสียของเนื้อโดยจุลินทรีย์

วิธีที่เชื่อถือได้ในการตรวจสอบการเน่าเสียควรจะขึ้นอยู่กับสาเหตุและกลไกการเน่าเสีย จากวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีในตารางที่ 4.4 ได้บอกเป็นนัยว่าเมื่อเนื้อสัตว์เกิดการเน่าเสียจะมีการใช้ซัลเฟอร์บางชนิดให้หมดไปหรือเกิดการสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียนั้น เป็นที่ทราบกันดีว่าการเสียของเนื้อขณะเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำจะเกิดร่วมกับการสร้างสารประกอบที่ให้กลิ่นผิดปกติเช่น แอมโมเนีย อินโดล ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และเอมีน ข้อเสียของการใช้วิธีการทางเคมีคือจุลินทรีย์ไม่ทั้งหมดที่มีความสามารถเท่ากันในการสร้างผลิตภัณฑ์ บางวิธีการมีความเชื่อที่ผิดว่าการเสียของเนื้อสัตว์ที่อุณหภูมิต่ำเกิดขึ้นร่วมกับการย่อยสลายโปรตีน ขณะที่วิธีทางกายภาพและวิธีทางแบคทีเรียวิทยาทั้งหมดมีความโน้มเอียงที่จะแสดงให้เห็นถึงสิ่งที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจนเช่นเนื้อที่เน่าเสียจะมีการเปลี่ยนแปลงของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส (organoleptic characteristics) เช่น กลิ่น เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และรสชาติ แต่วิธีการเหล่านี้ก็ไม่สามารถที่จะใช้ทำนายการเน่าเสียหรืออายุการเก็บรักษาเนื้อสดซึ่งการทดสอบความสดของเนื้อควรจะทำได้ในทางอุดมคติได้ ในบรรดาผลพลอยได้จากปฏิกิริยาเมแทบอลิกของการเน่าเสียของเนื้อ ได้มีผู้ทำการศึกษาสารไดเอมีน (diamines) ได้แก่ คาดาเวอรีน (cadaverine) และพิวทรีซีน (putrescine) ซึ่งใช้เป็นสารบ่งชี้การเน่าเสียของเนื้อ การผลิตสารไดเอมีนเกิดขึ้นได้ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



ตารางที่ 4.4 วิธีการตรวจสอบการเน่าเสียโดยจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์ เนื้อไก่ และอาหารทะเล

วิธีทางเคมี

ก. การวัดการผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	ฎ. การตรวจหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด
ข. การวัดเมอแคปเทน (mercaptans) ที่สร้างขึ้น	ฐ. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส
ค. การตรวจหาไนโตรเจนที่ไม่จับก้อน (noncoagulable nitrogen)	ฑ. การตรวจหาปริมาณของครีเอตินีน (creatinine content)
ง. การตรวจหาไดเมทิลเอมีน (dimethylamines) และไตรเมทิลเอมีน (trimethylamines)	ฒ. การตรวจหาความสามารถในการรีดิวซ์ย้อม (dye – reducing capacity)
จ. การตรวจหาสารประกอบเชิงซ้อนของไทโรซีน (tyrosine complexes)	ณ. การวัดไฮโปแซนทีน (hypoxanthine)
ฉ. การตรวจหาอินโดล (indole) และสแคทอล (skatol)	ด. การวัด ATP จากจุลินทรีย์
ช. การตรวจหากรดอะมิโน	ต. การวัดเรดิโอเมตริก (radiometric measurement) ของคาร์บอนไดออกไซด์
ซ. การตรวจหาสารรีดิวซ์ที่ระเหยได้	ถ. การผลิตเอทานอล (ปลาที่เน่าเสีย)
ณ. การตรวจหาไนโตรเจนอะมิโน	ท. การวัดปริมาณกรดแลคติก
ญ. การตรวจหาค่า BOD (Biochemical Oxygen Demand)	ธ. การตรวจสอบการเปลี่ยนสี
ฎ. การตรวจหาไนเตรดรีดักชัน (nitrate reduction)	น. การวัด CO ₂ evolution rate

วิธีทางกายภาพ

ก. การวัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช	ฉ. การตรวจหาประจุที่พื้นผิว (surface charges)
ข. การวัดดัชนีหักเห (refractive index) ของของเหลวจากกล้ามเนื้อ (muscle juice)	ช. การตรวจหาคุณสมบัติโคริอสโคปิก (cryoscopic properties)
ค. การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของการนำไฟฟ้า (electrical conductivity)	ซ. การตรวจหาการเปลี่ยนแปลง Impedance
ง. การหาแรงตึงผิว (surface tension)	ณ. ไมโคร – แคลอรีเมทรี (micro-calorimetry)
จ. การตรวจหาการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet illumination) (fluorescence)	ญ. การวัดการไหลออกและไหลเข้าของโปรตอนสู่เซลล์แบคทีเรีย

วิธีทางแบคทีเรียวิทยา

ก. การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด	ง. การวิเคราะห์ตามข้อ ก. ข. และค. ที่กล่าวมา 1 หรือมากกว่า 1 การวิเคราะห์ที่อุณหภูมิต่างกัน
ข. การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศทั้งหมด	จ. การตรวจหาเอนโดทอกซินของแบคทีเรียแกรมลบ
ค. การตรวจหาอัตราส่วนของจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศทั้งหมด	

วิธีทางเคมีกายภาพ

ก. การตรวจหาปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย (extract – release volume)	ง. การวัดการบวมตัวของเนื้อ (meat swelling capacity)
ข. การตรวจหาความสามารถในการอุ้มน้ำ (water – holding capacity)	จ. การตรวจหากรดอินทรีย์ที่ระเหยได้กับปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายโปรตอนด้วยเครื่องแมสสเปกโตรโฟโตเมทรี (PTR – MS)

- ค. การวัดความหนืด (viscosity)

ที่มา: Jay และคณะ¹

ในการศึกษาการใช้สารคาตาวารีนและพิวทรินเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของเนื้อวัวที่บรรจุในสภาพสุญญากาศและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 1°C เป็นเวลานานถึง 8 สัปดาห์พบว่า ปริมาณคาตาวารีนได้เพิ่มขึ้นมากกว่าพิวทริน ซึ่งตรงกันข้ามกับที่พบในตัวอย่างที่เก็บไว้ในสภาวะที่ต้องการอากาศ เมื่อเก็บรักษาจนครบระยะเวลาพบว่าคาตาวารีนในเนื้อที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น 10 เท่าของปริมาณเริ่มต้นและเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดในเนื้อมีย่านเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณพิวทรินเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และยังได้มีการศึกษาไดเอมีนในเนื้อวัวสด เนื้อหมูสด และเนื้อแกะสดพบว่า มีปริมาณพิวทรินอยู่ในช่วง 0.4 - 2.3 พีพีเอ็ม และคาตาวารีนอยู่ในช่วง 0.1 - 1.3 พีพีเอ็ม พิวทรินเป็นสารไดเอมีนชนิดหลักที่ผลิตโดย pseudomonads ขณะที่สารคาตาวารีนผลิตโดย Enterobacteriaceae มากกว่า จากตารางที่ 4.5 พบว่าปริมาณพิวทรินเพิ่มขึ้นจาก 1.2 ถึง 26.1 พีพีเอ็มในตัวอย่างเนื้อมด (ตัวอย่าง E) ที่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติและเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ส่วนคาตาวารีนมีปริมาณน้อยกว่ามาก และในตัวอย่าง F พบว่าสารไดเอมีนทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าภายใต้สภาวะเดียวกัน มีรายงานว่าคาตาวารีนเป็นสารเอมีนเพียงชนิดเดียวที่สัมพันธ์กับแบคทีเรียโคลิฟอร์มในเนื้อมด โดยที่ปริมาณพิวทรินและคาตาวารีนในเนื้อวัวจะไม่เปลี่ยนแปลงจนกว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นมากกว่า 4×10^7 โคโลนีต่อกรัมซึ่งทำให้เกิดข้อสงสัยเกี่ยวกับการใช้สารทั้งสองนี้เป็นตัวบ่งชี้การเสียของเนื้อ สิ่งนี้เป็นปัญหาที่พบในสารเมแทบอลิต์ส่วนใหญ่เพราะการผลิตและความเข้มข้นของสารเมแทบอลิต์นี้มีแนวโน้มเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่จำเพาะเท่านั้น จากอีกการศึกษาหนึ่งพบว่า การเปลี่ยนแปลงฮิสตามีน (histamine) และไทรามีน (tyramine) ในเนื้อวัวและเนื้อหมูเกิดขึ้นน้อยมากเกินกว่าที่ใช้เป็นสารบ่งชี้การเสียของเนื้อได้แต่ปริมาณพิวทรินในเนื้อวัว และคาตาวารีนในเนื้อหมูได้มีการเปลี่ยนแปลงมากเมื่อเกิดการเน่าเสียขึ้น¹

เทคนิคการหาปริมาณของเหลวที่ปลดปล่อย (extract – release (ERV) technique) ใช้ครั้งแรกในปี ค. ศ. 1964 เป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการตรวจสอบการเน่าเสียของเนื้อรวมทั้งการทำนายอายุการเก็บของเนื้อที่เก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ เทคนิคนี้จะวัดปริมาณของของเหลวที่ปลดปล่อยออกมาจากเนื้อวัวบดที่ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันหลังจากกรองผ่านกระดาษกรองในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ในการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะพบว่าเนื้อวัวที่มีคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและ คุณภาพทางจุลินทรีย์ดีจะปล่อยของเหลวออกมาปริมาณมาก ขณะที่เนื้อวัวที่มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ต่ำกลับปล่อยของเหลวในปริมาณน้อยกว่าหรือไม่มีเลย (รูปที่ 4.3) ความสำคัญของวิธีการนี้ประการหนึ่งคือ ข้อมูลที่ได้มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเน่าเสียของเนื้อวัวที่อุณหภูมิต่ำ วิธี ERV บอกได้ถึงกลไกการเน่าเสียได้ 2 ประเด็น ประเด็นแรกคือ การเน่าเสียของเนื้อที่อุณหภูมิต่ำเกิดขึ้นโดยไม่มีการย่อยสลายโปรตีนหลักในเนื้ออย่างมีนัยสำคัญหรืออย่างน้อยก็เกิดการย่อยสลายแต่ไม่สมบูรณ์แม้ว่าความจริงข้อนี้ได้ถูกพิสูจน์โดยการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดในเนื้อสดและเนื้อที่เน่าเสียแล้ว

ตามแต่สิ่งนี้ได้บอกเป็นนัยถึงสิ่งที่เกิดขึ้น นั่นคือ เมื่อเนื้อกำลังเน่าเสียโดยจุลินทรีย์ ค่า ERV จะลดลง แทนที่จะเพิ่มสูงขึ้นซึ่งก็เป็นไปได้ในกรณีที่เกิดการไฮโดรไลซิสของโปรตีนอย่างสมบูรณ์ ประเด็นที่ 2 การเน่าเสียของเนื้อที่ทราบได้จากค่า ERV นั้นได้บอกถึงการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการจับกับน้ำ (hydration capacity) ของโปรตีนในเนื้อโดยกลไกบางอย่างที่ยังไม่ทราบแน่ชัด ถึงแม้ว่าสารประกอบเชิงซ้อนของกรดอะมิโนกับน้ำตาลที่ถูกสร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียจะมีบทบาทสำคัญก็ตาม แต่ในสภาพที่ไม่มีการย่อยสลายโปรตีนอย่างสมบูรณ์นั้นได้เกิดข้อสงสัยว่า จุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียได้รับสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญได้อย่างไร¹

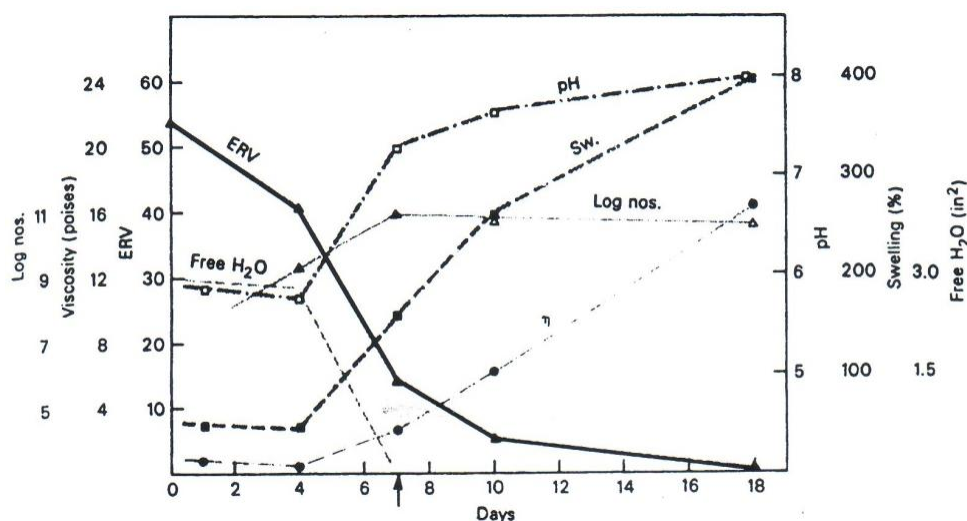
ตารางที่ 4.5 การเพิ่มของจำนวนจุลินทรีย์และความเข้มข้นของสารไดเอมีนในเนื้อวัวบดที่ปนเปื้อน โดยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5°C

ตัวอย่าง ^a	ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)	Putrescine ^b (µg/g)	Cadaverine ^c (µg/g)	<i>Enterobacteriaceae</i> (log ₁₀ /g)	จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (log ₁₀ /g)
E	0	1.2	0.1	3.81	6.29
	1	1.8	0.1	3.56	7.66
	2	4.2	0.5	4.57	8.49
	3	10.0	0.5	5.86	9.48
	4	26.1	0.6	7.54	9.97
F	0	2.3	1.3	6.18	7.49
	1	3.9	4.5	6.23	7.85
	2	12.4	17.9	6.69	8.73
	3	29.9	35.2	7.94	9.69
	4	59.2	40.8	9.00	9.91

^a ตัวอย่าง E และ F สุ่มมาจากตลาดขายปลีก 2 แห่ง

^b ค่าความเข้มข้นของไดเอมีนเป็นค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 2 ซ้ำ

ที่มา : Jay และคณะ¹



รูปที่ 4.3 การทดสอบการเน่าเสียของเนื้อวัวที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสจนกระทั่งเน่าเสีย จุดที่ถูกครีส์แสดงให้เห็นถึงวันแรกที่ตรวจพบกลิ่นผิดปกติ (ERV คือ extract release volume; Free H₂O คือ การวัดความสามารถในการอุ้มน้ำ; Sw คือ การบวมตัวของเนื้อ; η คือ ความหนืด และ log nos. คือ จำนวนแบคทีเรียที่ต้องการอากาศทั้งหมดต่อกรัม) ที่มา : Jay และคณะ¹

4.2 จุลินทรีย์ในสัตว์ปีกสด

สัตว์ปีกสดทั้งตัวมีแนวโน้มจะมีจุลินทรีย์ต่ำกว่าชิ้นสัตว์ปีกสดที่ผ่านการตัดแต่งแล้ว จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในสัตว์ปีกจะอยู่ที่ผิว มีผู้รายงานว่แบคทีเรียที่ผิวของไก่เพิ่มจำนวนเมื่อผ่านขั้นตอนต่างๆ ของการแปรรูป จากการศึกษาจุลินทรีย์ในไก่ทั้งตัวจากโรงงานแปรรูป 6 แห่งพบเชื้อจุลินทรีย์มีจำนวนเฉลี่ยที่ผิวของไก่เท่ากับ $\log_{10}$ 3.3 ต่อตารางเซนติเมตร หลังจากการตัดแต่งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น $\log_{10}$ 3.81 และเพิ่มเป็น $\log_{10}$ 4.08 หลังการบรรจุ สายพานที่ขนส่งไก่เหล่านี้พบว่า มีจำนวนจุลินทรีย์ $\log_{10}$ 4.76¹

4.2.1 การเสียของสัตว์ปีก

จากการศึกษาของนักวิจัยหลายท่านได้พบเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 27 สกุลในสัตว์ปีกสดได้แก่ เชื้อ *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Flavobacterium*, *Kocuria*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* และ *Vagococcus* เนื้อสัตว์ปีกจะเน่าเสียเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องระยะหนึ่ง เชื้อ *Pseudomonas* เป็น

จุลินทรีย์ที่พบบ่อยในการทำให้สัตว์ปีกเสีย ในการศึกษาจุลินทรีย์ 5,920 ไอโซเลตที่แยกได้จากซากไก่ พบว่าเป็น *Pseudomonas* ร้อยละ 30.5 เป็น *Acinetobacter* ร้อยละ 22.7 เป็น *Flavobacterium* ร้อยละ 13.9 เป็น *Corynebacterium* ร้อยละ 12.7 *Enterobacteriaceae* ยีสต์และอื่นๆ อีกเล็กน้อย มีรายงานว่าเมดิสที่ *Pseudomonas* สร้างขึ้นในเนื้อสัตว์ปีกลดลงจากร้อยละ 34 ในตอนเริ่มต้นของการเก็บรักษาเหลือร้อยละ 16 หลังจากเก็บรักษาระยะหนึ่งจนกระทั่งเกิดกลิ่นผิดปกติรุนแรง¹

เชื้อราถูกพิจารณาว่ามีความสำคัญน้อยในการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ปีก ยกเว้นเมื่อมีการใช้ยาปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อราเป็นจุลินทรีย์หลักในการทำให้เนื้อสัตว์ปีกเน่าเสีย ยีสต์สกุลที่สำคัญที่พบว่าเจริญบนเนื้อสัตว์ปีกได้แก่ *Candida*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces* และ *Yarrowia* ลักษณะการเน่าเสียของสัตว์ปีกคือ การเกิดเมือกที่ผิวนอกของชิ้นสัตว์ปีกหรือซากและการเกิดกลิ่นเปรี้ยวในช่องท้อง (visceral cavity) ซึ่งเป็นลักษณะการเสียที่เรียกว่า visceral taint เมื่อเนื้อสัตว์ปีกเกิดการเน่าเสีย โดยทั่วไปจะเกิดกลิ่นผิดปกติก่อนที่จะเกิดเมือก โดยจะตรวจพบกลิ่นผิดปกติเมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์ประมาณ 1.6×10^7 ถึง 10^8 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร และมักจะเกิดเมือกภายในเวลาเพียงไม่นานหลังจากเกิดกลิ่นผิดปกติ ซึ่งตรวจพบจุลินทรีย์ในระยะนี้ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ต้องการอากาศ (total aerobic plate counts) บนผิวสัตว์ปีกที่เกิดเมือกค่อนข้างสูงคือสูงกว่า 3.2×10^9 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร เมื่อแบคทีเรียเริ่มเจริญที่ผิว เนื้อเยื่อส่วนใต้ผิวหนังปราศจากแบคทีเรียภายในช่วงระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นแบคทีเรียจะเข้าสู่เนื้อเยื่อที่ลึกลงไปทีละน้อย ทำให้มีการเพิ่มการไฮเดรชันของโปรตีนในกล้ามเนื้อ¹

เหตุผลหลักของการเน่าเสียของสัตว์ปีกซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ผิวก็คือ เนื่องจากเนื้อเยื่อภายในมักจะปราศจากเชื้อหรือมีจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อยซึ่งไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียจึงอยู่ที่ผิวและหนังสัตว์ซึ่งจะปนเปื้อนมากับน้ำระหว่างขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการแปรรูป การเก็บสัตว์ปีกไว้ในสภาพแวดล้อมที่มีความชื้นสูงทำให้แบคทีเรียที่ต้องการอากาศเช่น *Pseudomonas* เจริญที่ผิวได้ง่ายโดยจะสร้างโคโลนีเล็กๆ ซึ่งจะรวมเข้าด้วยกันในระยะเวลาต่อมา ทำให้เกิดลักษณะของเมือกหรือไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่ผิวของสัตว์ปีกที่เน่าเสีย มีรายงานว่าหนังของสัตว์ปีกส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียได้ดีกว่าเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เมื่อการเน่าเสียดำเนินต่อไปที่ผิวมักจะเรืองแสงอัลตราไวโอเล็ตได้เพราะมี *Pseudomonas* เจริญอยู่จำนวนมาก สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผิวสัตว์ปีกที่เกิดเมือกให้เจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสามารถเตรียมสไลด์โดยเขี่ยส่วนที่เป็นเมือกมาเกลี่ยเป็นฟิล์มบาง ๆ บนสไลด์แล้วนำมาย้อมแกรม อาจพบจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่มีลักษณะเหมือนกับจุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้อาจใช้เตตราโซเลียม (tetrazolium หรือ 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) ในการประเมินกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ผิวสัตว์ปีก เมื่อฉีดซากสัตว์ปีกที่ควักไส้ออกแล้วด้วยสารนี้จะปรากฏเป็นเมดิสแดงขึ้นในบริเวณที่มีกิจกรรมของจุลินทรีย์มาก บริเวณนี้โดยทั่วไปเป็นผิวของกล้ามเนื้อที่ถูกตัดหรือบริเวณที่ถูกทำลายเช่น feather follicles เมื่อเอาผิวหนัง

ออกจากซากไก่สด กล้ามเนื้อส่วนน่องของขามีแนวโน้มที่จะเสียเร็วกว่ากล้ามเนื้ออก เนื่องจากค่า pH ของเนื้อน่องไก่ปกติอยู่ในช่วง 6.3-6.6 ซึ่งสูงกว่าค่า pH ของเนื้ออกไก่ (5.7-5.9) *Pseudomonas* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ เมื่อเนื้อสัตว์ปีกเสียที่อุณหภูมิ 1°C จะพบแบคทีเรียชนิดนี้มาก แต่ถ้าการเน่าเสียเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 10°C และ 15°C จะพบ enteric bacteria และแบคทีเรียชนิดอื่นมาก¹

4.2.2 การลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนซากสัตว์ปีก

ก่อนทำการฆ่าสัตว์ ที่ผิวหนังของสัตว์จะปนเปื้อนไปด้วยฝุ่นผง สิ่งสกปรก และมูลสัตว์ ดังนั้น จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนบนซากสัตว์หลังฆ่ามาจากสิ่งต่างๆ เหล่านี้ ถึงแม้ว่าส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค แต่ก็อาจมีจุลินทรีย์ก่อโรคอยู่ด้วย วิธีการที่จะทำให้จำนวนและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนบนซากสัตว์และในผลิตภัณฑ์สุดท้ายลดลงมีดังนี้ คือ 1) การตัดแต่ง (trimming) เป็นการตัดเอาส่วนผิวหนังหรือเนื้อเยื่อภายนอกออก 2) การล้าง โดยการใช้ น้ำที่อุณหภูมิระดับต่างๆ กันและใช้ความดันร่วมด้วย 3) การใช้กรดอินทรีย์ การเติมกรดอินทรีย์ เช่น กรดแอซีติก กรดซีตริก หรือกรดแลคติกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2-5 ลงไปในน้ำที่ใช้ล้าง 4) การใช้สารเคมีชนิดต่างๆ โดยเติมสารเคมีเช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) หรือคลอแอสซีดีน (chlorhexidine) ลงในน้ำที่ใช้ล้าง 5) การใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 80°C หรือสูงกว่า เป็นเวลา 5-10 วินาทีในขั้นตอนสุดท้ายของการเตรียมซากและ 6) การใช้หลาย ๆ วิธีรวมกัน โดยใช้วิธีดังกล่าวข้างต้น 2 วิธี หรือมากกว่า 2 วิธีร่วมกัน¹

4.3 จุลินทรีย์ในไข่

ไข่ไก่เป็นตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่ถูกปกป้องโดยปัจจัยภายนอก โดยภายนอกแล้วไข่ไก่สดมีโครงสร้าง 3 ชั้น ซึ่งในแต่ละชั้นมีประสิทธิภาพในการชะลอการเข้าของจุลินทรีย์ โครงสร้างชั้นนอกสุดคือ เยื่อหุ้มเปลือกไข่ชั้นนอก (outer waxy shell membrane) ถัดไปเป็นเปลือกไข่ (egg shell) และเยื่อหุ้มเปลือกไข่ชั้นใน (inner shell membrane) ส่วนภายในมีไลโซไซม์ (lysozyme) ในไข่ขาว เอนไซม์ชนิดนี้ค่อนข้างมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ไข่ขาวมีอะวิดิน (avidin) ซึ่งจับกับไบโอติน (biotin) เป็นสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นจึงทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้วิตามินชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ไข่ขาวยังมีค่าพีเอชสูง (ประมาณ 9.3) และประกอบด้วยคอนอัลบูมิน (conalbumin) ซึ่งจับกับธาตุเหล็กเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ดังนั้นจุลินทรีย์จึงนำไปใช้ไม่ได้ แต่อีกนัยหนึ่งปริมาณสารอาหารในไข่แดงและค่าพีเอชของไข่สด (ประมาณ 6.8) ทำให้ไข่เป็นแหล่งสารอาหารที่ดีเลิศสำหรับจุลินทรีย์¹

โดยทั่วไปไข่ไก่สดที่เพิ่งออกมาจากตัวแม่ไก่จะปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นเวลาเพียงไม่นานหลังจากวางไข่ที่ผิวของเปลือกไข่จะปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์จำนวนมาก และอาจเข้าสู่เปลือกไข่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะเจริญเติบโตและเป็นสาเหตุการเสีย อัตราเร็วที่จุลินทรีย์จะเข้าสู่ไข่เกี่ยวข้อกับอุณหภูมิของการเก็บรักษา อายุของไข่ และปริมาณการปนเปื้อน มีผู้รายงานว่าการใช้ไดออกไซด์แก๊ส (cryogenic gas, CO₂) เพื่อทำให้ไข่เย็นอย่างรวดเร็ว มีผลทำให้จุลินทรีย์เข้าสู่ไข่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับทำให้เย็นแบบดั้งเดิมหลังจากเก็บไข่ไว้ 30 วันที่อุณหภูมิ 7°C นอกจากนี้มีผู้ศึกษาการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย *Salmonella Enteritidis* จากไข่ขาวสู่ไข่แดงในไข่จำนวน 860 ฟอง พบว่าตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ภายใน 1 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของการเก็บรักษาและระดับการปนเปื้อนที่อุณหภูมิ 30°C การเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นภายใน 1 วัน แต่ที่อุณหภูมิ 7°C การเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นภายใน 14 วัน ไข่ไก่ที่อายุ 1 วันมีความต้านทานต่อการบุกรุกของแบคทีเรียมากกว่าไข่ที่อายุ 4 สัปดาห์ อัตราการเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับระดับของการปนเปื้อนแบคทีเรียที่พบในไข่ไก่ แบคทีเรียที่พบได้แก่ เชื้อ *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* และ *Staphylococcus* ส่วนเชื้อราที่พบอยู่ในสกุล *Mucor*, *Penicillium*, *Hormodendron*, *Cladosporium* และอื่นๆ *Torula* เป็นยีสต์ชนิดเดียวที่เคยพบในไข่¹

การเสียของไข่โดยแบคทีเรีย ได้แก่ การเน่าโดยทำให้เกิดสีเขียว (green rots) มีสาเหตุมาจาก *Pseudomonas* spp. โดยเฉพาะ *P. fluorescens* การเน่าเสียแบบไม่ทำให้เกิดสี (colorless rots) มีสาเหตุมาจาก *Pseudomonas*, *Acinetobacter* และแบคทีเรียชนิดอื่น การเน่าเสียซึ่งทำให้เกิดสีดำ (black rots) มีสาเหตุมาจาก *Proteus*, *Pseudomonas* และ *Aeromonas* การเน่าเสียซึ่งทำให้เกิดสีชมพู (pink rots) โดย *Pseudomonas* การเน่าเสียซึ่งทำให้เกิดสีแดง (red rots) มีสาเหตุมาจาก *Serratia* spp. และการเน่าเสียที่มีลักษณะเรียกว่า custard rots มีสาเหตุมาจาก *Proteus vulgaris* และ *P. intermedium*¹

การเสียของไข่โดยเชื้อรา โดยทั่วไปคือจุดเล็กๆ (pinspot) ที่เป็นลักษณะปรากฏของการเจริญของไมซีเลียมภายในไข่ที่เห็นได้โดยการส่องไข่ เชื้อราที่พบบ่อยที่สุดที่เป็นสาเหตุของการเกิด pinspot และการเน่าเสียโดยเชื้อราในไข่ก็คือ *Penicillium* และ *Cladosporium* spp. นอกจากนี้แบคทีเรียยังเป็นสาเหตุของการเกิดลักษณะ mustiness ในไข่ โดยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย *Pseudomonas graveolens* และ *Proteus* spp. โดย *P. graveolens* พบบ่อยว่าทำให้เกิดการเสียลักษณะนี้¹

ในสภาพที่มีความชื้นสูงช่วยส่งเสริมการเข้าของจุลินทรีย์ในไข่ทั้งเปลือก ภายใต้สภาวะนี้เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญได้ดีบนผิวของไข่ จากนั้นจึงเข้าสู่ไข่ผ่านเปลือกไข่และเยื่อหุ้มชั้นใน ในไข่แดงพบแบคทีเรียมากกว่าในไข่ขาว เนื่องจากในไข่ขาวมีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าในระหว่างการเก็บรักษา ไข่ขาวชั้นจะสูญเสียน้ำให้กับไข่แดง ทำให้ไข่แดงแบนลงและมีการหดตัวของ

ไข่ขาวชั้น ปรากฏการณ์นี้เป็นไปได้ที่ไข่แดงจะมาสัมผัสโดยตรงกับเยื่อหุ้มชั้นในซึ่งเป็นที่ที่จะถูกปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์โดยตรง เมื่อจุลินทรีย์อยู่ในไข่แดงก็จะเจริญโดยใช้สารอาหารในไข่แดง สร้างสารประกอบที่เป็นผลพลอยได้ของปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมของโปรตีนและกรดอะมิโนเช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์และสารประกอบที่ให้กลิ่นไม่ดีชนิดอื่นๆ การเจริญของจุลินทรีย์ทำให้ไข่แดงมีความเหลวมากขึ้นและสลายไป เชื้อราปกติจะเพิ่มจำนวน ขึ้นแรกในถุงอากาศ (air sac) ซึ่งมีออกซิเจนช่วยส่งเสริมการเจริญ ในสภาพที่มีความชื้นต่ำไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ผิวไข่แต่ไข่จะสูญเสียน้ำด้วยอัตราที่เร็วกว่า ดังนั้นจึงมีคุณภาพที่ไม่ดี¹

ไข่ขาวของไข่ไก่มีโอโวทรานสเฟอริน (ovotransferrin) ซึ่งจะคีเลต (chelate) กับอิออนของโลหะโดยเฉพาะ Fe^{3+} และโอโวฟลาโวโปรตีน (ovoflavoprotein) ซึ่งจับกับไรโบฟลาวิน (riboflavin) ที่ระดับพีเอชปกติ (9.0-10.0) ของไข่ พบว่าไข่ขาวทำลายแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ที่อุณหภูมิ 30°C และ 39.5°C การเติมธาตุเหล็กช่วยลดคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของไข่ขาว¹

4.4 จุลินทรีย์ในอาหารทะเล

4.4.1 ปลา

ปลาน้ำเค็มและปลาน้ำจืดมีปริมาณโปรตีนสูงและมีสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 4.6) เนื้อปลาไม่มีคาร์โบไฮเดรต มีไขมันปริมาณผันแปรจากต่ำไปถึงสูงขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ปลาสดมีสารประกอบไนโตรเจนค่อนข้างสูง (ตารางที่ 4.7)

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเสียของปลาแสดงในตารางที่ 4.8 ปลาสดแช่น้ำแข็งเน่าเสียโดยจุลินทรีย์หลายชนิด ขณะที่ปลาแห้งและปลาเค็มมีแนวโน้มจะเน่าเสียโดยเชื้อรา แบคทีเรียที่ทำให้ปลาเน่าเสียเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์เช่น *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* และอื่นๆ แบคทีเรียหลายชนิดที่ทำให้ปลาเน่าเสียเจริญได้ดีระหว่างอุณหภูมิ 0°C ถึง 1°C

การเสียของปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม มักจะเกิดขึ้นในลักษณะที่คล้ายกันโดยจะเกิดการเน่าเสียได้ง่ายจากการกระทำของเอนไซม์ย่อยสลายตัวเอง (autolytic enzyme) การเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวและการเจริญของจุลินทรีย์ เหงือกปลาเป็นส่วนที่เน่าเสียได้ง่ายที่สุด สัญญาณเริ่มแรกของการเน่าเสียก็คือการเกิดกลิ่นผิดปกติ หลังจากจับปลาถ้าไม่เอาเครื่องในออกโดยทันที แบคทีเรียในลำไส้จะเคลื่อนที่ผ่านผนังลำไส้เข้าสู่ส่วนของช่องท้อง และจะเกิดไฮโดรลิซิสของโปรตีนโดยเอนไซม์โปรตีนเนส (proteinases) กรดไขมันไม่อิ่มตัวในไขมันปลาจะเกิดการออกซิเดชัน การเสียโดยจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ สิ่งแวดล้อม ชนิดของปลา วิธีการจับปลา การขนส่งและเก็บรักษา¹

ตารางที่ 4.6 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทะเลสด

ชนิดของปลา	ปริมาณ (ร้อยละ)				
	น้ำ	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
<u>Bony fish</u>					
Blue fish	74.6	0	20.5	4.0	1.2
Cod	82.6	0	16.5	0.4	1.2
Haddock	80.7	0	18.2	0.1	1.4
Halibut	75.4	0	18.6	5.2	1.0
Herring	67.2	0	18.3	12.5	2.7
Mackerel	68.1	0	18.7	12.0	1.2
Salmon	63.4	0	17.4	16.5	1.0
Swordfish	75.8	0	19.2	4.0	1.3
<u>Crustaceans</u>					
Crab	80.0	0.6	16.1	1.6	1.7
Lobster	79.2	0.5	16.2	1.9	2.2
<u>Mollusks</u>					
Clams	80.3	3.4	12.8	1.4	2.1
Oysters	80.5	5.6	9.8	2.1	2.0
Scallops	80.3	3.4	14.8	0.1	1.4

ที่มา: Jay และคณะ¹

ตารางที่ 4.7 ปริมาณไนโตรเจนในเนื้อปลาสดและสัตว์น้ำเปลือกแข็งสด

ชนิดของปลา	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีนไนโตรเจน (ร้อยละ)	อัตราส่วนของปริมาณ โปรตีนไนโตรเจนต่อ ไนโตรเจนทั้งหมด
Cod (Atlantic)	2.83	2.47	0.87
Herring (Atlantic)	2.90	2.53	0.87
Sardine	3.46	2.97	0.86
Haddock	2.85	2.48	0.87
Lobster	2.72	2.04	0.75

ที่มา: Jay และคณะ¹

ตารางที่ 4.8 แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราที่พบบ่อยในปลาและอาหารทะเลที่สดและเน่าเสีย

ชนิดของจุลินทรีย์	การติดสีแกรม	การพบเชื้อ	ชนิดของจุลินทรีย์	การพบเชื้อ
<u>แบคทีเรีย</u>			<u>ยีสต์</u>	
<i>Acinetobacter</i>	-	X	<i>Candida</i>	XX
<i>Aeromonas</i>	-	XX	<i>Cryptococcus</i>	XX
<i>Alcaligenes</i>	-	X	<i>Debaryomyces</i>	X
<i>Bacillus</i>	+	X	<i>Hansenula</i>	X
<i>Corynebacterium</i>	+	X	<i>Pichia</i>	X
<i>Enterobacter</i>	-	X	<i>Rhodotorula</i>	XX
<i>Enterococcus</i>	+	X	<i>Sporobolomyces</i>	X
<i>Escherichia</i>	-	X	<i>Trichosporon</i>	X
<i>Flavobacterium</i>	-	X		
<i>Lactobacillus</i>	+	X	<u>เชื้อรา</u>	
<i>Listeria</i>	+	X	<i>Aspergillus</i>	X
<i>Microbacterium</i>	+	X	<i>Aureobasidium</i>	XX
<i>Moraxella</i>	-	X	(<i>Pullularia</i>)	
<i>Photobacterium</i>	-	X	<i>Penicillium</i>	X
<i>Pseudomonas</i>	-	XX	<i>Scopulariopsis</i>	X
<i>Psychrobacter</i>	-	X		
<i>Shewanella</i>	-	XX		
<i>Vibrio</i>	-	XX		
<i>Weissella</i>	+	X		
<i>Pseudoalteromonas</i>	-	X		

ที่มา: Jay และคณะ¹

เนื้อปลามีปริมาณสารประกอบต่าง ๆ สูงเช่น เปปไทด์ โปรตีน และสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (เช่น กรดอะมิโนอิสระ ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (trimethylamine oxide, TMAO) และครีเอติน (creatine) ไม่มีคาร์โบไฮเดรต ปลามีค่า pH มากกว่า 6.0 แบคทีเรียชนิดที่สำคัญที่เป็นสาเหตุการเสียของปลาได้แก่ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนเช่น *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Flavobacterium* และแบคทีเรียรูปท่อนที่เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศได้แก่ *Shewanella*, *Alcaligenes*, *Vibrio* และแบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Pseudomonas* เจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิแช่เย็นและที่อุณหภูมิสูงเล็กน้อย *Pseudomonas* มี generation time ค่อนข้างสั้น จากการศึกษานึ่งได้แยกแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 159 ไอโซเลตจากปลาน้ำจืด ปลาที่นำมาศึกษามีจำนวนจุลินทรีย์

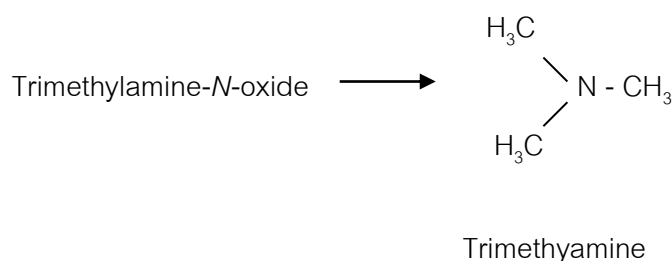
ทั้งหมด 10^8 CFU ต่อกรัม พบว่าเป็น *Pseudomonas* ร้อยละ 46 และอีกร้อยละ 38 เป็น *Shewanella* spp. ซึ่งสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์และรีดิวซ์ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (TMAO) เชื้อชนิดนี้จึงมีความสำคัญต่อการเสียของปลา และจากการศึกษาจุลินทรีย์ที่ผิวหนังของปลา 4 ชนิด แบคทีเรียที่พบมากได้แก่ *Pseudomonas-Alteromonas* ร้อยละ 32-60 และ *Moraxella-Acinetobacter* ร้อยละ 18-37 เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ปลาเน่าเสียเจริญได้ในยากในเมือกที่ผิวของตัวปลา ซึ่งมีสารมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ (mucopolysaccharide) กรดอะมิโนอิสระ ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ อนุพันธ์ไพเพอริดีน (piperidine derivatives) และสารประกอบที่เกี่ยวข้องชนิดอื่นๆ¹

การเก็บปลาไว้ในสภาพสุญญากาศ หรือในสภาพที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์สามารถช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียที่ต้องการอากาศ แต่แบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศและแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศสามารถเจริญได้เช่น จากการศึกษาหนึ่งได้รายงานว่า จุลินทรีย์กลุ่มแรกที่พบว่าเจริญเด่นในชิ้นปลา herring คือ *S. putrefaciens* และ *Pseudomonas* หลังจากทีปล่อยการเน่าเสียดำเนินต่อไปในสภาพที่มีอากาศพบว่ามีจุลินทรีย์เหล่านี้ถึงร้อยละ 62-95 ในปลาที่เน่าเสีย แต่เมื่อปล่อยให้การเสียของปลาเกิดขึ้นในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 100 ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าชิ้นปลา herring มี lactobacilli เจริญเด่นเกือบทั้งหมด ในกรณีของชิ้นปลา rock cod ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 80 และอีกร้อยละ 20 เป็นอากาศปกติ พบ lactobacilli เจริญในปลาร้อยละ 71-87 และพบ *Pseudomonas* บางส่วน สำหรับการถนอมปลาไว้ด้วยเกลือ ถ้าหากเติมเกลือเพียงเล็กน้อยปลาอาจเน่าเสียโดยแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม เช่น *Vibrio* และ *Micrococcus* การนำปลาไปรมควันจนกระทั่งมีค่า a_w ต่ำอาจยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่แต่เชื้อราสามารถเจริญที่ผิว สำหรับปลาที่ผ่านการแปรรูปเช่น ซูริมิ (surimi) และอาหารทะเลเทียมที่ทำจากเนื้อปลาอาจมีแบคทีเรียเริ่มต้นสูง (10^5 - 10^6 เซลล์ต่อกรัม) ชนิดของแบคทีเรียที่พบได้แก่ แบคทีเรียที่มีอยู่ดั้งเดิมในปลาและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการแปรรูป ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะเน่าเสียเร็วโดยแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนถ้าไม่นำไปแช่แข็งอย่างรวดเร็วหรือไม่ใช้ทันทีหลังจากทำให้ละลาย ปลากระป๋องที่ผ่านความร้อนในระดับ commercial sterilization อาจเสียโดย thermophilic sporeformers ถ้าไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปอย่างเหมาะสมและเก็บรักษาอย่างเหมาะสม^{1,4}

จุลินทรีย์ที่ทำให้ปลาเน่าเสียจะใช้สารประกอบอย่างง่ายเป็นอันดับแรก ในกระบวนการนี้จะสร้างสารที่ให้กลิ่นไม่ดีซึ่งระเหยได้ เชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนจะเริ่มเมแทบอลิซึมสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนและสร้างสารประกอบที่ระเหยได้ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า สารประกอบที่ระเหยได้ที่สร้างขึ้นได้แก่ แอมโมเนีย ไตรเมทิลเอมีน ฮีสตามีน (จากฮีสติดีน เป็นสาเหตุของ scombroid poisoning) พิวทรีซีน (putrescine) คาดาวารีน (cadavarine) อินโดล (indole) ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เมอแคปแทน (mercaptans) ไดเมทิลซัลไฟด์ (dimethyl sulfide โดยเฉพาะจาก

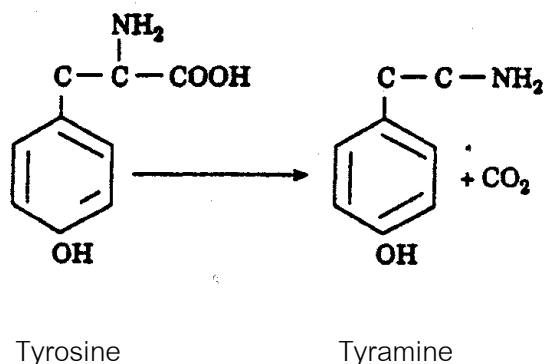
Shewanella putrefaciens) และกรดที่ระเหยได้เช่น กรดแอซีติก กรดไอโซบิวทิริก (isobutyric acid) และกรดไอโซเวเลอริก (isovaleric acid) มีรายงานว่าไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ ครีเอติน ทอรีน (taurine) แอนซีรีน (anserine) และสารประกอบอื่นที่เกี่ยวข้องรวมทั้งกรดอะมิโนบางชนิดลดลงในระหว่างการเสียของปลาและมีการสร้างไตรเมทิลเอมีน แอมโมเนีย ฮีสตามีน ไฮโดรเจนซัลไฟด์ อินโดลและสารประกอบอื่นๆ เนื้อปลาสดเกิดการย่อยสลายตัวเองได้เร็วกว่าเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การย่อยสลายตัวเองร่วมกับการเน่าเสียโดยจุลินทรีย์ช่วยเร่งให้การเน่าเสียเกิดได้เร็วขึ้น แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายนอกเซลล์ซึ่งจะไฮโดรไลสโปรตีนในตัวปลาให้เปปไทด์และกรดอะมิโนสำหรับเมแทบอลิซึมในขั้นต่อไป การเจริญของแบคทีเรียทำให้เกิดการสร้างเมือก การเปลี่ยนสีของตาและเหงือกของปลาและเกิดการสูญเสียลักษณะเนื้อสัมผัสของกล้ามเนื้อปลาทำให้มีลักษณะอ่อนนิ่มลง^{1, 4}

การตรวจสอบการเน่าเสียของปลาทำได้โดยการตรวจสอบการรีดิวซ์ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (trimethylamine oxide, TMAO) ไปเป็นไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) ดังนี้



TMAO เป็นสารประกอบปกติที่มีในปลาทะเล ปลาสดที่เพิ่งจับมาใหม่ๆ จะไม่มี TMA หรือมีน้อยมาก แบคทีเรียสามารถรีดิวซ์ TMAO ไปเป็น TMA แต่แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการรีดิวซ์ TMAO ได้ไม่เท่ากัน วิธีการที่จะตรวจหา TMA จะต้องสกัดสารนี้ออกจากปลาด้วยโทลูอีน (toluene) และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ตามด้วยการทำปฏิกิริยาด้วยกรดพิคริก (picric acid) และสกัดต่อไปด้วยสารละลายโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต แก๊สโครมาโทกราฟีใช้ตรวจหา headspace TMA การเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์สามารถทำเสร็จภายใน 5 นาที¹

การฮีสตามีน (histamine) เกี่ยวข้องกับการเกิด scombroid poisoning คาดาวารีน (cadavarine) และพิวทรีซีน (putrescine) เป็นสารไดเอมีนที่สำคัญซึ่งใช้เป็นสารบ่งชี้การเน่าเสียในปลา เนื้อสัตว์และสัตว์ปีก ไทรามิน (tyramine) สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้ปลาเน่าเสีย มีการรายงานถึงการสร้างสารนี้โดย *Carnobacterium piscicola* และ *Weissella viridescens* ที่แยกได้จากปลาที่ถนอมไว้ด้วยเกลือและน้ำตาลและเก็บรักษาในสภาพสุญญากาศ ผลิตภัณฑ์นี้อาจมีแบคทีเรียกรดแลคติกสูงถึง $\log_{10}$ 7-10 CFU ต่อกรัม การสร้างไทรามินอาจลดลงได้ถ้าลดอุณหภูมิของการเก็บรักษาจาก 9°C เหลือ 4°C การสร้างไทรามินเป็นผลมาจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ดังนี้¹



สารประกอบที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile compounds) รวมถึง total volatile bases (TVB), total volatile acids (TVA) และ total volatile nitrogen (TVN) ค่า TVB รวมถึงแอมโมเนีย ไดเมทิลเอมีน (dimethylamine) และไตรเมทิลเอมีน (TMA) ส่วนค่า TVN รวมถึงค่า TVB และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ที่ได้มาจากการกลั่นไอน้ำตัวอย่าง ค่า TVS คือสิ่งที่สามารถถูกให้อากาศและรีดิวซ์สารละลายอัลคาไลด์เพอร์แมงกาเนต ค่า TVA รวมถึงกรดแอซีติก กรดโพรพิโอนิกและกรดชนิดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ค่า TVN สูงสุดที่ยอมรับได้เท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ปริมาณ trimethylamine nitrogen สูงสุดคือ 5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม กลิ่นผิดปกติในกุ้งจะปรากฏเมื่อมีค่า TVN มากกว่า 30 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม¹

4.4.2 Shellfish

4.4.2.1 Crustaceans

ครัสเตเชียน (crustaceans) ที่นิยมรับประทานได้แก่ กุ้ง (shrimp) กุ้งมังกร (lobster) ปู (crab) และกุ้งเครย์ฟิช (crayfish) องค์ประกอบทางเคมีของสัตว์เหล่านี้แตกต่างกัน แต่พอจะมีคาร์โบไฮเดรตบ้าง (ประมาณร้อยละ 0.5) ซึ่งต่างจากปลาซึ่งไม่มีคาร์โบไฮเดรตเลย (ตารางที่ 4.6) เนื้อของครัสเตเชียนมีสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนค่อนข้างสูงเช่น กรดอะมิโนโดยเฉพาะอาร์จินีน (arginine) ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (TMAO) มีไกลโคเจนประมาณร้อยละ 0.5 และมีค่าพีเอชสูงกว่า 6.0 มีรายงานว่าเนื้อกุ้งมีกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าเนื้อปลาและมีคาร์โบไฮเดรตไดเอสเทอเรส (catheptic enzyme) ซึ่งจะย่อยสลายโปรตีนอย่างรวดเร็ว^{1,4}

แบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียน สะท้อนให้เห็นถึงการปนเปื้อนของแหล่งน้ำที่จับสัตว์มา การปนเปื้อนจากท่าเรือ ผู้ปฏิบัติงาน น้ำที่ใช้ล้าง จุลินทรีย์หลายชนิดที่มีรายงานว่าพบในปลาสดก็มีรายงานว่าพบในสัตว์กลุ่มนี้เช่นเดียวกัน จุลินทรีย์ pseudomonads, *Acinetobacter*, *Moraxella* และยีสต์หลายชนิดพบเจริญเด่นในเนื้อครัสเตเชียนที่เน่าเสีย จากการศึกษาหนึ่งได้ทดลองปล่อยให้กุ้งเกิดการเน่าเสียที่อุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 13 วันพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่เจริญเด่นคือ

Pseudomonas spp. โดยมีแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียอีกร้อยละ 2 ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งต่างกับในกุ้งสดที่พบแบคทีเรียแกรมบวกถึงร้อยละ 38 และเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5.6°C และ 11.1°C พบ *Moraxella* เจริญเด่น ขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 16.7°C และ 22.2°C พบ *Proteus* เจริญเด่น¹

การเสียของครัสเตเชียนคล้ายกับการเสียของปลาสด สำหรับกุ้งเมื่อเกิดการเน่าเสียโดยจุลินทรีย์จะมีกลิ่นเปลี่ยนไปจากการสร้างสารเมแทบอลิซึมที่ระเหยได้ นอกจากนี้ยังมีการสร้างเมือก การสูญเสียลักษณะเนื้อสัมผัสคือเนื้อกุ้งอ่อนนิ่มลงและสีเปลี่ยนไป มีรายงานว่ากล้ามเนื้อของครัสเตเชียนมีปริมาณสารประกอบไนโตรเจนมากกว่า 300 มิลลิกรัมต่อเนื้อ 100 กรัม การที่มีสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนสูงเช่น กรดอะมิโนอิสระทำให้แบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียเข้ากระทำได้ง่ายและอย่างรวดเร็ว การเน่าเสียเริ่มแรกของเนื้อครัสเตเชียนจะมีการสร้างสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ (volatile base nitrogen) ปริมาณมากเช่นเดียวกับการเน่าเสียของปลา สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้บางส่วนมาจากการรีดิวซ์ไนโตรเจนที่ติดอยู่ใน crustacean shellfish (แต่ไม่มีในมอลลัส (mollusks) ส่วนใหญ่) ใน shellfish ทั้งครัสเตเชียนและมอลลัสมีอาร์จินีนแต่ไม่มีครีเอติน การเสียของกุ้งพบได้มากกว่าในปูและกุ้งมังกรถ้าหากนำกุ้งไปแปรรูปหรือแช่แข็งโดยเร็วจะลดการเน่าเสียลง กุ้งมังกรมักจะถูกแช่แข็งหลังจากแปรรูปหรือขายขณะมีชีวิตจึงไม่ค่อยเผชิญกับสภาพการเน่าเสีย การทำให้สุกสามารถช่วยยืดอายุการเก็บกุ้ง กุ้งมังกรและปูได้ แต่ก็อาจเกิดการปนเปื้อนหลังจากผ่านความร้อนได้ถ้าหากปฏิบัติอย่างไม่ถูกสุขลักษณะ^{1,4}

4.4.2.2 Mollusks

สัตว์น้ำกลุ่มมอลลัส (molluscan shellfish) ได้แก่ หอยนางรม (oysters) ปลาหมึก (squid) หอยเชลล์ (scallop) หอย (clam) มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากพวกปลาและครัสเตเชียนโดยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตในเนื้อสูงกว่าและปริมาณสารประกอบไนโตรเจนทั้งหมดต่ำกว่า คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไกลโคเจน (ร้อยละ 3.5-5.5) ปกติมีค่า pH สูงกว่า 6.0 สัตว์ประเภทนี้ปกติมักจะถูกเก็บไว้ในสภาพมีชีวิตจนกว่าจะนำมาแปรรูป เนื้อของสัตว์ในกลุ่มนี้มี nitrogen bases สูงเช่นเดียวกับ shellfish ในกลุ่มอื่น สิ่งที่น่าสนใจคือ molluscan muscle tissue มีปริมาณกรดอะมิโนอาร์จินีน กรดแอสปาร์ติก และกรดกลูตามิกสูงกว่าที่พบในปลา สิ่งสำคัญด้านความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีระหว่างสัตว์ประเภทครัสเตเชียนและมอลลัสคือ มอลลัสมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงกว่า ตัวอย่างเช่น เนื้อของหอย (clam) และหอยเชลล์ (scallop) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 3.4 ขณะที่หอยนางรมมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 5.6 ส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไกลโคเจน การที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงทำให้การเสียของอาหารทะเลประเภทนี้แตกต่างจากอาหารทะเลประเภทอื่น คาดว่าการหมักอาจเป็นส่วนหนึ่งของการเน่าเสียในระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็น จุลินทรีย์จะเมแทบอลิซึมทั้งคาร์โบไฮเดรตและสารประกอบไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรตถูกเมแทบอลิซึมโดยแบคทีเรียกรดแลคติก enterococci และเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มให้กรดอินทรีย์จึงทำให้ค่า pH ลดลง มีรายงานว่ารูปแบบ

การเน่าเสียของปลาหมึกต่างกับการเน่าเสียของมอลลัสกันอื่น สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้เพิ่มขึ้นระหว่างการเน่าเสียของปลาหมึกเช่นเดียวกับในเนื้อคริสต์เตียน^{1,4}

จุลินทรีย์ในพบในสัตว์น้ำประเภทมอลลัสกันอยู่กับคุณภาพของน้ำที่เป็นแหล่งอาศัยของสัตว์ประเภทนี้และปัจจัยอื่น ๆ แบคทีเรียที่เคยพบในหอยนางรมที่เน่าเสียเช่น *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium* และ *Micrococcus* เมื่อการเน่าเสียเกิดขึ้นและดำเนินต่อไปจะพบ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter-Moraxella* spp. เจริญเด่น ส่วนเชื้อ enterococci, lactobacilli และยีสต์เจริญเด่นในขั้นสุดท้ายของการเน่าเสีย *Pseudoalteromonas* spp. จากสิ่งแวดล้อมในทะเลแถบประเทศฟิลิปปินส์พบมากในหอยนางรมที่เน่าเสียที่อุณหภูมิ 18°C¹

ในการเน่าเสียของมอลลัสกันจะเกิดการหมักเนื่องจากมีปริมาณไกลโคเจนค่อนข้างสูง นักวิจัยหลายท่านได้เสนอ pH scale เป็นพื้นฐานของการหาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของหอยนางรมดังนี้ 1) pH 6.2-5.9: คุณภาพดี 2) pH 5.8: ผิดปกติ 3) pH 5.7-5.5: musty และ 4) pH ≤ 5.2: เปื่อยหรือเสีย การวัดการลดลงของ pH เป็นการทดสอบที่ดีกว่าการหาปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ (volatile nitrogen bases) เพื่อป้องกันการเน่าเสียในหอยนางรมและมอลลัสกันอื่น ส่วนการหากรดที่ระเหยได้มีผู้รายงานว่าเชื่อถือไม่ได้ในการตรวจสอบความสดของหอยนางรม ถึงแม้ว่านักวิจัยหลายท่านจะบอกว่าเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการตรวจสอบคุณภาพทางจุลินทรีย์ของหอยนางรม แต่บางท่านก็ได้กล่าวว่าการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส และการตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็นวิธีการบ่งชี้คุณภาพทางจุลินทรีย์ที่ดีกว่า¹

4.5 จุลินทรีย์ในผักและผลไม้

คุณภาพทางกายภาพและชีวเคมีของผิวของพืชแต่ละชนิดซึ่งเป็นผลมาจากจีโนไทป์ของพืช (plant genotype) และการตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมในสิ่งแวดล้อมได้แก่ แสง อุณหภูมิ ความชื้น บรรยากาศ พืชและดินเป็นสิ่งที่กำหนดชนิดของจุลินทรีย์ที่จะพบได้ในพืช นอกจากนี้ชนิดและจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันสามารถพบได้ในพืชต่างชนิดกัน พบได้บนใบของพืชต่างใบกัน ซึ่งอยู่บนพืชต้นเดียวกัน และพบได้บนใบของพืชต่างใบกันในฤดูกาลที่ต่างกันและในวันแต่ละวัน แบคทีเรียมักจะสะสมในบริเวณของใบที่มีน้ำและถูกปกป้องจากรังสียูวี⁵

จุลินทรีย์ที่พบในผักที่เพาะปลูกบนดินมักจะสะท้อนให้เห็นถึงคุณภาพของดินที่ใช้เพาะปลูก เชื้อแอคติโนมัยซีต (actinomycetes) เป็นแบคทีเรียที่พบมากในดิน แต่มีรายงานน้อยกว่าพบในผลิตภัณฑ์ผัก ขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกพบน้อยในดินแต่มีความสำคัญในพืชและผลิตภัณฑ์จากพืช ถึงแม้ว่าผักและผลไม้บางชนิดจะมีโครงสร้างตามธรรมชาติที่ช่วยป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ และค่า pH เฉพาะที่ทำให้จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเจริญได้ก็ตาม แต่ถ้าหากผักและผลไม้ถูกทำลาย

โครงสร้างหรือเกิดการแตกหัก จุลินทรีย์ก็สามารถที่จะบุกรุกเข้าไปและเจริญอย่างรวดเร็วทำให้ผักและผลไม้เน่าเสียได้¹

การปนเปื้อนของผักและผลไม้โดยจุลินทรีย์ก่อโรค สามารถเกิดขึ้นได้ที่ได้ก็ตามตั้งแต่ฟาร์มถึงโต๊ะอาหารรวมถึงการปนเปื้อนเมล็ดพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้ การปนเปื้อนในระหว่างการผลิตได้แก่ การเก็บเกี่ยว การขนส่ง การขายปลีกและการเตรียมอาหาร จากการศึกษาในช่วงแรกถึงปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผักได้รายงานพบว่าพบแบคทีเรียแกรมลบจำนวนมากกว่า 2×10^6 CFU ต่อกรัมที่ใบด้านนอกของกระหล่ำปลี ต่างกับที่ใบด้านในซึ่งพบเพียง 4×10^3 CFU ต่อกรัม ผลผลิตที่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถที่จะถูกกำจัดออกได้อย่างสมบูรณ์โดยการล้าง การล้างผักช่วยลดจำนวนแบคทีเรียลงได้เพียง 2.5-3.0 เท่า⁶ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียเกาะติดอย่างแน่นที่ผิวของผัก ได้มีรายงานการตรวจพบแบคทีเรียที่มีชีวิตที่เนื้อเยื่อด้านในของแตงกวาและมะเขือเทศ⁵

4.5.1 ผักและผลิตภัณฑ์จากผัก

จุลินทรีย์ที่พบในผักสะท้อนให้เห็นสู่ลักษณะของขั้นตอนต่างๆ ในการแปรรูปและสภาพทางจุลชีววิทยาของวัตถุดิบที่นำมาแปรรูป มีรายงานว่าถั่วลิสงเต่าก่อนลวกมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 5.6 ถึงมากกว่า $6.0 \log_{10}$ CFU ต่อกรัม หลังจากลวกจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงเหลือ $3.0-3.6 \log_{10}$ CFU ต่อกรัม จากนั้นเมื่อผ่านการแปรรูปหลายๆ ขั้นตอนรวมทั้งการบรรจุ พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง $4.72-5.94 \log_{10}$ CFU ต่อกรัม ในผักชนิดอื่นเช่น ข้าวโพดก็มีรูปแบบการเพิ่มและลดของจุลินทรีย์เช่นเดียวกันคือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงหลังจากลวกจากนั้นเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการแปรรูปแต่ละขั้นตอน มีรายงานถึงจำนวนจุลินทรีย์ในผักสดชนิดต่างๆ (ตารางที่ 4.9) จะเห็นได้ว่าในผักสดมักมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดประมาณ 10^6-10^7 CFU ต่อกรัมและจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มประมาณ 10^5-10^6 CFU ต่อกรัม¹

ผักสดปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์จากดิน น้ำ อากาศและอื่นๆ รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ผักต่างชนิดกันมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.10) ปริมาณวิตามิน กรดนิวคลีอิกและองค์ประกอบอื่นๆโดยทั่วไปมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 1 เมื่อพิจารณาจากปริมาณสารอาหารในผัก แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์สามารถใช้สารอาหารในผักสำหรับการเจริญเติบโตได้ดี ดังนั้นผักจึงเน่าเสียโดยการกระทำของจุลินทรีย์เหล่านี้ การที่ผักมีปริมาณน้ำสูงจึงส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียและการที่ผักมีคาร์โบไฮเดรตและไขมันค่อนข้างน้อยชี้ให้เห็นว่าน้ำปริมาณมากที่มีในผักอยู่ในรูปอิสระ พิเศษของผักส่วนใหญ่อยู่ในช่วงที่แบคทีเรียจำนวนมากสามารถเจริญได้ ดังนั้นแบคทีเรียจึงเป็นจุลินทรีย์ที่มักจะทำให้ผักเน่าเสีย นอกจากนี้การที่ผักมีค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชันค่อนข้างสูงชี้ให้เห็นว่า จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศและจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งสภาพมีและไม่มีอากาศมีความสำคัญมากกว่าจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ แบคทีเรียที่พบบ่อยว่าทำให้ผักเน่าเสียคือแบคทีเรีย

สกุล *Erwinia* และ *Pectobacterium* แบคทีเรียทั้งสองสกุลนี้พบในสิ่งแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับพืชผัก รูปแบบของการเน่าเสียของผักที่กระทำโดยแบคทีเรียเหล่านี้คือ bacterial soft rot¹

ตารางที่ 4.9 จำนวนจุลินทรีย์ในผักสดบางชนิด

ผลิตภัณฑ์ผัก	จำนวนจุลินทรีย์ (log ₁₀ CFU ต่อกรัม)
ผักผสม: แครอท (carrot) ผสมกับชิกคอรี่แดงและ ชิกคอรี่เขียว (red and green chicory)	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด (Aerobic Plate Counts) = 7.94 โคลิฟอร์ม (coliform) = 7.03 ฟีคัลโคลิฟอร์ม (fecal coliform) = 6.74 แบคทีเรียกรดแลคติก = 6.18
ผักผสม: แครอทผสมกับชิกคอรี่แดงและเอ็นไดว์ (endive)	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 6.14 โคลิฟอร์ม = 4.68 ฟีคัลโคลิฟอร์ม = 4.51 แบคทีเรียกรดแลคติก = 5.86
ถั่วงอก (bean sprouts)	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 7.99 โคลิฟอร์ม = 7.49
บรอกโคลี (broccoli)	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 6.3 โคลิฟอร์ม = 4.8
แครอท	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 4.2
กะหล่ำดอก (cauliflower)	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 7.4 โคลิฟอร์ม = 2.9
ชีสสลัด	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 10.0
โคสลอ (coleslaw)	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 7.0
แรดิช (radish)	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 6.04
ผักกาดหอม	จำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมด = 8.6 โคลิฟอร์ม = 5.6

¹ ที่มา: Jay และคณะ¹

ตารางที่ 4.10 องค์ประกอบทางเคมีของผักชนิดต่างๆ

ชนิดของผัก	ปริมาณ (ร้อยละ)				
	น้ำ	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
ถั่วงอก (green bean)	89.9	7.7	2.4	0.2	0.8
บรอกโคลี (broccoli)	89.9	5.5	3.3	0.2	1.1
กะหล่ำดาว (brussel sprout)	84.9	8.9	4.4	0.5	1.3
กะหล่ำปลี	92.4	5.3	1.4	0.2	0.8
แคนตาลูป (cantaloupe)	94.0	4.6	0.2	0.2	0.6
กะหล่ำดอก (cauliflower)	91.7	4.9	2.4	0.2	0.8
ขึ้นฉ่าย (celery)	93.7	3.7	1.3	0.2	1.1
ข้าวโพด	73.9	20.5	3.7	1.2	0.7
แตงกวา	96.1	2.7	0.7	0.1	0.4
ผักกาดหอม	94.8	2.9	1.2	0.2	0.9
หัวหอม	87.5	10.3	1.4	0.2	0.6
ถั่ว (pea)	74.3	17.7	6.7	0.4	0.9
มันฝรั่ง (potato)	77.8	19.1	2.0	0.1	1.0
ฟักทอง (pumpkin)	90.5	7.3	1.2	0.2	0.8
แรดิช (radish)	93.6	4.2	1.2	0.1	1.0
ผักโขม (spinach)	92.7	3.2	2.3	0.3	1.5
มันเทศ (sweet potato)	68.5	27.9	1.8	0.7	1.1
มะเขือเทศ	94.1	4.0	1.0	0.3	0.6
แตงโม (watermelon)	92.1	6.9	0.5	0.2	0.3

ที่มา: Jay และคณะ¹

การที่เนื้อเยื่อผักมีค่า pH สูงทำให้ง่ายต่อการบุกรุกโดยจุลินทรีย์มากกว่าผลไม้ แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องมักจะเป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดที่ย่อยสลายเพคตินได้เช่น *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas* และ *Xanthomonas* ปัจจุบันแบคทีเรียสกุล *Erwinia* บางชนิดได้ถูกจัดจำแนกให้อยู่ในสกุลใหม่ คือ *Pectobacterium* ส่วน *Pseudomonas* บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับพืชได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุลใหม่เช่น *Acidovorax*, *Burkholderia* และ *Hydrogenophaga* ซึ่งการจำแนกชนิดยังดำเนินต่อไป โดยเน้นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของสารพันธุกรรม แบคทีเรียสกุล *Pantoea* เกี่ยวพันอย่าง

ใกล้เคียงกับสกุล *Erwinia* ตามด้วย *Citrobacter* และ *Klebsiella* ซึ่งมีความสำคัญต่อการเน่าเสียของผักที่เก็บรักษาไว้ แบคทีเรียหลายชนิดเป็นสาเหตุการเสียของผัก (ตารางที่ 4.11)^{1,7}

รูปแบบของการเน่าเสียที่พบบ่อยที่สุดคือ การที่เนื้อเยื่อผักอ่อนนุ่มลงจากการกระทำของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายเพคติน เพคตินเป็นเมทิลเอสเทอร์ของ α -1,4-poly-D-galacturonic acid กับ pectic substances อื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักของ middle lamella ที่อยู่ระหว่างเซลล์ทำให้เกิดเนื้อเยื่อพืช เมื่อสิ่งนี้ถูกทำให้แตกสลายเซลล์แต่ละเซลล์จะถูกบุกรุกโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย⁶ การเน่าเสียของผักแบบที่เรียกว่า soft rot เป็นการเน่าเสียโดยเกิดลักษณะอ่อนนุ่มของเนื้อเยื่อผักแทนที่จะแข็งคงตัว เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้แครอทเน่าเสียประเภทนี้คือ *Pectobacterium* spp. โดยเฉพาะ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* และ *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* หลังจากที่มีการเน่าเสียเริ่มขึ้นจะมีเชื้อแบคทีเรียที่อยู่อาศัยในดินเกี่ยวข้องกับเช่น *Pseudomonas* spp. รวมทั้ง *Bacillus*, *Paenibacillus* และ *Clostridium* ส่วนการเน่าเสียของมะเขือเทศและมันฝรั่ง *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* เป็นสาเหตุการเสียแบบ soft rot โดยเข้าทางผิวที่แตก ในกรณีของผักที่ได้จากส่วนของรากเช่น แครอท รากจะถูกปกป้องจากการบุกรุกของแบคทีเรียจากการที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และซูเปอร์ออกไซด์ จุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์คะตะเลสและซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เพื่อเอาชนะกลไกการป้องกันนี้ แบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas syringae* ผลิตเอนไซม์เหล่านี้¹

เชื้อราหลายชนิดเป็นสาเหตุการเสียของผักในรูปแบบต่างๆ (ตารางที่ 4.11) การเน่าเสียบางประเภทเริ่มต้นตั้งก่อนเก็บเกี่ยว บางประเภทเริ่มเน่าเสียหลังเก็บเกี่ยว การเสียของผักรูปแบบต่างๆ ได้แก่

1) Gray mold rot การเสียแบบนี้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Botrytis cinerea* ซึ่งสร้างไมซีเลียมสีเทา การมีความชื้นและอุณหภูมิสูงช่วยให้เกิดการเน่าเสียได้มากขึ้น ผักที่อาจเกิดการเน่าเสียแบบนี้ ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง หัวหอม กระเทียม ถั่วต่างๆ แครอท ขึ้นฉ่าย มะเขือเทศ ผักกาดหอม บรอกโคลี ดอกกะหล่ำ กะหล่ำดาว (brussel sprout) แตงกวา พริก พักทอง และมันเทศ เชื้อราเข้าสู่ผักทางรอยแตกรอยตัดก่อนก่อนที่จะเกิดการเน่าเสีย¹

2) Sour rot (oospora rot หรือ watery soft rot) การเสียแบบนี้มีสาเหตุมาจาก *Geotrichum candidum* และจุลินทรีย์ชนิดอื่น เชื้อราชนิดนี้จะอยู่ในดินและผักผลไม้ที่เน่าเสีย *Drosophila melanogaster* (fruit fly) เป็นพาหะนำสปอร์และส่วนของไมซีเลียมจากผักผลไม้ที่เน่าเสียมาสู่ผักผลไม้สดที่ยังไม่เน่าเสียทำให้เกิดการแตกและเน่ามากขึ้น ผักที่อาจเกิดการเน่าเสียแบบนี้ เช่น หน่อไม้ฝรั่ง หัวหอม กระเทียม ถั่วต่างๆ แครอท แร็ดดิส หัวผักกาดแดง (turnips) ผักชีฝรั่ง (parsley) มะเขือเทศ ผักกาดหอม บล๊อคโคลี ดอกกะหล่ำและกะหล่ำดาว¹

3) Rhizopus soft rot การเน่าเสียแบบนี้มีสาเหตุมาจาก *Rhizopus stolonifer* และเชื้อราชนิดอื่นๆ ทำให้ผักอ่อนนิ่มและ การเจริญคล้ายปุ๋ยล่ำและจุดสีดำของอับสปอร์มักจะปกคลุมผัก เชื้อราชนิดนี้ถูกทำให้แพร่กระจายโดย *D. melanogaster* ซึ่งจะวางไข่ที่รอยแตกของผักผลไม้ ผักที่อาจเกิดการเน่าเสียแบบนี้ได้แก่ ถั่วต่างๆ แครอท ผักชีล้อม มะเขือเทศ บล๊อคโคลี กะหล่ำปลี ดอกกะหล่ำ กะหล่ำดาว แตงกวา แตงโม แคนตาลูป ฟักทอง มันฝรั่งและมันเทศ¹

ตารางที่ 4.11 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการเสียของผัก

ชนิดของจุลินทรีย์ แบคทีเรีย	ลักษณะการเน่าเสียของผัก
<i>Corynebacterium sepedonicum</i>	การเน่าเสียของมันฝรั่ง (tuber rot of white potato)
<i>Corynebacterium nebraskense</i>	ใบเป็นจุด ใบสีซีด สว่าง และเกิดการเหี่ยวของข้าวโพด
<i>Corynebacterium michiganense</i>	มะเขือเทศเป็นจุดที่ใบและผล
<i>Pseudomonas marginalis</i> group	ผักเน่าเสียแบบ soft rot เกิดเมือกที่ด้านข้างใบ ผักกาดหอม
<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	เห็ดเน่าเสียแบบ soft rot
<i>Xanthomonas campestris</i>	กะหล่ำปลีและกะหล่ำดอกเน่าเสียแบบ black rot
เชื้อรา	
<i>Geotrichum candidum</i>	มะเขือเทศเน่าเสียแบบ sour rot
<i>Magnaporthe grisea</i>	ข้าวเกิดการเสียแบบ rice blast
<i>Ustilago maydis</i>	ข้าวโพดเกิด corn smut
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	แครอทเน่าเสียแบบ watery soft rot
<i>Rhizopus stolonifera</i>	มันเทศและมะเขือเทศเสียแบบ <i>Rhizopus</i> soft rot
<i>Collectotrichum coccodes</i>	ผักเน่าเสียแบบ <i>Phytophthora</i> rot

ที่มา: Jay และคณะ¹

4) Phytophthora rot การเน่าเสียแบบนี้มีสาเหตุมาจาก *Phytophthora* spp. มีผลต่อพืชในลักษณะต่างๆ ผักที่อาจเกิดการเน่าเสียโดยเชื้อราชนิดนี้ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง หัวหอม กระเทียม แตงโม แคนตาลูป มะเขือเทศ มะเขือยาวและพริก¹

5) Anthracnose โรคพืชประเภทนี้จะทำให้เกิดจุดที่ใบ ผลและเมล็ด มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Colletotrichum coccodes* และชนิดอื่นๆ เชื้อราชนิดนี้เป็น weak plant pathogen อยู่อาศัยจากฤดูหนึ่งไปยังอีกฤดูหนึ่งบนเศษชิ้นส่วนของพืชที่อยู่ในดินและบนเมล็ดของพืชหลายชนิดเช่น มะเขือเทศ อากาศที่อุ่นและชื้นทำให้เชื้อนี้แพร่กระจายได้ดี พืชที่อาจจะติดเชื้อมีได้แก่ แตงกวา แตงโม พักทอง มะเขือเทศและพริก¹

6) Blue mold rot โรคพืชชนิดนี้เกิดหลังการเก็บเกี่ยวแอปเปิ้ลและแพร์ที่มีสาเหตุมาจาก *Penicillium expansum* ในการที่จะพยายามควบคุมเชื้อราชนิดนี้ในแอปเปิ้ลและแพร์ ได้มีการทดลองใช้เชื้อ *Candida sake* และ *Pantoea agglomerans* เพื่อควบคุมด้วยชีววิธี เมื่อเติมเชื้อทั้งสองในอัตราส่วน 50:50 คือในปริมาณ 2.0×10^7 และ 8.0×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าขนาดของบริเวณที่พืชถูกทำลายโดยเชื้อราลดลงไปมากกว่าร้อยละ 95¹

4.5.2 ผลไม้และผลิตภัณฑ์จากผลไม้

จุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งสปอร์ของเชื้อรามักจะปนเปื้อนที่ผิวของผลไม้ระหว่างการฤดูการเพาะปลูก เชื้อราน้อยชนิดที่จะสามารถเข้าทำลายผลไม้ก่อนที่จะเก็บเกี่ยว กระบวนการบ่มผลไม้ทำให้ผลไม้มีโอกาสถูกจุลินทรีย์เข้าทำลายง่ายขึ้น ผลไม้ที่เก็บเกี่ยวจากพื้นดินมีจุลินทรีย์หลากหลายมากกว่าผลไม้ที่เก็บจากต้น⁸

4.5.2.1 การเน่าเสียของผลไม้

ผลไม้มีปริมาณน้ำเฉลี่ยประมาณร้อยละ 85 และมีคาร์โบไฮเดรตเฉลี่ยประมาณร้อยละ 13 (ตารางที่ 4.12) ผลไม้แตกต่างจากผักตรงที่มีปริมาณน้ำน้อยกว่าแต่มีคาร์โบไฮเดรตมากกว่า ปริมาณเฉลี่ยของโปรตีน ไขมันและเถ้าในผลไม้เท่ากับร้อยละ 0.9, 0.5 และ 0.5 ตามลำดับ ซึ่งค่อนข้างต่ำกว่าในผักยกเว้นปริมาณเถ้า ผลไม้ก็มีวิตามินและสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่นเดียวกับผัก เมื่อพิจารณาปริมาณสารอาหารในผลไม้จะเห็นได้ว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา อย่างไรก็ตามค่า pH ของผลไม้ต่ำกว่าระดับ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย ความจริงข้อนี้เพียงพอแล้วที่ดูเหมือนจะเพียงพอที่จะเป็นเหตุผลในการอธิบายถึงการไม่มีแบคทีเรียร่วมในการเน่าเสียของผลไม้ การที่เชื้อราและยีสต์เจริญได้ในช่วง pH ค่อนข้างกว้างทำให้เหมาะในการทำให้ผลไม้เน่าเสีย ยกเว้นลูกแพร์ที่บางครั้งเน่าเสียโดยแบคทีเรีย *Erwinia* (*Erwinia* rot) มีรายงานว่า *Erwinia* และ *Pectobacterium* spp. เริ่มเจริญที่ผิวของลูกแพร์ซึ่งมีค่า pH สูงกว่าเนื้อผลไม้ภายใน¹

จุลินทรีย์หลายชนิดเกี่ยวข้องกับการเสียของผลไม้ (ตารางที่ 4.13) เช่น *Penicillium italicum* เป็นสาเหตุของ blue rot และ *Penicillium digitatum* ทำให้เกิด green rot ในผลไม้ตระกูลส้ม *Penicillium expansum* ทำให้เกิด blue mold rot ในแอปเปิ้ลและเชอร์รี่ *Botrytis cinerea* เป็นสาเหตุ

ของ gray mold rot ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำให้องุ่นและสตรอเบอรี่เน่าเสีย *Monilia fructicola* ทำให้เกิด brown rot ในแอปปริคอต เนคทารีน (nectarine) และพีช ซึ่งเป็นโรคที่รุนแรงที่สุดของผลไม้เหล่านี้⁹

ผลไม้มักจะถูกปนเปื้อนโดยยีสต์หลายชนิดและทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ผลไม้เน่าเสีย ยีสต์หลายชนิดใช้น้ำตาลบนผลไม้และทำให้เกิดการหมักซึ่งให้แอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากยีสต์โดยทั่วไปเจริญได้เร็วกว่าเชื้อรา จึงเป็นสาเหตุการเสียของผลไม้ในบางกรณี ในการทำให้ผลไม้เน่าเสีย ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดว่าเชื้อราบางชนิดเจริญอย่างอิสระต่อการกระทำของยีสต์ในตอนเริ่มต้นหรือไม่ การใช้หรือการทำลายสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเกิดขึ้นโดยเชื้อรามากกว่ายีสต์ เชื้อราหลายชนิดสามารถใช้แอลกอฮอล์เป็นแหล่งพลังงานได้ เมื่อสารประกอบอย่างง่ายถูกใช้หมดไปเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้จึงทำลายส่วนที่เหลือของผลไม้ต่อไปเช่น พอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างและส่วนเปลือก¹

ตารางที่ 4.12 องค์ประกอบทางเคมีของผลไม้

ชนิดของผลไม้	ปริมาณ (ร้อยละ)				
	น้ำ	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
แอปเปิ้ล	84.1	14.9	0.3	0.3	0.4
แอปปริคอต (apricot)	85.4	12.9	1.0	0.6	0.1
กล้วย	74.8	23.0	1.2	0.8	0.2
แบคเบอรี่ (blackberries)	84.8	12.5	1.2	0.5	1.0
เชอร์รี่ชนิดหวานและเปรี้ยว	83.0	14.8	1.1	0.6	0.5
มะเดื่อ (fig)	78.0	19.6	1.4	0.6	0.4
เกรปฟรุิต (grapefruit)	88.8	10.1	0.5	0.4	0.2
องุ่น (American type)	81.9	14.9	1.4	0.4	1.4
เลมอน (lemon)	89.3	8.7	0.9	0.5	0.6
มะนาว (lime)	86.0	12.3	0.8	0.8	0.1
ส้ม	87.2	11.2	0.9	0.5	0.2
พีช (peach)	86.9	12.0	0.5	0.5	0.1
แพร์ (pear)	82.7	15.8	0.7	0.4	0.4
สับปะรด	85.3	13.7	0.4	0.4	0.2
พลัม (plum)	85.7	12.9	0.7	0.5	0.2
ราสเบอรี่ (raspberry)	80.6	15.7	1.5	0.6	1.6
รูบาท (rhubarb)	94.9	3.8	0.5	0.7	0.1
สตรอเบอรี่ (strawberry)	89.9	8.3	0.8	0.5	0.5
เชลี่ย	84.9	13.2	0.88	0.53	0.46

ที่มา: Jay และคณะ¹

ตารางที่ 4.13 การเสียของผลไม้และผลิตภัณฑ์จากผลไม้โดยจุลินทรีย์

ชนิดของอาหาร	ตำหนิที่เกิดขึ้น	จุลินทรีย์ที่เป็นต้นเหตุ
ผลไม้สดทั่ว ๆ ไป	blue mold rot	<i>Penicillium expansum</i>
	black mold rot	<i>Aspergillus niger</i>
	รสเปรี้ยวและขม	<i>Streptococcus faecalis</i>
	soft rot	<i>Byssoschlamys fulva</i> , <i>Penicillium</i>
	green mold rot	<i>Penicillium digitatum</i>
	anthracnose	<i>Colletotrichum</i>
	gray mold rot	<i>Botrytis cinerea</i>
แอปเปิ้ล	moldy core	<i>Alternaria tenuis</i>
	brown firm rot	<i>Trichoderma harzianum</i>
กล้วย	black rot	<i>Alternaria</i>
	crown rot	<i>Colletotrichum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Verticillium</i>
สตอเบอรี่	การหมัก	<i>Kloeckera</i>
	soft rot	<i>Rhizopus</i>
บลูเบอรี่ (blueberry)	black rot	<i>Alternaria</i>
	soft rot	<i>Phomopsis</i>
เชอร์รี่ (cherry)	brown rot	<i>Monilia</i> , <i>Sclerotinia</i>
ผลไม้ตระกูลส้ม (citrus fruits)	green mold	<i>Penicillium digitatum</i>
	blue mold	<i>Penicillium italicum</i>
	black rot	<i>Alternaria</i>
	sour rot	<i>Geotrichum candidum</i>
	stem-end rot	<i>Phomopsis</i> , <i>Diploida</i>
พีช (peach)	brown rot	<i>Monilia fructicola</i> , <i>Sclerotinia</i>
น้ำผลไม้	เกิดการเปรี้ยวและมีแก๊ส CO ₂	<i>Lactobacillus</i> และยีสต์
	เกิดการกรดแอซิติก	<i>Acetobacter</i>
	มีราขึ้นที่ผิว	<i>Penicillium</i>
แยม เยลลี่และผลไม้แช่อิ่ม	การหมัก	osmophilic yeasts
ไวน์	เกิดการกรดแอซิติก	<i>Acetobacter</i> , <i>Gloconobacter</i>

ที่มา: Splittstoesser⁸

4.6 จุลินทรีย์ในนมและผลิตภัณฑ์นม

4.6.1 จุลินทรีย์ในน้ำนมดิบ

น้ำนมดิบมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนหลายชนิดจากหลายแหล่ง น้ำนมวัวโดยเฉลี่ยประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 3.2 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 4.8 ไขมันร้อยละ 3.9 และแร่ธาตุร้อยละ 0.9 นอกจากในนมจะมีเคซีนและแลคตัลบูมิน (lactalbumin) แล้วยังมีกรดอะมิโนอิสระซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนที่ดีแล้วยังมีแลคโตสเป็นคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ในนม เชื้อจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์ย่อยสลายแลคโตสได้ก็จะได้เปรียบ ไขมันนมสามารถถูกไฮโดรไลส์โดยเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีการปล่อยกรดไขมันโมเลกุลเล็กที่ระเหยได้เช่น กรดบิวทิริก (butyric acid) กรดคาร์ปริก (capric acid) และกรดคาร์โพริก (caproic acid) ⁴

การเน่าเสียของนมโดยเชื้อจุลินทรีย์สามารถเกิดขึ้นได้จากเมแทบอลิซึมของแลคโตส สารประกอบประเภทโปรตีน กรดไขมัน (ชนิดไม่อิ่มตัว) และการไฮโดรลิซิสของไตรกลีเซอไรด์ ผ่านมดถูกแช่เย็นโดยทันทีหลังจากรีดนมและเก็บไว้หลายวัน การเน่าเสียจะเกิดขึ้นโดยแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน เช่น *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* spp. และแบคทีเรียโคลิฟอร์มบางชนิด *Pseudomonas* และแบคทีเรียชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกันซึ่งไม่สามารถใช้แลคโตสได้สามารถเมแทบอลิซึมสารประกอบโปรตีนทำให้รสของนมเปลี่ยนเป็นรสขม กลิ่นผลไม้หรือกลิ่นไม่สะอาด จุลินทรีย์เหล่านี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อนทำให้เกิดกลิ่นหืนและเอนไซม์โปรตีนเอสที่ทนความร้อนซึ่งมีความสำคัญ การเจริญของแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ใช้แลคโตสได้ทำให้เกิดกรดแลคติก กรดแอซีติก กรดฟอर्मิก แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน (โดย mixed-acid fermentation) เป็นสาเหตุให้น้ำนมเกิดลิ่ม ฟองและเกิดการเปรี้ยวขึ้น *Alcaligenes* spp. บางชนิดและโคลิฟอร์มเป็นสาเหตุของ ropiness (เกิดเมือก) โดยการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide) ที่เหนียวหนืด อย่างไรก็ตามถ้า น้ำนมดิบไม่ได้ถูกนำไปแช่เย็นโดยทันทีก็จะมี การเจริญของแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) เช่น เชื้อ *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Clostridium* และแบคทีเรียโคลิฟอร์มรวมทั้ง *Pseudomonas*, *Proteus* และอื่นๆ โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ไฮโดรไลส์แลคโตสได้เช่น *Lactococcus* spp. และ *Lactobacillus* spp. เจริญได้ในนม ผลิตรกรดมากพอที่จะลดค่า pH ของน้ำนมลงได้และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ในสภาพเช่นนี้น้ำนมจะเกิดลิ่มและมีรสเปรี้ยว ถ้าจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญด้วยก็จะเกิดการสร้างแก๊ส ย่อยสลายโปรตีนและไขมัน⁴

4.6.2 จุลินทรีย์ในน้ำนมพาสเจอร์ไรส์

น้ำนมดิบจะถูกนำมาพาสเจอร์ไรส์จำหน่ายในรูปน้ำนมชนิดเหลว แบคทีเรียที่ทนความร้อน (thermoduric bacteria) ได้แก่ เชื้อ *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* บางชนิด *Streptococcus*, *Corynebacterium* สปอร์ของ *Bacillus* และ *Clostridium* อาจอยู่รอดได้ นอกจากนี้ น้ำนมอาจถูกปนเปื้อนหลังการพาสเจอร์ไรส์โดยแบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ น้ำนมพาสเจอร์ไรส์เก็บไว้ในตู้เย็นได้เพียงช่วงระยะเวลาหนึ่ง เหตุผลหลักก็คือจะมีการเจริญของแบคทีเรียที่ชอบความเย็นทำให้น้ำนมเสีย รูปแบบการเน่าเสียของน้ำนมพาสเจอร์ไรส์คล้ายกับการเน่าเสียของน้ำนมดิบ ตำนานด้านกลิ่นรสของนมตรวจพบเมื่อมีจำนวนแบคทีเรียสูงเท่ากับหรือมากกว่า 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การเจริญของ *Bacillus* spp. ที่ชอบความเย็น เคยพบว่าเป็นสาเหตุการเสียของน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ สปอร์ของ *Bacillus* spp. ที่ชอบความเย็นอยู่รอดได้หลังผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ งอกและเพิ่มจำนวนทำให้เกิดตำหนิด้านกลิ่นรส แบคทีเรียนี้สร้างเอนไซม์เลซิทีเนสซึ่งจะไฮโดรไลซ์ฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเม็ดไขมัน เป็นผลให้เม็ดไขมันมารวมกันเกาะติดกับผิวของภาชนะบรรจุ *Bacillus* spp. ที่ชอบความเย็นและแบคทีเรียชนิดอื่นสร้างเอนไซม์ที่คล้ายกับเอนไซม์เรนินทำให้น้ำนมเกิดลิ่ม (sweet curdling) ในสภาพที่มี pH สูงกว่า pH ในสภาพที่จะเกิดลิ่มเมื่อน้ำนมมีกรดมากขึ้น (acid curdling) ⁴

น้ำนมยูเอชที (ultrahigh temperature-treated (UHT) milk) ซึ่งผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 150°C ภายในระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้นเพียง 2-3 วินาที เป็นผลิตภัณฑ์ปราศจากเชื้อที่ผ่านความร้อนทางการค้า (commercially sterile product) ซึ่งอาจพบเพียงสปอร์ของแบคทีเรียที่ชอบความร้อน (thermophilic bacteria) ที่จะรอดชีวิต ถ้าเก็บน้ำนมยูเอชทีไว้ที่อุณหภูมิห้องจะไม่เกิดการเน่าเสียได้ง่าย ยกเว้นที่อุณหภูมิสูง 40°C หรือสูงกว่าอาจเกิดการเน่าเสียได้⁴

4.6.3 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์นมชนิดอื่นๆ

น้ำนมระเหยน้ำ (evaporated milk) และนมข้นหวาน (sweeten condensed milk) อาจเสียได้โดยจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะต้องผ่านความร้อนอย่างเพียงพอเพื่อทำลายเซลล์ร่างกายของจุลินทรีย์รวมทั้งสปอร์ของเชื้อราและแบคทีเรีย น้ำนมระเหยน้ำประกอบด้วยไขมันนมร้อยละ 7.5 และของแข็งทั้งหมดร้อยละ 25 มักจะบรรจุกระป๋องและผ่านการสเตอริไลซ์ทางการค้า (commercial sterility) ภายใต้สภาวะการแปรรูปเหมาะสม เฉพาะสปอร์ของแบคทีเรียที่ชอบความร้อนสามารถรอดชีวิตได้ แต่ถ้าหากนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูงเท่ากับ 43°C หรือสูงกว่า สปอร์ของแบคทีเรียนี้อาจงอกและเจริญต่อไปได้ ภายใต้สภาวะเช่นนี้ *Bacillus coagulans* อาจเป็นสาเหตุทำให้น้ำนมเกิดการจับก้อนเป็นลิ่ม สำหรับนมข้นหวานเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย ไขมันร้อยละ 8.5 ของแข็งทั้งหมดร้อยละ 28 และน้ำตาลซูโครสร้อยละ 42 นมข้นหวานมีค่า a_w ต่ำจึงมักจะ

เน่าเสียโดยการเจริญของ osmophilic yeast เช่น *Torula* spp. ทำให้เกิดการสร้างแก๊ส ถ้าภาชนะบรรจุมี headspace และออกซิเจนเพียงพอ เชื้อราเช่น *Penicillium* และ *Aspergillus* อาจเจริญที่ผิว⁴

เนย (butter) ประกอบด้วยไขมันนมร้อยละ 80 อาจเติมเกลือหรือไม่ก็ได้ คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนยขึ้นอยู่กับคุณภาพของครีมและสภาวะในการผลิตและการเจริญของแบคทีเรีย (*Pseudomonas* spp.) ยีสต์ (*Candida* spp.) และเชื้อรา (*Geotrichum candidum*) ที่ผิวของเนย เป็นสาเหตุของการเกิดตำหนิด้านกลิ่นรสของเนยเช่น อาจเกิดกลิ่นเหม็น กลิ่นหืนหรือกลิ่นคาวปลา และสีที่ผิวของก้อนเนยเปลี่ยนไป ในเนยที่ไม่ได้เติมเกลือ อาจพบแบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Enterococcus* และ *Pseudomonas* เจริญใน water phase ซึ่งมีสารอาหารจากน้ำนมทำให้เกิดตำหนิด้านกลิ่นรสของเนย⁴

4.7 จุลินทรีย์ในอาหารหมักและผลิตภัณฑ์ (ที่ไม่ใช้นม) (Nondairy fermented foods and products)

4.7.1 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

ความหลากหลายของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ทำให้มีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่เชื้อจุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมักคือ แบคทีเรียกรดแลคติกและอาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องด้วย เช่น ยีสต์ โดยปกติไส้กรอกหมักที่ไม่ได้ผ่านความร้อนจะมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกประมาณ 10^8 - 10^9 เซลล์ต่อกรัม และ micrococci ประมาณ 10^5 - 10^7 เซลล์ต่อกรัม ส่วนในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านความร้อนจะมีแบคทีเรียกรด แลคติกในช่วง 10^2 - 6.5×10^6 เซลล์และจุลินทรีย์ที่ย่อยไขมันจะพบประมาณ 1×10^7 - 2×10^7 เซลล์⁹

เนื้อมักทำเป็นไส้กรอกหลายชนิด จะต้องมีการเติมเกลือในเตรตหรือไนไตรต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างกรดแลคติกในการหมักเพื่อให้เกิดการหมักที่เหมาะสม โดยช่วยกำจัดและลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ต้องการอย่างเช่น สีแดงหรือชมพูของเนื้อมีกลิ่นแรงและลักษณะเนื้อสัมผัสมีความคงตัว มีลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ชนิดนั้นๆ การเจริญและการสร้างกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดขึ้นได้ดีที่พีเอชต่ำกว่า 6.0 ค่า a_w 0.96 เนื่องจากมีเกลือร้อยละ 2.5-3.0 โซเดียมไนไตรต์ 100 ppm และกลูโคสร้อยละ 3 เมื่อนำมายัดใส่ได้ทำให้ค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน ลดลงซึ่งจะช่วยเพิ่มกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติก²

ไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติ มักจะพบแบคทีเรียกรดแลคติกพวก *Lactobacillus* เจริญเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. alimentarius* และ *L. carvatus* มีความสำคัญในกระบวนการหมักไส้กรอกซึ่งมีการเติมชูโครสและนมผงร่วมด้วย และบ่อยครั้งที่จะใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้เป็นก้ำเชื้อซึ่งจะให้กลิ่นรสที่ดีและช่วยในการถนอมอาหาร *L. sake* และ *L. curvatus*

เจริญได้ดีที่ค่า a_w ต่ำ (0.91) โดยจะพบว่าเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียสจะพบ *L. plantarum* เจริญในไส้กรอกหมักที่หมักตามธรรมชาติ⁹ ส่วนจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ชอบความเย็นและสามารถสร้างกรดแลคติกได้ เช่น *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Weissella* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่ทนเกลือได้น้อย (ยกเว้น *Weissella nalotolerans*) หรือเจริญเติบโตได้ไม่ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส เช่น *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus*² ส่วน *Leuconostoc* spp. และ *Lactobacilli* ที่อยู่ในกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) จะพบปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 10 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่มีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่เป็นที่ต้องการเนื่องจากสามารถสร้างก๊าซเปอรอกไซด์และเมือกได้ *L. plantarum* บางไบโโอบีสามารถปรับตัวให้เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำและมีบทบาทในอาหารทะเล นอกจากนี้ *Lactobacillus* บางชนิดที่อยู่ในกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ เช่น *L. viridescens* ทำให้เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เน่าเสียโดยเปลี่ยนเป็นสีเขียว⁹ ในการหมักด้วยวิธีดั้งเดิมส่วนใหญ่ใช้ในเตรตเป็นสาร curing agent และพบจุลินทรีย์พวก nitrate-reducing micrococci ได้แก่ *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus* หรือ *S. piscifermentans* ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไนเตรตเป็นไนไตรต์ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสีที่เหมาะสม และมีความปลอดภัยโดยจะช่วยยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum* เนื่องจากการปล่อยให้เกิดการหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติทำให้โอกาสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมมีน้อย ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอกหมักส่วนใหญ่จึงนิยมเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงลงไป²

4.7.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มได้แก่ ไส้กรอกอีสาน แหนม ปลาร้า เป็นต้น ผ่านกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก โดยไม่มีการควบคุมคุณภาพการหมักจากการใช้กล้ำเชื้อแบคทีเรีย แต่ในระยะหลังได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อนำกล้ำเชื้อไปใช้ในการผลิตอาหารหลายชนิดรวมถึงในกลุ่มอาหารหมักพื้นเมือง^{10, 11} ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกลำเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกล้ำเชื้อสำหรับพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพในเช่น ไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติมักพบแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* เจริญเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. alimentarius* และ *L. curvatus* ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการหมักไส้กรอกที่มีการเติมชูโครสและนมผงร่วมด้วยและบ่อยครั้งที่จะใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้เป็นกล้ำเชื้อซึ่งจะให้กลิ่นรสที่ดีและช่วยในการถนอมอาหาร โดย *L. sake* และ *L. curvatus* เจริญได้ดีที่ค่า a_w ต่ำ โดยจะพบว่าเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส พบ *L. plantarum* เจริญ

ในไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติ⁹ ในการหมักด้วยวิธีดั้งเดิม ส่วนใหญ่จะใช้ในเตรทเป็นสาร curing agent และพบจุลินทรีย์พวก nitrate-reducing micrococci ได้แก่ *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus xylosus* หรือ *Staphylococcus piscifermentans* ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพดีเหมาะสม และมีความปลอดภัยโดยจะช่วยยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum* เนื่องจากการปล่อยให้เกิดการหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติทำให้อากาศที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมมีน้อย ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอกหมักส่วนใหญ่จึงนิยมเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียลงไป²

4.7.3 กล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการหมักเนื้อ

Hammes และคณะ¹¹ ได้ให้นิยามของกล้ำเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเนื้อว่าเป็นจุลินทรีย์ ซึ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์ในระยะพักตัวซึ่งจะพัฒนากิจกรรมเมแทบอลิก (metabolic activity) ที่ต้องการในเนื้อ ตามหลักเกณฑ์ในการเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นกล้ำเชื้อที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศและเป็นพวกที่หมักคาร์โบไฮเดรตให้เกิดสารประกอบหลายชนิด (facultatively heterofermentative) ซึ่งสายพันธุ์นี้จะผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลเฮกโซส เช่นกลูโคสและแลคโตส เนื่องจากผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์เมแทบอลิกจากวิถีไกลโคลิซิส (glycolysis) เนื่องจากกลูโคสที่อยู่ในเนื้อไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดแลคติกซึ่งจะทำให้พีเอชลดลงอย่างเห็นได้ชัดจึงต้องมีการเติมกลูโคสลงไปร้อยละ 0.4 ถึง 0.7 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักในส่วนผสมของไส้กรอก สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักน้ำตาลแลคโตสได้ เช่น *Lactobacillus sakei* ซึ่งแลคโตสอาจถูกใช้ไปร้อยละ 0.5 ถึง 1.0 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกไม่ทุกสายพันธุ์จะสามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้อย่างง่ายและโดยเฉพาะจุลินทรีย์โพรไบโอติกบางชนิด เช่น *Lactobacillus rhamnosus* GG ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ ดังนั้นต้องคำนึงถึงสมบัติของกล้ำเชื้อก่อนนำมาใช้ประโยชน์ กล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้หมักเนื้อจะผลิตทั้งกรดแลคติกและกรดอะซิติกจากการหมักน้ำตาลเพนโตส เช่น อะราบินอส (arabinose) และไซโลส (xylose) ผ่านวิถี 6 - phosphogluconate / phosphoketolase ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกที่กล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นมีปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาณกรดแลคติกที่กล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตได้ ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในทางการค้าที่ใช้ในการหมักเนื้อ ได้แก่ *Lactobacillus casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus*¹²

เอกสารอ้างอิง

1. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.
2. Marshall, D.L., Bal' A, M.F.A. 2001. Microbiology of meat, pp. 149-169. In: Hui, Y. H., Nip, W.K., Roger, R.W. , Young, O.A. (Eds.). Advances in Meat Science and Applications. Marcel Dekker, New York.
3. Davidson, C.M., Dowdell, M.J., Board, R.G. 1973. Properties of gram negative aerobes isolated from meats. Journal of Food Science. 38: 303-305.
4. Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology, 3rd ed. CRC Press., Boca Raton, Florida.
5. Mandrell, R.E., Gorski, L., Brandl, M.T. 2006. Attachment of microorganisms to fresh produce, pp. 33-73. In: Sapers, G.M., Gorny, J.R., Yousef, A.E. (Eds.) Microbiology of Fruits and Vegetables. Taylor & Francis Group, LLC., Boca Raton, Florida.
5. Gorny, J. 2006. Microbial contamination of fresh fruits and vegetables, pp. 3-32. In: Sapers, G.M., Gorny, J.R. , Yousef, A.E. (Eds.). Microbiology of Fruits and Vegetables. Taylor & Francis Group, LLC., Boca Raton, Florida.
6. Adams, M.R., Moss, M.O. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.
7. Banwart, G.J. 1989. Basic Food Microbiology. Van Nostrand Reinhold, New York.
8. Splittstoesser, D.F. 1987. Fruits and fruit products, pp. 101-128. In: Beuchat, L.R. (Ed.). Food and Beverage Mycology. Van Nostand Reinhold, New York.
9. Kröckel, L. 1995. Bacteria fermentation of meats. In G. Campbell-Platt, & P.E. Cook, Advances in fermented meats (pp. 69-101). Great Britain: Blackie Academic and Professional.
10. De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. UK: Blackie Academic & Professional.
11. Hammes, W.P., Bantleon, A. and Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. FEMS Microbiology Letters. 87: 165-173.
12. Työppönen, S., Petaja, E. and Sandholm, T.M. 2003. "Bioprotectives and probiotics for dry sausages." International Journal of Food Microbiology. 83: 233-244.

บทที่ 5

การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารโดยวิธีทางกายภาพ

การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ มีจุดประสงค์เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในอาหารได้แก่ จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ประโยชน์ของการควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารได้แก่ ลดการสูญเสียของอาหารและทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เมื่อใดก็ตามที่จุลินทรีย์เผชิญกับสภาวะเครียดเกินกว่าที่จุลินทรีย์จะทนได้ เซลล์ก็จะเกิดการเสียหาย การเจริญของจุลินทรีย์อาจถูกยับยั้ง ถ้าเซลล์เผชิญกับสภาวะเครียดที่รุนแรงเซลล์ก็อาจถูกทำลายได้ การเน่าเสียของอาหารอาจป้องกันได้โดยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การทำลายเซลล์จุลินทรีย์ หรือการขจัดจุลินทรีย์ออกจากอาหารด้วยวิธีกล¹

วิธีทางกายภาพในการถนอมอาหารคือ การใช้กระบวนการทางกายภาพในการยับยั้งทำลายหรือขจัดจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกไป โดยที่ไม่มีการเติมสารยับยั้งหรือผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น วิธีทางกายภาพในการควบคุมจุลินทรีย์มีดังนี้

5.1 การใช้อุณหภูมิต่ำในการถนอมอาหาร

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสภาพแวดล้อมปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อจุลินทรีย์มากที่สุด เนื่องจากมีอิทธิพลต่อการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ กิจกรรมภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ถูกทำให้ช้าลงได้โดยการลดอุณหภูมิของอาหารให้ต่ำลงเหนือจุดเยือกแข็ง กิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์จะหยุดชะงักเมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ดังนั้นการนำอาหารไปแช่เย็นหรือแช่แข็งจึงช่วยในการถนอมอาหารได้ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะว่าอัตราเร็วของกิจกรรมเมแทบอลิซึมทั้งหมดภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้นขึ้นอยู่กับการอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาก็จะเพิ่มขึ้นและเช่นเดียวกัน ถ้ายิ่งลดอุณหภูมิต่ำลงมากเท่าใดอัตราเร็วของปฏิกิริยาภายในเซลล์ก็จะลดลงมากเท่านั้น² ดังนั้นจึงอาจคาดคะเนได้ว่า การแช่แข็งเป็นวิธีที่ดีที่สุดในการถนอมอาหารทุกชนิดแต่อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งอาจทำให้อาหารเสื่อมคุณภาพได้เช่นกันโดยจะทำให้เนื้อเยื่อของอาหารถูกทำลาย ในอาหารบางชนิดการทำลายเนื้อเยื่อของอาหารไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเช่น นำอาหารบางชนิดไปแช่เย็นอาหารอาจเป็นสาเหตุทำให้เนื้อเยื่อของอาหารเกิดการเสียหาย ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเก็บอาหารจึงขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารด้วย²

5.1.1 การเก็บรักษาอาหารในสภาพแช่เย็น

โดยทั่วไปการแช่เย็น (cool storage หรือ chill storage) หมายถึงการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงกว่าการแช่แข็งคือตั้งแต่ 16°C ต่ำลงมาถึง -2°C ปกติน้ำบริสุทธิ์แข็งตัวที่อุณหภูมิ 0°C แต่อาหารส่วนใหญ่ยังคงไม่แข็งจนกระทั่งอุณหภูมิต่ำลงถึงประมาณ -2°C หรือต่ำกว่านั้น แต่ปกติการแช่เย็นจะหมายถึงการแช่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°C จุลินทรีย์ประเภทที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) ไม่สามารถเจริญได้จึงไม่เป็นปัญหาในอาหารแช่เย็น แต่จุลินทรีย์มีไซโพลบางชนิดที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำด้วยจึงสามารถเจริญได้ในอาหารแช่เย็น อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้คือ $25-30^{\circ}\text{C}$ และการเจริญจะลดลงที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 10°C ดังนั้นจุลินทรีย์หลักที่เกี่ยวข้องคือ จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเจริญช้าลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง จุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นพวกไซโครไฟล์ (psychrophile) สามารถก่อให้เกิดโรคได้ และจุลินทรีย์ที่ก่อโรคนี้ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 1.7°C ดังนั้นจึงควรเก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 1.7°C ^{1,3}

อย่างไรก็ตาม ควรตระหนักว่าผักผลไม้สดหลายชนิดอาจเกิด chilling injury ได้ถ้าหากเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิวิกฤต (ต่ำกว่า $4-12^{\circ}\text{C}$) ระยะเวลาที่อาหารจะเก็บได้ในตู้เย็นจะขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร เนื่องจากอาหารแต่ละชนิดมีคุณลักษณะต่างกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บอาหารแต่ละชนิดจึงต่างกัน สารเคมีในอาหารมีอิทธิพลต่ออายุการเก็บรักษาของอาหารที่อุณหภูมิต่ำ อาหารบางชนิดเช่น ขนมน้ำแข็ง ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิต่ำที่แช่แข็งแทนที่จะแช่เย็น ขนมน้ำแข็ง แครกเกอร์และคุกกี้มีแนวโน้มที่จะไม่กรอบถ้าแช่เย็นซึ่งเนื่องมาจากความชื้นในตู้เย็น การตกตะกอนของน้ำตาลในมาร์ชมาโล (marshmallow) เกิดขึ้นเมื่อแช่เย็นในตู้เย็น เมื่อจะเอาอาหารไปแช่เย็น ควรห่ออย่างเหมาะสมเพื่อป้องกันความชื้นและเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงกลิ่น ^{1,3} การแช่เย็นอาหารชนิดต่าง ๆ มีดังนี้

5.1.1.1 เนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์ควรแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 3°C หรือให้ใกล้เคียง -2°C มากเท่าที่จะทำได้เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และเพื่อชะลอการการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เนื้อสัตว์ควรทำให้เย็นเร็วที่สุดหลังจากฆ่า อัตราการทำให้เย็นไม่เพียงแต่ขึ้นกับอุณหภูมิของห้องเย็นเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับขนาดของห้องเย็น ความจุความร้อน ปริมาณไขมันที่ปกคลุมชิ้นเนื้อ และความเร็วของอากาศที่หมุนเวียนในห้อง ¹

5.1.1.2 เนื้อสัตว์ชิ้นเล็ก

เนื้อหมู เนื้อลูกวัวและเนื้อจากวัวตัวเล็ก จะใช้เวลาในการทำให้เย็นประมาณ $1/3$ ถึง $1/2$ ของเวลาที่ใช้ในการทำให้เนื้อวัวชิ้นใหญ่เย็นลง การเพิ่มความเร็วของอากาศจะช่วยลดเวลาในการทำให้เย็นลงแต่อาจทำให้เนื้อหดตัวได้เพราะสูญเสียความชื้น ความชื้นที่สูงจะช่วยลดการหดตัวแต่จะเร่ง

การเจริญของจุลินทรีย์ที่ผิว สำหรับชิ้นเนื้อวักปอกตีหมักบ่มที่อุณหภูมิ 16°C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง เพื่อช่วยเพิ่มความนุ่ม การใช้แสง UV ช่วยเพิ่มอุณหภูมิของห้องเป็นการเร่งให้เนื้อนุ่มเร็ว นอกจากนี้ การใช้แสง UV และโอโซนช่วยชะลอการเจริญของจุลินทรีย์

การบรรจุเนื้อในสภาพสุญญากาศ มีแนวโน้มที่จะช่วยลดการหดตัว ลดการเปลี่ยนสีและช่วยชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ การที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำและมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์สูงในภาชนะบรรจุช่วยยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* ซึ่งเป็นสาเหตุการเสียของเนื้อแช่แข็ง เนื้อที่บรรจุจำหน่ายในห้างสรรพสินค้ามีอายุการเก็บ 3 วัน เนื้อแช่เย็นที่เก็บที่อุณหภูมิ $2.2-4.4^{\circ}\text{C}$ รวมทั้งเนื้อบด ตับบด และเนื้อไก่บดไม่ควรเก็บนานกว่า 2 วัน ถ้าจะเก็บไว้นานควรแช่แข็ง¹

5.1.1.3 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม (cured meat products)

จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำถูกยับยั้งโดย curing salts ดังนั้นผลิตภัณฑ์ชนิดนี้จึงค่อนข้างที่จะคงตัวกว่าเนื้อสดที่เก็บในตู้เย็น และเนื้อประเภทนี้มักผ่านการพาสเจอร์ไรส์มาก่อน ซึ่งช่วยเพิ่มความคงตัว การบรรจุในสภาพสุญญากาศช่วยป้องกันการเปลี่ยนสีและช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศและเชื้อรา¹

5.1.1.4 เนื้อสัตว์ปีก

อายุการเก็บของชิ้นเนื้อสัตว์ปีกขึ้นกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ผิว หลังจากฆ่าตัดแต่งจะต้องขจัดความร้อนออกโดยเร็วที่สุดโดยการแช่เย็นอย่างต่อเนื่อง (continuous immersion chilling) การแช่เย็นแบบสเปรย์หรือ air chilling เนื้อสัตว์ปีกที่บรรจุไว้เพื่อการจำหน่ายถ้าหากเก็บไว้ที่ -2°C จะเก็บได้ 1 สัปดาห์ แต่ถ้าเก็บที่ $1.7-4.4^{\circ}\text{C}$ จะเก็บไว้ได้เพียง 1-2 วัน เนื้อสัตว์ปีกเสีียง่ายกว่าเนื้อหมูและเนื้อวัวอาจเป็นเพราะอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของเนื้อสัตว์ปีกมากกว่า นอกจากนี้วิธีการฆ่าและการตัดแต่งอาจเป็นผลให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชอบความเย็นที่ทำให้เน่าเสีย¹

5.1.1.5 ไข่ทั้งเปลือก

ทันทีที่ไข่ไก่วางไข่คุณภาพจะลดลง การใช้อุณหภูมิต่ำ การทรีตเมนต์เปลือกไข่ (shell treatment) การควบคุมอุณหภูมิ (thermal stabilization) การปิดกล่อง การควบคุมความชื้นและกรรมวิธีอื่น ๆ ช่วยรักษาคุณภาพของไข่ เมื่อเก็บไข่ไว้ที่อุณหภูมิ -1.1°C อัตราการสูญเสียความชื้น ปริมาณการสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์และอัตราการเปลี่ยนแปลงทางเคมีจะลดลง นอกจากนี้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะช้าลง ไข่ต้มสุกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10°C ได้เป็นเวลา 30 วัน แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $25-35^{\circ}\text{C}$ จะเก็บไว้ได้เป็นเวลาเพียง 2-3 วัน¹

5.1.1.6 ผลิตภัณฑ์จากไข่

ไข่แดงและไข่ทั้งฟองต้องทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิ 4.4°C ภายในเวลาน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.5 ชั่วโมง หลังจากเอาเปลือกไข่ออกควรเก็บไข่ขาวไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เก็บไข่แดงได้เนื่องจากในไข่ขาวมีสารยับยั้งและมีปริมาณสารอาหารน้อยกว่า สำหรับไข่เหลวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $0-5^{\circ}\text{C}$

ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยที่มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์เล็กน้อย แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10°C หรือสูงกว่านี้จำนวนจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นมาก¹

5.1.1.7 นมและผลิตภัณฑ์นม

น้ำนมดิบควรเก็บใกล้อุณหภูมิ 0°C แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 3.3°C แบบที่เรียวยโคลิฟอร์มมีแนวโน้มลดลง และถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7.2°C จุลินทรีย์ไฮโครโทรฟจะเพิ่มขึ้น 10 เท่า แบคทีเรียแกรมลบที่พบในน้ำนมดิบได้แก่ *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* รวมทั้งจุลินทรีย์ในวงศ์ Enterobacteriaceae ควรเก็บน้ำนมพาสเจอร์ไรส์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 5°C เพื่อให้มีอายุการเก็บยาวนาน¹

บัตเตอร์มิลค์ โยเกิร์ต เนยแข็งคอตเตจ (cottage cheese) และเนยแข็งชนิดอ่อน (soft cheese) ควรแช่เย็นทันทีหลังผลิตให้มีอุณหภูมิลดลงถึงใกล้ 0°C เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 0°C จะมีอายุการเก็บเป็นเวลานานกว่าหรือเท่ากับ 1 สัปดาห์ แต่ถ้าหากวางซ้อนกันมากผลิตภัณฑ์ที่อยู่ด้านบนอาจมีอุณหภูมิ 5°C หรืออาจสูงถึง 10°C ทำให้มีอายุการเก็บสั้นลง¹

ผลิตภัณฑ์นมบางชนิดเช่น เนยแข็งชนิดแข็ง (hard cheese) อาจเก็บไว้ในตู้เย็นได้เป็นเวลานานหลายเดือน แต่ที่ผิวอาจมีเชื้อราขึ้นได้ การเจริญของเชื้อราไม่เป็นที่ต้องการเนื่องจากทำให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติทันทีในบริเวณที่เชื้อราเจริญและยังมีโอกาสที่เชื้อราจะสร้างสารพิษอีกด้วย¹

5.1.1.8 ผลิตภัณฑ์ประมง

ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เน่าเสียง่ายมาก ดังนั้นต้องทำให้เย็นทันทีและเก็บที่อุณหภูมิต่ำจนกว่าจะรับประทานหรือผ่านการแปรรูปขั้นต่อไป วิธีการทำให้เย็นได้แก่ การใช้น้ำแข็ง การใช้น้ำทะเลแช่เย็น การใช้อากาศเย็นและ cryogenic gas หรือ cryogenic liquids¹

ปลาเสียเร็วมากที่อุณหภูมิ $15-20^{\circ}\text{C}$ แต่ถ้าลดอุณหภูมิต่ำถึง 0°C จะยืดอายุการเก็บได้นานขึ้น การลดอุณหภูมิจาก 10°C เหลือ 0°C จะช่วยยืดอายุการเก็บได้ 5-6 เท่า การใช้คาร์บอนไดออกไซด์ช่วยยืดอายุการเก็บได้เช่นกัน การบรรจุในสภาพสุญญากาศช่วยยืดอายุการเก็บได้เพราะช่วยชะลอการเกิด oxidative rancidity ของไขมันและน้ำมันในปลา กุ้งสดในเรือควรเก็บในน้ำแข็ง¹

5.1.1.9 ผักและผลไม้

ผักและผลไม้เกิดการสูญเสียมากในระหว่างการขนส่งและการขายปลีก การสูญเสียนี้เกิดจากปฏิกิริยาทางเคมี กิจกรรมของเอนไซม์และจุลินทรีย์เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสีย เพื่อที่จะลดหรือควบคุมการเน่าเสียจำเป็นต้องลดความร้อนจากแปลงเพาะปลูก ทันทีที่เก็บเกี่ยวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ¹

การจัดความเย็นนี้ทำได้ 2 วิธีคือ 1) วิธี hydrocooling ใช้ได้ทั้งผักและผลไม้ ระบบนี้จะฉีดน้ำเย็นเหนือผักผลไม้สดเพื่อลดอุณหภูมิด้วยอัตราที่เร็วมาก น้ำที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นจะหมุนเวียนผ่าน

น้ำแข็งหรือตู้เย็นเพื่อทำให้น้ำเย็นลงอีกครั้งก่อนที่จะฉีด บางกรณีผักและผลไม้ที่ผ่านการขจัดความร้อนด้วยวิธีนี้จะเกิดการเน่าเสียมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการขจัดความร้อน การเติมคลอรีนลงในน้ำจะช่วยควบคุมจุลินทรีย์ในน้ำและที่ผิวของผักและผลไม้ 2) วิธี vacuum cooling วิธีนี้ใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมาก ระบบนี้จะทำงานคล้ายกับเหงื่อที่ออกจากผิวหนังของคน เมื่อน้ำระเหยออกจากผิวของผักผลไม้จะทำให้ผักผลไม้มีอุณหภูมิลดต่ำลง ดังนั้นเพื่อที่จะป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากผักและผลไม้จึงจำเป็นต้องฉีดน้ำลงไปก่อน จากนั้นจึงใช้ระบบสุญญากาศช่วยในการระเหยน้ำที่ฉีดลงไปซึ่งเป็นการทำให้อุณหภูมิผักผลไม้เย็นลง ปริมาณความเย็นที่ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณน้ำที่ระเหยไป ผักชนิดที่ใช้วิธีนี้ได้ผลดีคือ ผักกาดหอม ผักโขมและกะหล่ำปลี¹

ผลของอุณหภูมิต่ำต่อจุลินทรีย์

ผลของอุณหภูมิต่ำต่อจุลินทรีย์ใด ๆ ขึ้นแปรขึ้นกับสถานะภาพทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ ณ เวลาที่จุลินทรีย์เผชิญกับอุณหภูมิต่ำนั้น องค์ประกอบของอาหารและอุณหภูมิก่อนที่การทำให้เย็นจะเริ่มขึ้นมีผลต่อสถานะภาพทางสรีรวิทยานี้ อัตราการทำให้เย็นจะเป็นสิ่งที่กำหนดว่าจุลินทรีย์จะปรับตัวต่ออุณหภูมิต่ำนั้นหรือไม่

ถ้าจุลินทรีย์สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำ จุลินทรีย์จะได้รับผลกระทบถ้าการเผชิญอุณหภูมิต่ำนั้นเป็นผลให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพ cold shock (การเผชิญกับสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำอย่างกะทันหัน) ถ้าสภาพ cold shock เกิดขึ้นโดยเฉฉาจากจุลินทรีย์เข้ากับน้ำเย็นปริมาณมาก แนนอนเซลล์อาจแตกและตายได้ แต่ถ้าลดอุณหภูมิแบบไม่รวดเร็วเช่น การย้ายพลาสติกหรือหลอดทดลองที่มีเชื้อเจริญอยู่จากอ่างน้ำอุ่นไปยังอ่างน้ำเย็น หรือทำให้อาหารที่มีคุณค่าสูงที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่เย็นลงอย่างรวดเร็วจะไม่มีผลทำให้เซลล์ตาย อีกนัยหนึ่งถ้าอุณหภูมิต่ำอยู่ในช่วงที่เซลล์เจริญได้ อาจทำให้เกิด lag phase หลายชั่วโมง ดังนั้นการชักนำให้เกิด cold shock โดยการทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว อาจทำให้เซลล์มีระยะ lag phase ในจุลินทรีย์บางชนิด แต่เป็นไปได้ที่จะทำให้เซลล์ตายซึ่งเซลล์ที่ผ่าน cold shock จะต้านทานสารยับยั้งได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่าน cold shock

5.1.2 การเก็บรักษาอาหารในสภาพแช่แข็ง

อุณหภูมิต่ำสุดที่ใช้ในห้องแช่แข็งของตู้เย็นตามบ้านคือ -20°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่น้ำอิสระส่วนใหญ่ในอาหารอยู่ในสถานะของแข็ง น้ำแข็งแข็ง (อุณหภูมิ -78°C) และไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196°C) ก็สามารถใช้ในการแช่แข็งได้โดยใช้สำหรับการแช่แข็งแบบรวดเร็ว ซึ่งไม่เพียงแต่จะต้องลดอุณหภูมิให้ต่ำเพื่อการแช่แข็งเท่านั้นแต่จะต้องรักษาอุณหภูมิต่ำให้อาหารแช่แข็งมีอุณหภูมิระหว่าง -20 ถึง -30°C ด้วย การที่จะเก็บรักษาอาหารแช่แข็งไว้ได้นานเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารซึ่งอาจเก็บได้ไว้นานหลายเดือนหรืออาจนานกว่า 1 ปี ผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ ปลา ผลิตภัณฑ์แปรรูปและ

ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำให้สุกแล้ว (รับประทานได้ทันทีหลังจากละลายน้ำแข็งและทำให้อุ่น) สามารถเก็บถนอมไว้ได้โดยการแช่แข็ง⁴

5.1.2.1 กรรมวิธีการผลิตอาหารแช่แข็ง

การแช่แข็งเป็น unit operation ที่อุณหภูมิของอาหารจะถูกทำให้ลดลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง น้ำจะถูกเปลี่ยนสถานะเป็นผลึกน้ำแข็ง การถนอมอาหารด้วยวิธีนี้จะต้องใช้หลาย ๆ กระบวนการร่วมกัน เช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ การลดค่า a_w และในการผลิตอาหารแช่แข็งบางชนิดจะต้องทำการ pre-treatment โดยการลวก (blanching) เมื่ออาหารผ่านกรรมวิธีการแช่แข็งและการเก็บรักษาที่ถูกต้องจะมีการเปลี่ยนแปลงคุณค่าของสารอาหารและคุณภาพทางประสาทสัมผัสเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อาหารที่จะทำการแช่แข็งจะต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมเสียก่อน กลุ่มของอาหารแช่แข็งหลัก ๆ ที่มีการผลิตขึ้นจำหน่ายมีดังนี้⁵

- 1) ผลไม้ เช่น สตรอเบอร์รี่ ราสเบอร์รี่ และอื่น ๆ ทั้งผลหรือในรูปบด หรือน้ำผลไม้เข้มข้น
- 2) ผัก เช่น ถั่ว ถั่วลันเตา ข้าวโพดหวาน ผักโขม ผักงอกและมันฝรั่ง
- 3) ซีนปลาและอาหารทะเล เช่น เนื้อปลานชนิดต่างๆ กุ้ง และปู รวมทั้งปลาสดหรืออาหารปรุงสำเร็จที่บรรจุซองไว้ด้วย
- 4) เนื้อสัตว์ เช่น เนื้อวัว เนื้อแกะและเนื้อสัตว์ปีกทั้งตัวหรือตัดเป็นก้อนและในรูปผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น ไส้กรอก เบอร์เกอร์เนื้อวัวและสเต็ก
- 5) ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เช่น ขนมปัง เค้ก ผลไม้และพายเนื้อ (meat pie)
- 6) อาหารปรุงสำเร็จ เช่น พิซซ่า ขนมหวาน ไอศกรีมและอาหารชุบปรุงสำเร็จที่ทำให้สุกแล้ว

ก) การเตรียมอาหารสำหรับการแช่แข็ง

การเตรียมผักสำหรับการแช่แข็งจะต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ก่อนได้แก่ การคัดเลือกผักและการหาตำหนิ การทำความสะอาด การลวก และการบรรจุก่อนที่จะแช่แข็ง เมื่อตรวจพบการเน่าเสียของอาหาร ควรขจัดออกจากกระบวนการแช่แข็งอาหารทันที เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก อาหารทะเล ไข่ และอาหารอื่น ๆ ควรสดมากเท่าที่จะเป็นไปได้²

การลวกทำได้โดยจุ่มอาหารลงในน้ำร้อนหรือใช้น้ำโดยมีจุดประสงค์เพื่อ 1) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงที่ไม่พึงประสงค์ในระหว่างการเก็บรักษาอาหารแช่แข็ง 2) การเพิ่มหรือรักษาสีเขียวของผักให้คงอยู่ 3) ลดจำนวนจุลินทรีย์ในอาหาร 4) ทำให้บรรจุผักได้ง่ายเนื่องจากผักจะอ่อนตัวลง 5) เป็นการแทนที่อากาศที่ถูกจับอยู่ในเนื้อเยื่อพืช²

วิธีการลวกขึ้นอยู่กับขนาดของผัก ชนิดของผักและปัจจัยอื่นๆ เมื่อมีการใช้น้ำควรป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียสะสมเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งปนเปื้อนอาหาร มีรายงานว่า การลวกทำให้จุลินทรีย์ลดลงได้มากถึงร้อยละ 99 แบคทีเรียส่วนใหญ่ถูกทำลายที่อุณหภูมิของการพาสเจอร์ไรส์นม (145°F หรือ 62.3°C เป็นเวลา 30 นาที) รวมทั้งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่สำคัญต่อการเสียของผักก็ถูกทำลายด้วย

ถึงแม้ว่าจุดประสงค์หลักของการลวกไม่ได้เพื่อทำลายจุลินทรีย์ แต่ปริมาณความร้อนที่ใช้ในการทำลายเอนไซม์ก็เพียงพอที่จะลดจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ด้วย²

ข) การแช่แข็ง

ในการแช่แข็งจะต้องทำให้สารหรือสิ่งที่จะแช่แข็งมีอุณหภูมิต่ำลงจนถึงอุณหภูมิที่ทำให้น้ำและของแข็งเกิดผลึกขึ้นอย่างเต็มที่ บริเวณนี้ผลึกน้ำแข็งจะเริ่มโตขึ้น ดังนั้นจึงทำให้สารละลายที่เหลืออยู่มีความเข้มข้นสูงขึ้นซึ่งสามารถทำให้ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลง ในสารหลายชนิดสามารถวัดอุณหภูมิของจุดหลอมเหลวได้แต่ในสารอื่นอีกหลายชนิดไม่สามารถทำการวัดค่าออกมาได้ การเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นอยู่กัปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อัตราการให้ความเย็น ความเข้มข้นเริ่มต้น อุณหภูมิสุดท้ายในการทำให้เย็น และระยะเวลาที่สารอยู่ที่อุณหภูมิสุดท้ายนี้ ในผลิตภัณฑ์หลายๆ ชนิดไม่มีการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นและผลิตภัณฑ์ยังคงอยู่ในสถานะอะมอร์ฟัส (amorphous) ซึ่งเป็นสถานะที่สารจะมีรูปร่างเหมือนแก้ว (glass-like) หรือมีสถานะผสมของ 2 สถานะ⁶ ในการแช่แข็งอาหารและสารบางชนิด น้ำบางส่วนจะแข็งตัวเป็นผลึกน้ำแข็งขณะเดียวกันมีน้ำบางส่วนที่ยังไม่แข็งตัว (unfreezable water) (ตารางที่ 5.1) การแช่แข็งแบ่งได้เป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. การแช่แข็งด้วยอัตราช้า (slow freezing)

การแช่แข็งด้วยอัตราช้า เป็นการทำให้อาหารมีอุณหภูมิต่ำลงจนถึงระดับที่ต้องการภายใน 3-72 ชั่วโมง อัตราการลดอุณหภูมิของเนื้อเยื่ออาหารต่ำกว่า 1°C ต่อนาที เช่นการแช่แข็งในห้องแช่แข็งของตู้เย็น เมื่อให้ความเย็นจนน้ำในอาหารแข็งหมด พบว่าผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นภายนอกเซลล์หรือเกิดระหว่างเซลล์ ผลึกน้ำแข็งจะมีขนาดใหญ่ น้ำที่ก่อตัวเป็นผลึกน้ำแข็งส่วนใหญ่มาจากน้ำในเซลล์ของเนื้อเยื่อ หลังจากที่มีน้ำไหลออกจากเซลล์ เซลล์จะเหี่ยวและเนื้อเยื่อมีขนาดเล็กลง

2. การแช่แข็งด้วยอัตราเร็ว (quick freezing หรือ fast freezing)

การแช่แข็งด้วยอัตราเร็วเป็นการทำให้อาหารมีอุณหภูมิต่ำลงเหลือ -20°C ภายในเวลา 30 นาที² ตัวอย่างของการแช่แข็งวิธีนี้ได้แก่

2.1 การพ่นด้วยอากาศเย็น (air blast freezing) โดยใช้อุปกรณ์ blast freezers อากาศเย็นมีอุณหภูมิประมาณ -30°C ถึง -40°C หมุนเวียนอยู่เหนืออาหารด้วยความเร็ว 1.5-6.0 เมตรต่อวินาที วิธีนี้สามารถใช้ในการแช่แข็งอาหารที่มีรูปร่างและขนาดต่างๆ กัน⁵

2.2 การแช่แข็งโดยใช้อุปกรณ์ cryogenic freezers อาหารจะสัมผัสกับสารทำความเย็นโดยตรงโดยการฉีดด้วยของเหลวที่ใช้ทำความเย็น ของเหลวที่ใช้ทำความเย็นชนิดที่นิยมใช้กันมากและมีจุดเดือดที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ ได้แก่ ไนโตรเจนเหลว (มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ -196°C) คาร์บอนไดออกไซด์เหลว รวมทั้งสารไดคลอโรไดฟลูออโรมีเทน (dichlorodifluoromethane หรือ refrigerant 12 หรือ freon 12) มีรายงานว่าสารนี้ทำให้เกิด heat shock ที่น้อยกว่าสารไฮโดรเจนชนิดอื่น ซึ่งจะมีประโยชน์มากถ้าใช้กับอาหารที่ไวต่อความร้อนเช่น มะเขือเทศที่หั่นเป็นชิ้นบาง ๆ วิธีนี้จะมีการเปลี่ยน

สถานะของสารที่ใช้ทำความเย็น (refrigerant หรือ cryogen) การระเหยของของเหลวนี้จะทำให้อาหารแข็งตัวอย่างรวดเร็ว อัตราการผลิต 500-9,000 กิโลกรัมต่อชั่วโมง แต่มีข้อจำกัดคือความเสี่ยงต่อการมีสารไคโอเจนตกค้างในอาหาร หลายๆ ประเทศกำหนดให้มีสารไคโอเจนตกค้างในอาหารได้ไม่เกิน 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม⁵

2.3 การพ่นหรือจุ่มอาหารลงในของเหลวที่ทำความเย็น (liquid-immersion freezing) โดยใช้ immersion freezers อาหารที่บรรจุแล้วจะถูกลำเลียงผ่านไปยังอ่างของสารละลายแช่เย็นที่มีจุดเดือดต่ำมากได้แก่ โพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) น้ำเกลือ กลีเซอรอลหรือแคลเซียมคลอไรด์ วิธีนี้แตกต่างจาก cryogenic freezing ที่ของเหลวไม่เกิดการเปลี่ยนสถานะซึ่งยังคงเป็นของเหลวตลอดกระบวนการแช่แข็ง วิธีนี้มีอัตราการถ่ายเทความร้อนที่สูงมาก⁵

2.4 การวางอาหารบนแผ่นโลหะเย็น (plate freezing) อาจใช้ plate freezers ซึ่งประกอบด้วยชั้นของแผ่นโลหะเย็นแนวดิ่งหรือแนวนอน ภายในบรรจุสารละลายที่ทำให้แผ่นโลหะเย็นได้แก่ น้ำเกลือ แอมโมเนีย หรือสารระเหยที่มีจุดเยือกแข็งต่ำ อาหารที่เป็นชิ้นบางๆ จะถูกวางบนแผ่นโลหะแต่ละแผ่น มีการใช้ความดันเล็กน้อยเพื่อเคลื่อนแผ่นโลหะเข้าหากันจะช่วยให้อาหารกับแผ่นโลหะสัมผัสกันมากขึ้นซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทความร้อน⁵

ตารางที่ 5.1 ปริมาณของน้ำที่แข็งตัวและไม่แข็งตัวในอาหารบางชนิดที่อุณหภูมิแช่แข็งระดับต่างๆ

ชนิดของ ผลิตภัณฑ์	ปริมาณน้ำที่เกิดการแข็งตัวที่อุณหภูมิต่างๆ (ร้อยละของปริมาณน้ำทั้งหมด)				ปริมาณน้ำที่ไม่ แข็งตัว (ร้อยละของปริมาณ น้ำทั้งหมด)
	-10°C	-15°C	-20°C	-30°C	
เนื้อวัวไม่ติดมัน	82	85	87	88	12
ไส้กรอก	84	87	89	91	9
ไข่รวมเหลว	89	91	92	93	7
ไข่แดง	85	86	87	87	13
ไข่ขาว	91	93	94	-	6
ยีสต์	80	85	88	89	11
น้ำผลไม้	85	90	93	96	-
ถั่ว (peas)	80	86	89	92	-

ที่มา: Riedel⁷

การแช่แข็งแบบรวดเร็ว น้ำในเนื้อเยื่อของอาหารจะแข็งอย่างรวดเร็ว จึงทำให้น้ำในเซลล์ไม่มีโอกาสไหลออกมานอกเซลล์ ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก ๆ กระจายอยู่ในภายในเซลล์ อัตราการเกิดผลึกน้ำแข็งจะเพิ่มขึ้นถ้าเซลล์มีขนาดลดลง ขณะเดียวกันจะเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ด้วย แต่มีจำนวนน้อยกว่าเพราะน้ำภายนอกเซลล์มีปริมาณน้อย การแช่แข็งด้วยอัตราเร็วมีข้อได้เปรียบมากกว่าการแช่แข็งด้วยอัตราช้า (ตารางที่ 5.2)

ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็ง

การแช่แข็งด้วยอัตราเร็ว	การแช่แข็งด้วยอัตราช้า
1. เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก	1. เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่
2. ชัดขวางหรือยับยั้งเมแทบอลิซึม	2. ทำลายเมแทบอลิซึม
3. ผิดพลาดกับสารอาหารเข้มข้นเพียงระยะเวลานั้นๆ	3. ผิดพลาดกับสภาพที่มีสารอาหารเข้มข้นเป็นเวลายาวนานกว่า
4. จุลินทรีย์ไม่มีการปรับตัวต่ออุณหภูมิต่ำ	4. จุลินทรีย์ปรับตัวต่ออุณหภูมิต่ำที่ละน้อย
5. thermal shock (รุนแรงเพราะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิกระทันหัน)	5. ไม่มีผลของ thermal shock
6. เซลล์ของจุลินทรีย์ไม่ได้รับการป้องกัน	6. มีการสะสมตัวถูกละลายเข้มข้นภายในเซลล์ซึ่งเป็นผลดีต่อเซลล์

ที่มา: Jay และคณะ²

เมื่อพิจารณาถึงการสร้างผลึกน้ำแข็ง การแช่แข็งด้วยอัตราช้าทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ขณะที่การแช่แข็งด้วยอัตราเร็วทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็ก การโตขึ้นของผลึกน้ำแข็ง (crystal growth) เป็นปัจจัยหนึ่งที่จำกัดอายุการเก็บของอาหารแช่แข็งบางชนิด เพราะผลึกน้ำแข็งที่โตขึ้นทำให้เซลล์เสียหายจากการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์และโครงสร้างภายในของเซลล์พืชเมื่อนำอาหารมาทำให้ละลาย อาหารจะมีลักษณะเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสไม่เหมือนเดิม ดังนั้นเมื่อทำให้อาหารละลาย อาหารที่แช่แข็งด้วยอัตราช้าเมื่อละลายจะสูญเสีย น้ำ (drip) ออกมาจากเซลล์ของอาหารมากกว่าอาหารที่แช่แข็งด้วยอัตราเร็ว (คำว่า “drip” ใช้กับเนื้อสัตว์ ส่วนคำว่า “leakage” ใช้กับผัก) ข้อได้เปรียบของการสร้างผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กต่อคุณภาพของอาหารแช่แข็งพิจารณาจากสิ่งที่เกิดขึ้นเมื่ออาหารถูกแช่แข็ง²

ค) ความคงตัวของอาหารแช่แข็งระหว่างการเก็บรักษา

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 0°C หรือต่ำกว่า 0°C การเจริญของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำขึ้นขึ้นอยู่กับปริมาณสารอาหาร pH ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ค่า a_w ของอาหารจะลดลงเมื่ออุณหภูมิลดต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับค่า a_w ของน้ำและน้ำแข็งแสดงดังตารางที่ 5.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่า น้ำที่อุณหภูมิ 0°C มีค่า a_w เท่ากับ 1.0 แต่ค่า a_w จะลดลงเหลือ 0.8 ที่อุณหภูมิ -20°C และลดลงเหลือ 0.62 ที่อุณหภูมิ -50°C จุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งต้องเจริญได้ในสภาพที่มีค่า a_w ลดต่ำลง ในน้ำผลไม้เข้มข้นซึ่งมีปริมาณน้ำตาลสูง น้ำตาลมีแนวโน้มที่จะช่วยรักษาระดับ a_w ไว้ที่ระดับสูงกว่าระดับ a_w ในกรณีที่อยู่ในน้ำบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงทำให้เป็นไปได้ที่จะมีการเจริญของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง การเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ให้ผลเช่นเดียวกัน อาหารต่างชนิดกันจะแข็งตัวที่อุณหภูมิต่างกันดังตารางที่ 5.4 อุณหภูมิของการแข็งตัวเริ่มต้นของอาหารโดยส่วนใหญ่เนื่องมาจากธรรมชาติของตัวถูกละลายที่เป็นองค์ประกอบ และความเข้มข้นของตัวถูกละลายเหล่านั้นซึ่งมีสมบัติทำให้จุดเยือกแข็งลดต่ำลง²

ตารางที่ 5.3 ความดันไอของน้ำและความดันไอของน้ำแข็งที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	ความดันไอของน้ำ (mm Hg)	ความดันไอของน้ำแข็ง (mm Hg)	$a_w = \frac{P_{\text{น้ำแข็ง}}}{P_{\text{น้ำ}}}$
0	4.579	4.579	1.00
-5	3.163	3.013	0.953
-10	2.149	1.950	0.907
-15	1.436	1.241	0.864
-20	0.943	0.776	0.823
-25	0.607	0.476	0.784
-30	0.383	0.286	0.75
-40	0.142	0.097	0.68
-50	0.048	0.030	0.62

ที่มา: Jay และคณะ²

ถึงแม้ว่ากิจกรรมของจุลินทรีย์จะหยุดที่อุณหภูมิแช่แข็ง แต่ก็ไม่สามารถเก็บอาหารแช่แข็งไว้ได้ตลอดกาลโดยที่มีลักษณะเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง ระยะเวลาในการเก็บของอาหารแช่แข็งแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยได้แก่ ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่นรส สี และคุณค่าทางโภชนาการของอาหารที่ทำให้ละลายและทำให้สุกแล้ว²

อาหารบางชนิดที่เก็บในสภาพแช่แข็งถ้าห่ออย่างไม่เหมาะสมอาจทำให้เกิด freezer burn (การเกิดสีน้ำตาลของอาหารแช่แข็งเช่น หนั๋งไก่) การเกิดสีน้ำตาลนี้เป็นผลมาจากการสูญเสียน้ำที่ผิว ทำให้อาหารมีความพูนมากกว่าเริ่มต้น สภาพนี้ผันกลับไม่ได้ อาหารที่อาจเกิด freezer burn ได้ เช่น ผลไม้ สัตว์ปีก เนื้อ ปลาดิบและปลาทำให้สุกแล้ว²

ตารางที่ 5.4 อุณหภูมิของการแข็งตัวของอาหาร

ชนิดของอาหาร	Freezing temperature	
	°F	°C
ถั่วลิสง	17	-8.3
วอลนัท (walnuts)	20	-6.7
มะพร้าว	24.5	-4.4
กล้วย	25	-3.9
กระเทียม	25.5	-3.6
เนื้อลูกแกะ เนื้อลูกวัว	27	-2.8
มันฝรั่ง	28	-2.2
เนื้อวัว เนื้อปลา	28.5	-2.0
แครอท	29	-1.7
ราสเบอร์รี่	29.5	-1.4
หน่อไม้ฝรั่ง	30	-1.1
ถั่วต่างๆ	30.5	-0.9
ดอกกะหล่ำ	31	-0.6
ผักกาดหอม กะหล่ำปลี	31.5	-0.3
น้ำ	32	0.0

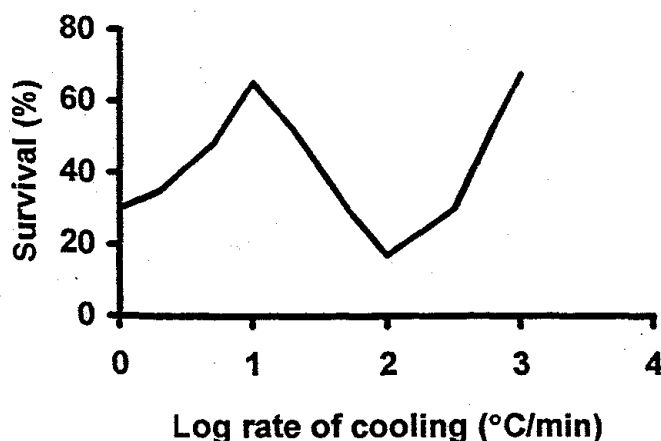
ที่มา: Jay และคณะ²

ง) ผลของการแช่แข็งต่อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ในอาหารแช่แข็งได้รับผลกระทบจากการเกิดผลึกน้ำแข็งนอกเซลล์ ผลึกน้ำแข็งในเซลล์ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกเซลล์และการแห้งของเซลล์จุลินทรีย์ จากการที่มีความแตกต่างของความดันออสโมติกระหว่าง freezing medium และ supercooled cytoplasm จะเป็นผลให้มีการเคลื่อนของน้ำออกจากเซลล์ อัตราการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์ เซลล์ขนาดเล็กจะมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูงกว่าเซลล์ขนาดใหญ่ ดังนั้นเซลล์ขนาดเล็กจึงสูญเสียน้ำออกจากเซลล์เร็วกว่า ถ้าการสูญเสียน้ำเร็วเพียงพอจะเกิดความสมดุลของความดัน

ออสโมติกระหว่างไซโทพลาสซึมและสิ่งแวดล้อม ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับการลดอุณหภูมิและน้ำภายในเซลล์จะไม่แข็งตัว ดังนั้นอัตราการทำให้เย็น 1°C ต่อนาทีหรือน้อยกว่านี้ซ้ำกันไปจะทำให้เกิดการสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ การที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ของแบคทีเรียได้จะต้องใช้อัตราการทำให้เย็นมากกว่า 10°C ต่อนาที⁸

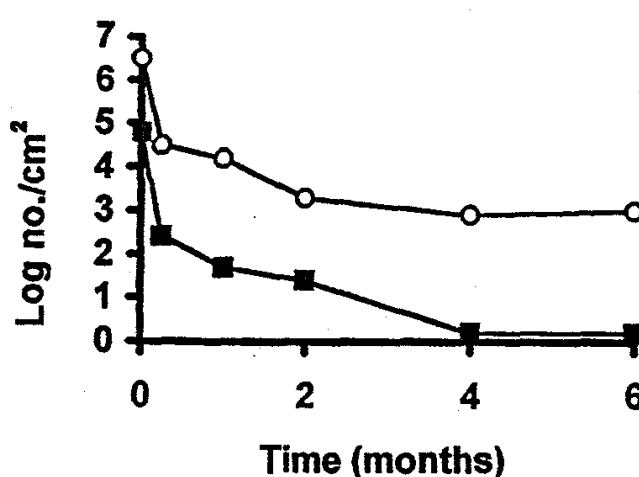
เมื่ออัตราการทำให้เย็นช้ามวลของอาหารจะถูกแช่แข็ง จุลินทรีย์บางส่วนอาจถูกดักภายในผลึกของน้ำแข็งบริสุทธิ์ แต่จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะอยู่ในน้ำส่วนที่ไม่ได้ถูกแช่แข็งซึ่งจะเผชิญกับสภาพตัวถูกละลายที่เข้มข้นขึ้น เมื่อรักษาสภาพสมดุลไว้ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในน้ำที่ยังไม่แข็งตัวจะมีความดันไอเท่ากับ ความดันไอของน้ำส่วนที่แข็งตัว อย่างไรก็ตามที่ผิวของอาหารหรือในชั้นบาง ๆ ของอาหาร การแข็งตัวของน้ำสามารถเกิดได้ด้วยอัตราที่เร็วมากเท่าที่จะรักษาสภาพสมดุลระหว่างสารละลายกับน้ำแข็งไว้ได้ ดังนั้นน้ำมีแนวโน้มที่จะแข็งในรูปของสารละลายและมีตัวถูกละลายเข้มข้นเพียงเล็กน้อยในน้ำที่ยังไม่แข็งตัว ดังนั้นการแช่แข็งด้วยอัตราช้าจุลินทรีย์จะเผชิญกับสภาพเครียดที่มีความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงเช่นเดียวกับการเผชิญต่อสภาพเครียดในระหว่างการการทำแห้ง โดยทั่วไปการอยู่รอดของจุลินทรีย์มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการทำให้เย็น (รูปที่ 5.1)⁸



รูปที่ 5.1 อัตราการทำให้เย็นต่อการอยู่รอดของ *Escherichia coli* ในน้ำแข็ง
ที่มา: Gill⁸

การแช่แข็งแบบรวดเร็วมากจะเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กภายในเซลล์ จุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะรอดชีวิตเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการทำให้เย็น ซึ่งอัตราการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในอาหารที่แช่แข็งแบบนี้จะลดลงได้ถ้าทำให้ละลายอย่างช้าๆ เนื่องจากผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์สามารถโตขึ้นได้ระหว่างการทำให้ละลาย โดยทั่วไปอัตราการทำให้ละลายมีผลน้อยต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่ถูกแช่แข็งด้วยอัตราช้า⁸

ข้อมูลจากการวิจัยได้แสดงให้เห็นว่า ในระหว่างการแช่แข็งเซลล์จุลินทรีย์มักถูกทำให้เสียหายโดย osmotic stress หรือความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่เพิ่มขึ้นมากกว่าที่จะเสียหายทางกลโดยผลึกน้ำแข็ง หลังแช่แข็งเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มลดลงต่อไปเมื่อเก็บอาหารแช่แข็งไว้ อัตราการลดลงของจำนวนเซลล์ระหว่างการเก็บอาหารแช่แข็งอาจช้ากว่าอัตราการลดลงของจำนวนเซลล์ขณะแช่แข็งมาก และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น การลดลงของจำนวนเซลล์ในอาหารแช่แข็งเกิดขึ้นช้าจนในที่สุดมีจำนวนคงที่ (รูปที่ 5.2)⁸



รูปที่ 5.2 ผลของการแช่แข็งและการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -29°C ต่อจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ต้องการอากาศ (O) และโคลิฟอร์ม (■) ในไก่วง

ที่มา: Gill⁸

แบคทีเรียมีความสามารถในการอยู่รอดได้ต่างกันระหว่างการแช่แข็ง แบคทีเรียแกรมลบรูปกลมโดยทั่วไปจะต้านทานได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน แบคทีเรียแกรมลบบาซิลโดยการแช่แข็งได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นเนื้อสดแช่แข็งมีแนวโน้มที่จะมีแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่า ในบรรดาแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* มีความต้านทานต่อการแช่แข็งน้อยกว่า *Staphylococcus aureus* รวมทั้งเซลล์ของ *Clostridium* ขณะที่เอนโดสปอร์และสปอร์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษไม่ได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิต่ำ สปอร์ของเชื้อราทนต่อการแช่แข็งได้ดีกว่าเซลล์ร่างกายและการแช่แข็งมีผลเล็กน้อยต่อเชื้อราที่ทนความเย็น จากการศึกษาผลของการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -25.5°C ต่อการรอดชีวิตของ *Salmonella* หลายสปีชีส์ พบว่ามีการลดจำนวนของ *Salmonella* ในช่วงเวลาของการแช่แข็งเป็นเวลา 270 วัน (ตารางที่ 5.5) แต่เซลล์ของ *Salmonella* จำนวนหนึ่งยังคงมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาของการแช่แข็ง²

ตารางที่ 5.5 การรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* ใน Chicken Chow Mein ที่อุณหภูมิ -25.5°C

ชนิดของแบคทีเรีย	จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ($\times 10^5$ เซลล์ต่อกรัม) หลังการเก็บรักษา (วัน)								
	0	2	5	9	14	28	50	92	270
<i>S. Newington</i>	7.5	56.0	27.0	21.7	11.1	11.1	3.2	5.0	2.2
<i>S. Typhimurium</i>	167.0	245.0	134.0	118.0	11.0	95.5	31.0	90.0	34.0
<i>S. Typhi</i>	128.5	45.5	21.8	17.3	10.6	4.5	2.6	2.3	0.86
<i>S. Gallinarum</i>	68.5	87.0	45.0	36.5	29.0	17.9	14.9	8.3	4.8
<i>S. Anatum</i>	100.0	79.0	55.0	52.5	33.5	29.4	22.6	16.2	4.2
<i>S. Paratyphi B</i>	23.0	205.0	118.0	93.0	92.0	42.8	24.3	38.8	19.0

ที่มา: Jay และคณะ²

ดังนั้นในแง่ของการถนอมอาหารจึงไม่ควรใช้การแช่แข็งเป็นวิธีการทำลายจุลินทรีย์ ชนิดของจุลินทรีย์ที่จะสูญเสียการมีชีวิตรอดในขณะแช่แข็งนั้นผันแปรขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ วิธีการแช่แข็งที่ใช้ ธรรมชาติของอาหารและองค์ประกอบของอาหาร ระยะเวลาของการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็ง และปัจจัยอื่นๆ เช่นอุณหภูมิของการแช่แข็ง จุลินทรีย์จะตายที่อุณหภูมิของการแช่แข็งสูง (อุณหภูมิตดลบน้อย) ได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิจากการแช่แข็งต่ำ (อุณหภูมิตดลบมาก) เช่น อุณหภูมิของการแช่แข็งที่ -20°C เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์น้อยกว่าที่อุณหภูมิจากการแช่แข็ง -10°C เช่นเดียวกันเซลล์ของจุลินทรีย์จะถูกทำลายที่อุณหภูมิจากการแช่แข็ง -4°C มากกว่าที่อุณหภูมิจากการแช่แข็ง -15°C หรือต่ำกว่า แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า -24°C ดูเหมือนว่าจะไม่มีผลกระทบต่อมากนัก จำนวนเซลล์ของ *Listeria monocytogenes* ในฟอสเฟตบัพเฟอร์ลดจำนวนลงเพียงเล็กน้อยเมื่อแช่แข็งและการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิจากการแช่แข็ง -198°C แต่จะลดจำนวนลงมากเมื่อแช่แข็งและเก็บรักษาที่ -18°C หรือแช่แข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวแล้วเก็บไว้ที่ -18°C นอกจากนี้ช่วงอุณหภูมิจากการแช่แข็งตั้งแต่ -2°C ถึง -10°C จะก่อให้เกิดอันตรายต่อจุลินทรีย์มากที่สุดเนื่องจากอุณหภูมินี้จะเกิดผลึกน้ำแข็งและมีกิจกรรมทางเคมีเกิดขึ้นมากและเซลล์ของจุลินทรีย์จะได้รับบาดเจ็บมากในช่วงอุณหภูมินี้^{2,8}

นอกจากนี้ถ้าสภาพของสารละลายหรืออาหารที่เซลล์แขวนลอยอยู่ยังมีความซับซ้อนมากขึ้นเท่าใดก็มีโอกาสน้อยเท่านั้นที่จุลินทรีย์จะถูกทำลายจากการแช่แข็ง มีรายงานว่าส่วนผสมอาหารเช่น ไข่ขาว น้ำตาลซูโครส น้ำเชื่อมข้าวโพด ปลา กลิเซอรอลและเนื้อสัตว์ที่ยังไม่เสียสภาพช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ผ่านการแช่แข็งโดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ และมีรายงานว่าการอยู่รอดของเซลล์จุลินทรีย์ในสารละลายเกลือจะสูงกว่าในน้ำบริสุทธิ์ การอยู่รอดในน้ำมันหรือใน

อาหารเหลวจะสูงกว่าในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ การอยู่รอดในอาหารจะสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ การมีอยู่ของสารป้องกันความเย็น (cryoprotectants) เช่น กลูโคส ซูโครส แลคโตส กลีเซอรอล ซอร์บิทอล หางนม และอื่นๆ จะช่วยส่งเสริมการทนความเย็นของจุลินทรีย์ในอาหาร อย่างไรก็ตาม สภาพความเป็นกรดทำให้อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ลดลง การมีตัวถูกละลายบางชนิด เช่น กรดแลคติกในเนื้อสดอาจช่วยเร่งให้เกิดการบาดเจ็บของจุลินทรีย์จากการแช่แข็งได้ดีขึ้นถ้ากรดแลคติกนั้นเข้มข้นอยู่ในส่วนของของเหลวขณะที่แช่แข็งอย่างช้า^{2,8}

เมื่อเซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำจะส่งผลให้ความเสถียรของโปรตีนภายในเซลล์ลดน้อยลง อันเนื่องมาจากกระบวนการต่างๆ ซึ่งได้แก่ อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์และการนำซับสเตรตเข้าสู่เซลล์ลดลง การคงรูปของเยื่อหุ้มเซลล์ลดน้อยลง การเกิดกิจกรรมของ RNA polymerase ต่ำลง และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สูงขึ้นซึ่งส่งผลให้โปรตีนภายในเซลล์เกิดการบาดเจ็บจากความดันออสโมติกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ นอกจากนี้การตายของเซลล์จุลินทรีย์ที่เกิดจากการแช่แข็งและการละลายส่วนมากมักเกิดจากความเสียหายและการเสียสภาพของ DNA เซลล์ที่เจริญในระยะ log phase บาดเจ็บได้โดยการแช่แข็งมากกว่าเซลล์ในระยะ stationary phase ได้มีผู้รายงานว่าเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* ในระยะ log phase ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารน้อยมีความไวต่อการแช่แข็งน้อยกว่าเซลล์ในระยะเดียวกันที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์ซึ่งเกี่ยวข้องกับการอดอาหารของเซลล์ นอกจากนี้เซลล์ที่ปรับตัวต่อความเย็นจะอยู่รอดในระหว่างแช่แข็งได้ดี การที่แบคทีเรียจะอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิต่ำได้นั้น แบคทีเรียจะต้องปรับตัวต่ออุณหภูมิต่ำโดยการเพิ่มการสะสมกรดไขมันอิ่มตัวและการสังเคราะห์โพลีเพปไทด์ มีผู้รายงานว่า *Enterococcus faecalis* ที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำจะมีความไวต่ออุณหภูมิของการแช่แข็งน้อยกว่าเชื้อชนิดเดียวกันที่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า และมีการรายงานการพบการสังเคราะห์ cold-shock protein (CsPs) ในจุลินทรีย์บางชนิดที่เริ่มต้นเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35-37°C จากนั้นลดอุณหภูมิสำหรับการเจริญลงถึงใกล้อุณหภูมิต่ำสุดที่จะเจริญได้ cold-shock protein เป็น RNA-binding proteins เกี่ยวข้องกับ transcription elongation และ message stability ซึ่งก็คือ RNA-chaperones ปกติมีขนาด 7 kDa พบในแบคทีเรียส่วนใหญ่ เช่น มีรายงานการพบ 12 CsPs ในเซลล์ของ *Listeria monocytogenes* ที่เริ่มต้นเพาะเลี้ยงที่ 37°C จากนั้นลดอุณหภูมิลงเหลือ 5°C ดังนั้นเซลล์ที่อดอาหารและเซลล์ที่ปรับตัวโดยการสะสม compatible solute จะต้านทานต่อการถูกทำลายด้วยอุณหภูมิแช่แข็งได้ดี^{2,8,9}

สรุป สิ่งที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ผ่านการแช่แข็งมีดังนี้²

- 1) น้ำที่ถูกแช่แข็ง เป็นน้ำอิสระ (free water) ซึ่งน้ำอิสระนี้จะกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ผลึกน้ำแข็งนี้จะค่อยๆ มีขนาดใหญ่ขึ้น ในการแช่แข็งด้วยอัตราช้าผลึกน้ำแข็งอยู่ภายนอกเซลล์ แต่ในการแช่แข็งด้วยอัตราเร็วผลึกน้ำแข็งจะอยู่ภายในเซลล์ ส่วนน้ำที่ถูกอนุภาคอาหารยึดไว้ยังไม่แข็ง ดังนั้น ในการแช่แข็งเซลล์จะขาดน้ำที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้

- 2) การแช่แข็งเป็นผลให้ความหนืดของส่วนประกอบในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นผลโดยตรงที่น้ำถูกทำให้เข้มข้นขึ้นในรูปของผลึกน้ำแข็ง
- 3) การแช่แข็งเป็นผลให้มีการสูญเสียแก๊สในไซโทพลาสซึมได้แก่ ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ การสูญเสียออกซิเจนมีผลไปยังปฏิกิริยาการหายใจ
- 4) การแช่แข็งมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลง pH ของส่วนประกอบในเซลล์ นักวิจัยหลายท่านได้รายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงค่า pH อยู่ในช่วง 0.3-2.0 หน่วยของค่า pH
- 5) การแช่แข็งมีผลทำให้สารอิเลคโตรไลต์ภายในเซลล์เข้มข้นขึ้นซึ่งเป็นผลสืบเนื่องมาจากน้ำที่เข้มข้นขึ้นในรูปของผลึกน้ำแข็ง
- 6) การแช่แข็งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง colloidal state ของไซโทพลาสซึมของเซลล์ องค์ประกอบเซลล์ที่อยู่ในไซโทพลาสซึมเช่น โปรตีน อยู่ในรูป dynamic colloidal state ในเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณน้ำที่เหมาะสมจำเป็นต่อการคงอยู่ที่ดีของ colloidal state นี้
- 7) การแช่แข็งเป็นสาเหตุทำให้โปรตีนในเซลล์เกิดการเสียสภาพ ผลกระทบนี้เกิดขึ้นได้อย่างไรนั้น ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด แต่เท่าที่ทราบก็คือ เมื่อเกิดการแช่แข็งหมู่ซัลไฟดริล (-SH group) จะหายไป หมู่นี้ที่อยู่ในลิพิดโปรตีนถูกทำให้แตกออกจากสิ่งอื่น ดังนั้นการที่มีน้ำน้อยลงประกอบกับการที่มีสารอิเลคโตรไลต์ (electrolytes) เข้มข้นขึ้นจึงไม่ต้องสงสัยเลยว่าสิ่งนี้มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเซลล์
- 8) การแช่แข็งทำให้เกิด temperature shock ในจุลินทรีย์บางชนิด สิ่งนี้เป็นจริงกับจุลินทรีย์กลุ่มเทอร์โมไฟล์และมีไซโฟล์มากกว่าไซโครไฟล์
- 9) การแช่แข็งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์บางเซลล์เกิดการบาดเจ็บ (metabolic injury) เช่น *Pseudomonas* spp. แบคทีเรียบางชนิดจะมีความต้องการสารอาหารเพิ่มมากขึ้นเมื่อนำเซลล์ในสภาพแช่แข็งมาทำให้ละลายและมีเซลล์มากถึงร้อยละ 40 ที่ได้รับผลกระทบนี้

จ) ผลของการทำให้ละลายต่อจุลินทรีย์

กระบวนการทำให้ละลาย (thawing) มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ที่ผ่านการแช่แข็ง การแช่แข็งและการทำให้ละลายซ้ำ ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง ทำให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลงมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิคงที่เนื่องจากการทำเช่นนั้นจะไปทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดความเสียหาย และเกิดการเสียสภาพของ DNA ที่เป็นเหตุให้เซลล์ตายหลังจากการแช่แข็งและทำให้ละลาย ขณะที่โปรตีนถูกทำลายเนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ถ้าการละลายเกิดขึ้นได้เร็วมากเพียงใดก็จะมีจำนวนแบคทีเรียอยู่รอดได้มากขึ้นเท่านั้น การละลายเร็ว (rapid thawing) ทำให้แบคทีเรียอยู่รอดได้มากกว่าการละลายช้า (slow thawing) ทั้งนี้เนื่องมาจากมีการโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งระหว่างการทำให้ละลายช้าซึ่งเหตุการณ์นี้จะไม่เกิดขึ้นในการละลายเร็ว การทำให้อาหารแช่แข็งละลายเกิดขึ้นได้ช้ากว่าการทำให้อาหารแข็งตัว รูปแบบของอุณหภูมิและเวลาในการละลายเป็นอันตรรกะต่อเชื้อจุลินทรีย์

มากกว่าการแช่แข็ง ในระหว่างทำให้ละลายอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเร็วใกล้จุดหลอมเหลวและคงที่ไปจนตลอดการละลาย ดังนั้นจึงทำให้มีโอกาสที่จะเกิดปฏิกิริยาเคมีและการตกผลึกอีกครั้ง แม้แต่มีการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นได้ถ้าหากการละลายเกิดขึ้นช้ามาก อาหารที่แช่แข็งแล้วทำให้ละลายจะเสียเร็วกว่าอาหารสดเนื่องจากลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารเปลี่ยนแปลง ช่วยให้จุลินทรีย์บุกรุกจากผิวของอาหารลงไปได้เร็วได้ลึกมากขึ้น ทำให้การเสียเกิดได้ง่าย^{2,8,9}

จ) คุณลักษณะบางประการของไซโครโทรฟและไซโครไฟล์

ปกติในเซลล์แบคทีเรียส่วนใหญ่มีปริมาณไขมันร้อยละ 2-5 ส่วนใหญ่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ไขมันในแบคทีเรียอยู่ในรูปของกลีเซอรอลเอสเทอร์ 2 ชนิดคือ 1) นิวทรัลลิพิด (neutral lipids) ซึ่งหมู่ -OH ทั้ง 3 หมู่หรือเพียง 1 หรือ 2 หมู่ของกลีเซอรอลถูกเอสเทอร์ิฟกับกรดไขมันสายยาวและ 2) ฟอสโฟลิพิด ซึ่งหมู่ -OH 1 หมู่เชื่อมต่อกับโคลีน (choline) เอทานอลเอมีน (ethanolamine) กลีเซอรอล อินอซิทอล (inositol) หรือซีรีน (serine) ส่วนหมู่ -OH อีก 2 หมู่ถูกเอสเทอร์ิฟกับกรดไขมันสายยาว²

ไซโครโทรฟสังเคราะห์นิวทรัลลิพิดและฟอสโฟลิพิดที่มีสัดส่วนของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเจริญที่อุณหภูมิต่ำเปรียบเทียบกับเมื่อเจริญที่อุณหภูมิสูง มีรายงานว่าปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเซลล์ของ *Candida* spp. เพิ่มขึ้นมากถึงร้อยละ 50 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 10°C เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 50°C ตารางที่ 5.6 แสดงการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเซลล์ของ *Candida utilis* เมื่อลดอุณหภูมิจาก 30°C เหลือ 5°C²

ตารางที่ 5.6 ผลของอุณหภูมิของการบ่มต่อปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ของเชื้อยีสต์ *Candida utilis* ในระยะ stationary

อุณหภูมิ ของการบ่ม (°C)	ความเข้มข้นของ เซลล์ (mg/ml)	ปริมาณกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ (ร้อยละของปริมาณกรดไขมันทั้งหมด)				
		16 : 0 ^a	16 : 1	18 : 1	18 : 2	18 : 3
30	2.0	18.9	4.6	39.1	34.3	2.1
20	2.0	20.3	11.4	31.6	27.7	6.1
10	2.0	27.4	20.6	20.7	17.6	10.7
5	1.7	19.2	15.9	18.2	16.3	27.3

^aชนิดของกรดไขมันแทนด้วยสัญลักษณ์ x : y

เมื่อ x คือจำนวนอะตอมของคาร์บอนและ y คือจำนวนพันธะคู่ต่อ 1 โมเลกุล

ที่มา: Jay และคณะ²

5.2 การใช้อุณหภูมิสูงในการถนอมอาหาร

ในการใช้อุณหภูมิสูงในการถนอมอาหาร ความร้อนจะช่วยให้การทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย การใช้ความร้อนเป็นหนึ่งในวิธีการถนอมอาหารที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการให้ความร้อนจะต้องให้ความร้อนในระดับที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Critical Control Point) ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ดังนั้นจึงมีความสำคัญในการประกันอายุการเก็บและความปลอดภัยของอาหารที่ผ่านการให้ความร้อน การให้ความร้อนอาหารจะต้องกระทำอย่างเหมาะสมเพื่อทำลายจุลินทรีย์เป้าหมายที่ทนความร้อนได้สูง ดังนั้นการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะต้องคำนึงถึง ถ้าหากประมาณการทนความร้อนของจุลินทรีย์สูงเกินไป ทำให้ใช้ความร้อนสูงเกินไปในกระบวนการแปรรูปอาหารก็จะมีผลเสียต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสและคุณภาพทางโภชนาการของอาหาร แต่ถ้าประมาณการทนความร้อนของจุลินทรีย์ต่ำเกินไป อาหารนั้นก็อาจมีจุลินทรีย์หลงเหลืออยู่หลังจากผ่านความร้อน ซึ่งเสี่ยงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ การให้ความร้อนอาหาร แบ่งได้เป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

5.2.1 การใช้ความร้อนต่ำหรือการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization)

การพาสเจอร์ไรส์หมายถึง การใช้ความร้อนระดับที่ไม่สูงมาก แต่สูงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่ไม่สร้างสปอร์ทั้งหมดและสูงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียจำนวนมาก จนทำให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บนานขึ้น ตัวอย่างเช่น ในการพาสเจอร์ไรส์น้ำนม เวลาและอุณหภูมิที่ใช้มีดังนี้ 63°C 30 นาที (Low Temperature Long Time, LTLT), 72°C 15 วินาที (High Temperature Short Time, HTST), 89°C 1 วินาที, 90°C 0.5 วินาที, 94°C 0.1 วินาที และ 100°C 0.01 วินาที เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์เพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่ไม่สร้างสปอร์ซึ่งทนความร้อนได้ดีที่สุด คือ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งทำให้เกิดวัณโรค และเชื้อ *Coxiella burnetii* ซึ่งทำให้เกิดโรค Q fever จากการทดลองทำลายเชื้อ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ความเข้มข้นของเซลล์ 40-100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่เติมลงในน้ำนม โดยการพาสเจอร์ไรส์แบบ LTLT หรือ HTST พบว่าไม่มีเซลล์ที่รอดชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมหลังจากเก็บน้ำมนั้นไว้เป็นเวลา 4 เดือน²

นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้ในการพาสเจอร์ไรส์น้ำนมยังเพียงพอที่จะทำลายเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่มีจุลินทรีย์ 2 กลุ่มที่อาจอยู่รอดจากการทำลายด้วยกระบวนการพาสเจอร์ไรส์คือ กลุ่มที่ทนความร้อน (thermoduric) และกลุ่มที่ชอบความร้อน (thermophile) จุลินทรีย์กลุ่มที่ทนความร้อนคือ เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถอยู่รอดได้เมื่อได้รับความร้อนค่อนข้างสูงแต่ไม่จำเป็นต้องเจริญที่อุณหภูมิระดับสูงนี้ จุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสปอร์ที่สามารถอยู่รอดได้ในกระบวนการพาสเจอร์ไรส์น้ำนมโดยทั่วไปเป็นเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* และ

Lactobacillus บางครั้งอาจพบสกุลอื่น สำหรับพวกเทอร์โมไฟล์ ไม่เพียงแต่จะอยู่รอดที่อุณหภูมิสูงเท่านั้นแต่ยังต้องการอุณหภูมิสูงสำหรับการเจริญและกิจกรรมเมแทบอลิก จุลินทรีย์เทอร์โมไฟล์ได้แก่ *Bacillus* และ *Clostridium* ซึ่งมีความสำคัญมากที่สุดในอาหาร การพาสเจอร์ไรส์เบียร์มักทำที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 8-15 นาที²

5.2.2 การใช้ความร้อนสูงหรือการสเตอริไลซ์ (sterilization)

การสเตอริไลซ์หมายถึง การใช้ความร้อนที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 100°C ภายใต้ความดันสูงในการทำลายจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด โดยนิยมให้ความร้อนหลังการบรรจุในกระบวนการผลิตอาหารกระป๋อง การใช้ความร้อนสูงในกระบวนการผลิตอาหารกระป๋อง บางครั้งเรียกว่า “commercially sterile” ตามทฤษฎี ถึงแม้ว่าการสเตอริไลซ์เป็นกระบวนการที่ใช้ทำลายจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดแต่ในทางปฏิบัติ การให้ความร้อนสูงเกินไปจะทำให้อาหารบางชนิดอาจมีลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) เสียไป ดังนั้นจึงพยายามที่จะถนอมลักษณะดังกล่าวโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงมากภายในระยะเวลาอันสั้นเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญเช่น จุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียให้หมดไป การใช้ความร้อนสูงเวลาดังนั้นทำให้ตรวจไม่พบจุลินทรีย์ที่มีชีวิตด้วยวิธีการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำกันตามปกติซึ่งอาจมีจุลินทรีย์หรือสปอร์ที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ แต่ไม่สามารถเจริญได้เนื่องจากความไม่เหมาะสมต่อการเจริญในด้านของพีเอช ความต่างศักย์ของออกซิเดชัน – รีดักชัน และอุณหภูมิในการเก็บรักษา^{2,3}

เมื่อเร็วนี้ในการแปรรูปน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมได้ใช้อุณหภูมิในระดับที่สูงมากๆ (Ultrahigh temperature) ในการสเตอริไลซ์อาหาร (140-150°C 2-3 วินาที) กระบวนการนี้เป็นการรวมกระบวนการให้ความร้อนอย่างต่อเนื่อง (continuous flow thermal processing) เข้าด้วยกันกับกระบวนการบรรจุด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic packaging) หรืออาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่ากระบวนการ “aseptic processing” คุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการนี้จะไม่สูญเสียไปมากเนื่องจากการให้ความร้อนและทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว อาหารและภาชนะบรรจุจะผ่านการสเตอริไลซ์แยกกัน จากนั้นอาหารจะถูกเติมลงไปในภาชนะบรรจุที่ปลอดเชื้อภายใต้สภาพปลอดเชื้อก่อนที่จะปิดภาชนะบรรจุ สามารถเก็บรักษาอาหารไว้ได้นานถึง 8 สัปดาห์โดยที่กลิ่นรสของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง เทคโนโลยีนี้ใช้กันมากสำหรับการผลิตน้ำผลไม้ ผลิตภัณฑ์นม ครีม ซอส และซูปซึ่งเป็นอาหารที่จะสูญเสียคุณค่าได้ถ้าหากให้ความร้อนนานเกินไป³

5.2.2.1 การผลิตอาหารกระป๋อง

กรรมวิธีการผลิตอาหารกระป๋องประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. รับวัตถุดิบ (receiving of raw material)
2. คัดเลือกและคัดขนาด (sorting and grading)

วัตถุดิบที่เข้าสู่โรงงาน ต้องผ่านการคัดเลือกเอาเฉพาะวัตถุดิบที่สดและปราศจากการเน่าเสีย จากนั้นก็ทำการแบ่งแยกขนาดของวัตถุดิบเพื่อให้ได้วัตถุดิบที่มีขนาดสม่ำเสมอ อาจใช้น้ำหนักของผล หรือเส้นผ่าศูนย์กลางของผลเป็นเครื่องกำหนดขนาด หรืออาจใช้ทั้งเส้นผ่าศูนย์กลางของผลและความยาวเป็นเครื่องกำหนดขนาด

3. การทำความสะอาด (cleaning)

การทำความสะอาด เป็นการขจัดสิ่งปนเปื้อนที่ติดมาให้หลุดออกจากผิวของวัตถุดิบในสภาพที่เหมาะสมสำหรับการแปรรูปในขั้นต่อไป การทำความสะอาดมี 2 แบบคือ การทำความสะอาดแบบเปียก (wet cleaning) และการทำความสะอาดแบบแห้ง (dry cleaning) การทำความสะอาดแบบเปียกมีประสิทธิภาพมากกว่าการทำความสะอาดแบบแห้งในการขจัดดินออกจากรากของพืชและขจัดยากำจัดแมลงที่ตกค้างในดินที่ติดมากับผักและผลไม้ และยังทำให้ไม่เกิดฝุ่นและทำให้อาหารเสียหายน้อยกว่าวิธีการทำความสะอาดแบบแห้ง น้ำที่ใช้ควรเป็นน้ำสะอาด อาจล้างโดยวิธีจุ่มลงในน้ำ ฉีดพ่นน้ำ หรือใส่วัตถุดิบลงไปในถังขนาดใหญ่ที่หมุนด้วยความเร็ว ควรระวังเรื่องค่าใช้จ่ายที่สูงในการกำจัดน้ำเสีย เพื่อที่จะลดค่าใช้จ่ายอาจใช้น้ำที่เติมคลอรีน กรองแล้วหมุนเวียนเอามาใช้ใหม่ สำหรับการทำความสะอาดแบบแห้งใช้กับวัตถุดิบขนาดเล็กที่มีความชื้นต่ำเช่น เมล็ดธัญชาติและเมล็ดถั่ว อาจทำความสะอาดได้โดยใช้ลมช่วยในการแยกสิ่งสกปรก ใช้แม่เหล็กสำหรับแยกสิ่งแปลกปลอมหรือใช้ตะแกรงช่วยในการแยกสิ่งแปลกปลอม⁵

4. การปอกเปลือก (peeling)

การปอกเปลือกเป็นขั้นตอนที่จำเป็นในการแปรรูปผักและผลไม้เพื่อขจัดสิ่งที่ไม่ต้องการหรือสิ่งที่ยับยั้งการรับประทานไม่ได้และเพื่อปรับปรุงลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ ทำได้หลายวิธีเช่น 1) flash steam peeling ใช้ไอน้ำภายใต้ความดัน 2) knife peeling ใช้มีดในการปอก อาจทำโดยใช้เครื่องมือหรือโดยใช้คนปอก 3) abrasion peeling ใช้วัสดุหยาบที่ทำด้วยซิลิคอน (silicon) และคาร์บอน เมื่อเปลือกหลุดออกจะล้างตามด้วยน้ำ 4) caustic peeling เป็นการปอกเปลือกโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1-2 ที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100-120°C และ 5) flame peeling ใช้เปลวไฟในการปอก ส่วนมากใช้ในการปอกเปลือกหัวหอม⁵

5. การลวก (blanching)

การลวก มีวัตถุประสงค์เพื่อทำลายกิจกรรมของเอนไซม์ในผักและผลไม้บางชนิดก่อนที่จะแปรรูปต่อไป ถ้าไม่นำวัตถุดิบไปลวกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางประสาทสัมผัสและสมบัติด้านโภชนาการระหว่างการเก็บรักษาอาหาร นอกจากนี้การลวกรยังช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ผิวของวัตถุดิบ การลวกทำให้สีของอาหารบางชนิดสว่างขึ้นเพราะช่วยขจัดอากาศและฝุ่นที่ผิวดังนั้นจึงเปลี่ยนความยาวคลื่นของแสงที่สะท้อน ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของวัตถุดิบอ่อนตัวลงจึงช่วยให้สะดวกต่อการบรรจุ อาจนำวัตถุดิบไปลวกในน้ำเดือดภายในระยะเวลาสั้นหรือนำมานึ่งในไอน้ำร้อน

ภายในระยะเวลาสั้น โดยมักจะเติมโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.125 น้ำหนักโดยน้ำหนักหรือเติมแคลเซียมออกไซด์ลงในน้ำที่ลวกเพื่อป้องกันและรักษาคลอโรฟิลทำให้สีเขียวของผักยังคงอยู่ แต่การลวกก็มีข้อเสียคือ ทำให้คุณค่าทางอาหารเปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะจะมีการสูญเสียเกลือแร่ วิตามินที่ละลายน้ำได้และสารประกอบอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังทำให้ลักษณะทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนไป แต่เมื่อทำการลวกอย่างถูกต้อง อาหารส่วนใหญ่จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสไปมากนักระหว่างเก็บรักษา แต่ถ้าไม่นำวัตถุดิบไปลวกหรือลวกอย่างไม่เหมาะสมจะเกิดกลิ่นรสผิดปกติของอาหารแห้งหรืออาหารแช่แข็งระหว่างการเก็บรักษา⁵

6. การบรรจุ (filling)

การบรรจุ อาจทำได้โดยใช้คนบรรจุและชั่งน้ำหนักหรือใช้เครื่องมือช่วยขึ้นอยู่กับธรรมชาติของผลิตภัณฑ์และอัตราการผลิต สิ่งสำคัญคือจะต้องให้ได้น้ำหนัก drained weight (น้ำหนักเฉพาะเนื้ออาหารที่บรรจุภายในกระป๋อง) ตามที่กฎหมายกำหนดไว้ สำหรับผลไม้ควรมี drained weight มากกว่าร้อยละ 50 สิ่งสำคัญของการบรรจุคือ จะต้องคำนึงถึง headspace (ช่องว่างจากฝากระป๋องถึงผิวหน้าของอาหาร) ปกติควรมี headspace ประมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรทั้งหมดของกระป๋อง ประโยชน์ของ headspace คือ ช่วยลดแรงดันต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในขณะภาชนะผ่านการสเตอริไลซ์และเพื่อให้เกิดสภาพสุญญากาศในส่วนของ headspace นี้ทำให้ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศและลดการเกิดสนิมที่ตัวกระป๋อง

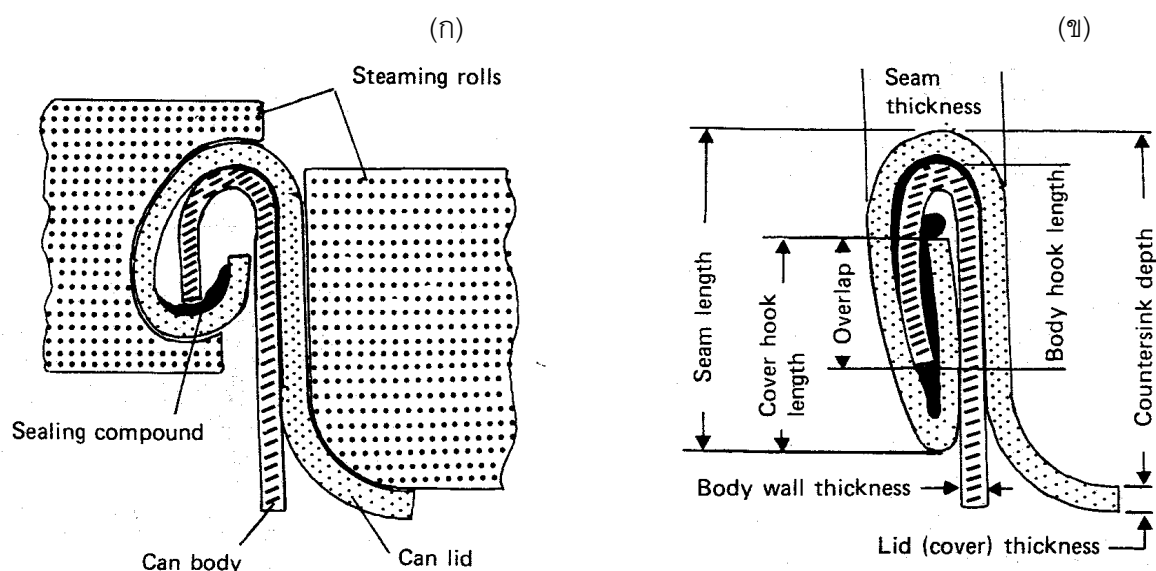
ในการผลิตผักหรือผลไม้กระป๋องนิยมเติมน้ำเชื่อมและน้ำเกลือ เนื่องจากน้ำเชื่อมและน้ำเกลือเป็นตัวนำความร้อนที่ดี ทำให้ความร้อนกระจายอย่างทั่วถึง ช่วยถนอมอาหาร ช่วยไล่อากาศและออกซิเจน ช่วยเสริมรสชาติและช่วยชะลอการเปลี่ยนสีของผลไม้บางชนิด เช่น กัลวี่ ชมพู แอปเปิ้ล

7. การไล่อากาศ (exhausting)

การไล่อากาศ เป็นการกำจัดอากาศออกจากภาชนะบรรจุก่อนที่จะปิดผนึก จุดประสงค์ของการไล่อากาศก็เพื่อกำจัดอากาศออกไป เป็นการป้องกันไม่ให้เกิดแบคทีเรียในกระป๋องเกิดการกัดกร่อนทำให้เกิดสภาพเป็นสุญญากาศบางส่วนในช่องว่างเหนืออาหารในภาชนะ และช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันของอาหารบางชนิด การไล่อากาศสามารถทำได้โดย 1) บรรจุอาหารขณะร้อนลงในภาชนะ 2) บรรจุอาหารขณะเย็นและให้ความร้อนอาหารที่บรรจุในภาชนะจนมีอุณหภูมิ 80-95°C เช่น นำกระป๋องที่บรรจุอาหารเรียบร้อยแล้วมานึ่งไล่อากาศในรังถึง หรือทำให้กระป๋องเคลื่อนที่ผ่านสายพานเข้าสู่รางที่มีไอน้ำร้อนพ่นออกมาโดยปิดฝาไว้บางส่วน 3) ขจัดอากาศออกโดยใช้ปั๊มสุญญากาศเช่น นำกระป๋องมาผ่านเข้าเครื่องปิดฝากระป๋องสุญญากาศ เครื่องนี้จะมีปั๊มที่จะดูดอากาศที่มีอยู่ในอาหารออกไปจนหมดและ 4) ผ่านไอน้ำที่ความดัน 34-41.5 kPa ซึ่งไอน้ำจะพาอากาศออกไปจากผิวของอาหารทันทีก่อนปิดฝากระป๋อง⁵

8. การปิดภาชนะบรรจุ (sealing)

การปิดฝาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน จึงเรียกว่า double seaming วิธีการปิดฝาทำได้โดยวางกระป๋องพร้อมฝาลงบนแท่นวางกระป๋อง ส่วนบนของตัวเครื่องติดลูกกลิ้งตัวแรก (first operation roller) จะทำให้ขอบบนของกระป๋องกับฝาประสานกันอย่างหลวม ๆ โดยจะม้วนฝาให้เกี่ยวกับตัวกระป๋อง (รูปที่ 5.3 ก) จากนั้นลูกกลิ้งตัวที่ 2 (second operation roller) จะทำหน้าที่บีบให้ตะเข็บที่ม้วนนั้นติดแน่นสนิทกับตัวกระป๋อง (รูปที่ 5.3 ข) สาร thermoplastic sealing compound จะหลอมระหว่างการให้ความร้อนในการแปรรูปทำให้เต็มเต็มช่องว่างในตะเข็บกระป๋องเพื่อเป็นด้านป้องกัน การปนเปื้อนเพิ่มเติม ตะเข็บของกระป๋องเป็นจุดอ่อนของกระป๋องที่ควรต้องทำการตรวจสอบอย่างสม่ำเสมอโดยเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพ⁵



รูปที่ 5.3 การสร้างตะเข็บกระป๋อง

(ก) การทำงานของลูกกลิ้งตัวแรก

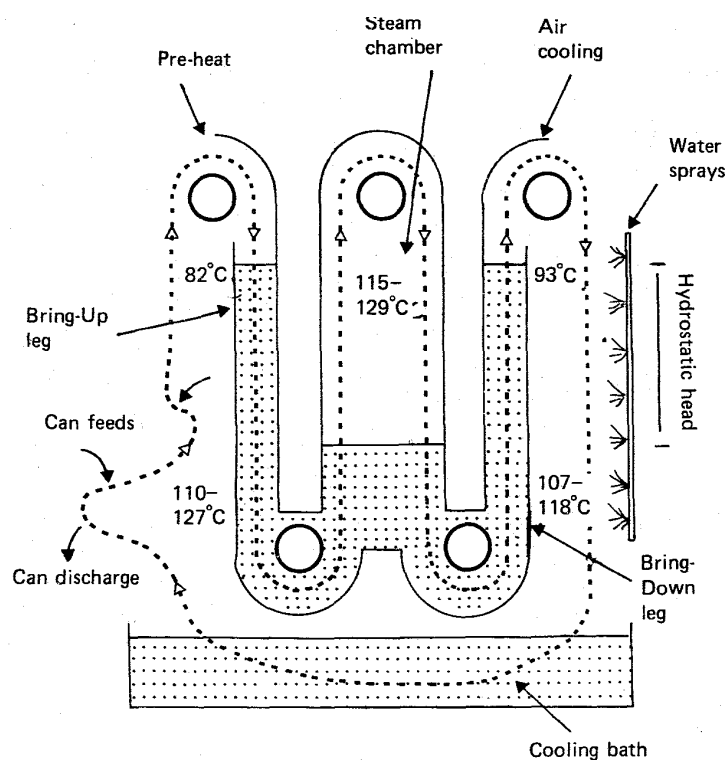
(ข) การทำงานของลูกกลิ้งตัวที่สอง

ที่มา: Fellows⁵

9. การฆ่าเชื้อ (retorting หรือ heat processing)

การนึ่งฆ่าเชื้อทำในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อหรือหม้ออัดความดันที่เรียกว่า retort หรือ autoclave ในระดับอุตสาหกรรม เรียกว่า retort วิธีการสเตอริไลซ์อาหารแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ 1) การสเตอริไลซ์แบบไม่ต่อเนื่อง (batch) หมายถึงการสเตอริไลซ์อาหารทีละชุด batch retort อาจมีรูปทรง

แนวนอนหรือแนวดิ่ง batch retort รูปทรงแนวนอนสะดวกต่อการเอาของเข้าและออกมากกว่าแบบแนวดิ่งและ 2) การสเตอริไลซ์แบบต่อเนื่องคือ การใส่ภาชนะอาหารเข้าไปใน continuous retort ตลอดเวลา อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจะออกมาอีกทาง ในการสเตอริไลซ์จะทำต่อเนื่องกันไปในแต่ละกระป๋อง ไม่มีการหยุดผลิตในขั้นตอนใด ๆ ทั้งสิ้น (รูปที่ 5.4) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสม่ำเสมอมากกว่าการสเตอริไลซ์แบบไม่ต่อเนื่อง⁵



รูปที่ 5.4 เครื่องสเตอริไลซ์อาหารแบบต่อเนื่อง
ที่มา: Fellows⁵

10. การทำให้เย็น (Cooling)

หลังจากอาหารกระป๋องผ่านการสเตอริไลซ์มาแล้ว กระป๋องจะถูกทำให้เย็นด้วยน้ำ ใอน้ำจะกลั่นตัวอย่างรวดเร็วในหม้อน้ำแช่แข็ง แต่อาหารจะเย็นลงช้าๆ และความดันยังคงสูง เมื่ออาหารเย็นลงถึงต่ำกว่า 100°C ความดันส่วนเกินจะถูกขจัดออกไปจากนั้นอาหารจะค่อยๆ เย็นลงจนถึงอุณหภูมิประมาณ 40°C จุดประสงค์ของการทำให้เย็นก็เพื่อป้องกันไม่ให้อาหารนิ่มจนเกินไป ทำให้น้ำที่อยู่ในกระป๋องกลั่นตัวเป็นหยดน้ำได้เร็วขึ้นเกิดสภาพสุญญากาศขึ้นภายในกระป๋อง และทำลายจุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบความร้อนที่ยังหลงเหลืออยู่ในกระป๋อง การลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วทำให้อุณหภูมิและสปอร์ปรับตัวไม่ทัน⁵

ความแตกต่างระหว่างการพาสเจอร์ไรส์และการสเตอริไลซ์

Pasteurization	Steritization
1. ใช้อุณหภูมิต่ำกว่า 100°C	1. ใช้อุณหภูมิสูงกว่า 100°C ภายใต้อากาศดัน
2. ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดแต่อาจมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียเหลืออยู่	2. ทำลายจุลินทรีย์ทุกชนิดโดยสิ้นเชิง
3. ใช้เครื่องมือง่าย ๆ	3. ใช้เครื่องมือซับซ้อนกว่า
4. ต้นทุนการผลิตต่ำกว่า	4. ต้นทุนการผลิตสูงกว่า
5. ถนอมคุณค่าทางอาหารได้มากกว่า	5. คุณค่าทางอาหารน้อยกว่าเพราะวิตามินชนิดต่าง ๆ เหลืออยู่น้อยมาก
6. ต้องเก็บไว้ในตู้เย็น	6. เก็บที่อุณหภูมิห้องได้
7. เก็บไว้ได้ไม่นาน	7. เก็บไว้ได้นานเป็นปี

5.2.2.2 หลักการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อน

ความร้อนขึ้นเช่นการให้ความร้อนด้วยไอน้ำ สามารถทำลายจุลินทรีย์โดยการทำให้กรดนิวคลีอิกโปรตีนและเอนไซม์เสียสภาพ การเสียหายของ DNA อาจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ตายในส่วนของสปอร์นั้นช่วงการงอกของสปอร์เป็นช่วงที่ไวต่อความร้อนมากที่สุด ส่วนการให้ความร้อนที่ไม่สูงมากนัก เยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นบริเวณหลักของการบาดเจ็บ แต่การให้ความร้อนแห้งจะทำให้จุลินทรีย์ตายน้อยกว่าการให้ความร้อนขึ้น โดยความร้อนแห้งจะทำลายจุลินทรีย์โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ และเกิดการออกซิเดชัน การให้ความร้อนแห้งจำเป็นที่จะต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่าและเวลานานกว่าในการที่จะทำให้เซลล์ตายได้เท่ากับการให้ความร้อนขึ้น³

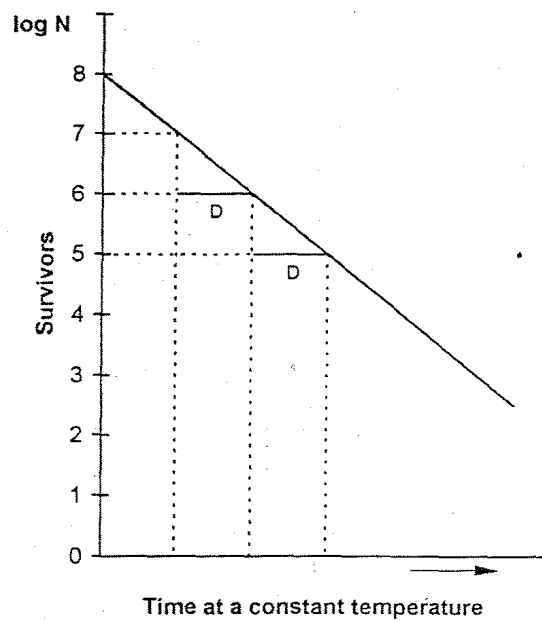
การตายของแบคทีเรียโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่มีจลศาสตร์แบบลอการิทึม (logarithmic kinetics) ซึ่งก็คือ การให้ความร้อนในเวลาเท่ากัน ณ อุณหภูมิระดับหนึ่งจะสามารถทำลายแบคทีเรียได้ในปริมาณเท่ากันโดยไม่คำนึงถึงจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น ตัวอย่าง เช่น ถ้าให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำลายแบคทีเรียได้ร้อยละ 90 การต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จะทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ร้อยละ 99 และต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จะทำลายแบคทีเรียได้ร้อยละ 99.9 ตามทฤษฎีแล้วไม่สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ถึงร้อยละ 100 การพิจารณาอีกวิธีหนึ่งก็คือ ถ้าแบคทีเรียเริ่มต้นมีจำนวนเท่ากับ 10,000 เซลล์ หลังจากให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาทีจะทำให้เซลล์ลดลงเหลือ 1,000 เซลล์เช่นเดียวกันถ้าจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 10,000,000 เซลล์หลังจากให้ความร้อนจะมีแบคทีเรีย 1,000,000 เซลล์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่³ เพื่อที่จะเข้าใจหลักการทำลายจุลินทรีย์ด้วยความร้อนซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการถนอมอาหารเช่น การผลิตอาหารกระป๋อง จึงจำเป็นต้องเข้าใจหลักการพื้นฐานดังต่อไปนี้

Thermal Death time (TDT) เป็นเวลาที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งในอุณหภูมิที่กำหนด ซึ่งวิธีนี้จะใช้อุณหภูมิที่คงที่เพื่อหาระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีค่า Thermal Death point (TDP) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการทำลายจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งในเวลาที่กำหนด มักกำหนดเวลา 10 นาที²

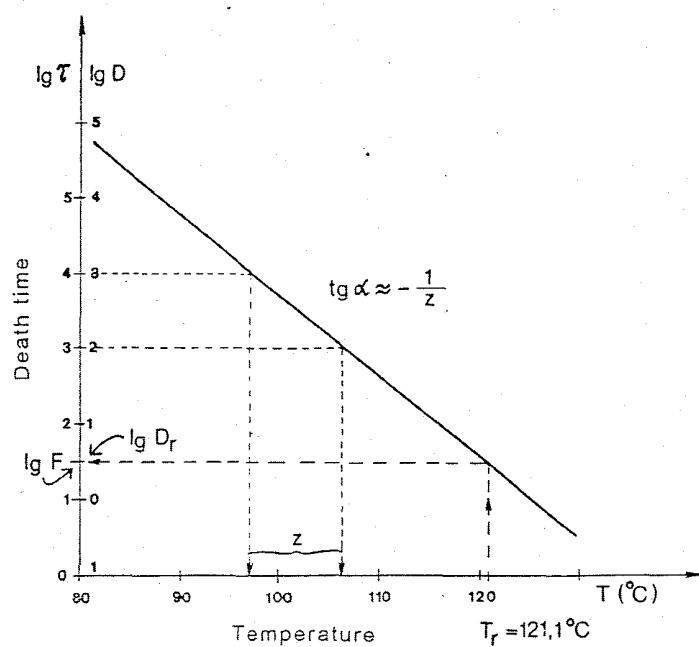
การหาค่า TDT ทำได้หลายวิธีรวมทั้งวิธีที่ทำในหลอดทดลอง กระป๋อง ถัง ฟลาสก์ เทอร์โมรีซิสโตมิเตอร์ (thermoresistometer) และหลอดแก้วขนาดเล็ก (capillary tube) สำหรับวิธีการทำโดยทั่วไปจะนำสารแขวนลอยเซลล์หรือสปอร์ที่มีจำนวนเพียงพอมาใส่ในหลอดทดลองหรือหลอดแก้วขนาดเล็กหลายๆหลอด ปิดหลอดแก้วให้สนิท จากนั้นนำหลอดเชื้อที่เตรียมไว้มาใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ตั้งอุณหภูมิที่ระดับที่ต้องการให้ความร้อน ทำการจับเวลาเมื่ออุณหภูมิภายในหลอดเท่ากับอุณหภูมิในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แล้วนำหลอดออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเมื่อครบระยะเวลาที่ให้ความร้อนในช่วงต่างๆ กัน หลอดที่นำออกมาต้องทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็น ทำการตรวจหาจำนวนเซลล์หรือสปอร์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม จนกระทั่งตรวจไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงหยุดการทดลอง

n) D value และ Z value

เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตกับเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน (รูปที่ 5.5) ณ อุณหภูมิระดับหนึ่งจะทำให้สามารถหาเวลาที่ใช้ในการทำให้อุณหภูมิลดลง 10 เท่า (หรือร้อยละ 90) ค่านี้เรียกว่า D value หรือ decimal reduction value โดยค่า D value เป็นค่าที่แสดงถึงเวลาที่ต้องการในการทำลายจุลินทรีย์ไปร้อยละ 90 (1 log unit) ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด กราฟดังกล่าว ก็คือ กราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (survival curve) ซึ่งจะแสดงถึงอัตราการตายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ศึกษาในอาหารหรือสารแขวนลอยเฉพาะที่อุณหภูมิเฉพาะระดับหนึ่ง ภายใต้สภาวะที่ศึกษาอัตราการตายของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิระดับหนึ่งจะคงที่ ไม่ขึ้นกับจำนวนเซลล์เริ่มต้น และถ้านำค่า log ของ D values มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่ให้ความร้อนจะได้กราฟ thermal death time (รูปที่ 5.6) ค่า thermal death time เป็นเวลาที่จะต้องใช้ทำลายจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งที่อุณหภูมิหนึ่ง อย่างไรก็ตามในกระบวนการให้ความร้อนนั้น จุลินทรีย์จะถูกทำลายที่หลายระดับอุณหภูมิโดยในกระบวนการผลิตนั้นความร้อนของอาหารจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงอุณหภูมิของการแปรรูป และคงไว้ที่อุณหภูมิระดับนั้นจนครบเวลาจึงทำให้เย็น ที่อุณหภูมิสูงจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ กราฟ thermal death time แสดงถึงว่า การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างไรที่อุณหภูมิของการให้ความร้อนต่างกัน ซึ่งจะทำให้สามารถคำนวณหาการตายของจุลินทรีย์ในแต่ละกระบวนการของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับหนึ่งร่วมกับเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อน³



รูปที่ 5.5 กราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (Survival curve): อัตราการตายของจุลินทรีย์ที่ศึกษา
ในอาหารหรือสารแขวนลอยเฉพาะที่อุณหภูมิระดับหนึ่ง ภายใต้สภาวะที่ศึกษา
ที่มา: Montville และ Matthews³



รูปที่ 5.6 กราฟ thermal death time ของจุลินทรีย์
ที่มา: Montville และ Matthews³

ค่า Z value หมายถึง อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$ หรือ $^{\circ}\text{F}$) ที่ต้องใช้ในการทำให้ thermal destruction curve ลดลง 1 log cycle หรืออุณหภูมิที่ใช้ในการให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้นต่อการลดลงของ D value 10 เท่า จะแสดงถึงว่า การตายของจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิได้อย่างไร ค่า Z value สามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$t_2 = t_1 \times 10^{(T_1 - T_2) / Z}$$

เมื่อ T_1 คือ อุณหภูมิที่ระดับสูงของสองระดับอุณหภูมิ โดยที่ค่า D value เท่ากับ t_1

T_2 คือ อุณหภูมิที่ระดับต่ำ โดยที่ค่า D value เท่ากับ t_2

Z คือ อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปซึ่งจะทำให้ค่า D value ลดลงไป 10 เท่าเช่น ถ้าค่า D value ที่อุณหภูมิ 250°F เป็น 2 นาที แล้วค่า Z value เป็น 18°F ดังนั้นค่า D value ที่อุณหภูมิ 232°F เป็น 20 นาที โดยอุณหภูมิจะเปลี่ยนแปลง 18°F เพื่อให้ค่า D เปลี่ยน 10 เท่า³

ข) การคำนวณกระบวนการให้ความร้อนอาหาร

ขณะให้ความร้อน อาหารในภาชนะบรรจุจะมีอุณหภูมิไม่ถึงระดับที่ต้องการในทันที ยิ่งกว่านั้นทุกระดับอุณหภูมิที่กำลังเพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการให้ความร้อนจะมีผลทำลายจุลินทรีย์ ด้วยเหตุนี้ การใช้เวลาในการให้ความร้อนร่วมกับอุณหภูมิที่ต่างๆ กันหลายๆ ระดับสามารถทำให้จุลินทรีย์ตายได้เท่าๆ กัน ตัวอย่างเช่น การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 268°F เป็นเวลา 0.6 นาที สามารถทำให้จุลินทรีย์ตายได้เท่ากับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 250°F เป็นเวลา 6 นาที มีค่ามาตรฐานที่ใช้ในการเปรียบเทียบการตายของเชื้อจุลินทรีย์ ค่า F (F value) ใช้สำหรับจุดประสงค์นี้ ค่า F ก็คือเวลาที่อุณหภูมิเฉพาะค่าหนึ่งที่ใช้ในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์จำนวนหนึ่งด้วยค่า z ที่เฉพาะค่าหนึ่ง ดังนั้นจึงมีการตั้งค่าอุณหภูมิระดับหนึ่งสำหรับ universal reference F value (F_0 value) คือ ระดับอุณหภูมิ 250°F และค่า Z เป็น 10°C (18°F) F_0 value ของการให้ความร้อนระดับนี้เรียกว่า sterilization value ถ้าทราบเวลาที่ใช้ในการทำลายเซลล์จำนวนหนึ่งด้วยค่า Z เท่ากับ 10°C ที่อุณหภูมิ 250°F จะสามารถทำให้ได้ผลเช่นเดียวกันโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาระดับอื่นโดยใช้สมการดังต่อไปนี้³

$$\text{เวลาที่อุณหภูมิใหม่} = \frac{F_0}{10^{(อุณหภูมิใหม่ - 121) / Z}}$$

อาหารต่างชนิดกันต้องได้รับความร้อนด้วยค่า F_0 ที่ต่างกัน ปัจจัยหลายประการมีผลต่อความไวของจุลินทรีย์ต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน เนื่องจากสปอร์ของ *Clostridium botulinum* type A และ type B เป็นสปอร์ที่ทนความร้อนได้ดีที่สุด ดังนั้นการสเตอริไลซ์ทางการค้า (commercial sterilization)

ของอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ ($pH > 4.6$) จะต้องทำลายสปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้ แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่อันตรายที่สุด ในสภาพไร้อากาศเช่น ภายในกระป๋องแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษ (exotoxin) ที่มีศักยภาพสูงซึ่งก็คือ botulinum toxin ดังนั้นการใช้ความร้อนในการสเตอริไลซ์อาหารอย่างต่ำต้องการทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้ จึงใช้หลักการนี้กับอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำ (pH สูงกว่า 4.6) เพราะสปอร์ของ *C. botulinum* จะไม่งอกและสร้างสารพิษที่ pH ต่ำกว่า 4.6 การให้ความร้อนนี้เรียกว่า botulinum cook ซึ่งก็คือ กระบวนการให้ความร้อนที่สามารถลดจำนวนสปอร์ของ *C. botulinum* ไป 12 D (12 decimal ($\log_{10}$) values) หลักการนี้เรียกว่า 12 D concept หลักการนี้ให้ขอบเขตของความปลอดภัยของอาหารกระป๋องที่มีกรดต่ำค่อนข้างกว้าง ถ้าสมมติว่าอาหารกระป๋อง 10^{12} กระป๋อง มีสปอร์ของ *C. botulinum* จำนวน 1 สปอร์ต่อกระป๋องและได้รับความร้อน 12-D botulinum cook จะมีเพียง 1 กระป๋องที่มีสปอร์ที่รอดชีวิตโดยคำนวณหา F_0 (เวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C (250°F) ได้ดังนี้^{2, 3, 5}

$$F_0 = D_r (\log a - \log b)$$

เมื่อ $r = 121^\circ\text{C}$; a = จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นและ b = จำนวนจุลินทรีย์สุดท้าย ดังนั้น:

$$\begin{aligned} F_0 &= 0.21 (\log 1 - \log 10^{-12}) \\ &= 0.21 \times 12 = 2.52 \text{ นาที} \end{aligned}$$

ดังนั้นการให้ความร้อนเป็นเวลา 2.52 นาทีที่อุณหภูมิ 250°F ควรจะลดจำนวนสปอร์ของ *C. botulinum* ให้เหลือเพียง 1 สปอร์ใน 1 กระป๋องจากจำนวนทั้งหมด 10^{12} กระป๋อง เมื่อพิจารณาถึง flat-sour spore (ทำให้อาหารภายในกระป๋องเป็นกรดแต่กระป๋องไม่บวม) บางชนิดมีค่า D_r ประมาณ 4.0 ดังนั้นถ้าอาหารกระป๋องได้รับความร้อน (F_0 treatment = 6.0-8.0) จึงจะทำให้สปอร์ของ *C. botulinum* ลดลงถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้^{2, 3}

ค) ปัจจัยที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์

การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์แต่ละชนิด และการเปลี่ยนแปลงของการต้านทานความร้อนตามอุณหภูมิของการให้ความร้อนที่เปลี่ยนไปนั้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการด้วยกัน ปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ได้แก่

น้ำ

การต้านทานความร้อนของเซลล์จุลินทรีย์จะสูงขึ้นเมื่อความชื้น ปริมาณน้ำหรือปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) ลดลงเช่น สปอร์ของ *Bacillus cereus* เมื่ออยู่ในสภาพที่มี a_w 1.00 และมี pH 6.5 จะมีค่า $D_{95^\circ\text{C}}$ เป็น 2.386 นาที แต่ที่ระดับ a_w 0.86 จะมีค่า $D_{95^\circ\text{C}}$ เป็น 13.842 นาที (ตารางที่ 5.7) เมื่อนำเซลล์แห้งใส่ในหลอดทดลองแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อน พบว่าจะมีการต้านทานความร้อนสูงกว่าเซลล์เปียกที่ทดลองด้วยวิธีเดียวกัน เนื่องจากการเสียดสภาพของโปรตีนจะเกิดขึ้นได้เร็วในสภาพที่มีน้ำมากกว่าการเสียดสภาพของโปรตีนในอากาศ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสีย

สภาพของโปรตีนอาจเป็นกลไกที่ทำให้เซลล์ตาย หรือเป็นสิ่งที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ การที่น้ำช่วยให้โปรตีนเสียสภาพได้ง่ายนั้นยังไม่ใช่สิ่งที่เข้าใจอย่างชัดเจน แต่ได้มีการชี้ให้เห็นว่าการให้ความร้อนโปรตีนในสภาพที่มีน้ำเป็นสาเหตุให้เกิดการสร้างหมู่ -SH อิสระ ซึ่งช่วยเพิ่มความสามารถของโปรตีนในการจับกับน้ำ การที่มีน้ำจะช่วยให้ความร้อนแตกสลายพันธะเปปไทด์ โดยกระบวนการนี้ต้องการพลังงานมากกว่าถ้าอยู่ในสภาพที่ไม่มีน้ำ²

ตารางที่ 5.7 ผลของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และค่าพีเอชที่มีต่อค่า *D* ของสปอร์ของ *Bacillus cereus*

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณน้ำอิสระ (a _w)	<i>D</i> value (นาที)		
		pH 6.5	pH 5.5	pH 4.5
95	1.00	2.386	1.040	0.511
95	0.95	5.010	2.848	1.409
95	0.86	13.842	14.513	7.776
85	1.00	63.398	13.085	5.042
85	0.86	68.909	91.540	33.910

ที่มา : Jay และคณะ²

ไขมัน

ในสภาพที่มีไขมัน จุลินทรีย์บางชนิดจะต้านทานความร้อนได้ดีขึ้น ซึ่งบางครั้งอาจกล่าวได้ว่าเป็นผลมาจากการป้องกันของไขมันซึ่งการที่จุลินทรีย์ต้านทานความร้อนได้ดีขึ้นนั้นมีผลโดยตรงกับความชื้นของเซลล์ มีรายงานว่ากรดไขมันสายยาวมีผลช่วยป้องกันเซลล์ *Clostridium botulinum* ต่อความร้อนและกรดไขมันสายยาวช่วยให้เซลล์ต้านทานความร้อนได้ดีกว่ากรดไขมันสายสั้น²

เกลือ

ผลของเกลือต่อการต้านทานความร้อนของเซลล์จุลินทรีย์นั้นผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของเกลือ ความเข้มข้นที่ใช้ และปัจจัยอื่นๆ เกลือบางชนิดมีผลป้องกันเซลล์ของจุลินทรีย์ แต่เกลือบางชนิดมีแนวโน้มที่จะทำให้เซลล์มีความไวต่อความร้อนมากขึ้น เกลือบางชนิดอาจช่วยลดปริมาณน้ำอิสระ ดังนั้นจึงช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อนโดยกลไกที่เหมือนกับการทำแห้ง ขณะที่เกลือบางชนิดอาจช่วยเพิ่มปริมาณน้ำอิสระ เช่น Ca^{2+} และ Mg^{2+} ดังนั้นจึงทำให้ไวต่อความร้อนมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากการเติมแคลเซียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus megaterium* ทำให้สปอร์ของเชื้อ

ชนิดนี้ต้านทานความร้อนได้ดีขึ้น ขณะที่การเติมแอล-กลูตาเมต (L-glutamate) แอล-โพรลีน (L-proline) หรือฟอสเฟตลงไปทำให้การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ลดลง²

คาร์โบไฮเดรต

การที่มีน้ำตาลในอาหารจะทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารนั้นทนต่อความร้อนได้มากขึ้น ซึ่งผลต่อการต้านทานความร้อนนี้บางส่วนเนื่องมาจากการลดลงของปริมาณน้ำอิสระที่มีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง ซึ่งมีความแปรผันเกี่ยวข้องกับชนิดของน้ำตาลและแอลกอฮอล์ซึ่งมีความสัมพันธ์กับผลในการต้านทานความร้อน ตารางที่ 5.8 แสดง ค่า *D* value ของเชื้อ *Salmonella* Senftenberg 775W ในสภาพที่มีค่า a_w ระดับเดียวกันจากการใช้กลีเซอรอลและซูโครสพบว่า จุลินทรีย์มีความไวต่อความร้อนแตกต่างกันมาก และมีรายงานว่าซูโครสช่วยเพิ่มความต้านทานต่อความร้อนของเชื้อ *S. Senftenberg* มากกว่าคาร์โบไฮเดรตอีก 4 ชนิดที่ทำการทดสอบ ซึ่งสามารถเรียงลำดับคาร์โบไฮเดรต ทั้ง 5 ชนิด จากผลการช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อนได้มากไปหาน้อย ดังนี้คือ ซูโครส > กลูโคส > ซอร์บิทอล > ฟรุคโตส > กลีเซอรอล²

ความเป็นกรดต่าง

จุลินทรีย์มีการต้านทานความร้อนสูงสุดในสภาพที่มีพีเอชเหมาะสมต่อการเจริญ โดยทั่วไปพีเอชเหมาะสมคือ 7.0 การที่เชื้ออยู่ในสภาพพีเอชต่ำกว่าหรือสูงกว่าสภาพที่เหมาะสมทำให้ไวต่อความร้อนมากขึ้น ข้อเท็จจริงนี้มีประโยชน์ต่อการให้ความร้อนอาหารที่มีกรดสูง โดยในการสเตอริไลส์ จะให้ความร้อนน้อยกว่าอาหารที่มีพีเอชใกล้เคียงกลาง ไข่ขาวเป็นตัวอย่างของอาหารที่เป็นด่างซึ่งต้องทำให้เป็นกลางก่อนการให้ความร้อน ในทางปฏิบัติจะไม่ทำกับอาหารชนิดอื่น ไข่ขาวมีพีเอช 9.0 เมื่อนำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 60-62°C เป็นเวลา 3.5-4.0 นาที โปรตีนจะตกตะกอนทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้นซึ่งจะมีผลต่อปริมาตรและเนื้อสัมผัสของเค้กที่ทำจากไข่ขาวพาสเจอร์ไรส์นี้ มีรายงานว่าอาจทำการพาสเจอร์ไรส์ไข่ขาวด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการพาสเจอร์ไรส์ไข่ทั้งฟองเมื่อลดค่าพีเอชของไข่ขาวลงถึง 7.0 การลดลงของพีเอชทำให้ทั้งจุลินทรีย์และโปรตีนของไข่ขาวมีความเสถียรต่อความร้อนมากขึ้น การเติมเกลือของธาตุเหล็กหรืออลูมิเนียมลงไปจะช่วยเพิ่มความคงตัวของโปรตีน conalbumin ซึ่งไม่ทนความร้อน ทำให้นำไปพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 60-62°C ได้ แบคทีเรียที่อยู่ในไข่ขาวที่มีพีเอช 5.4-5.6 ต้านทานความร้อนได้ดีกว่าเชื้อที่อยู่ในสภาพพีเอช 8.0-8.5 (ตารางที่ 5.8)²

โปรตีนและสารประกอบอื่นๆ

โปรตีนที่มีในอาหารที่จะให้ความร้อนมีผลช่วยป้องกันจุลินทรีย์ ดังนั้นอาหารโปรตีนสูงจะต้องให้ความร้อนสูงกว่าอาหารโปรตีนต่ำจึงจะทำให้ได้ผลสุดท้ายเหมือนกันคือปราศจากจุลินทรีย์ การมีอนุภาคคอลลอยด์ในอาหารที่จะให้ความร้อน อนุภาคนี้อาจช่วยป้องกันเซลล์ต่อความร้อนเช่นในสภาพที่มีค่าพีเอชเดียวกัน จำนวนจุลินทรีย์และปัจจัยอื่นๆ เหมือนกันจะใช้เวลาในการสเตอริไลส์อาหารที่ทำจากถั่ว (pea purée) นานกว่าการสเตอริไลส์อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด nutrient broth²

ตารางที่ 5.8 ค่า *D* value ของ *Salmonella* Senftenberg 775W

อุณหภูมิ (°C)	<i>D</i> values	สภาวะ
61	1.1 นาที	ไข่ทั้งฟอง
61	1.19 นาที	Tryptose broth
60	9.5 นาที	ไข่ทั้งฟอง, พีเอช 5.5
60	9.0 นาที	ไข่ทั้งฟอง, พีเอช 6.5
60	4.6 นาที	ไข่ทั้งฟอง, พีเอช 7.4
60	0.36 นาที	ไข่ทั้งฟอง, พีเอช 8.5
65.6	34-35.3 วินาที	น้ำมัน
71.7	1.2 วินาที	น้ำมัน
70	360-480 นาที	น้ำมันซ็อกโกแลต
55	4.8 นาที	Trypticase soy broth, log phase เจริญที่ 35°C
55	12.5 นาที	Trypticase soy broth, log phase เจริญที่ 44°C
55	14.6 นาที	Trypticase soy broth, stationary phase เจริญที่ 35°C
55	42.0 นาที	Trypticase soy broth, stationary phase เจริญที่ 44°C
57.2	13.5 นาที	a_w 0.99 (กลีเซอรอลร้อยละ 4.9) พีเอช 6.9
57.2	31.5 นาที	a_w 0.90 (กลีเซอรอลร้อยละ 33.9) พีเอช 6.9
57.2	14.5 นาที	a_w 0.99 (ซูโครสร้อยละ 15.4) พีเอช 6.9
57.2	62.0 นาที	a_w 0.90 (ซูโครสร้อยละ 58.6) พีเอช 6.9
60	0.2-6.5 นาที	Heart infusion broth พีเอช 7.4
60	2.5 นาที	a_w 0.90, Heart infusion broth, กลีเซอรอล
60	75.2 นาที	a_w 0.90, Heart infusion broth, ซูโครส
65	0.29 นาที	0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, พีเอช 6.5
65	0.8 นาที	สารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 30
65	43.0 นาที	สารละลายซูโครสความเข้มข้นร้อยละ 70
65	2.0 นาที	สารละลายกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 30
65	17.0 นาที	สารละลายกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 70
65	0.95 นาที	สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 30
65	0.70 นาที	สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 70
55	35 นาที	a_w 0.997, Tryptone soya agar, พีเอช 7.2

ที่มา : Jay และคณะ²

จำนวนจุลินทรีย์

ถ้ามีจำนวนจุลินทรีย์มากการต้านทานความร้อนจะสูงด้วย (ตารางที่ 5.9) โดยมีผู้เสนอว่า กลไกป้องกันความร้อนของจุลินทรีย์จำนวนมากเนื่องมาจากการสร้างสารป้องกันที่ปล่อยออกมาจาก เซลล์ และนักวิจัยบางท่านได้ยืนยันการมีอยู่ของสารประกอบนั้น เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าโปรตีน มีผลป้องกันต่อความร้อน และสารประกอบหลายชนิดที่ปล่อยออกมาจากเซลล์คาดว่าจะโปรตีนที่ ช่วยป้องกันเซลล์ต่อความร้อนได้ บางทีการที่มีเซลล์อยู่เป็นจำนวนมากอาจมีความสำคัญไม่ต่างกับการที่มีเซลล์อยู่เป็นจำนวนน้อย เนื่องจากในธรรมชาติเป็นไปได้ที่จะมีจุลินทรีย์ที่ต้านทานต่อความร้อนได้ในระดับต่างๆ กันอยู่ปะปนกัน²

ตารางที่ 5.9 ผลของจำนวนสปอร์ของ *Clostridium botulinum* ที่มีต่อค่า Thermal death time ที่ อุณหภูมิ 100°C

จำนวนสปอร์	Thermal death time (นาที)
72,000,000,000	240
1,640,000,000	125
32,000,000	110
650,000	85
16,400	50
328	40

ที่มา : Jay และคณะ²

ชนิดของเซลล์จุลินทรีย์

สปอร์มีความต้านทานความร้อนสูงกว่าเซลล์ปกติประมาณ 10^4 - 10^5 เท่า ถึงแม้จะมีหลายทฤษฎีที่กล่าวถึงการต้านทานความร้อนได้ดีของสปอร์ แต่กลไกการต้านทานความร้อนที่แท้จริงก็ยังเป็นเพียงการคาดคะเน นอกจากนี้วิธีการสร้างสปอร์ก็น่าจะมีผลต่อการต้านทานความร้อนของสปอร์ได้ แอสโคสปอร์ของยีสต์มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าเซลล์ปกติ 30 ถึง 350 เท่า หรือ 100 เท่า¹

การเจริญในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ (Sporulation medium)

มีรายงานว่าอ็อกซินของแคลเซียมและแมงกานีสในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ทำให้การต้านทานความร้อนของสปอร์เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบหลักฐานที่แน่นอนที่แสดงถึงการที่อ็อกซินมอโนวาเลนต์ ช่วยเพิ่มคุณสมบัติการทนความร้อนของสปอร์ และไม่พบว่าการเติมอ็อกซินของแมงกานีสในอาหารชักนำการสร้างสปอร์ของ *Bacillus stearothermophilus* ช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อน และยังมี

รายงานอีกว่า พิเศษของอาหารชักนำการสร้างสปอร์มีผลต่อการต้านทานความร้อนของสปอร์ที่เกิดขึ้น นอกจากนี้ชนิดของเปปโตเน แหล่งคาร์บอนและกรดไขมันในอาหารเลี้ยงเชื้อยังส่งผลต่อการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์และพบว่าสปอร์ที่เลี้ยงในอาหาร cooked meat medium มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าเมื่อเลี้ยงในเนื้อดิบ มีรายงานว่าคอนิเดียของ *Aspergillus* ที่เจริญในอาหารที่มีโปรตีนต่ำ และมีกลูโคสสูง มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าเมื่อเจริญในอาหารที่มีโปรตีนสูงแต่มีกลูโคสต่ำ และมีรายงานว่าแคดเมียมในอาหารเลี้ยงเชื้อชักนำการต้านทานความร้อนของ *E. coli* ¹

อายุของเซลล์

เซลล์แบคทีเรียมีแนวโน้มต้านทานความร้อนได้สูงสุดในระยะสแตชันนารี (stationary phase หรือเซลล์แก่) และต้านทานความร้อนได้น้อยในระยะล็อก (logarithmic phase) ซึ่งเป็นจริงสำหรับเชื้อ *S. Senftenberg* (ตารางที่ 5.8) โดยเซลล์แบคทีเรียชนิดนี้ในระยะสแตชันนารีสามารถต้านทานความร้อนได้มากกว่าเซลล์ในระยะล็อกหลายเท่า อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าเซลล์ในช่วงเริ่มต้นของระยะแล็ก (lag phase) ต้านทานความร้อนได้สูง แต่การต้านทานความร้อนลดลงต่ำสุดเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะล็อก และมีรายงานว่าสปอร์ของแบคทีเรียที่แก่มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าสปอร์ที่อ่อน กลไกการต้านทานความร้อนที่สูงขึ้นของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างที่น้อยนั้นซับซ้อนมาก และยังไม่เข้าใจอย่างแน่ชัด²

อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ

การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพิ่มขึ้น สิ่งนี้เป็นจริงโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ได้ ถึงแม้ว่ากลไกที่เกิดขึ้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่ก็เป็นไปได้ว่าการคัดเลือกทางพันธุกรรมมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ทนความร้อนได้ดี มีรายงานว่า *S. Senftenberg* ที่เจริญที่อุณหภูมิ 44°C มีการต้านทานความร้อนสูงกว่าจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิ 35°C ประมาณ 3 เท่า (ตารางที่ 5.8) ²

สารยับยั้งการเจริญ

การต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะลดลง เมื่อนำอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะที่ทนความร้อน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นมาให้ความร้อน มีรายงานว่าการใช้ความร้อนร่วมกับสารปฏิชีวนะหรือการใช้ความร้อนร่วมกับไนไตรต์มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเสียของอาหารได้ดีกว่าการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว การเติมสารยับยั้งลงไปในอาหารก่อนที่จะนำไปให้ความร้อนช่วยลดปริมาณความร้อนที่ใช้ลงจากที่จะต้องใช้เวลาให้ความร้อนเพียงอย่างเดียว²

เวลาและอุณหภูมิ

จากการที่คาดว่าทำให้ความร้อนเป็นเวลานานจะมีผลทำลายจุลินทรีย์ได้ดีนั้นก็มักเป็นสิ่งที่จริงบ่อยครั้ง แต่กฎพื้นฐานนี้ก็มักมีข้อยกเว้น อย่างไรก็ตามกฎที่เชื่อถือได้มากกว่าก็คือยิ่งให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงมากขึ้นเท่าใดก็จะมีผลทำลายจุลินทรีย์ได้ดีมากขึ้นเท่านั้น (ตารางที่ 5.10) ในกรณี

ของสปอร์ของแบคทีเรียถ้าอุณหภูมิที่ให้ความร้อนเพิ่มสูงขึ้นจะใช้เวลาลดลงเพื่อให้ได้ผลที่เหมือนกัน จากหลักการนี้สมมุติว่า ผลของความร้อนจะเกิดขึ้นทันทีทันใด และไม่มีสิ่งใดมาขัดขวาง ขนาดของภาชนะหรือภาชนะบรรจุ และชนิดของภาชนะบรรจุ (แก้ว เหล็ก พลาสติก) ที่ใช้บรรจุสิ่งที่จะให้ความร้อนก็มีความสำคัญ อาหารที่บรรจุในภาชนะขนาดใหญ่จะใช้เวลาในการพาสเจอร์ไรส์หรือสเตอริไลส์นานกว่าอาหารที่บรรจุอยู่ในภาชนะขนาดเล็ก เช่นเดียวกับภาชนะที่ทำด้วยวัสดุที่นำความร้อนได้ไม่ดี²

ผลของอุลตราโซนิกส์ (Ultrasonics)

เอนโดสปอร์ของแบคทีเรียที่ผ่านอุลตราโซนิก ก่อนที่จะนำไปให้ความร้อนหรือระหว่างการให้ความร้อนมีผลทำให้สปอร์ต้านทานความร้อนได้ไม่ดี²

ตารางที่ 5.10 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อค่า Thermal death time ของสปอร์ *Clostridium botulinum*

อุณหภูมิ (°C)	<i>C. botulinum</i> (จำนวน 6.0×10^{13} สปอร์ใน บัฟเฟอร์พีเอช 7)	จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (1.5×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในน้ำข้าวโพด ที่พีเอช 6.1)
100	260 นาที	1,140 นาที
105	120 นาที	-
110	36 นาที	180 นาที
115	12 นาที	60 นาที
120	5 นาที	17 นาที

ที่มา : Jay และคณะ²

ความสัมพันธ์ของการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์

โดยทั่วไปการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์จะสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ไซโครไฟล์ (psychrophile) จะมีความไวต่อความร้อนสูงสุด รองลงมาได้แก่ จุลินทรีย์มีโซไฟล์ (mesophile) และเทอร์โมไฟล์ (thermophile) แบคทีเรียที่สร้างสปอร์จะมีการต้านทานความร้อนสูงกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ และโดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่สร้างสปอร์จะมีการต้านทานความร้อนสูงกว่าแบคทีเรียมีโซไฟล์ที่สร้างสปอร์ และพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกจะต้านทานความร้อนได้สูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรียรูปกลมจะต้านทานความร้อนได้สูงกว่าแบคทีเรียรูปท่อน ยีสต์และเชื้อราจะค่อนข้างไวต่อความร้อน แอสโคสปอร์ของยีสต์จะมีการต้านทานความร้อนสูงกว่าเซลล์ของยีสต์เพียงเล็กน้อย สปอร์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราจะมีการต้านทานความร้อนสูงกว่าไมซีเลียมของเชื้อราเพียงเล็กน้อย¹

ผลของความร้อนต่อเซลล์ของจุลินทรีย์

ความร้อนมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ และเกิดการจับก้อน (coagulation) ทำให้ DNA แตกหัก ทำให้ RNA เกิดการชำรุด ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้

การเสียสภาพหรือการจับก้อนของโปรตีนเกี่ยวข้องกับการหายใจของเซลล์ หรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์ซึ่งจะเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตายได้ที่อุณหภูมิ 50-60°C จะทำให้เกิดการรั่วของเซลล์ การไหลออกขององค์ประกอบภายในเซลล์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นตัวบ่งบอกว่าผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามพบว่าที่อุณหภูมิสูง เซลล์จุลินทรีย์จะตายก่อนที่จะองค์ประกอบภายในเซลล์จะรั่วออกนอกเซลล์ มีรายงานว่าความร้อนอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนในผนังเซลล์ของ *Escherichia coli* ซึ่งจะทำให้เกิดการทำลายชั้นเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan layer) ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ นอกจากนี้ผลจากการบาดเจ็บของเซลล์จากแรงดันออสโมติกภายในทำให้เกิดรอยแตกที่ผนังเซลล์ในบริเวณที่ขาดความแข็งแรงของเซลล์ ตราบใดที่ยังได้รับความร้อนอยู่องค์ประกอบภายในเซลล์จะหลุดออกมาตามรอยแยกของเซลล์ อาจจะสันนิษฐานได้ว่าการที่เซลล์ถูกทำลายด้วยความร้อนอุณหภูมิสูงมีผลต่อการบาดเจ็บของเซลล์ที่ไม่ทำให้ถึงตาย (sublethal injury) แต่ถ้าพบว่าจุลินทรีย์ถูกทำลายที่อุณหภูมิที่สูงก่อนที่จะมีการเกิดรอยแตกในผนังเซลล์แสดงว่าอาจมีกลไกการถูกทำลายแบบอื่นเกิดขึ้นและมีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสปอร์ เช่น *E. coli* การถูกทำลายของ RNA มีความเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์โดยความร้อน การให้ความร้อนกับ *E. coli* เป็นสาเหตุให้เยื่อหุ้มชั้นนอกบางส่วนหลุดออก

ปกติเซลล์ร่างกาย (vegetative cell) ของแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์จะถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 10-15 องศาเซลเซียส การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60-80°C เป็นเวลาเหมาะสม พบว่าเซลล์จุลินทรีย์รวมทั้งไวรัสจะถูกทำลายทั้งหมด เซลล์ปกติจะถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที ส่วนการให้ความร้อนแก่สปอร์ที่อุณหภูมิ 70-100°C มีผลทำให้สูญเสียกรดไดพิโคลินิก (dipicolinic acid) โปรตีนและองค์ประกอบของเซลล์อื่น ๆ สิ่งนี้เป็นตัวบ่งชี้ว่าเปลือกหุ้มสปอร์ถูกทำลาย อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า การถูกทำลายของสปอร์เกิดขึ้นเร็วกว่าการปลดปล่อยของกรดไดพิโคลินิก ช่วงการงอกของสปอร์เป็นช่วงที่ไวต่อความร้อนมากที่สุด การตายของสปอร์จะเกิดระหว่างที่มีการงอกของสปอร์หรือหลังจากที่สปอร์งอกแล้ว และมีรายงานอีกว่าในช่วงแรกของการให้ความร้อนแก่สปอร์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีโดยจะเกิดการแทรกของน้ำไปยังส่วนกลางของสปอร์ระหว่างเกิดการงอก และยังมีรายงานว่าองค์ประกอบของสปอร์จะเป็นตัวกำหนดบริเวณที่เกิดความเสียหายของสปอร์ นอกจากนี้สปอร์ของ *Byssoschlamys fulva* สามารถรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 88°C ที่เวลา 5 ชั่วโมง สปอร์ของแบคทีเรียจะมีการต้านทานความร้อน

สูงสุด โดยพบว่าสปอร์ของ *Bacillus stearothermophilus* ที่มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^5 ถึง 10^6 สปอร์ต่อกรัม สามารถรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลามากกว่า 20 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าเชื้อนี้จะมี ความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารกระป๋องเนื่องจากการต้านทานความร้อนสูง และพบว่าเชื้อชนิด นี้จะทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารกระป๋องประเภทที่มีกรดต่ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การ ทำลายฟาจ (phage) และไวรัสด้วยความร้อนจะเกิดขึ้นเนื่องจากเกิดการจับก้อนของโปรตีน การ เสียสภาพของโปรตีนจะเกิดขึ้นในหลายบริเวณของเซลล์¹

การให้ความร้อนแบบเปียก เช่น การให้ความร้อนด้วยไอน้ำ สามารถทำลายจุลินทรีย์โดยการทำให้กรดนิวคลีอิก โปรตีนและเอนไซม์เสียสภาพ การที่ DNA ถูกทำให้เสียสภาพอาจเป็นตัวการในการทำให้เซลล์ปกติตาย ในระหว่างการให้ความร้อนที่ไม่สูงมากนัก เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนหลักที่ถูกทำให้ บาดเจ็บ การให้ความร้อนแบบแห้งจะทำให้จุลินทรีย์ตายน้อยกว่าการให้ความร้อนแบบเปียก โดยการให้ ความร้อนแบบแห้งจะทำลายจุลินทรีย์โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ และการออกซิเดชัน การให้ความร้อน แบบแห้งจำเป็นที่จะต้องใช้อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานเพื่อให้เซลล์ของจุลินทรีย์ตายได้เท่ากับการให้ความ ร้อนแบบเปียก³

5.3 การถนอมอาหารโดยการทำแห้ง

การถนอมอาหารโดยการทำแห้งอาศัยหลักการที่ว่า จุลินทรีย์และเอนไซม์ต้องการน้ำในการทำ กิจกรรมต่างๆ ในการถนอมอาหารด้วยวิธีนี้ จะต้องลดปริมาณน้ำถึงจุดที่จุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ ทำให้อาหารเสียจะถูกยับยั้ง โดยทั่วไปอาหารแห้งหรืออาหารที่มีความชื้นต่ำมีปริมาณน้ำไม่เกินร้อยละ 25 และมีค่า a_w อยู่ระหว่าง 0.00 ถึง 0.60 อาหารที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแห้งก็จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ส่วนอาหารที่ค่อนข้างคงตัวอีกกลุ่มหนึ่งมีปริมาณความชื้นระหว่างร้อยละ 15-50 ซึ่งมีค่า a_w ระหว่าง 0.60 ถึง 0.85 อาหารกลุ่มนี้เรียกว่า อาหารกึ่งแห้ง (Intermediate Moisture Food, IMF)²

5.3.1 การเตรียมอาหารและการทำแห้งอาหารที่มีความชื้นต่ำ

วิธีการทำแห้งอาหารที่ทำกันมาแต่ดั้งเดิมคือ การตากแดด (sun drying) จนกระทั่งอาหารมี ความชื้นต่ำ อาหารแห้งบางชนิดอาจทำได้ด้วยวิธีนี้ได้ถ้าอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์เอื้ออำนวยให้ ใน การตากแห้งผลไม้ในอุตสาหกรรมในครัวเรือนได้แก่ กัลยตาก องุ่นแห้ง และอื่น ๆ จำเป็นต้องใช้ พื้นที่มาก แต่สำหรับการผลิตอาหารแห้งในอุตสาหกรรมมีการใช้เครื่องมือที่ทันสมัยเช่น เครื่องระเหย เครื่องทำแห้ง (drum dryer และ spray dryer) และเครื่องแช่แข็งแห้ง (freeze dryer)²

การเตรียมอาหารเพื่อการทำแห้งคล้ายกับการเตรียมอาหารเพื่อการแช่แข็ง แตกต่างกันเพียง เล็กน้อย ในการทำแห้งผลไม้ที่มีสีอ่อนเช่น ลำไย ส่วนใหญ่จะใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น

ประมาณ 1,000-3,000 ppm ช่วยในการรักษาสีและป้องกันการเปลี่ยนแปลงในระหว่างเก็บรักษา ลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากทำแห้งผลไม้ควรใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 150-185°F เป็นเวลา 30-70 นาที เพื่อพาสเจอร์ไรส์ สำหรับผักจะต้องผ่านการลวกเสียก่อนโดยจุ่มน้ำร้อน 1-8 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดของผัก จุดประสงค์ของการลวกก็เพื่อทำลายเอนไซม์ซึ่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่พึงปรารถนา ในการลวกผักประเภทใบใช้เวลาสั้นกว่าการลวกผักประเภทถั่วและแครอท ในการทำแห้งที่อุณหภูมิ 140-145°F (60-62.8°C) พบว่ามีความปลอดภัยสำหรับผักบางชนิด ควรลดปริมาณความชื้นในผักให้ต่ำกว่าร้อยละ 4 เพื่อให้มีคุณภาพและอายุการเก็บยาวนาน ผักหลายชนิดอาจเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์เพื่อเพิ่มความคงตัวมากขึ้น สำหรับเนื้อสัตว์มักทำให้สุกก่อนที่จะทำแห้ง ปริมาณความชื้นสุดท้ายสำหรับเนื้อวัวและเนื้อหมูแห้งประมาณร้อยละ 4 ส่วนการทำนมผงไม่ว่าจะเป็นนมปราศจากไขมันหรือนมพร้อมมันเนยจะใช้วิธี drum drying หรือ spray drying ถ้าขจัดน้ำออกจากนมพร้อมมันเนยประมาณร้อยละ 60 จะได้นมระเหย (evaporated milk) ซึ่งมีแลคโตสประมาณร้อยละ 11.5 ส่วนนมข้นหวาน (sweetened condensed milk) ผลิตโดยการเติมซูโครสลงในนมก่อนที่จะนำไประเหยจนกระทั่งมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 54 หรือมากกว่าร้อยละ 64²

ในการทำแช่แข็งแห้ง (freeze drying หรือ lyophilization หรือ cryophilization) ต้องทำการลวกผักและทำให้เนื้อสุกเสียก่อน โดยนำไปแช่แข็งก่อนการทำแห้ง การแช่แข็งด้วยอัตราที่รวดเร็วทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีกว่าการแช่แข็งด้วยอัตราช้า หลังจากแช่แข็งแล้ว น้ำในรูปของน้ำแข็งจะถูกขจัดออกโดยการระเหิด (sublimation) กระบวนการนี้ใช้ความร้อนสูง²

5.3.2 ผลของการทำแห้งต่อจุลินทรีย์

แม้ว่าจุลินทรีย์บางชนิดจะถูกทำลายในกระบวนการทำแห้ง กระบวนการนี้บางครั้งอาจไม่ทำให้จุลินทรีย์ตาย จุลินทรีย์หลายชนิดจากอาหารแห้งอาจฟื้นคืน โดยทั่วไปแบคทีเรียต้องการน้ำในการเจริญมากกว่าที่ยีสต์ต้องการและเชื้อราต้องการน้ำในการเจริญน้อยกว่ายีสต์ เนื่องจากแบคทีเรียต้องการ a_w สูงกว่า 0.90 สำหรับการเจริญ แบคทีเรียจึงไม่มีบทบาทในการทำให้อาหารแห้งเสีย โดยทั่วไปสามารถแบ่งระดับของค่า a_w ที่เกี่ยวข้องกับการเสียของอาหารได้ดังนี้คือ ที่ระดับ a_w 0.80-0.85 การเสียเกิดขึ้นภายใน 1-2 สัปดาห์โดยเชื้อราหลายชนิด ที่ระดับ a_w 0.75 การเสียของอาหารช้าลงแต่อาจเสียได้ถ้าเก็บไว้นาน มีผู้แนะนำว่าถ้าจะเก็บอาหารแห้งให้อยู่ได้นานหลายปี ควรทำให้อาหารมีความชื้นลดลงจนมี a_w 0.65-0.75 หรือ 0.70 สำหรับระดับ a_w 0.90 จุลินทรีย์ที่น่าจะเจริญได้มากที่สุดเป็นยีสต์และรา ค่า a_w ระดับนี้ใกล้เคียงค่า a_w ต่ำสุดสำหรับยีสต์ทั่วไป ถึงแม้ว่าการเสียของอาหารจะไม่เกิดขึ้นถ้าค่า a_w ของอาหารต่ำกว่า 0.65 แต่ราบางชนิดก็ยังสามารถเจริญได้ที่ a_w ต่ำถึง 0.60-0.62 มีรายงานว่า osmophilic yeast เช่น *Zygosaccharomyces rouxii* เจริญได้ที่ a_w 0.65 อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่เป็นปัญหามากที่สุดก็คือ เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus glaucus*²

ถึงแม้ว่าการทำแห้งจะทำลายจุลินทรีย์บางชนิด แต่เอนโดสปอร์ ยีสต์รา แบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดอาจอยู่รอดได้ มีผู้ทดลองเติมเชื้อ *Staphylococcus aureus* ลงในอาหารก่อนนำอาหารไปแช่แข็งแห้ง พบว่า แบคทีเรีย *S. aureus* สามารถอยู่รอดได้ในบางสภาพ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ปรสิตบางชนิดเช่น *Trichinella spiralis* อยู่รอดได้ในระหว่างกระบวนการทำแห้ง โดยทั่วไปเป็นที่ยอมรับทั่วกันว่า อาหารแห้งไม่ควรจะมีโคลิฟอร์มและจุลินทรีย์ก่อโรคเหลืออยู่เลย ยกเว้นอาจเป็นไปได้ที่จะมี *Clostridium perfringens* อยู่ในปริมาณต่ำ นอกจากจุลินทรีย์บางชนิดจะถูกทำลายในระหว่างขั้นตอนการลวกหรือทำให้อาหารสุกก่อนทำแห้ง แต่ก็อาจมีจุลินทรีย์จำนวนน้อยที่ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็งแห้ง ส่วนใหญ่ถูกทำลายในระหว่างการแช่แข็งมากกว่าการทำแห้ง ในระหว่างการแช่แข็ง น้ำปริมาณร้อยละ 5-10 จับอยู่กับอนุภาคของอาหาร น้ำส่วนนี้จะระเหยออกไปในระหว่างการทำแห้ง การตายหรือการบาดเจ็บของจุลินทรีย์จากการทำแห้ง อาจเป็นผลมาจากการเสียสภาพของเซลล์ที่อยู่ในอาหารส่วนที่ยังไม่แห้ง เมื่อการตายของจุลินทรีย์เกิดขึ้น อัตราการตายจะสูงสุดระหว่างขั้นตอนแรก ๆ ของการทำแห้ง นอกจากนี้มีรายงานว่า เชื้อที่มีอายุน้อยจะมีความไวต่อการถูกทำลายโดยการทำแห้งมากกว่าเชื้อที่มีอายุมาก²

5.3.3 อาหารกึ่งแห้ง (Intermediate - Moisture Foods)

อาหารกึ่งแห้งหรือ IMF เป็นอาหารที่มีปริมาณความชื้นร้อยละ 15-50 และมีค่า a_w ระหว่าง 0.60-0.85 อาหารเหล่านี้ค่อนข้างคงตัวที่อุณหภูมิห้อง มีอายุการเก็บผันแปรต่างกัน ได้มีการทำอาหารกึ่งแห้งกันมานานแล้ว ตารางที่ 5.11 แสดงถึงอาหารกึ่งแห้งแบบดั้งเดิมและค่า a_w ของอาหาร อาหารกึ่งแห้งนี้ถูกทำให้ค่า a_w ลดลงโดยการดึงน้ำออกโดยใช้วิธี desorption และ วิธี adsorption และ/หรือการเติมสารเจือปนอาหารเช่น น้ำตาล และเกลือ อาหาร IMF ที่พัฒนาขึ้นเมื่อเร็ว ๆ นี้มีการเติมกลีเซอรอล ไกลคอล ซอร์บิทอล ซูโครสและอื่น ๆ สารเหล่านี้เรียกว่าฮิวเมคแตนต์ (humectant) อาจมีการเติมสารป้องกันการเจริญของเชื้อราเช่น ซอร์เบต (sorbate) และเบนโซเอต (benzoate)²

5.3.3.1 การเตรียมอาหารกึ่งแห้ง

S. aureus เป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดเดียวที่สามารถเจริญได้ที่ a_w ต่ำถึง 0.86 ดังนั้นในการเตรียมอาหารกึ่งแห้งจึงควรลดค่า a_w ของอาหารจนมีความชื้นระหว่างร้อยละ 15-50 เพื่อที่จะปรับค่า a_w ให้ต่ำกว่า 0.86 โดยใช้สารฮิวเมคแตนต์และเติมสารต้านเชื้อราเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์จำนวนมากที่สามารถเจริญได้ที่ a_w มากกว่า 0.70 นอกจากนี้การเพิ่มความคงตัวในการเก็บรักษาอาจทำได้โดยการลดค่า pH แม้ว่าสิ่งที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการผลิตอาหารกึ่งแห้ง แต่จริง ๆ แล้วการที่จะผลิตอาหารกึ่งแห้งให้มีความคงตัวในการเก็บรักษานั้นมีวิธีการที่ค่อนข้างซับซ้อน²

การหาค่า a_w ในอาหาร นอกจากจะหาได้จากสูตร $a_w = P/P_0$ เมื่อ P คือความดันไอของสารละลายและ P_0 คือความดันไอของตัวทำละลาย (น้ำ) และค่า a_w ยังมีความสัมพันธ์กับความชื้นสัมพัทธ์ตามสมการ $R.H. = 100 \times a_w$ แล้วยังสามารถใช้กฎของ Raoult ในการหาค่า a_w คือ ค่า a_w เท่ากับ จำนวนโมลของน้ำในสารละลายหารด้วยจำนวนโมลทั้งหมดในสารละลายดังสมการ²

$$a_w = \frac{\text{โมลของน้ำ}}{\text{โมลของน้ำ} + \text{โมลของตัวถูกละลาย}}$$

ตัวอย่าง เช่น น้ำ 1 ลิตรมี 55.5 โมล สมมติว่าเป็นน้ำบริสุทธิ์ ดังนั้น

$$a_w = \frac{55.5}{55.5 + 0} = 1.00$$

ถ้าเติมซูโครส 1 โมล ลงไป ดังนั้น

$$a_w = \frac{55.5}{55.5 + 1} = 0.98$$

สมการนี้สามารถใช้ในการคำนวณหาจำนวนโมลที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ค่า a_w ที่กำหนดค่าหนึ่ง แต่ถ้าอาหารประกอบด้วยส่วนประกอบหลายชนิดที่ค่อนข้างซับซ้อน ส่วนประกอบนั้นอาจกระทำกับน้ำและกระทำกับส่วนประกอบอื่นซึ่งยากที่จะทำนายค่า a_w อีกนัยหนึ่งถ้าซูโครสสามารถลดค่า a_w ได้มากกว่าที่คาดคะเน การคำนวณโดยใช้กฎของ Raoult ก็จะไม่มีความประโยชน์²

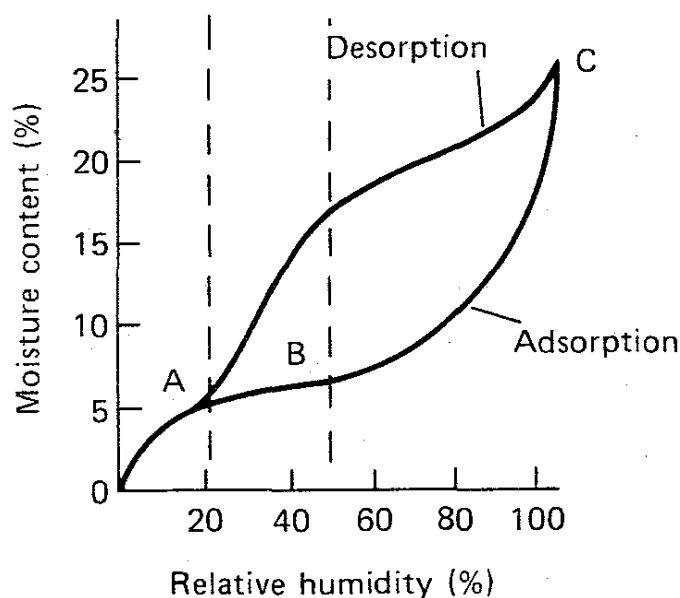
ในการเตรียมอาหารกึ่งแข็ง น้ำในอาหารอาจถูกขจัดออก 2 วิธีด้วยกันคือ 1) วิธี adsorption วิธีนี้ขั้นแรกจะขจัดน้ำออกจากอาหารให้แห้งสนิทเสียก่อน (มักใช้วิธีการแช่แข็งแห้ง) จากนั้นจึงทำให้ความชื้นกลับเข้าสู่อาหารใหม่จนกระทั่งอาหารมีค่า a_w ตามต้องการและ 2) วิธี desorption อาหารจะถูกนำมาแช่ในสารละลายที่มีความดันออสโมติกสูงกว่า ค่า a_w ของอาหารจะเปลี่ยนไปจนถึงระดับสมดุล อาหารจะมี a_w ตามต้องการ ถึงแม้ว่าการเตรียมอาหารกึ่งแข็งทั้งสองวิธีสามารถทำให้ได้ค่า a_w เท่ากัน แต่อาหารกึ่งแข็งที่เตรียมโดยวิธี adsorption สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้มากกว่าอาหารที่เตรียมโดยวิธี desorption เมื่อหา sorption isotherm ของอาหาร ซึ่งก็คือความสัมพันธ์ของค่า a_w ของอาหารกับปริมาณน้ำที่ถูกดูดซับเข้าสู่อาหารโดยหน้าที่

ของความชื้นสัมพัทธ์หรือไอน้ำรอบ ๆ อาหารหลังจากเข้าสู่ภาวะสมดุลที่อุณหภูมิคงที่ระดับหนึ่ง โดยจะพบว่าที่ค่า a_w เท่ากัน การเตรียมอาหารทั้งวิธี adsorption และ วิธี desorption สามารถนำมาหา sorption isotherm ได้ ซึ่งจะพบว่าการเตรียมอาหารด้วยวิธี desorption เป็นผลให้มีการอุ้มน้ำมากกว่าอาหารที่เตรียมโดยวิธี adsorption โดยอาหารที่เตรียมโดยวิธี adsorption มีปริมาณน้ำน้อยกว่าอาหารที่เตรียมโดยวิธี desorption ผลของความแตกต่างนี้เรียกว่า ฮีสเทอรีซิส (hysteresis effect) (รูปที่ 5.7) สิ่งที่มีผลต่อกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อจุลชีววิทยาของอาหารกึ่งแห้งได้แก่สมบัติ sorption ของอาหารกึ่งแห้ง การกระทำระหว่างส่วนผสมของอาหารแต่ละชนิดกับน้ำและส่วนผสมชนิดอื่นๆ และลำดับในการผสมส่วนผสมอาหารแต่ละชนิด²

ตารางที่ 5.11 อาหารกึ่งแห้งดั้งเดิม (Traditional Intermediate Moisture Foods)

ผลิตภัณฑ์อาหาร	ค่า a_w
ผลไม้แห้ง	0.60-0.75
เค้กและขนมพาย	0.60-0.90
อาหารแช่แข็ง	0.60-0.90
น้ำตาลและน้ำเชื่อม	0.60-0.75
ลูกกวาดบางชนิด	0.60-0.65
ไส้ขนมพาย	0.65-0.71
ธัญพืชบางชนิด	0.65-0.75
เค้กผลไม้	0.73-0.83
น้ำผึ้ง	0.75
น้ำผลไม้เข้มข้น	0.79-0.84
แยม	0.80-0.91
นมข้นหวาน	0.83
ไส้กรอกหมักบางชนิด	0.83-0.87
น้ำเชื่อมเมเปิล (maple syrup)	0.90
เนยแข็งบางชนิดที่ผ่านการบ่ม	0.96

ที่มา : Jay และคณะ²



รูปที่ 5.7 Water sorption isotherm แสดงปรากฏการณ์ hysteresis:
ที่มา: Fellows²

5.3.3.2 จุลินทรีย์กับอาหารกึ่งแห้ง

ระดับ a_w ของอาหารกึ่งแห้งจะทำให้แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญและแบ่งตัวได้ ยกเว้นแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มบางชนิด จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์และ lactobacilli นอกจากผลการยับยั้งของค่า a_w ที่ระดับต่ำแล้ว กิจกรรมของจุลินทรีย์ยังถูกยับยั้งโดยผลของปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พีเอช ความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน (Eh) วัตถุดิบเสียที่เติมลงไป สารฮิวเมคเตนต์บางชนิด จุลินทรีย์ที่เจริญแข่งขันและกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ที่ใช้ระหว่างกระบวนการผลิตรวมทั้งอุณหภูมิต่ำที่ใช้ในการเก็บรักษา²

5.3.3.3 ความคงตัวในการเก็บรักษาอาหารกึ่งแห้ง

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ไม่พึงปรารถนาดังเช่นที่เกิดขึ้นในอาหารแห้ง ก็อาจเกิดขึ้นได้ในอาหารกึ่งแห้งเช่นเดียวกัน ที่ระดับความชื้นและ a_w ของอาหารกึ่งแห้งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันและการเกิดสารสีน้ำตาลโดยปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard browning) อย่างไรก็ตาม ปฏิกิริยาเมลลาร์ดจะเกิดด้วยอัตราสูงในช่วง a_w เท่ากับ 0.4-0.5 โดยเฉพาะเมื่อใช้กลีเซอรอลเป็นสารฮิวเมคเตนต์ การเก็บรักษาอาหารกึ่งแห้งภายใต้สภาพที่เหมาะสมสามารถช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อราซึ่งทำให้อาหารมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น²

5.4 การแช่แข็งแห้ง

การแช่แข็งแห้ง (freeze-drying หรือ lyophilization) รวม 2 วิธีการถนอมอาหารเข้าด้วยกันคือ จะทำให้อาหารแข็งตัวเป็นน้ำแข็งก่อนแล้วจึงทำให้น้ำในอาหารแช่แข็งนั้นระเหิดกลายเป็นไอน้ำได้ สูญญากาศ (vacuum sublimation)³

5.5 การเก็บรักษาอาหารในสภาพควบคุมบรรยากาศ

อุณหภูมิต่ำที่สุดที่จุลินทรีย์จะเจริญได้จะต่ำสุดเมื่อปัจจัยอื่นๆอยู่ในสภาวะเหมาะสม เมื่อปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการเจริญอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมอุณหภูมิต่ำที่สุดที่จุลินทรีย์จะเจริญได้จะเพิ่มขึ้น ปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ พีเอช ค่า water activity ความเข้มข้นของออกซิเจน การใช้ปัจจัยเหล่านี้หลายอย่างร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยยืดอายุความเสถียรของอาหาร การเก็บรักษาอาหารในสภาพควบคุมบรรยากาศ (controlled-atmosphere storage) ใช้กันมากในการเก็บรักษาผักและผลไม้ โดยจะลดปริมาณออกซิเจนลงเหลือร้อยละ 2-5 และเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ถึงร้อยละ 8-10 โดยจะควบคุมปริมาณอากาศในห้องแช่เย็นที่ปิดสนิท³

คาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยเหตุผลหลายประการ เช่นเมื่อละลายน้ำจะช่วยลดค่าพีเอชแต่กลไกหลักคือยับยั้งการหายใจของจุลินทรีย์ แบคทีเรียชอบความเย็นเช่น *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* ค่อนข้างไวต่อคาร์บอนไดออกไซด์คือถูกยับยั้งได้ง่ายซึ่งต่างกับแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์³

5.6 การบรรจุในสภาพปรับบรรยากาศ (modified-atmosphere packaging)

การบรรจุอาหารในสภาพปรับบรรยากาศคล้ายกับการเก็บรักษาอาหารในสภาพควบคุมบรรยากาศ ในกรณีของผลิตภัณฑ์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศนั้นหมายถึง การบรรจุผลิตภัณฑ์ที่เน่าเสียง่ายในสภาพบรรยากาศที่ถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปจากองค์ประกอบของอากาศเดิม โดยที่บรรยากาศรอบๆอาหารถูกทำให้เปลี่ยนแปลงไปโดยการดึงออกซิเจนออกหรือเติมคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไป หรืออาจเติมแก๊สหลายชนิดร่วมกันเช่น ออกซิเจน ไนโตรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ช่วยลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์โดยไปช่วยเพิ่ม lag phase ให้ยาวนานขึ้น ขณะที่แก๊สไนโตรเจนถูกนำมาใช้แทนออกซิเจนโดยทำหน้าที่เป็นแก๊สเฉื่อย ภาชนะบรรจุควรมีสมบัติเหมาะสมในการกั้นการซึมผ่านของไอน้ำและออกซิเจนเพื่อป้องกันการเน่าเสียประเภทใดๆก็ตามที่มีสาเหตุมาจากการเจริญของจุลินทรีย์¹⁰ ถ้าฟิล์มที่ใช้ห่ออาหารมีความสามารถในการให้แก๊สผ่านได้ต่ำมากอาจทำให้ความเข้มข้นของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เปลี่ยนไป สิ่งที่เกิดขึ้นนี้เป็นเพราะออกซิเจนถูกใช้ให้หมดไปและคาร์บอนไดออกไซด์ถูกสร้างขึ้นระหว่างการหายใจ การปรับบรรยากาศจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดและช่วยเพิ่มคุณภาพการเก็บรักษาของอาหาร อย่างไร

ตามเชื้อ *Clostridium botulinum* เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนและอาจก่อให้เกิดอันตราย ด้วยเหตุนี้อาหารที่บรรจุในสภาพสุญญากาศโดยเฉพาะอาหารพาสเจอร์ไรส์ควรเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 3.3 องศาเซลเซียส³

การปรับสภาพบรรยากาศในการเก็บรักษาอาหารมีหลายวิธีได้แก่ 1) vacuum-packaging เริ่มมีการใช้อันดับแรก ผลิตภัณฑ์ถูกบรรจุด้วยฟิล์มที่ออกซิเจนผ่านได้น้อย ดึงอากาศภายในออก ไม่ให้อากาศภายนอกเข้า 2) vacuum skin packaging มีการนำสภาพสุญญากาศมาประยุกต์ใช้กับ thermoformable film (ฟิล์มที่ทำให้อ่อนตัวด้วยความร้อน) 3) gas packaging สามารถทำได้โดยการแทนที่อากาศด้วยส่วนผสมของอากาศ (gas mixtures) หรือการสร้างบรรยากาศภายในภาชนะบรรจุโดยใช้ตัวปรับสภาพบรรยากาศที่เหมาะสม 4) master packaging มักจะใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ ภายใต้การปฏิบัติงานนี้ใช้ประโยชน์ของ permeability ของ packaging film ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่ออายุการเก็บรักษาของเนื้อสัตว์ที่ขายปลีก¹⁰

เอกสารอ้างอิง

1. Banwart, G.J. 1989. Basic Food Microbiology, 2 nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
2. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.
3. Montville, T.J., Matthews, K. 2005. Food Microbiology: an Introduction. ASM Press, Washington, DC.
4. Ray, B. 2013. Fundamental Food Microbiology, 5th ed. Taylor & Francis Inc, Boca Roca, USA.
5. Fellows, P. 1990. Food Processing Technology: Principles and Practice. Ellis Horwood Limited, West Sussex, England.
6. Oetjen, G.-W., Haseley, P. 2004. Freeze-drying. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Federal Republic, Germany.
7. Riedel, L. 1972. Enthalpy-water content diagram for lean beef (also valid for other meats with fat content below 4%). In : Recommendations for The Processing and Handling of Frozen Foods. 2nd ed. International Institute of Refrigeration (IIR), Paris.
8. Gill, C.O. 2002. Microbial control with cold temperature, pp. 55-73. In: Juneja, V. K. and Sofos, J. N. (Eds.). Control of Foodborne Microorganisms. Marcel Dekker, Inc.,

New York.

9. Panoff, J.-M., Thammavongs, B., Guéguen, M., Boutibonnes, P. 1998. Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology*. 36: 75-83.
10. Tewari, G. 2002. Microbial control by packaging, pp. 191-233. . In: Juneja, V. K. and Sofos, J. N. (Eds.). *Control of Foodborne Microorganisms*. Marcel Dekker, Inc., New York.

บทที่ 6

การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารโดยใช้สารเคมีและ สารถนอมอาหารทางชีวภาพ

การใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์โดยการยับยั้ง ลดจำนวน หรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการยืดอายุการเก็บอาหาร ในปัจจุบันการนำสารเคมีมาใช้เพื่อชะลอการเน่าเสียของอาหารบางส่วนอาจมาจากข้อเท็จจริงที่ว่า สารเหล่านั้นถูกนำมาใช้ได้สำเร็จในการรักษาโรคในคน สัตว์ และพืช แต่ก็ไม่ใช่ทุกชนิดที่จะนำมาใช้ในอาหารได้ แต่อีกนัยหนึ่งมีสารถนอมอาหาร (food preservative) บางชนิดอาจไม่มีประสิทธิภาพหรือเป็นพิษมากเกินไปถ้าหากนำไปใช้ในอาหาร อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมีสารเคมีจำนวนมากที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสารถนอมอาหารแต่ก็มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่อนุญาตให้ใช้ได้ ในผลิตภัณฑ์อาหาร สารถนอมอาหารที่อนุญาตให้ใช้ได้อย่างปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) แสดงดังตารางที่ 6.1¹

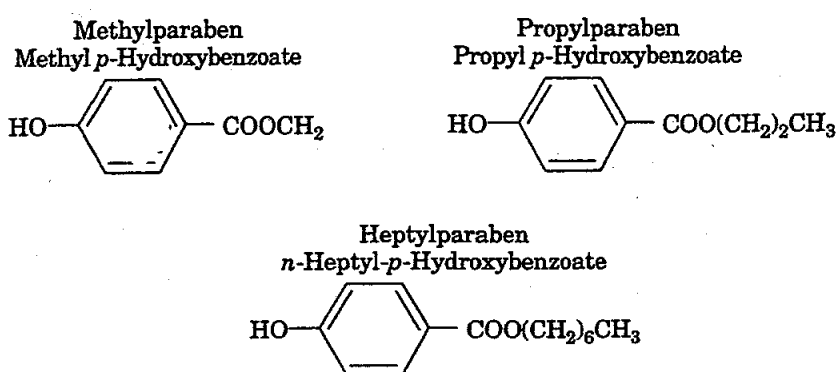
6.1 กรดอินทรีย์

ในยุคแรก บรรพบุรุษของมนุษย์เราได้ตระหนักว่าอาหารบางชนิดเช่น ผลไม้ มีความต้านทานต่อการเน่าเสียได้ดี ต่อมาจากการสังเกตก็พบว่าอาหารหมักและเครื่องดื่มที่เตรียมจากผักและผลไม้ น้ำนม ปลาและเนื้อสัตว์สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าวัตถุดิบสดที่นำมาทำอาหารหมักเหล่านี้ มนุษย์ในสมัยก่อนจึงอาจเก็บอาหารไว้ในรูปของอาหารหมัก มิฉะนั้นอาหารสดปริมาณมากก็จะเน่าเสียอย่างรวดเร็ว กรดอินทรีย์หลายชนิดใช้เป็นสารช่วยลดพีเอชและช่วยเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย² แต่กรดอินทรีย์ไม่ทุกชนิดที่จะมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ กรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนต่อกันเป็นสายยาว 10-12 อะตอมเหมาะสมที่สุดที่จะเป็นสารต้านจุลินทรีย์³

6.1.1 กรดเบนโซอิกและพาราเบน

กรดเบนโซอิก (benzoic acid สูตรเคมี C_6H_5COOH) และเกลือของกรดเบนโซอิก ($C_7H_5NaO_2$) รวมทั้งเอสเทอร์ของ *p*-hydroxybenzoic acid (parabens) จะกล่าวในหัวข้อนี้ โซเดียมเบนโซเอตเป็นสารเคมีชนิดแรกที่ใช้ในอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) อนุญาตให้ใช้ได้ ในอาหารและยังคงใช้กัน ในอาหารต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบันนี้ อนุพันธ์ของสารนี้มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 6.1

กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเบนโซเอตเกี่ยวข้องกับค่าพีเอช โดยจะมีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าพีเอชต่ำและจะไม่มีประสิทธิภาพที่พีเอชเป็นกลาง โมเลกุลที่ไม่แตกตัวมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี ค่า pK ของเบนโซเอตเท่ากับ 4.2 ที่พีเอช 4.0 มีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวร้อยละ 60 แต่ที่พีเอช 6.0 จะมีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเพียงร้อยละ 15 สิ่งนี้จึงเป็นผลให้กรดเบนโซอิกและเกลือโซเดียมของกรดชนิดนี้มีประสิทธิภาพดีเมื่อใช้กับอาหารที่เป็นกรดสูงเช่น apple cider, soft drink ซอสมะเขือเทศและน้ำสลัด ความเป็นกรดสูงอย่างเดียวเพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่ไม่เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์บางชนิด เบนโซเอตเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์เมื่อใช้ในอาหารที่เป็นกรด เบนโซเอตที่ความเข้มข้น 50-500 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด สำหรับที่พีเอช 5.0-6.0 เบนโซเอตความเข้มข้น 100-500 ppm มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ แต่ที่ความเข้มข้น 30-300 ppm เบนโซเอตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา การใช้เบนโซเอตที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 0.1 อาจมีผลทำให้รสชาติของน้ำผลไม้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค¹



รูปที่ 6.1 สูตรโครงสร้างของเมทิลพาราเบน โพรพิลพาราเบนและเฮพทิลพาราเบน
ที่มา: Jay และคณะ¹

พาราเบน 3 ชนิดที่ตามกฎหมายอนุญาตให้ใช้ได้ในการในสหรัฐอเมริกาคือ เมทิลพาราเบน (methylparaben) โพรพิลพาราเบน (propylparaben) และเฮพทิลพาราเบน (heptylparaben) ส่วนบิวทิลพาราเบน (butylparaben) และเอทิลพาราเบน (ethylparaben) อนุญาตให้ใช้ได้ในการในบางประเทศ พาราเบนซึ่งเป็นเอสเทอร์ของ *p*-hydroxybenzoic acid ต่างกับเบนโซเอตตรงที่กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของพาราเบนมีความไวต่อพีเอชน้อยกว่า เฮพทิลพาราเบนค่อนข้างมีประสิทธิภาพดีคือที่ความเข้มข้น 10-100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบได้อย่างสมบูรณ์ โพรพิลพาราเบนมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมทิลพาราเบนคือ จำเป็นต้องใช้โพรพิลพาราเบนที่ความเข้มข้น 1000 ppm และเมทิลพาราเบนที่ความเข้มข้น 1000-4000

ppm ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้งโดยพาราเบนได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ มีรายงานว่าเฮฟทิลพาราเบนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ malo-lactic bacteria และโพรพิลพาราเบนที่ความเข้มข้น 100 ppm มีผลชะลอการงอกและการสร้างสปอร์ของ *Clostridium botulinum* type A ใน reduced-broth medium แต่ถ้าใช้ถึงความเข้มข้น 200 ppm มีผลยับยั้งได้นานถึง 120 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C

ตารางที่ 6.1 สารถนอมอาหารที่อนุญาตให้ใช้ได้อย่างปลอดภัย (GRAS)

ชนิดของสารถนอมอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ใช้	จุลินทรีย์ที่ได้รับผลกระทบ	อาหารที่เติมสารถนอมอาหาร
Propionic acid/ propionates	0.32%	เชื้อรา	ขนมปัง เค้ก เนยแข็งบางชนิด
Sorbic acid/ sorbates	0.2%	เชื้อรา	เนยแข็งชนิดแข็ง มะเดื่อ น้ำเชื่อม น้ำสลัด เค้ก และเยลลี่
Benzoic acid/ benzoates	0.1%	เชื้อราและยีสต์	มาการีน apple cider ซอสมะเขือเทศ soft drink น้ำสลัด
Parabens	0.1%	เชื้อราและยีสต์	ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ soft drink น้ำสลัด ผักดอง
SO ₂ / sulfites	200-300 ppm	แมลงและจุลินทรีย์	กากน้ำตาล ผลไม้แห้ง ไวน์ น้ำมะนาว
Ethylene/ propylene oxides	700 ppm	เชื้อรา ยีสต์และแมลง	ใช้เป็น fumigant สำหรับเครื่องเทศ ถั่ว
Sodium diacetate	0.32%	เชื้อรา	ขนมปัง
Nisin	1%	แบคทีเรียกรดแลคติก <i>Clostridium</i>	Pasteurized cheese spread บางชนิด
Dehydroacetic acid	65 ppm	แมลง	ใช้ฆ่าแมลงบนสตอเบอรี่ และ squash
Sodium nitrite	120 ppm	<i>Clostridium</i>	ใช้สำหรับการเตรียมผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม
Caprylic acid	-	เชื้อรา	ใช้กับสิ่งที่ใช้ห่อเนยแข็ง
Sodium lactate	สูงถึง 4.8%	แบคทีเรีย	ใช้กับ pre-cooked meats
Ethyl formate	15-200 ppm	เชื้อราและยีสต์	ผลไม้แห้งและถั่ว

ที่มา: Jay และคณะ¹

พาราเบนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าอีสต์ โพรพิลพาราเบนที่ความเข้มข้น 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของอีสต์บางชนิดขณะที่เฮฟทิลพาราเบนต้องใช้ที่ความเข้มข้น 50-200 ppm และเมทิลพาราเบนต้องใช้ที่ความเข้มข้น 500-1000 ppm กฎหมายอนุญาตให้ใช้เมทิลพาราเบนและโพรพิลพาราเบนได้ในอาหารได้สูงสุดถึงร้อยละ 0.1 เช่นเดียวกับกรดเบนโซอิก และเกลือของกรดเบนโซอิก ส่วนเฮฟทิลพาราเบนอนุญาตให้ใช้ในเปียร์ได้สูงสุด 12 ppm และในเครื่องดื่มผลไม้อนุญาตให้ใช้ได้สูงสุด 20 ppm ค่า pK ของสารประกอบเหล่านี้คือประมาณ 8.47 และเมื่อค่าพีเอชลดลง กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก็จะไม่เพิ่มขึ้นถึงระดับเดียวกับการใช้เบนโซเอตโดยมีรายงานว่าประสิทธิภาพที่พีเอชสูงถึง 8.0

กลไกการทำงานของกรดเบนโซอิกเหมือนกับของกรดซาลิไซลิก (salicylic acid) คือ เมื่อเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ที่กำลังหายใจก็จะไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคสและไพรูเวตที่ acetate level ในเชื้อ *Proteus vulgaris* เบนโซเอตเหมือนกับโพรพิโอเนตและซอร์เบตโดยจะกระทำต่อจุลินทรีย์โดยไปยับยั้งการรับสารขับเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ ขั้นตอนการออกของสปอร์ไวต่อการถูกยับยั้งโดยเบนโซเอตมากที่สุด (รูปที่ 6.2)

โมเลกุลในรูปที่ไม่แตกตัว จำเป็นต่อกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเบนโซเอตเช่นเดียวกับซอร์เบต (sorbate) และโพรพิโอเนต (propionate) สารประกอบเหล่านี้จะละลายได้ในเยื่อหุ้มเซลล์และทำหน้าที่ในฐานะของโปรตอนไอโอโนฟอร์ (ionophores) สารประกอบเหล่านี้ช่วยให้โปรตอนเข้าเซลล์ได้ง่าย ทำให้เซลล์ต้องปล่อยพลังงานออกมาเพื่อช่วยรักษาให้พีเอชภายในคงอยู่ในสภาพปกติและเนื่องจากกิจกรรมของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกขัดขวางจึงมีผลต่อการขนส่งกรดอะมิโนด้วย¹

6.1.2 กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบต

กรดซอร์บิก (sorbic acid) มีสูตรเคมี ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CHCOOH}$, MW 112.3) ใช้เป็นสารถนอมอาหาร มักใช้ในรูปแบบของเกลือโซเดียม โพแทสเซียม หรือแคลเซียม ความสามารถในการละลายของกรดซอร์บิกเท่ากับ 0.15 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ขณะที่ความสามารถในการละลายของเกลือโซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียมเท่ากับร้อยละ 1.2, 32 และมากกว่า 50 น้ำหนักโดยปริมาตร ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะละลายได้ดีในอาหารที่ระดับไม่เกินร้อยละ 0.2 ความเข้มข้นของกรดซอร์บิกที่ใช้อยู่ช่วง 500-2000 ppm (ร้อยละ 0.05-0.2) เช่นเดียวกับเบนโซเอต เกลือของกรดซอร์บิกมีประสิทธิภาพในอาหารที่เป็นกรดมากกว่าอาหารที่มีค่าพีเอชเป็นกลาง มักใช้ซอร์เบตเติมลงในอาหารชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์บางชนิด ผักและผลไม้แปรรูป ขนมหวาน ลูกกวาด มายองเนส น้ำสลัด และมัสตาร์ด ซอร์เบตใช้เติมลงในเค้กได้ในปริมาณที่สูงกว่าโพรพิโอเนตโดยไม่มีผลต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์^{1, 2, 4}

เกลือของกรดซอร์บิกเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ในการการค้าและใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม อนุพันธ์อื่น ๆ บางตัวเคยมีการนำมาทดสอบและพบว่ามีประสิทธิภาพ ซอร์บาไมด์ (sorbamide) เป็นสารชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ alcohol dehydrogenase จากยีสต์ได้มากถึง 1,000 เท่า ขณะที่กรดซอร์โบไฮดรอกซามิก (sorbohydroxamic acid) มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราที่พีเอชช่วง 3.6-9.2 ค่า pKa ของกรดชนิดนี้เท่ากับ 8.8 ดังนั้นจึงอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวได้ในช่วงพีเอชที่กว้างกว่ากรดซอร์บิก ซอร์บิกอัลดีไฮด์มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน แต่การที่สารนี้มีกลิ่นและรสชาติที่ไม่พึงประสงค์จึงจำกัดการใช้ประโยชน์ เอสเทอร์ของกรดซอร์บิกที่ไม่แตกตัวยังคงรักษาประสิทธิภาพการทำงานในช่วงพีเอชที่กว้าง แต่การที่สารนี้ไม่ละลายในน้ำจึงนำมาใช้ประโยชน์ได้ไม่มาก⁵

6.1.2.1 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์และเชื้อราได้ดีจึงใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (antifungal agent) เชื้อราและยีสต์ที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตได้แก่ *Brettanomyces*, *Byssoschlamys*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Sporotrichum* และ *Trichoderma* ซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนยแข็ง ผักและผลไม้ และเนื้อสัตว์ และยังสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษของเชื้อราที่สร้างโดย *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Penicillium expansum* และ *P. patulum* ได้อีกด้วย นอกจากนี้ซอร์เบตก็ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายชนิด แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตได้แก่เชื้อ *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* และ *Yersinia enterocolitica* กรดซอร์บิกจะยับยั้งแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ส่วนแบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสส่วนใหญ่จะต้านทานต่อซอร์เบตได้ และซอร์เบตยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิดไม่ว่าจะอยู่บนผิวหน้าอาหารหรืออยู่ในอาหาร ได้แก่ เชื้อ *Aeromonas* spp. ที่พบบนปลาเค็มตากแห้งซึ่งมีความเข้มข้นของซอร์เบตร้อยละ 1.5 เชื้อ *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ในไส้กรอก *S. aureus* ในเบคอน *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเล *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *E. coli* ในสัตว์ปีก *Y. enterocolitica* ในเนื้อสุกร *Salmonella* Typhimurium ในนมและเนยแข็ง และ *E. coli* O157:H7 ในเนยแข็ง⁴

การที่ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของซอร์เบตที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยเช่น ค่าพีเอช ส่วนผสม ปริมาณ ความชื้นและวัตถุดิบอาหารอื่น ๆ ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์รวมทั้งการปนเปื้อน การแปรรูป การบรรจุ อุณหภูมิในการเก็บรักษา ระยะเวลาในการเก็บรักษาและสุขลักษณะในการผลิต มีการรายงานว่ากรด

ซอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ผิวหน้าในระหว่างการหมักแดงกวาดองโดยไม่มีการรบกวนการหมักที่ต้องการ อย่างไรก็ตามมีผู้พบว่ากรดซอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ไม่เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของ fermentative yeasts ในการหมักแดงกวาดองได้เท่านั้น แต่ยังยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ นอกจากนี้ได้มีรายงานว่าการยับยั้งของกรดซอร์บิกต่อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในการหมักแดงกวาดองขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำเกลือ ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ยิ่งสูงมากขึ้นก็จะยับยั้งการหมักกรดแลคติกได้ดีมากขึ้น⁵

จากการศึกษาได้พบว่า เกลือและน้ำตาลทำงานเสริมฤทธิ์กันกับซอร์เบตและช่วยเพิ่มผลการต้านจุลินทรีย์ และจากการรายงานอื่น ๆ ได้พบปฏิริยาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างซอร์เบต ฟิเชส เกลือ และน้ำตาลเช่นเดียวกัน เมื่อเร็ว ๆ นี้มีผู้รายงานว่าซอร์เบตให้ผลในการเสริมฤทธิ์การทำงานกับเกลือ NaCl สาร BHA และ TBHQ ในการยับยั้ง *S. aureus* บางสายพันธุ์ ความเป็นกรดอาจทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของซอร์เบตลดลง โดยทั่วไป กรดจะเพิ่มกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบตโดยการลดค่าฟิเชสของสารตั้งต้นให้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับค่าคงที่การแตกตัว กรดแอซีติกอาจถูกใช้ร่วมกับซอร์เบตในการทำแดงกวาดองเพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซีติกที่จะเจริญได้ดีจากการที่ซอร์เบตยับยั้งการเจริญของยีสต์ในน้ำแอปเปิ้ลจะถูกยับยั้งโดยกรดแอซซอร์บิกที่มีอยู่ ปฏิริยาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างซอร์เบตกับอุณหภูมิเคยมีรายงานมาแล้ว การใช้ความร้อนต่ำ (49°C) และการเติมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.06-0.12 สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ผลไม้ได้นานขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้ซอร์เบตยังช่วยยืดอายุการเก็บน้ำองุ่นที่อุณหภูมิต่ำ (1.1°C) และได้มีรายงานว่ากรดซอร์บิกมีผลยับยั้งกลไกการซ่อมแซมองค์ประกอบภายในของเซลล์หลังจากการให้ความร้อน *E. coli* และ *Candida utilis* ดังนั้นซอร์เบตจึงช่วยเสริมผลของความร้อนในการทำลายเซลล์⁵

6.1.2.2 ผลของฟิเชส

ซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากที่ค่าฟิเชสใกล้เคียงกับค่าคงที่ในการแตกตัวของกรด (pKa) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.75 ที่ค่าฟิเชสนี้ ร้อยละ 50 ของปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว แต่ที่ฟิเชส 4.0 ร้อยละ 86 ของซอร์เบตอยู่ในรูปไม่แตกตัว และถ้าอยู่ในสภาพฟิเชส 6.0 จะมีเพียงร้อยละ 6 ของสารประกอบนี้ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัว (ตารางที่ 6.2) ดังนั้นซอร์เบตจึงมีประสิทธิภาพมากในอาหารที่มีความเป็นกรดที่ระดับฟิเชสสูงขึ้นไป ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบตมีมากกว่าเบนโซเอตและโพธิโอเนต อาจจะสามารถอธิบายได้โดยพิจารณาจากค่า pKa กรดซอร์บิกทำงานได้ดีที่ฟิเชส 6.0 และโดยทั่วไปจะไม่มีประสิทธิภาพที่ฟิเชสสูงกว่า 6.5 ซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากกว่าโซเดียมเบนโซเอตที่ฟิเชสในช่วง 4.0-6.0 และที่ฟิเชส 3.0 หรือต่ำกว่า ซอร์เบตมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับโซเดียมเบนโซเอตแต่มีประสิทธิภาพมากกว่าโพธิโอเนตเล็กน้อย ฟิเชสสูงสุดในการทำงานของโพธิโอเนตและเบนโซเอตคือ 5.0-5.5 และ 4.0-4.5 ตามลำดับ Nanasombat และ Chooprang⁶ ได้รายงานไว้ในสภาพที่

มีพีเอช 6.0-6.5 พบว่า *E. coli* ถูกยับยั้งโดยโพแทสเซียมซอร์เบตได้ดีกว่าโซเดียมแลคเตตและโซเดียมแอซิเตต ในอาหารที่มีความเป็นกรดสูงสามารถใช้ซอร์เบตแทนเบนโซเอตได้บางส่วนหรือทั้งหมดเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีและเพื่อเพิ่มความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง^{1, 5}

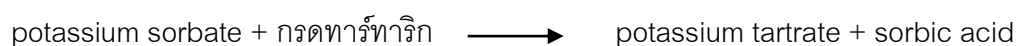
ตารางที่ 6.2 ผลของพีเอชต่อการแตกตัวของกรดซอร์บิก

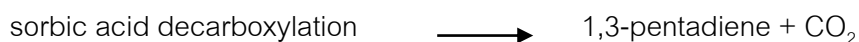
ค่าพีเอช	ปริมาณกรดในรูปที่ไม่แตกตัว (ร้อยละ)
7.00	0.6
6.00	6.0
5.80	7.0
5.00	37.0
4.75 (pKa)	50.0
4.40	70.0
4.00	86.0
3.70	93.0
3.00	98.0

ที่มา : Sofos และ Busta⁵

6.1.2.3 เมแทบอลิซึมและการต้านทานต่อซอร์เบต

เชื้อราบางชนิดต้านทานกรดซอร์บิกได้ดี บางครั้งจึงพบว่าเชื้อราทำให้อาหารที่เก็บถนอมไว้ด้วยซอร์เบตเน่าเสีย นอกจากนี้มีรายงานว่า เชื้อราเริ่มต้นปริมาณมากในเนยแข็งสามารถย่อยสลายกรดซอร์บิกได้ สิ่งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าซอร์เบตมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอที่จะใช้ถนอมรักษาเนยแข็งที่ผลิตภายใต้สภาวะที่ไม่ถูกสุขลักษณะให้เก็บไว้ได้นาน ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถใช้กรดซอร์บิกได้ อย่างไรก็ตามมีผู้รายงานว่า *Clostridium* หลายชนิดใช้ซอร์เบตเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และมีการรายงานว่าเชื้อราหลายชนิดย่อยสลายซอร์เบตในเนยแข็งได้ และซอร์เบตจะถูกย่อยสลายได้ดีขึ้นในสภาพที่มีสารอาหารคุณค่าสูงและถูกย่อยสลายได้ช้าลงในอาหารที่ด้อยคุณค่า การย่อยสลายซอร์เบตเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างสารประกอบที่ระเหยได้ซึ่งมีกลิ่นเหมือนสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ซึ่งก็คือสาร 1,3 pentadiene มีผู้เสนอว่าเชื้อราย่อยสลายซอร์เบตโดยผ่านกระบวนการดึงคาร์บอนออก (decarboxylation) ดังนี้





นอกจากการเกิดกลไกผ่านเมแทบอลิซึมของกรดไขมัน กลไกข้างบนนี้ยังอาจจะเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของซอร์เบตโดยเชื่อว่า มีผู้รายงานว่ากรดซอร์บิกได้ถูกเมแทบอลิไตโดยยีสต์ที่ความเข้มข้นของซอร์เบตภายในเซลล์ต่ำ อย่างไรก็ตามกลไกซอร์เบตที่ความเข้มข้นสูงยับยั้งเมแทบอลิซึมและการเจริญของยีสต์ได้ มีการรายงานว่า *Saccharomyces bailii* ต้านทานต่อกรดซอร์บิก กรดเบนโซอิก และกรดโมโนคาร์บอกซิลิกสายสั้น (short-chain monocarboxylic acid) และเสนอว่าการต้านทานต่อวัตถุดิบเสียเหล่านี้เบื้องต้นมีผลมาจากระบบที่ต้องการพลังงานซึ่งขนส่งวัตถุดิบเสียออกนอกเซลล์ กลไกนี้ถูกชักนำขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตเจริญในสภาวะที่มีวัตถุดิบเสียความเข้มข้นต่ำมาก่อนหน้านี้⁵

6.1.2.4 กลไกการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบต

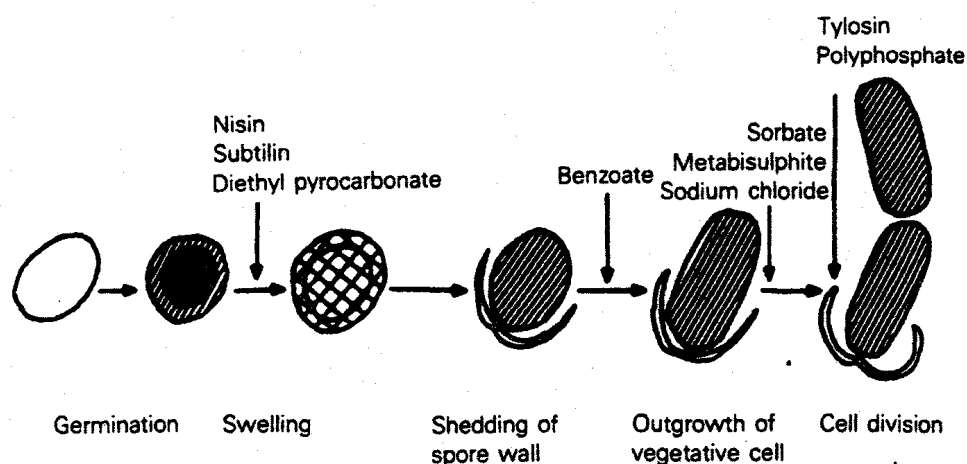
การที่ซอร์เบตเป็นวัตถุดิบเสียที่ช่วยควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ได้หรือทำให้การเจริญช้าลงโดยการยับยั้งหรือทำลายสปอร์หรือเซลล์นั้นเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องเข้าใจกลไกที่ทำให้เกิดผลการยับยั้งนี้ ความเข้าใจในกลไกเหล่านี้สามารถถูกปรับปรุงและอาจขยายการใช้ประโยชน์ของซอร์เบตให้มากขึ้น และอาจมีประโยชน์ในการค้นหาวัตถุกันเสียชนิดใหม่ที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ⁵

บางรายงานได้กล่าวเป็นนัยว่าการยับยั้งระบบเอนไซม์ต่างๆ และปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นเป็นกลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยซอร์เบต เมื่อต้นปี ค.ศ. 1954 ได้มีผู้กล่าวว่ากรดซอร์บิกยับยั้งเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา β -oxidation ของกรดไขมันซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน โดยเชื่อว่า การสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้ (เช่นที่เกิดโดยการเติมกรดซอร์บิก) ช่วยป้องกันการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นจึงยับยั้งเมแทบอลิซึมและการเจริญของเชื้อรา อย่างไรก็ตามกลไกนี้เป็นสมมติฐานที่ได้จากการทดลองที่เกี่ยวกับการย่อยสลายกรดซอร์บิกโดยเชื้อรา⁵ ซอร์เบตป้องกันการเจริญของเซลล์หลังจากการงอกของเอนโดสปอร์ (รูปที่ 6.2)¹

6.1.2.5 การใช้ซอร์เบตในอาหาร

ได้มีการนำซอร์เบตมาใช้ในอาหารต่าง ๆ โดยการเติมลงไปโดยตรง การจุ่ม การฉีดพ่น หรือใช้ในขั้นตอนการบรรจุ เมื่อใช้โพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 ฉีดพ่นหลังจากการทำหรือเติมลงไปโดยตรงในขนมปังสามารถยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ได้ ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ มีการใช้ซอร์เบตความเข้มข้นต่างกันได้แก่ เครื่องดื่มใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เค้กและน้ำตาลไอศกรีมใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 เนยแข็งและผลิตภัณฑ์เนยแข็งใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-0.3 น้ำผลไม้ที่มีแอลกอฮอล์ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 ผลไม้แห้งใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.02-0.05 น้ำผลไม้ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.025-0.075 มาร์กการีนใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ขนมพายใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 น้ำสลัดใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 และไวน์ใช้ความเข้มข้นร้อยละ

0.02-0.04⁴ ปัจจุบันได้มีการยอมรับให้ใช้ซอร์เบตในผลิตภัณฑ์เนื้อในประเทศสหรัฐอเมริกา เช่น ในการจุ่มไส้ที่ใช้สำหรับทำ stuffed dry sausages ด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราบนผิวของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการทำแห้ง และได้มีผู้ศึกษาผลของโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Clostridium botulinum*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* ในไส้กรอกสุก ซึ่งไม่ได้เติมสารยับยั้งชนิดอื่นและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27°C พบว่าโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถชะลอการเจริญของ *Salmonella* และ *S. aureus* ขณะที่จำนวน *C. perfringens* ลดลงจนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ในทั้งชุดควบคุมและตัวอย่างที่เติมซอร์เบต ซอร์เบตยังชะลอการเจริญของเชื้อ *C. botulinum* และการผลิตสารพิษจากเชื้อนี้ อย่างไรก็ตามสิ่งที่ค้นพบนี้เป็นสิ่งที่ไม่ได้คาดคิดมาก่อน เนื่องจากการรายงานก่อนหน้านี้ได้พบว่า กรดซอร์บิกเป็นสารคัดเลือกเชื้อ *Clostridium* ให้เจริญขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ⁵



รูปที่ 6.2 แผนภาพการงอกของเอนโดสปอร์ไปเป็น vegetative cells แสดงขั้นตอนที่ถูกยับยั้งโดยสารถนอมอาหารบางชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่จะยับยั้งได้

ที่มา: Jay และคณะ¹

การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับไนไตรต์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของไนโตรซามีนที่เป็นสารก่อมะเร็งในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม (cured meat products) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเบคอนทอดกรอบเมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการรายงานว่า ไนไตรต์เป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง ไนไตรต์ทำหน้าที่ที่สำคัญบางอย่างเช่น ทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน (myoglobin) ทำให้เกิดสีที่ดีของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม ไนไตรต์มีผลกระทบต่อกลิ่นรสของเนื้อและยังทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) การป้องกันการเกิดกลิ่นที่ไม่ดี และที่สำคัญไนไตรต์ช่วยชะลอการผลิตสารพิษโดยเชื้อจุลินทรีย์ถ้าเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิไม่เหมาะสม จากความจำเป็นในการที่จะหาวิธีการลดการสร้าง

ไนโตรซามีนในผลิตภัณฑ์เนื้อและผลิตภัณฑ์ยังคงมีความปลอดภัยจากสารพิษโบ툴ินัม (botulinum toxin) ได้อย่างดีเยี่ยม ทำให้มีการทดลองนำซอร์เบตมาใช้แทนไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์เนื้อทั้งหมด หรือใช้แทนบางส่วนในการควบคุมการทดลองการเจริญของ *C. botulinum* ซึ่งได้พบว่า ซอร์เบตร้อยละ 0.2 มีผลช่วยชะลอการสร้างสารพิษในหลาย ๆ ผลิตภัณฑ์และที่สำคัญอย่างมากคือ การใช้ซอร์เบตร้อยละ 0.2 ร่วมกับไนไตรต์ที่ความเข้มข้นต่ำลง (40-80 ppm) ให้ผลเสริมฤทธิ์กันและช่วยยืดระยะเวลาในการสร้างสารพิษในผลิตภัณฑ์ที่เก็บภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม ในปี ค.ศ.1979 กฎหมายที่ออกโดย USDA (USDA regulation) ได้อนุญาตให้ใช้โพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้นร้อยละ 0.26 ร่วมกับโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 40 ppm ได้ในเบคอน จากการศึกษาของ USDA เมื่อเร็ว ๆ นี้เกี่ยวกับเบคอน ถึงแม้ว่ามีการพิสูจน์ผลของกิจกรรมการต้านการสร้างสารพิษโบ툴ินัมโดยการใช้ซอร์เบตร่วมกับไนไตรต์แล้วก็ตาม แต่ก็ยังมีรายงานจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ซึ่งพบว่าการใช้ซอร์เบตร่วมกับไนไตรต์อาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ในบางคนได้⁵

6.1.2.6 ข้อดีของซอร์เบต

งานวิจัยจำนวนมากได้ทำการทดลองเกี่ยวกับความเป็นพิษ เมแทบอลิซึม ความคงตัว วิธีการตรวจวัดและความมีประสิทธิภาพของซอร์เบตในการเป็นวัตถุกันเสีย ในช่วงแรกที่มีการนำซอร์เบตมาใช้ ซอร์เบตถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่ไม่เป็นพิษ โดยมีรายงานว่าซอร์เบตสามารถถูกเมแทบอลิซึมโดยสิ่งมีชีวิตเหมือนกับการเมแทบอลิซึมกรดไขมันที่พบในธรรมชาติ และยังมีรายงานอีกว่าซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากกว่าเบนโซเอตและมีความเป็นพิษน้อยกว่าเบนโซเอต เบนโซเอตถูกเมแทบอลิซึมต่างจากซอร์เบต โดยเบนโซเอตต้องถูกกำจัดพิษในตับก่อนที่จะถูกขับถ่ายออกมา ค่า LD_{50} ของกรดซอร์บิกคือประมาณ 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สำหรับค่า LD_{50} ของเกลือ (NaCl) คือ 5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในบรรดาวัตถุกันเสียในอาหารองค์การอนามัยโลกได้ระบุว่าซอร์เบตเป็นสารที่รับเข้ามาในแต่ละวันสูงที่สุด ซึ่งเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากกว่าเบนโซเอตอย่างน้อย 3 เท่าในการเป็นวัตถุกันเสียในเนยแข็ง ปลา และผลิตภัณฑ์พวกขนมอบ การกระจายของไขมันต่อน้ำของเกลือโพธิโอเนตดีกว่าของซอร์เบต แต่ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าโพธิโอเนต ซอร์เบตมีประสิทธิภาพดีกว่าเกลือโพธิโอเนตประมาณ 4 เท่าในการถนอมรักษาเนยแข็ง ปลาและผลิตภัณฑ์ขนมอบ *S. Typhimurium* ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตที่เติมลงในเนยแข็งแช่เย็นได้เร็วกว่าโพธิโอเนตมาก⁵

6.1.3 กรดโพธิโอเนก

กรดโพธิโอเนกที่ความเข้มข้นถึงร้อยละ 1 ($pK_a = 4.87$) ถูกสร้างขึ้นตามธรรมชาติในเนยแข็งสวิส (Swiss cheese) โดยเชื้อ *Propioibacterium freudenreichii* spp. *shermaninii* กรดโพธิโอเนก โซเดียมโพธิโอเนต โพแทสเซียมโพธิโอเนต และแคลเซียมโพธิโอเนตใช้ในการต้านเชื้อราเป็นหลัก

ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดก็ถูกยับยั้งด้วยกรดโพพิโอนิก โพพิโอเนต (ร้อยละ 0.1-5%) ช่วยชะลอการเจริญของ *E.coli*, *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *Salmonella*, *Proteus vulgaris*, *Lactobacillus plantarum*, *L. monocytogenes*, ยีสต์ *Candida* และ *Saccharomyces cerevisiae* กรดโพพิโอนิกช่วยต้านการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และเนยแข็ง การเติมกรดโพพิโอนิกร้อยละ 0.1 ลงในโดที่ใส่ขนมปัง (bread dough) ช่วยยับยั้งการเจริญของ roap-forming *Bacillus subtilis* จำนวน 6 CFU ต่อกรัมในขนมปังที่ทำจากข้าวสาลี (pH 5.3) ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลานานกว่า 6 วัน หรือแม้แต่การใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ก็ช่วยป้องกันการสร้าง rope ได้เป็นเวลา 4 วัน อาจเติมกรดโพพิโอนิกลงโดได้โดยตรงเนื่องจากไม่มีผลต่อกิจกรรมของ baker's yeast⁴

6.1.4 กรดฟูมาริก

กรดฟูมาริก (Fumaric acid, $\text{COOH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$) ได้เคยใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในไวน์ กรดฟูมาริกมีผลทำลายแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อนของ *Tararomyces flavus* และ *N. fischeri* เอสเทอร์ของกรดฟูมาริก (เช่นโมโนเมทิลเอสเทอร์ ไดเมทิลเอสเทอร์และเอทิลเอสเทอร์) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15-0.2 ได้ถูกทดสอบเพื่อใช้แทนไนเตรตในเบคอน เอสเทอร์ของกรดฟูมาริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.125 ช่วยชะลอการบวมและการสร้างสารพิษในเบคอนกระป๋องที่เติมเชื้อ *Clostridium botulinum* ได้เป็นเวลานานถึง 56 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C เมทิลฟูมาเลต ไดเมทิลฟูมาเลต เอทิลฟูมาเลตและไดเอทิลฟูมาเลตช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อราในน้ำมะเขือเทศและบนขนมปัง⁴

6.1.5 กรดซิตริก

กรดซิตริกมีกิจกรรมการต้านเชื้อราและแบคทีเรียถึงแม้ว่าโดยปกติจะไม่ใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร กรดซิตริกช่วยชะลอการเจริญและการสร้างสารพิษโดย *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus vesicolor* แต่ไม่ช่วยชะลอการเจริญและการสร้างสารพิษโดย *Penicillium expansum* กรดซิตริกช่วยยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* บนซากสัตว์ปีก ช่วยยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษโดย *C. botulinum* ในกุ้งและในผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ ช่วยยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เกิดการเสียแบบ flat sour ในน้ำมะเขือเทศ กรดซิตริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.156 ในน้ำมะม่วง (pH 5.3) ช่วยลดการต้านทานความร้อนของเชื้อ *Neosartorya fischeri* ได้ 2.3 เท่าที่อุณหภูมิ 85°C ตามทฤษฎีกล่าวว่ากลไกการยับยั้งของซิตริกเกี่ยวข้องกับความสามารถของซิตริกในการคีเลตไอออนของโลหะ มีรายงานว่าขณะที่กรดซิตริกในรูปแบบที่ไม่แตกตัวยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* แต่กรดซิตริกในรูปแบบที่แตกตัวมีผลช่วยปกป้องจุลินทรีย์

6.1.6 กรดแอซีติกและเกลือแอซีเตต

กรดแอซีติก (CH_3COOH , $\text{pKa} = 4.75$ น้ำหนักโมเลกุล 60.05) เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำส้มสายชู เกลือโซเดียม โพแทสเซียมและแคลเซียมของกรดแอซีติกเป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในอาหารกันมานาน เกลือไดแอซีเตตเช่น โซเดียมไดแอซีเตตและแคลเซียมไดแอซีเตตเป็นอนุพันธ์ของกรดแอซีติก กรดแอซีติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา แบคทีเรียบางชนิดสามารถทนต่อกรดแอซีติกได้เช่น *Acetobacter* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซีติก แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรียกรดบิวทริก (*butyric acid bacteria*) แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งโดยกรดแอซีติกได้แก่ *Bacillus*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* และ *Pseudomonas spp.* เชื้อราและยีสต์สามารถต้านทานต่อกรดแอซีติกได้มากกว่าแบคทีเรีย แต่ก็มีเชื้อราและยีสต์บางชนิดที่ไวต่อกรดแอซีติก เช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* และ *Saccharomyces* บางสายพันธุ์⁴

6.1.6.1 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

กิจกรรมของกรดแอซีติกขึ้นอยู่กับอาหาร สภาพแวดล้อม และชนิดของจุลินทรีย์ ได้มีผู้ศึกษาบทบาทในการต้านจุลินทรีย์ของกรดแอซีติกที่พีเอช 4, 5 และ 6 ในสภาพที่มีพีเอช 6 พบว่า *Bacillus*, *Clostridium* และแบคทีเรียแกรมลบถูกยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เมื่อค่าพีเอชลดลงถึงพีเอช 5.0 แบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้งได้ดีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และเชื้อรา ส่วนที่พีเอช 4.0 พบว่าความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ต้องใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง และนักวิจัยบางท่านได้ใช้ความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ยับยั้งแบคทีเรียได้มาศึกษาการต้านจุลินทรีย์ต่าง ๆ พบว่า *Staphylococcus aureus* ถูกยับยั้งที่พีเอช 5.0 เชื้อ *B. cereus* และ *Salmonella* ถูกยับยั้งที่พีเอช 4.9 เชื้อ *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* ถูกยับยั้งที่พีเอช 4.1 และ 3.9 ตามลำดับ และมีผู้รายงานว่ากรดแอซีติกยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ร้อยละ 90 และ 99 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ที่พีเอช 5.2 และ 5.0 ตามลำดับ และยังมีผู้รายงานว่ากรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ได้มากกว่าร้อยละ 99.9 ภายในเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้มีผู้พบว่ากรดแอซีติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดชนิดหนึ่งที่สามารถต้านการเจริญของ *Yersinia enterocolitica*⁵

6.1.6.2 ผลของพีเอช

กรดแอซีติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราขนมปัง *A. niger* และ *Rhizopus nigricans* ที่ระดับพีเอช 3.5 และยังมีผู้รายงานว่ากรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 0.8-1.0 ที่พีเอช 3.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* และ *Penicillium glaucum* ขณะที่กรดแอซีติกความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 4 ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองที่พีเอช 7.0 นอกจากนี้

นี้ได้มีการศึกษาพบว่าเมื่อเติมกรดแอซีติกลงในน้ำเย็นซึ่งมีพีเอช 2.5 สามารถยืดอายุการเก็บรักษาขึ้นเนื้อไก่ที่ตัดแต่งแล้วได้⁷

6.1.6.3 การใช้ประโยชน์ในอาหาร

กรดแอซีติกและเกลือของกรดชนิดนี้มีรายงานว่าสามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารได้ ตัวอย่างเช่น กรดแอซีติกสามารถช่วยเพิ่มอายุการเก็บของสัตว์ปีกและลดการต้านทานความร้อนของ *Salmonella* Newport, *S. Typhimurium* และ *Campylobacter jejuni* ในน้ำที่ใช้ลวกสัตว์ปีก การเติมกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงในน้ำร้อนที่ใช้ลวกสัตว์ปีกพบว่าให้ค่า D_{52} ของ *S. Newport*, *S. Typhimurium* และ *C. jejuni* ลดลง 5-10 เท่า และพบว่ากรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำให้แบคทีเรียทั้ง 3 สกุลนี้ตายลงอย่างฉับพลัน สารประกอบนี้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5-2.5 ใช้เป็นส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ฉีดพ่นเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนซากสัตว์และใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการเป็นสารละลายต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการจุ่มขึ้นเนื้อวัว เนื้อแกะและเนื้อปลาตุ๋น เมื่อจุ่มเนื้อวัวลงในสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1.2 เป็นเวลา 10 วินาที พบว่าจำนวนเชื้อประจำถิ่นได้แก่ *S. Typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Streptococcus faecalis* ลดจำนวนลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 65 การนำเนื้อแกะที่เพิ่งฆ่าและเสร็จจุ่มลงในสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1.5 หรือ 3.0 ที่อุณหภูมิ 25°C หรือ 55°C แล้วนำไปบรรจุภายใต้สุญญากาศและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0°C พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการจุ่มในสารละลายกรดแอซีติกต่ำกว่าชุดควบคุม และพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งมากที่สุดเมื่อจุ่มลงในสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 3 ที่อุณหภูมิ 55°C นอกจากนี้มีรายงานว่า กรดแอซีติกมีประสิทธิภาพมากกว่ากรดซิตริกและกรดแลคติกในการควบคุมการเจริญของ *E. coli* O157: H7 ในเนื้อวัวบด นักวิจัยท่านหนึ่งได้ศึกษาผลของกรดแอซีติกในซูปมะเชือกเทศและซูปกุ้ง ซึ่งถูกทำให้เป็นกรดด้วยกรดแอซีติกมีพีเอชเท่ากับ 4.2 และ 4.6 พบว่าไม่มีการเจริญหรือการสร้างสารพิษของ *Clostridium botulinum* ในผลิตภัณฑ์หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 26°C เป็นเวลา 8 สัปดาห์ใน frankfurter emulsion slurry นอกจากนี้กรดแอซีติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3-1.16 สามารถทำให้อัตราการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus coagulans* และ *B. stearothermophilus* ที่พีเอช 4.2 อุณหภูมิ 105-110°C และที่พีเอช 4.6 อุณหภูมิ 121°C เพิ่มขึ้นตามลำดับ^{4, 7}

สำหรับไซเดียมแอซีเตตมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง rope-forming bacteria (*Bacillus subtilis*) ในขนมอบและสามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Penicillium expansum* และ *Mucor pusillus* ที่พีเอช 3.5-4.5 ได้ ไซเดียมแอซีเตตมีประโยชน์มากในการผลิตขนมอบเพราะมีผลน้อยต่อยีสต์ที่ใช้ในการหมัก มีรายงานว่า การจุ่ม

กึ่งทั้งเปลือกหรือกึ่งที่แกะเปลือกแล้วลงในสารละลายโซเดียมแอซิเตตความเข้มข้นร้อยละ 10 น้ำหนัก โดยน้ำหนักเป็นเวลา 2 นาทีช่วยยืดอายุการเก็บในแง่ของจุลินทรีย์และลักษณะทางประสาทสัมผัส⁴

เกลือแคลเซียมแอซิเตตและโซเดียมแอซิเตต คาดว่ามีกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์เช่นเดียวกับกรดแอซิกที่พีเอชเดียวกัน และมีการนำมาใช้ในอาหารต่างๆ ได้แก่ กล้วยที่ขอบ กรอบ เนยแข็ง ไขมันและน้ำมัน เจลาติน ลูกอม แยมและเยลลี่ เนื้อสัตว์ อาหารขบเคี้ยว ชูฟเฟลม และ ซอสหวาน สำหรับโซเดียมไดแอซิเตต (sodium diacetate) ซึ่งมีค่า pKa เท่ากับ 4.75 ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1-2.0 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราใน cheese spread และโซเดียมได แอซิเตตที่ความเข้มข้น 32 มิลลิโมลาร์ (ร้อยละ 0.45) ในอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) (พี เอช 5.4) สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis และ *Shewanella putrefaciens* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fragi*, *Enterococcus faecalis* หรือ *Lactobacillus fermentis* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้โซเดียมไดแอ ซิเตตความเข้มข้น 21-28 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อประจำถิ่นในเนื้อวัวบดหลังจาก เก็บที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลานานถึง 8 วัน และมีรายงานว่า จำนวน *L. monocytogenes* ที่มีชีวิต ลดลง 2.6 log cycle ในเนื้อปู (blue crab meat) ที่ล้างด้วยโซเดียมไดแอซิเตตความเข้มข้น 2 โมลาร์ หลังจากเก็บไว้ 6 วัน ที่อุณหภูมิ 4°C^{4,7}

ในประเทศสหรัฐอเมริกา กรดแอซิกเป็นสารที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย (GRAS, Generally Recognized as Safe) ปริมาณสูงสุดที่ใช้ในอาหารแสดงในวงเล็บดังนี้ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.25) เนยแข็ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.8) ซอสและซอสพริก (ความเข้มข้นร้อยละ 9.0) ผลิตภัณฑ์นม (ความเข้มข้นร้อยละ 0.8) ไขมันและน้ำมัน (ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5) น้ำเกรวี่และซอส (ความเข้มข้นร้อยละ 3.0) และเนื้อ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.6) อาหาร อื่นๆอาจจะมีกรดมากกว่าร้อยละ 0.15 โซเดียมแอซิเตต สามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ที่รับประทานเป็น อาหารเช้า (ความเข้มข้นร้อยละ 0.007) ไขมันและน้ำมัน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) ลูกอมชนิดแข็ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.15) แยมและเยลลี่ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.12) เนื้อสัตว์ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.12) ลูกอมชนิดอ่อน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.2) และอาหารทานเล่น ชูฟเฟลม และซอสหวาน (ทั้งหมด ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05) สำหรับแคลเซียมแอซิเตตปรับปรุงเพื่อใช้ในเนยแข็ง (ความเข้มข้นร้อย ละ 0.02) เจลาติน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.02) อาหารทานเล่น (ความเข้มข้นร้อยละ 0.06) และซอส หวาน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.15) โซเดียมไดแอซิเตตยังเป็นสาร GRAS ด้วยสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์ ขนมอบ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.4) เนยแข็ง น้ำเกรวี่และซอส (ความเข้มข้นร้อยละ 0.25) เนื้อสัตว์ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) ลูกอม (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) และชูฟเฟลม (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05)⁷

6.1.7 กรดแลคติกและเกลือแลคเตต

กรดแลคติก ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$, $\text{pK}_a = 3.79$ น้ำหนักโมเลกุล 90.08) เป็นกรดอ่อน มี 2 stereoisomer คือ L (+) lactic acid และ D (-) lactic acid กรดแลคติกพบในเนื้อเยื่อเกือบทั้งหมดพบในของเหลวในร่างกายและสารที่หลั่งออกมา ในระหว่างการหมักอาหารกรดแลคติกจะถูกผลิตขึ้นตามธรรมชาติโดยแบคทีเรียกรดแลคติก เชื้อแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างกรดแลคติกปริมาณมากเช่น *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* และ *Bacillus* ^{4, 8}

6.1.7.1 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

กรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* และ *Yersinia enterocolitica* ^{4, 8} การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยเกลือแลคเตตเกี่ยวข้องกับโปรตอนและแอนไอออน มีผู้รายงานว่าไอออนของเกลือแลคเตตสามารถยับยั้งการเจริญของ *C. botulinum* และ *Listeria* ได้ มีผู้เสนอว่าการสะสมไอออนลบ เป็นสาเหตุทำให้กรดที่เกิดขึ้นจากการหมักเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ในสภาพที่มีค่าพีเอชต่ำ⁹ ในอุตสาหกรรมอาหาร การใช้ประโยชน์ของกรดแลคติกและแลคเตตส่วนมากจะใช้กรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 0.2-2.5 ในการฉีดพ่นหรือจุ่มเพื่อลดการปนเปื้อนบนผิวหน้าเนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อสัตว์ปีก โดยทั่วไปถูกพิจารณาเป็น 2 ขั้นตอนคือ 1) เพื่อลดการปนเปื้อนของอาหารเช่น ชากโคที่โรงฆ่าสัตว์และ 2) เพื่อยืดอายุการเก็บของอาหารสดหรืออาหารกึ่งแปรรูป⁸ โซเดียมแลคเตตที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.5-5.0 สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *L. monocytogenes* และแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อหลายชนิด มีรายงานว่าที่อุณหภูมิ 15°C โซเดียมแลคเตตร้อยละ 2 ชะลอการสร้างสารพิษของ *C. botulinum* ที่ย่อยสลายโปรตีนได้⁴

6.1.7.2 กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยกรดแลคติกและแลคเตตมีเพียง 2 กลไกเท่านั้นที่เป็นไปได้และได้เคยมีผู้เสนอไว้คือ 1) ความสามารถในการลดค่าพีเอชของอาหารและคุณลักษณะที่ขอบไขมันของกรดอ่อน (ได้แก่ กรดแลคติก) ในรูปที่ไม่แตกตัว (undissociated form) ซึ่งจะทำให้กรดในรูปที่ไม่แตกตัวผ่านเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ได้ง่ายและ 2) ผลของแลคเตตต่อค่า a_w ของอาหาร⁸

ก) การลดลงของพีเอชภายในเซลล์

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไวต่อการถูกยับยั้งโดยกรดอินทรีย์มากกว่ากรดอนินทรีย์ ซึ่งการยับยั้งนี้จะเพิ่มขึ้นถ้าหากลดค่าพีเอชของอาหารลง สิ่งที่เกิดขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับคุณลักษณะที่ไม่ชอบน้ำของกรดอินทรีย์ โมเลกุลของกรดที่ละลายได้ไขมันสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างอิสระในรูปโปรตอนตัวพาที่มีพลังงาน (energy-linked carriers) และศักยภาพของเยื่อหุ้มเซลล์อาจจะเกี่ยวข้องในการรับโมเลกุลของกรดเข้าสู่เซลล์ ถ้าพีเอชภายนอกเซลล์ต่ำกว่าพีเอชภายในเซลล์ กรดในรูปที่ไม่แตกตัวจะ

แตกตัวปล่อยโปรตอนออกมาทันทีที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ทำให้ไซโทพลาสซึมมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปเซลล์พยายามที่จะรักษาค่าพีเอชภายในเซลล์ให้คงที่โดยการกำจัดโปรตอนออกไป และเมื่อพลังงานปริมาณมากของเซลล์ถูกใช้ไปเพื่อรักษาพีเอชภายในเซลล์ให้คงที่ จึงทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ลดลง กลไกนี้ได้รับการสนับสนุนจากผลการวิจัยที่พบว่าเมื่อพีเอชลดลงหรือในสภาพที่มีกรดอินทรีย์ ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นมากกว่ากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ที่พีเอชใกล้เคียงเป็นกลาง^{8,9}

ข) ผลของไซเดียมแลคเตตต่อค่า a_w

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยเกลือของกรดแลคติกอาจเกี่ยวข้องกับผลของการลดค่า a_w การใช้ไซเดียมแลคเตตและไซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นระดับเดียวกันเติมลงในผลิตภัณฑ์ต่างชนิดกันและทำการวัดค่า a_w ของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดพบว่า ความเข้มข้นของแลคเตตซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในเนื้อมีส่วนในการลดค่า a_w เช่นเดียวกับการรายงานโดยนักวิจัยหลายท่านที่ได้ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการเจริญของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงค่า a_w ในผลิตภัณฑ์เนื้อที่เติมเกลือไซเดียมแลคเตตพบว่า ความเข้มข้นของแลคเตตซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในเนื้อมีส่วนในการลดค่า a_w แม้ว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามมีผู้ศึกษาผลของไซเดียมแลคเตตในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายพบว่า แลคเตตไม่มีคุณสมบัติในการลดค่า a_w และมีรายงานว่า การเติมแลคเตตที่ความเข้มข้นระดับเดียวกับความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ลงในเนื้อวัวบดสุกซึ่งมีความชื้นร้อยละ 55 มีประสิทธิภาพด้อยกว่าไซเดียมคลอไรด์ในการลดค่า a_w (ตารางที่ 6.3) เช่นเดียวกัน มีรายงานว่า การเติมเกลือไซเดียมแอสซิเตต ไซเดียมแอสคอร์เบต ไซเดียมคลอไรด์ ไซเดียมซิเตรต ไซเดียมไดฟอสเฟต ไซเดียมกลูตาเมตและไซเดียมแลคเตตที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน (ร้อยละ 1) ลงในไส้กรอกดิบพบว่าไซเดียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการลดค่า a_w รองลงมาคือแลคเตตซึ่งค่า a_w ลดลงร้อยละ 66 ของค่า a_w ที่ลดลงเมื่อใช้เกลือคลอไรด์ นักวิจัยอีกท่านหนึ่งได้ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียชนิดต่าง ๆ และจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเหลวที่มีไซเดียมแลคเตตหรือไซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ a_w เท่ากันคือ 0.958 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไซเดียมในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ระดับเดียวกัน จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดที่นำมาทดสอบ (ยกเว้น *Escherichia coli* สายพันธุ์หนึ่ง) มีความไวต่อแลคเตต แต่ไม่ไวต่อคลอไรด์⁹

การวัดค่า a_w ได้รับการยอมรับกันทั่วโลกว่าสามารถใช้ในการทำนายความคงตัว (shelf-stability) ในการเก็บรักษาและความปลอดภัยด้านจุลินทรีย์ของอาหารได้ เมื่อเร็ว ๆ นี้มีผู้เสนอว่าตัวถูกละลายที่เป็นโพลิเมอร์เช่น น้ำตาลอาจจะสร้างสารที่มีความเสถียรมากซึ่งมีผลต่อความคงตัวของจุลินทรีย์มากกว่าตัวถูกละลายที่ไม่ใช่โพลิเมอร์ กรดแลคติกสามารถเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (self-esterification) ได้เองและปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย การเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะมีผลต่อปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้⁹

6.1.7.3 การใช้ประโยชน์ในอาหาร

ในการศึกษาผลของแลคเตตต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ในอาหารเนื้อจำลอง (meat model system) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อวัวบดที่ไม่ได้เติมวัตถุเจือปนอาหารพบว่า การเติมโซเดียมแลคเตตความเข้มข้นร้อยละ 4 ลงในเนื้อที่มีความชื้นร้อยละ 55 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ Scott A ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 7 วัน¹⁰ การใช้ประโยชน์ของแลคเตตในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 6.4⁹

ตารางที่ 6.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์และโซเดียมแลคเตตต่อค่า a_w ของเนื้อวัวบดสุกซึ่งมีความชื้นร้อยละ 55

เกลือที่ใช้	ค่า a_w ที่ความเข้มข้นต่างๆของเกลือ (ร้อยละ)		
	2	3	4
โซเดียมคลอไรด์	0.962	0.954	0.943
โซเดียมแลคเตต	0.972	0.968	0.964

a_w ของชุดควบคุม เท่ากับ 0.986

ที่มา : Shelef⁹

ตารางที่ 6.4 การใช้แลคเตตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ผลิตภัณฑ์	การเก็บรักษา (วัน/ ที่อุณหภูมิ)	โซเดียมแลคเตต (ร้อยละ)	ผลต่อจุลินทรีย์
ไส้กรอกหมู	45 วัน/ 5°C	3	ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ
ไส้กรอกหมู	28 วัน/ 4°C	2-3	ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศช้าลง
ตับหมู	42 วัน/ 6°C	2	ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศและจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศ
ไส้กรอกแพรง เฟอเทอร์	56 วัน/ 4°C	2-4	ยับยั้ง <i>Listeria monocytogenes</i> และจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ
ไก่วงบดสุก	10 วัน/ 27°C	3-3.5	<i>Clostridium botulinum</i> สร้างสารพิษช้าลง
เนื้อวัวสุก	80 วัน/ 0°C	1-4	ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ

ที่มา : Shelef⁹

โซเดียมแลคเตตความเข้มข้นร้อยละ 2.5-5.0 สามารถยับยั้ง *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *L. monocytogenes* และแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อ การใช้โซเดียมแลคเตตความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับโซเดียมแอสซิเตตความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ช่วยยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในแฮมและผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเป็นเวลา 5 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4°C นอกจากนี้มีรายงานว่า กรดโพลีแลคติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 สามารถช่วยเพิ่มอายุการเก็บเนื้อสัตว์สดที่บรรจุในสภาพสุญญากาศโดยช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสีย ส่วนกรดแลคติกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ก็ประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน⁴

6.1.7.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรดแลคติกกับกรดอินทรีย์ชนิดอื่น

โดยทั่วไปกรดแลคติกมีประสิทธิภาพต่ำกว่ากรดซอร์บิก กรดแอสติค กรดโพรพิโอนิกและกรดเบนโซอิก ประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ค่า pKa ของกรดและพีเอชของอาหารมีผลต่อปริมาณกรดที่แตกตัวเมื่อเติมกรดอินทรีย์ลงในอาหาร (ตารางที่ 6.5) กรดที่มีค่า pKa สูงกว่าจะมีปริมาณโมเลกุลที่ไม่แตกตัวสูงกว่า มีรายงานเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Yersinia enterocolitica* ของกรดชนิดต่างๆ สามารถจัดลำดับประสิทธิภาพของกรดได้ดังนี้ 1) เมื่อพิจารณาค่าพีเอช: กรดโพรพิโอนิก > กรดแลคติก > กรดแอสติค > กรดซิตริก 2) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นของกรดในรูปที่ไม่แตกตัว (เฉพาะ monoprotic acid เท่านั้น): กรดแลคติก > กรดโพรพิโอนิก > กรดแอสติค 3) ที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน: กรดซิตริก > กรดแลคติก > กรดโพรพิโอนิก > กรดแอสติค นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากรดแลคติกมีประสิทธิภาพมากกว่ากรดมาลิก กรดซิตริก กรดโพรพิโอนิกและกรดแอสติคถึง 4 เท่าในการป้องกันการเพิ่มจำนวนของ *Bacillus coagulans* ในน้ำมะเขือเทศ^{2,8}

ตารางที่ 6.5 อิทธิพลของค่าพีเอชต่อปริมาณอิออนของกรดอินทรีย์ที่แตกตัว (กรดอ่อน)

ชนิดของกรด	ค่า pKa	ปริมาณกรดที่แตกตัวที่ระดับพีเอชต่างๆ (ร้อยละ)		
		พีเอช 4	พีเอช 5	พีเอช 6
กรดแอสติค	4.8	15.5	65.1	94.9
กรดโพรพิโอนิก	4.9	12.4	58.3	93.3
กรดแลคติก	3.8	60.8	93.9	99.3
กรดซิตริก	3.1	81.1	99.6	> 99.1
กรดซอร์บิก	4.8	18.0	70.0	95.9
กรดเบนโซอิก	4.2	40.7	87.2	98.6
พาราเบน	8.5	< 0.1	0.1	0.3

ที่มา : Ray²

ความสามารถในการละลายน้ำของกรดอินทรีย์มีความสำคัญต่อการต้านจุลินทรีย์ กลีเซอรอลของกรดอินทรีย์เช่น แอซีเตต โพรพิโอเนต แลคเตต และซิเตรตสามารถละลายในน้ำได้ดี ขณะที่เบนโซเอต ซอร์เบตและพาราเบนละลายในน้ำได้น้อย ดังนั้นในสารละลายที่มีความเข้มข้นเดียวกันกรดอินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีประสิทธิภาพต่างกัน ประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ในการต้านจุลินทรีย์จะแปรผันตามมวลโมเลกุล ที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีจำนวนโมเลกุลต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์จะให้ผลที่ดีกว่า สมบัติการเป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้วของกรดอินทรีย์ทำให้มีประสิทธิภาพต่างกันด้วย กรดแอซติกและกรดโพรพิโอนิกมีโมเลกุลที่ไม่มีขั้วมากกว่ากรดแลคติกและมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์มากกว่ากรดแลคติก ซิเตรตถูกขนส่งผ่านเยื่อหุ้มโดยกลไกการขนส่งแบบจำเพาะและมีประสิทธิภาพต่ำกว่ากรดที่ไม่มีขั้ว จุลินทรีย์หลายชนิดใช้ออนของกรดอ่อนได้เช่น ใช้แอซีเตตและแลคเตตเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในสภาพที่มีพีเอชสูงขึ้นกลีเซอรอลของกรดเหล่านี้อาจมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่ำลง Nanasombat และ Chooprang⁶ รายงานว่าสภาพที่มีพีเอช 7.0 โซเดียมแลคเตตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทดสอบได้ไม่ดีเท่าที่พีเอช 4.5-5.5 และเมื่อมีการใช้กรดร่วมกันในการยับยั้งพบว่ากรดบางชนิดแสดงผลเสริมฤทธิ์กันอย่างเหมาะสม (เช่น กรดแอซติกและแลคติก กรดโพรพิโอนิกและซอร์บิก)²

6.1.7.5 การใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับวิธีการถนอมอาหารอื่นๆ

การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายในของอาหาร ปัจจัยภายนอกได้แก่ ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ บรรยากาศ และปัจจัยภายในได้แก่ คุณสมบัติของอาหารที่ใช้เช่น ค่าพีเอช a_w ของอาหารและปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปอาหาร (เช่น ไนโตรเจน ความร้อน) หรือปัจจัยที่เกี่ยวกับคุณสมบัติของเชื้อประจำถิ่น สำหรับการยับยั้งหรือการลดการเจริญของจุลินทรีย์อย่างน้อยที่สุดต้องทำให้ปัจจัยบางอย่างเหล่านี้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไป การใช้เพียงวิธีเดียวในการยับยั้งหรือลดการเจริญของจุลินทรีย์นั้นไม่เพียงพอ เนื่องจากผลในด้านของคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารและการจำกัดการใช้ในอนาคต ดังนั้นการใช้หลาย ๆ วิธีร่วมกันมีความเหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่า ซึ่งอาจจะมีการใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ หรือการใช้กรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ระดับอุณหภูมิสูงหรือการใช้กรดอินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกันเป็นต้น¹ Nanasombat และ Chooprang⁶ ได้ศึกษาผลของโซเดียมแลคเตต (1.91 มิลลิกรัมต่อกรัม) โซเดียมแอซีเตต (8.4 มิลลิกรัมต่อกรัม) และโพแทสเซียมซอร์เบต (2.56 มิลลิกรัมต่อกรัม) ร่วมกับการแช่แข็งที่อุณหภูมิ $-23 \pm 2^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมงและการทำให้ละลายด้วยอัตราช้าต่อการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella Rissen* และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรพบว่า จำนวนเซลล์ *S. Rissen* และ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรลดลงเมื่อระยะเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้นและหลังจากแช่แข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ *S. Rissen* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตน้อยกว่าใน

เนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแอสซิเตต แต่จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตหรือโซเดียมแอสซิเตตน้อยกว่าในเนื้อสุกรที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบต เมื่อแช่แข็งครบ 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ *S. Rissen* ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตและ *S. aureus* ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตมีจำนวนมากที่สุด นอกจากนี้การใช้กรดร่วมกับสารสกัดจากพืช อาจให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการต้านจุลินทรีย์ เช่น จากการทดลองของ Nanasombat และคณะ¹¹ ซึ่งพบว่าการเติมโซเดียมแลคเตตร่วมกับสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยผสมที่ประกอบด้วย สารสกัดจากผักแพรว (*Polygonum odoratum*) ใบขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) ใบชะมวง (*Garcinia cowa*) และใบแขยง (*Limnophila aromatica*) มีผลช่วยลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในกุ้งแช่แข็งได้มากกว่าการเติมโซเดียมแลคเตตเพียงอย่างเดียวหลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 21 วันที่อุณหภูมิ 4°C

6.1.8 ซัลเฟอร์ไดออกไซด์และซัลไฟต์

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) เกลือโซเดียมและเกลือโพแทสเซียมของซัลไฟต์ ($=\text{SO}_3$) และไบซัลไฟต์ ($=\text{S}_2\text{O}_5$) ทั้งหมดทำปฏิกิริยาคลายๆกัน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ถูกนำมาใช้ในรูปแบบของแก๊สหรือรูปของเหลวหรือในรูปแบบเกลือของกรดในการทำผลไม้แห้ง น้ำมะนาว ไวน์ กากน้ำตาล น้ำผลไม้และอื่นๆ มีการนำสารประกอบเหล่านี้มาใช้ในการถนอมอาหารตั้งแต่ยุคโบราณ และใช้เป็นสารถนอมเนื้อในสหรัฐอเมริกาอย่างน้อยตั้งแต่ปี ค.ศ. 1813 อย่างไรก็ตามห้ามใช้สารนี้ในเนื้อสัตว์หรืออาหารชนิดอื่นที่เป็นแหล่งของกรดอะมิโน thiamine ถึงแม้ว่าซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะมีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์แต่ก็ถูกใช้ในอาหารบางชนิดในฐานะของสารต้านอนุมูลอิสระ¹

ปริมาณอนุมูลของกรดซัลฟูรัสที่มีมากขึ้นกับค่าพีเอชโดยเฉพาะอนุมูล SO_2 เหมาะกับค่าพีเอชต่ำกว่า 3 ส่วนอนุมูล HSO_3^- เหมาะกับค่าพีเอชระหว่าง 3-5 และอนุมูล SO_3^{2-} เหมาะกับค่าพีเอช ≥ 6.0 สำหรับผลของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ต่อการต้านจุลินทรีย์ SO_2 มีประสิทธิภาพที่ค่าพีเอชต่ำต่อเชื้อ *Acetobacter* spp. และแบคทีเรียกรดแลคติกที่ระดับพีเอชต่ำ ความเข้มข้น 100-200 ppm มีประสิทธิภาพในน้ำผลไม้และเครื่องดื่มต่างๆ ความเข้มข้นยิ่งสูงยิ่งทำลายแบคทีเรียได้ดี ยีสต์ค่อนข้างไวหรือได้รับอันตรายได้ง่ายระดับปานกลางโดย SO_2 ถ้าเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติกหรือแบคทีเรียกรดแอสติกและเชื้อรา จุลินทรีย์ที่ยืดต้องการอากาศ (aerobic species) ในการเจริญมากเท่าใดก็จะยิ่งไวต่อ SO_2 มากเท่านั้นถ้าเทียบกับจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่หมักได้ดี (fermentative species) กรดซัลฟูรัส (sulfurous acid) ที่ความเข้มข้น 0.2-20 ppm มีประสิทธิภาพต่อยีสต์บางชนิดเช่น *Saccharomyces*, *Pichia* และ *Candida* ขณะที่การยับยั้ง *Zygosaccharomyces bailii* ต้องใช้ที่ความเข้มข้นถึง 230 ppm ถึงจะยับยั้งเชื้อนี้ได้ เชื้อราเช่น *Botrytis* บนผลองุ่นสามารถถูกควบคุมโดยการรมควัน SO_2 เป็นระยะๆได้ และสามารถใส่ไบซัลไฟต์ในการทำลายสารพิษอะฟลาทอกซินได้ มีรายงานว่าทั้ง aflatoxin B1 และ aflatoxin B2 สามารถถูกทำให้ลดลงในข้าวโพดได้ สำหรับกลไกการ

ยับยั้งเชื้อโดย SO_2 มีข้อเสนอแนะหนึ่งกล่าวว่าเกี่ยวข้องกับกรดซัลฟูรัสในรูปที่ไม่แตกตัวและการลดลงของค่าพีเอชที่มีผลต่อกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ อีกข้อเสนอแนะหนึ่งกล่าวว่าเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการรีดิวซ์ที่สูงที่ทำให้สารนี้สามารถลด oxygen tension ไปยังจุดที่ต่ำกว่าจุดที่เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนจะเจริญได้หรือกระทำโดยตรงต่อระบบเอนไซม์ ซึ่งเชื่อว่า SO_2 เป็นสารพิษต่อเอนไซม์ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยไปยับยั้งเอนไซม์ที่มีความสำคัญ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ใช้ในการทำแห้งเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดสารสีน้ำตาล (enzymatic browning reaction) ¹

6.1.9 ไนเตรตและไนไตรต์

เนื่องจากการค้นพบโดยบังเอิญว่าเนื้อมีสีแดงสวยจากการมีไนเตรตผสมอยู่ในเกลือ สิ่งที่ค้นพบจากการสังเกตนี้ทำให้มีการใช้ในเตรตเติมลงในเนื้อโดยตรงเพื่อถนอมรักษาน้ำเนื้อ ในช่วงศตวรรษที่ผ่านมา ผลงานวิจัยได้แสดงให้เห็นว่าไนเตรตที่เติมลงในเนื้อถูกรีดิวซ์ไปเป็นไนไตรต์โดยแบคทีเรีย ดังนั้นไนไตรต์จึงมีบทบาทสำคัญในการทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเกลือมีสีแดงสวย โดยการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนที่ละลายน้ำได้ซึ่งก็คือไมโอโกลบิน (myoglobin) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ สังกัดกระทรวงเกษตร (USDA) ของอเมริกาได้อนุญาตให้ใช้ในเตรตในการหมักเนื้ออย่างเป็นทางการในปี ค. ศ. 1908 และงานวิจัยในช่วงต่อมาก็ทำให้ USDA อนุญาตให้เติมไนไตรต์ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้ โดยเป็นส่วนผสมหนึ่งของสูตร (curing recipe)

คุณสมบัติของไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเกลือ (cured meat) ค่อนข้างเด่น ไนไตรต์และไนเตรตเป็นสารที่มีหน้าที่หลายประการ (multifunctional compound) เช่น ช่วยทำให้เนื้อเป็นสีชมพูสวย ทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีของ cured meat ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะ *Clostridium botulinum* และช่วยยับยั้งการเกิด oxidative rancidity

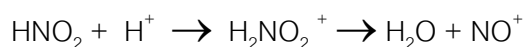
6.1.9.1 ปฏิกิริยาเคมีของไนไตรต์

โซเดียมไนไตรต์ (Sodium nitrite) เป็นสารที่มีผลึกสีเหลืองอ่อน ละลายน้ำได้ เมื่อละลายในน้ำจะเป็นสารละลายที่แตกตัวเป็นไอออนได้สูงและเป็นด่างเล็กน้อย ไอออนของไนไตรต์ ค่อนข้างเป็นไอออนที่จะทำปฏิกิริยาได้สูง (highly reactive ion) และสามารถใช้เป็น reducing agent และ oxidizing agent

คำว่าไนเตรตจะหมายถึงไอออนของไนไตรต์ (NO_2^-) และกรดไนตรัส (HNO_2) กรดไนตรัสเป็นสารที่จะทำให้เกิด nitrosating compound แม้ว่าจะมีกรดไนตรัสเพียงความเข้มข้นต่ำก็สามารถให้ nitrosating compound ที่ทำปฏิกิริยาได้สูงมาก

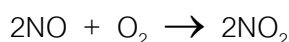
ขั้นตอนแรกของปฏิกิริยาเริ่มจากการที่กรดไนตรัสทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนไอออน จากนั้นก็ทำให้ได้โมเลกุลของ nitrous oxide (NO) ที่อยู่ในสภาพเป็นกลาง ส่วนในรูปที่มีประจุบวกเรียกว่า

nitrosonium (NO^+) เป็น strongest nitrosating compound กรดแก๊สที่เกิดขึ้นคือ nitrous acidum (H_2NO_2) และ nitrosonium ion (NO^+) ดังสมการ



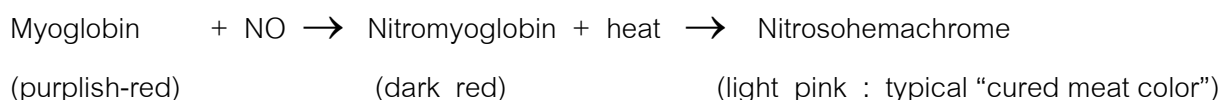
ไนไตรต์ในรูปของไนตริกออกไซด์ (NO) มีความสำคัญต่อการเกิดสีที่ดีของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประกอบเชิงซ้อนของไนตริกออกไซด์กับ heme pigments ในเนื้อก็คือ ไนโตรซิลไมโอโกลบิน (nitrosylmyoglobin) ไนโตรซิลฮีโมโกลบิน (nitrosylhemoglobin) และได้ไนโตรซิลฮีโมโครม (dinitrosyl hemochrome) ทำให้เกิดสีชมพูและสีแดงของ cured meat

ไนตริกออกไซด์ เมื่ออยู่ในสภาพมีอากาศจะถูกออกซิไดซ์อย่างรวดเร็ว ทำให้สีของ cured meat ไม่คงตัว



ปฏิกิริยานี้สามารถอธิบายคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไนไตรต์ เนื่องจากปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นเร็วมาก และไนตริกออกไซด์ยังเป็นตัวหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (radical chain terminator) ในกระบวนการออกซิเดชันอีกด้วย ด้วยเหตุผลนี้จึงสามารถอธิบายได้ว่าทำไมไนไตรต์จึงเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากในการชะลอการเกิดออกซิเดชัน นอกจากนี้ยังได้เสนอกลไก 3 กลไกที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไนไตรต์ใน cured meat ดังนี้ ก) การสร้างไนโตรซิลไมโอโกลบิน (MbNO) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant property) ข) เมื่อได้รับความร้อนไนโตรซิลไมโอโกลบินทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่คงตัวก็คือ ไนโตรซิลฮีโมโครม (nitrosylhemochrome) ซึ่งขัดขวาง catalytic activity ของ heme iron และยังช่วยป้องกันการปล่อย heme iron ค) ไนไตรต์ไปคีเลต (chelate) ธาตุชนิดอื่นที่ไม่ใช่ heme iron เช่นทองแดง (copper) และโคบอลต์ (cobalt) ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่คงตัว ดังนั้นจึงช่วยยับยั้ง catalytic activity

กระบวนการทั้งหมดในการหมักเกลือ ในที่สุดจะทำให้การสร้าง nitric oxide myoglobin ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้



ปฏิกิริยาเหล่านี้ไม่สามารถผันกลับได้ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า แหล่งของไนโตริกออกไซด์ (NO) ก็คือไนไตรต์ ไนโตรโซไมโอโกลบินเป็นรงควัตถุชนิดแรกของ cured meat เมื่อมีการให้ความร้อนไนโตรโซไมโอโกลบินจะเปลี่ยนเป็นไนโตรโซฮีโมโครม ซึ่งเป็นโปรตีนที่เสียสภาพทำให้สีของ cured meat มีสีชมพู¹²

Nitrite Intake และ Nitrosamine

เมื่อต้นศตวรรษที่ 20 มนุษย์ได้ตระหนักถึงผลของไนเตรตไนไตรต์ต่อสุขภาพ ไนไตรต์ที่ความเข้มข้นสูงมีความเป็นพิษต่อร่างกาย และยังมีผลในการทำให้เกิดไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogenic nitrosamine) แต่ถ้าใช้ไม่เกินปริมาณที่กฎหมายกำหนดก็จะเป็นอันตราย อย่างไรก็ตามมีรายงานความเป็นพิษของไนไตรต์จากการใช้ในไตรต์ที่มากเกินไป ความเข้มข้นของไนเตรตที่ทำให้ถึงตายได้ (lethal nitrite dose) คือ 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไนไตรต์สามารถลดปริมาณวิตามินเอที่เก็บไว้ในตับและขัดขวางการทำงานของไทรอยด์ และยังออกซิไดซ์ฮีโมโกลบินไปเป็นเมทฮีโมโกลบิน (methemoglobin) ทำให้ความสามารถของเลือดในการขนส่งออกซิเจนลดลง ความผิดปกตินี้เรียกว่า เมทฮีโมโกลบินีเมีย (methemoglobinemia) อาจทำให้ถึงตายได้โดยส่วนใหญ่เกิดขึ้นกับเด็กทารก

สารไนโตรซามีน (nitrosamine) หรือไนโตรโซไพโรลิดีน (nitrosopyrrolidine) อาจเกิดขึ้นได้ใน cured meat ดังนั้นการรายงานของ FDA-USDA เมื่อวันที่ 5 กพ. 2515 ว่าพบไนโตรซามีนในเบคอนทอดที่ขายปลีกโดยพบในปริมาณระหว่าง 30 - 106 ppb แต่พบว่าเบคอนดิบปราศจากไนโตรซามีน ไนโตรซามีนเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของไนไตรต์หรือกรดไนตริกกับ secondary amine หรือ tertiary amine¹²

Cured meat มีผลเล็กน้อยต่อปริมาณไนไตรต์ที่ร่างกายได้รับ มีรายงานว่าร่างกายได้รับไนไตรต์บางส่วนจากการรับประทาน cured meat ไนไตรต์ส่วนที่เหลือมาจากการรีดิวส์ไนเตรตโดยจุลินทรีย์ในปาก ผักที่มาจากส่วนใบบางชนิดเช่น ผักโขม ผักกาดหอมและผักที่เป็นส่วนราก เช่น หัวบีท หัวเรดดิช (radish) เป็นแหล่งไนเตรตที่สำคัญ นอกจากนี้ น้ำดื่มก็มีปริมาณไนเตรตสูง

6.2 สารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ

ในปัจจุบันมีความพยายามที่จะลดการใช้วัตถุเจือปนอาหารเช่น สารเคมีต้านจุลินทรีย์ เพิ่มการผลิตอาหารที่ใช้สารธรรมชาติมาก สิ่งนี้ได้กระตุ้นให้มีการวิจัยเพื่อค้นหาสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติใหม่มาทดแทนสารเคมีกันเสีย การใช้ประโยชน์ของสารเคมีกันเสียได้ถูกควบคุมโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) และองค์กรในประเทศอื่นๆ นอกจากนี้ FAO (Food and

Agriculture Organization) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ของ United Nations ได้ควบคุมการใช้สารเคมีต้านเชื้อจุลินทรีย์ในระดับนานาชาติโดยได้ให้คำแนะนำเกี่ยวกับปริมาณการใช้ ความปลอดภัยรวมทั้งปริมาณเฉลี่ยของการได้รับสารในแต่ละวัน (average daily intake, ADI) สารเจือปนอาหารที่ใช้จะต้องได้รับการพิสูจน์แล้วว่าไม่เป็นพิษในปริมาณที่ใช้ สารหลายชนิดได้ถูกอนุญาตให้ใช้ได้อย่างปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) สารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติพบได้หลากหลาย สารต้านจุลินทรีย์หลักๆ มีอยู่ในพืช สัตว์และเชื้อจุลินทรีย์ (ตารางที่ 6.6) ¹³

ตารางที่ 6.6 สารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ

ประเภทแหล่งที่มา	สารต้านจุลินทรีย์	ตัวอย่างของแหล่งที่มา
สัตว์- มีอยู่แล้ว	แลคโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase)	น้ำนม
	แลคโตเฟอริน (lactoferrin)	
	ไลโซไซม์ โอโวทรานส์เฟอริน (ovotransferrin)	ไข่
	อะวิดิน (avidin)	
สัตว์- ชักนำให้เกิดขึ้น	ทรานส์เฟอริน (transferrins)	ซีรัม (serum)
	แอนติบอดี (antibodies)	ระบบภูมิคุ้มกัน
	แอตติซิน (atticins) ซีโครปิน (cecropins)	แมลง
จุลินทรีย์	ไนซิน (nisin) เพ็ดดิโอซิน (pediocin) และแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ	แบคทีเรียกรดแลคติก
พืช (ก่อนติดเชื้อ)	กรดอินทรีย์	สมุนไพรรักษาโรค และพืชชนิดอื่น
	สารประกอบฟีนอลิก	
	Methylated flavones	
	ฟลาโวนอล (Flavonols)	
	อัลคาลอยด์ (alkaloids เช่น α -tomatine)	
	Hydroxyphenyl-threne derivatives	แลคโตน (lactones)
	สารประกอบคล้ายโปรตีน	
	กลูโคไซด์ (glucosides) ไกลโคไซด์ (glycosides) และไดอีน (dienes)	
พืช (หลังติดเชื้อ)	สารประกอบฟีนอลิก	พืชติดเชื้อหรือได้รับความเสียหาย
	ซัลฟอกไซด์ (sulfoxides)	
	ไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanates)	
	ไฟโตเลคซิน (phytoalexins)	

ที่มา: Vigil และคณะ¹³

6.2.1 สารต้านจุลินทรีย์จากพืช

พืช สมุนไพร และเครื่องเทศ (spice) รวมทั้งน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชเหล่านี้ประกอบด้วยสารหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราได้ เท่าที่ทราบมีพืชมากกว่า 1,340 ชนิดเป็นแหล่งของสารต้านจุลินทรีย์ สารต้านจุลินทรีย์ในพืชมักจะอยู่ในส่วนของน้ำมันหอมระเหยจากส่วนของใบ เช่น โรสแมรี่ (rosemary) ดอกและช่อดอกเช่น กานพลู (clove) หัว เช่น หัวหอมและกระเทียม ส่วนเหง้า (rhizome) เช่น ขิง ผลเช่น พริกไทย กระวานหรือส่วนอื่นๆ

6.2.1.1 เครื่องเทศและน้ำมันหอมระเหย

เครื่องเทศใช้เติมลงในอาหารเพื่อปรุงแต่งรสชาติ หลายชนิดมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้จึงมีการนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหาร บางชนิดใช้เป็นยารวมทั้งใช้เพื่อช่วยให้เกิดความอยากอาหารและช่วยย่อยอาหาร มีผู้ให้คำจำกัดความของเครื่องเทศว่าเป็นผลิตภัณฑ์จากพืชที่ทำให้แห้ง รวมทั้งพืชเมื่อบรรจุที่มีสาร aromatics (Tropical aromatics) เช่น พริกไทย อบเชย กานพลู สมุนไพรจำพวกใบ (leafy herbs) เช่น โหระพา (basil) ออริกาโน (oregano) จำพวกเมล็ด เช่น งา (sesame) มัสตาร์ด (mustard) และจำพวกผัก เช่น หัวหอม กระเทียม เครื่องเทศใช้ปรุงแต่งรสชาติของอาหารเป็นหลัก ได้นำเครื่องเทศบางชนิดมาใช้เป็นสารถนอมอาหาร บางชนิดใช้เป็นยา ช่วยให้เกิดความอยากอาหาร (appetizers) และช่วยย่อยอาหาร (digestives) เครื่องเทศบางชนิดมีคุณสมบัติต้านทานอนุมูลอิสระได้ ในขณะที่เครื่องเทศบางชนิดมีคุณสมบัติต้านและทำลายจุลินทรีย์ได้ดีอีกด้วย¹⁴

เครื่องเทศที่มีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์สูงที่สุดได้แก่ อบเชย กานพลูและออร์สไปร์ท (allspice) สมบัติการต้านจุลินทรีย์หลักๆ พบน้ำมันหอมระเหยของเครื่องเทศเหล่านี้ มีรายงานว่ามี cinnamic aldehyde (3-phenyl-2-propenal) เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หลักๆ ที่พบในอบเชย นอกจากจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแล้วยังยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์จากเชื้อราอีกด้วย นอกจากนี้สารอัลดีไฮด์อิมตัวอื่นๆ (citral และ citronellol) แอลกอฮอล์ไม่อิ่มตัว (unsaturated alcohol เช่น geraniol) และเทอร์ปีนแอลกอฮอล์ (terpene alcohol เช่น menthol) มีกิจกรรมต้านเชื้อรา geraniol และ citronellol สามารถยับยั้งการเจริญของ *Erwinia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้ผลไม้และผักเน่าเสีย¹⁵ มีผู้ทำการจำแนกชนิดสารที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันอบเชยพบว่า น้ำมันเปลือกอบเชยประกอบด้วยสารสำคัญจำนวนมากถึง 72 ชนิดโดยมีซินนามัลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) เป็นสารประกอบหลักซึ่งมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 75 และสารประกอบอื่นๆอีกหลายชนิดได้แก่ ซินนามิลแอซีเตต (cinnamyl acetate) ร้อยละ 5.0 คาร์โยไฟลีน (caryophyllene) ร้อยละ 3.3 ลินาลูล (linalool) ร้อยละ 2.4 ยูจีนอล (eugenol) ร้อยละ 2.2 1:8-cineole ร้อยละ 2.0 *p*-ไซมีน (*p*-cymene) ร้อยละ 1.1 และสารอื่นๆ ปริมาณน้อยอีกหลายชนิด¹⁶ Nanasombat และ Wimuttigol¹⁷ ได้ศึกษากิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ 16 ชนิดโดยน้ำมันหอมระเหยของเทียนสัตตบงชัญ เรว์ อบเชย เทียน

ตาตักแตน จันทน์เทศ ขมิ้นอ้อย พริกหอมและกระเทียม พบว่า น้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยแบคทีเรียที่มีความไวต่อน้ำมันอบเชยมากที่สุด คือ *Bacillus cereus* ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันอบเชย น้ำมันเทียนตาตักแตน น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี เชื้อราที่มีความไวต่อน้ำมันเหล่านี้คือ *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus ochraceus* และ *Fusarium moniliforme* และเมื่อทดสอบหาค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) ของน้ำมันหอมระเหยผสม 2 คู่ได้แก่ 1) น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศ และ 2) น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันพริกหอมพบว่ามีค่า FICI อยู่ในช่วง 0.32-0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Salmonella* Rissen นอกจากนี้ Nanasombat และ Lohasupthawee¹⁸ ได้ศึกษาสมบัติของสารสกัดหยาบและน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ 14 ชนิด ได้แก่ กระวาน อบเชย กานพลู ลูกผักชี ยี่ห่วย กระเทียม ขิง ใบกระเพรา ใบมะกรูดและผิวมะกรูด ลูกจันทน์ ดอกจันทน์ พริกไทยขาว พริกไทยดำและขมิ้นในการต้านการเจริญของ *Salmonella* 20 ซีโรไทป์และ enterobacteria 5 ชนิดพบว่า สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยมีประสิทธิภาพมากกว่าสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศชนิดเดียวกัน น้ำมันกานพลูและน้ำมันผิวมะกรูดต้านจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด น้ำมันกระวาน น้ำมันลูกผักชีและน้ำมันยี่ห่วยก็มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูงเช่นกัน *Salmonella* Typhimurium และ *E. coli* ไวต่อการถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากเครื่องเทศมากที่สุด S. Rissen และ S. Derby มีความต้านทานสูงที่สุดต่อการถูกยับยั้งโดยสารสกัดจากเครื่องเทศ

โดยทั่วไป เครื่องเทศและน้ำมันหอมระเหยในอาหารมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์น้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียแกรมบวกไวต่อการถูกยับยั้งโดยเครื่องเทศมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในบรรดาแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียกรดแลคติกต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยเครื่องเทศได้ดีที่สุด¹ กิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยเครื่องเทศเป็นผลมาจากการมีสารสำคัญหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ (ตารางที่ 6.7) เช่นฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของกานพลูเป็นผลมาจากการมียูจีนอล (eugenol หรือ 2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol) เป็นองค์ประกอบหลัก น้ำมันกานพลูมียูจีนอลสูงถึงร้อยละ 70-90²⁰ สารนี้ต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด²¹ กานพลูยังมีแทนนินปริมาณสูง (ร้อยละ 10-19) ซึ่งช่วยเพิ่มกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของกานพลู²⁰ เมื่อใช้เครื่องเทศในรูป whole spice ค่าความเข้มข้นต่ำสุดสำหรับการยับยั้ง (minimum inhibitory concentration, MIC) มีค่าร้อยละ 1-5 สำหรับจุลินทรีย์ที่ไวต่อการถูกยับยั้ง¹

น้ำมันผิวมะกรูดก็ประกอบด้วยสารต้านจุลินทรีย์เช่นกัน สารประกอบหลักในน้ำมันผิวมะกรูด ได้แก่ β -ไพเนน (β -pinene) ร้อยละ 30.6 ลิโมนีน (limonene) ร้อยละ 29.2 ซาบินีน (sabinene) ร้อยละ 22.6 และสารประกอบอื่นๆ ขณะที่สารประกอบหลักของใบมะกรูดคือซิโทรเนลลอลร้อยละ 65.4²¹

เครื่องเทศกลุ่ม *Allium* species เช่น กระเทียม (*Allium sativum*) หอม (*Allium cepa*) และ leek (*Allium porrum*) ซึ่งนิยมรับประทานกันมากมีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์สูง ได้มีการใช้กระเทียมในทางยากันมาหลายศตวรรษ จนกระทั่งช่วงปี ค.ศ. 1940-1949 มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันว่ากระเทียมมีสมบัติทั้งการต้านจุลินทรีย์และสมบัติทางยา อัลลิซิน (allicin ซึ่งเป็น diallyl thiosulfinate (2-propenyl-2-propenethiol sulfinate) ในกระเทียมมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ มีรายงานว่ากระเทียมสามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 1:85,000 ในอาหารเหลวสำหรับทำปฏิบัติการโดยออกฤทธิ์กว้างต่อแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก¹⁵ อัลลิซิน (allicin) ในกระเทียม (*Allium sativum*) มีปริมาณผันแปรอยู่ในช่วงร้อยละ 0.3-0.5¹

6.2.1.2 พืชสมุนไพร ผักและผลไม้

สมุนไพรไทยหลายชนิดมีรายงานว่ามีความสามารถในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ Nanasombat และคณะ²⁵ ได้ศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ 15 ชนิดในสารสกัดสมุนไพรไทยทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ ชาจีน (*Camella sinensis*) ใบเตย (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) ใบน้อยหน่า (*Annona squamosa* Linn) ใบบัวบก (*Centella asiatica* Linn. Urban) ใบพลู (*Piper betle* Linn.) ใบหม่อน (*Morus alba*) ใบมะยม (*Phyllanthus acidus* Skeels) และผลมะตูม (*Angle marmelos* Correa) ที่สกัดด้วยด้วยเอทานอล พบว่า สารสกัดจากชาจีนและผลมะตูมมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้สูงที่สุด รองลงมาเป็นใบพลู ใบเตย ใบบัวบก ใบหม่อน ใบน้อยหน่าและใบมะยม แบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ไวต่อการยับยั้งด้วยสารสกัดจากชาจีนและผลมะตูมมากที่สุดได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (ค่า MIC 10.4-41.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียที่ไวต่อการยับยั้งโดยสารสกัดทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ดีที่สุดคือ *Leuconostoc mesenteroides* (ค่า MIC 10.4-20.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับยีสต์ที่ไวต่อสารสกัดจากชาจีนมากที่สุดได้แก่ *Hanseniaspora uvarum* และ *Rhodotorula glutinis* (ค่า MIC 41.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนยีสต์ที่ไวต่อสารสกัดจากผลมะตูมที่สุดคือ *Candida lipolytica* และ *Pichia membranaefaciens* (ค่า MIC 83.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ผักหลายชนิดก็มีสารที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์ได้เช่นกัน Nanasombat และ Teckchuen²⁶ ได้ทดสอบสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 19 ชนิดโดยสารสกัดจากผักพื้นบ้านไทยจำนวน 20 ชนิดพบว่าสารสกัดหยาบจากพืช 4 ชนิดซึ่งสกัดด้วยเมทานอลได้แก่ ใบชะมวง (*Garcinia cowa*) ใบขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) ใบแขยง (*Limnophila aromatica*) และใบแพรว (*Polygonum odoratum*) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดี โดยสารสกัดจากใบแขยงและใบชะมวงมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์สูงกว่าสารสกัดจากใบแพรวและสารสกัดจากใบแพรวมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารสกัดจากใบขี้เหล็ก *B. cereus* และ *S. aureus* ถูกยับยั้งได้โดยสารสกัดจากใบแขยงมากที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2.6 มก.ต่อมล.

ตารางที่ 6.7 เครื่องเทศและสารต้านจุลินทรีย์หลักที่พบในเครื่องเทศ

เครื่องเทศ/ส่วนของพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	องค์ประกอบหลัก
เทียนสัตตบุชย์ (anise)/ เมล็ด	<i>Pimpinella anisum</i>	anethole ²¹
พริกไทยดำ (black pepper)/ ผล	<i>Piper nigrum</i>	monoterpenes, sesquiterpenes ¹³
กระวาน (cardamom)/ เมล็ด	<i>Amomum krervanh</i>	1,8-cineole, α -terpinyl acetate ¹⁹
อบเชย (cinnamon)/ เปลือก	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Cinnamaldehyde, cinnamyl acetate, caryophyllene, linalool, eugenol ²²
กานพลู (clove)/ flower buds	<i>Syzygium aromaticum</i>	eugenol, cariofilene ¹³
ลูกผักชี (coriander)/ ผล	<i>Coriandrum sativum</i>	d-linalool, d- α -pinene, β -pinene ¹³
ยี่ห่วย (cumin)/ เมล็ด	<i>Cuminum cyminum</i>	cuminaldehyde, p-cymene ¹³
กระเทียม (garlic)/ หัว	<i>Allium sativum</i>	diallyl disulfide, diethyl sulfide, diallyl trisulfide, allicin ¹³
ขิง (ginger)/ เหง้า	<i>Zingiber officinale</i>	gingerone, gingerol ²²
โหระพา (basil)/ ใบ	<i>Ocimum basilicum</i>	α -linalool, methyl chavicol, eugenol, cineol, geraniol ¹³
มะกรูด (kaffir lime)	<i>Citrus hystrix</i> DC.	Leaves and Fruits
ตะไคร้ (lemongrass)/ เหง้า	<i>Cymbopogon citratus</i>	citral, geraniol ¹³
ดอกจันทน์ (mace)/ เปลือกหุ้มเมล็ด	<i>Myristica fragrans</i>	sabinene, terinen-4-ol, safrole, α -pinene ²⁴
มัสตาร์ด (mustard)/ เมล็ด	<i>Brassica hirta</i> , <i>B. Juncea</i> , <i>B. nigra</i>	allyl-isothiocyanate ¹³
โรสแมรี่ (rosemary)/ ใบ	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Borneol, cineol, camphor, α -pinene, p-cymene ¹³
ลูกจันทน์ (nutmeg)/ ผล	<i>Myristica fragrans</i>	α -pinene, β -pinene, sabinene ¹⁹
ไทม์ (thyme)/ ใบ	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol, carvacrol, <i>l</i> -linalool, geraniol, <i>p</i> -cymene ¹³
sage/ ใบ	<i>Salvia officinalis</i>	Thujone, cineol, borneol, thymol, eugenol ¹³

รองลงมาคือ *S. Typhimurium* (ค่า MIC 10.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) *Listeria monocytogenes* และ *Yersinia enterocolitica* ถูกยับยั้งได้โดยสารสกัดจากใบชะมวงมากที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 5.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากใบแพรวมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดและมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดโดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 315.35 ไมโครกรัมของสารสกัดต่อมิลลิกรัมของ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) สารสกัดจากใบแพรวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติที่ทดสอบ (vero cells) โดยมีค่า IC_{50} มากกว่า 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมได้ในระดับปานกลางซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 6.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์หาชนิดของสารสำคัญในใบแพรวโดยใช้วิธี HPLC พบสารฟลาโวนอยด์หลัก ๆ จำนวน 5 ชนิดได้แก่ รูทีน (rutin) คาเทชิน (catechin) ควอเซทิน (quercetin) เคมเฟอรอล (kaempferol) และไอโซรามาเนทิน (isorhamnetin) โดยสารชนิดที่พบมากที่สุด ใบแพรวคือ รูทีนซึ่งมีปริมาณร้อยละ 3.77 น้ำหนักโดยน้ำหนักของสารสกัดแห้ง

สารสกัดจากใบชะมวงมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกับสารสกัดจากเปลือกชะมวงตามการรายงานของ Joseph และคณะ²⁷ ซึ่งได้พบว่าสารสกัดจากเปลือกชะมวงสามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 3000 ppm และยังสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษ aflatoxin B1 เมื่อเร็ว ๆ นี้ Negi และคณะ²⁸ ได้รายงานว่าการเปลือกของผลชะมวงสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ Panthong และคณะ²⁹ ยังได้รายงานว่าพบ tetraoxygenated xanthenes (cowaxanthenes A-E) รวมทั้ง tetraoxygenated xanthenes เดิมที่เคยพบในสารสกัดหยาบของผลชะมวงที่สกัดด้วยเฮกเซน นอกจากนี้ Mahabusarakam และคณะ³⁰ ได้แยกแซนโทน (xanthenes) 5 ชนิด คือ cowagarcinone A-E จากยางของต้นชะมวง

สารสกัดจากใบแขมมีสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดเนื่องจากพืชชนิดนี้ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ใบแขมประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยที่ไม่มีสี ปริมาณร้อยละ 0.1 ซึ่งมีฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย มีผู้รายงานว่าการพบสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เช่น nevadensin 7-O-glycoside และ 8-hydroxylated flavones ในใบแขม³¹ สำหรับผักแพรวประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิดได้แก่ (Z)-3-hexenal, (Z)-3-hexenol ดีคานอล (decanal) อันดีคานอล (undecanal) และโดดีคานอล (dodecanal)³² Thongsard และคณะ³³ พบว่าใบและดอกชี้เหล็กมีสารสำคัญที่เรียกว่า บาราคอล (barakol)

สารสกัดจากผลไม้บางชนิดมีสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ Mayachiew และ Devahastin³⁴ ซึ่งพบว่ามะขามป้อมมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง เท่ากับ 21.8 ± 0.6 มิลลิเมตร มีค่า MIC เท่ากับ 13.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC เท่ากับ 13.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC พบว่ามะขามป้อมมีสารที่

เกี่ยวข้องกับการมีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ซึ่งประกอบด้วยวิตามินซี (ร้อยละ 11.21) สารแทนนินและกรดแกลลิก

Nanasombat และคณะ³⁵ ได้รายงานว่าการสกัดจากผลมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์สูง จึงได้ทดลองเปรียบเทียบการใช้สารสกัดจากมะขามป้อมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25-2.0 เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพในเนื้อหมูบดแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C โดยพบว่าสารสกัดจากมะขามป้อมที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวน *Pseudomonas* ทั้งหมดในเนื้อหมูบดแช่เย็น หลังจากการเก็บรักษาหมูบดแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 วัน จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวน *Pseudomonas* ทั้งหมดมีอัตราการรอดชีวิตเพียงร้อยละ 23.27 และ 2.06 ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากมะขามป้อมความเข้มข้นร้อยละ 2 ยังมีผลช่วยชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษาอีกด้วย

Nanasombat และคณะ³⁶ ได้ศึกษาสมบัติของสารสกัดจากสมุนไพรไทยทั้งหมด 34 ชนิดซึ่งสกัดด้วยเมทานอลในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียกรดอะซิติกที่ทำให้อาหารเสียพบว่า สารสกัดจากลำต้นไต้ดินของว่านน้ำ (*Acorus calamus*) ยับยั้งการเจริญของ *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ได้ดี (ค่า MIC เท่ากับ 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดจากลำต้นชุมเห็ดเทศ (*Cassia alata*) ผลมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) กลีบดอกบัวหลวงแดง (*Nymphaea lotus*) และว่านน้ำมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของ *Rhodotorula glutinis* และ *Schizosaccharomyces pombe* ได้ดี (ค่า MIC เท่ากับ 0.64-1.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารสกัดจากเกสรของหญ้าฝรั่ง (*Crocus sativus*) ยับยั้งการเจริญของ *Hanseniaspora uvarum*, *Zygosaccharomyces rouxii* และ *Acetobacter aceti* ได้ค่อนข้างดี (ค่า MIC เท่ากับ 2.56-7.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารสกัดจากชุมเห็ดเทศต้านการเจริญของ *Lactobacillus casei* ได้ค่อนข้างดี (ค่า MIC เท่ากับ 2.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สารสกัดจากว่านน้ำ ชุมเห็ดเทศ มะขามป้อม บัวหลวงแดง หญ้าฝรั่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นผลมาจากการมีสารสำคัญหลายชนิด ดังจะทราบได้จากรายงานการวิจัยของ Gyawali และ Kim³⁷ ที่ได้รายงานไว้ว่า ในเหง้าของว่านน้ำนั้นประกอบด้วยสารสำคัญอยู่หลายชนิด ได้แก่ [E,Z]-2,4-decadienal, linalool, farnesol, methyleugenol, α -asarone และ β -asarone ซึ่งสาร β -asarone นั้นเป็นสารที่เป็นองค์ประกอบของว่านน้ำที่สำคัญที่พบมากที่สุดโดยมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 46.78 Pongpaichit และคณะ³⁸ ได้ทำการทดลองศึกษาเกี่ยวกับกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของสาร β -asarone ที่แยกได้จากสารสกัดจากว่านน้ำที่สกัดด้วยเมทานอลพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์และเชื้อราได้ดี รวมทั้งยังมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus*, Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), *E. coli* และ

Enteroinvasive *E. coli* ได้โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 5 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC มากกว่า 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Rajput และ Karuppaiyl³⁹ ได้พบว่า สารสกัดจากลำต้นใต้ดินของ ว่านน้ำในสวนที่สกัดด้วยเฮกเซน และสาร β -asarone ที่แยกได้จากส่วนที่สกัดด้วยเฮกเซนนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albicans* ได้ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และ Rahman และคณะ⁴⁰ พบว่าสารประกอบฟลาโวนอยด์จากใบ ชุมเห็ดเทศ ได้แก่ 2,5,7,4'-tetrahydroxy isoflavone และ 3,5,7,4'- tetrahydroxy isoflavone สามารถยับยั้งเชื้อราได้หลายชนิดโดยเฉพาะเชื้อราที่ก่อโรคในคน สัตว์และพืช นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามะขามป้อมประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดได้แก่ สาร Kaempferol 3- β -D-glucopyranoside เคมเฟอรอล (Kaempferol) ควอร์เซทิน (quercetin) ไอโซคอร์ริลาจิน (isocorilagin) และเจอราานิอิน (geraniin) อีกทั้งสารประกอบระเหยได้ เช่น เบต้า-บอร์บอนีน (β -bourbonene) เทอราโคเซน (teracosane) กรดปาล์มิติก (palmitic acid) ไทมอล (thymol) เบต้า-คาร์โยฟิลลิน (β -caryophyllene) และอัลดีเคน (undecane)⁴¹ สำหรับหญ้าฝรั่ง ได้มีรายงานไว้ว่า สารซาฟรานาล (safranal) และโครซิน (crocin) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในหญ้าฝรั่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด⁴² และ Akinjogunla และคณะ⁴³ พบว่าในสารสกัดของใบบัวหลวงแดงมีสารสำคัญได้แก่ แทนนิน ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ แอนทรา ควิโนน ซาโปนิน คาร์ดิแอกไกลโคไซด์ (cardiac glycosides) และฟีนอลิก

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสารสกัดจากเหง้าของว่านนางคำ (*Curcuma aromatica*) และปูด (gall) ของเบญจกานี (*Quercus infectoria*) มีสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ดีโดยเฉพาะ *Bacillus cereus* และ *Yersinia enterocolitica* (ค่า MIC เท่ากับ 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนสกัดจากรากของโกฐน้ำเต้า (*Rheum palmatum*) เหง้าของว่านนางคำ (*Curcuma aromatica*) เหง้าของเปราะหอม (*Kaempferia galanga*) และเปลือกของลำต้นชุมเห็ดเทศมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Porphyromonas gingivalis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคเหงือกอักเสบ (ค่า MIC เท่ากับ 0.32 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)⁴⁴ ซึ่งการที่สารสกัดจากสมุนไพรเหล่านี้มีกิจกรรมยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี อาจเป็นผลมาจากการมีสารสำคัญหลายชนิดเป็นส่วนประกอบเช่น มีการรายงานว่าสารประกอบฟีนอลิกที่สกัดจากเบญจกานีประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดได้แก่ isoquercetin, quercetin, ferulic acid, rutin, coumaric acid, kaempferol, vanillic acid, sinapic acid และ tannic acid โดยพบ tannic acid ในปริมาณสูงถึงร้อยละ 52.85⁴⁵ Wang และคณะ⁴⁶ ได้ศึกษาสารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในสารประกอบฟีนอลิกที่แยกได้จากสารสกัดหยาบจากโกฐน้ำเต้าพบว่า สารสกัดหยาบจากโกฐน้ำเต้าประกอบด้วยแทนนินในปริมาณที่สูงถึงร้อยละ 38.26 นอกจากนี้ยังได้ระบุถึงชนิดของสารประกอบต่าง ๆ ที่พบในสารประกอบฟีนอลิกดังกล่าว ซึ่งพบว่าได้แก่ gallic acid, galloyl glucose, di-O-galloyl-glucose, glucopyranosyl-

galloyl-glucose, coumaroyl-O-galloyl-glucose, trimer of catechin, catechin gallate, catechin-glucopyranoside, carboxyl-chrysophanol-O-glucose และ emodin-O-glucose ซึ่งการที่สารสกัดจากโกฐน้ำเต้านั้นประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิดอาจช่วยให้สารสกัดหายาจากโกฐน้ำเต้ามีกิจกรรมยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด

6.2.2 สารต้านจุลินทรีย์จากสัตว์

เอนไซม์และพอลิเปปไทด์ (polypeptide) อื่นๆที่มีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์เกิดขึ้นตามธรรมชาติในสัตว์เช่นเดียวกับในพืช พอลิเปปไทด์เหล่านี้มักจะถูกจัดจำแนกในด้านการทำงานได้แก่ กลไกที่ขึ้นอยู่กับออกซิเจน (oxygen-dependent mechanism) หรือ กลไกที่ไม่ขึ้นกับออกซิเจน (oxygen-independent mechanism) การยับยั้งหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยกลไกที่ขึ้นอยู่กับออกซิเจนเกี่ยวข้องกับเอนไซม์หรือกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สร้างสารเมแทบอไลต์ของออกซิเจนที่เป็นพิษเช่น ไฮโดรเจน เพอร์ออกไซด์ ซูเปอร์ออกไซด์ไอออน (superoxide ions) และอนุมูลไฮดรอกซิล (hydroxyl radicals) ¹⁵

6.2.2.1 ไลติกเอนไซม์ (lytic enzymes)

ไลโซไซม์ (lysozyme) ซึ่งเป็น mucopeptide glycohydrolase และ ไลติกเอนไซม์อื่นๆ พบในอาหารหลายชนิดและสิ่งที่หลั่งออกมาจากร่างกายเช่น อัลบูเมนของไข่ (egg albumen) น้ำตาและน้ำนม ไลโซไซม์ทำงานโดยแตกสลายพันธะไกลโคไซด์ระหว่าง C₁ ของ N-acetylmuramic acid และ C₄ ของ acetylglucosine ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ไลโซไซม์บางชนิดไฮโดรไลสไคตินหรือมีกิจกรรมเอสเทอเรส (esterase activity) มีรายงานว่า ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เสริมฤทธิ์กับไลโซไซม์โดยทำให้เซลล์แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียแตกเช่น *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia* และ *Pseudomonas* นอกจากนี้ไลโซไซม์แล้วยังมีเอนไซม์อื่นที่แตกสลายคาร์โบไฮเดรตและพันธะเปปไทด์เช่น เอนไซม์ไกลโคซิเดสที่จำเพาะต่อพันธะไกลโคไซด์ (glycoside bond) ระหว่างน้ำตาลใน polypeptide backbone ของเซลล์แบคทีเรีย เอนไซม์อะมิเดส (amidase) ซึ่งปล่อย tetrapeptide จาก N-acetylmuramic acid เอนไซม์เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) และไลเปส ¹⁵ มีรายงานว่าเอนไซม์ที่ทำให้เซลล์แตก (lytic enzymes) มีผลทำลายเซลล์ของแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Campylobacter*, *E. coli*, *Salmonella* และ *V. parahaemolyticus* ซึ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการนำมาใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติเพื่อลดความเสี่ยงของการป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ

6.2.2.2 เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) และออกซิเดส (oxidase)

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส เช่น แลคโตเพอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เป็นเอนไซม์ที่พบมากในน้ำนมวัว แลคโตเพอร์ออกซิเดสออกซิไดส์ไทโอไซยาเนต (thiocyanate) หรือฮาโลเจน (halogens)

ให้สารเมแทบอลิไทต์ที่เป็นพิษ แลคโตเพอร์ออกซิเดสในน้ำนมดิบยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ทำลายแบคทีเรียแกรมลบก่อโรคที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำและ *Salmonella*¹⁵

เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเร่งปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและออกซิเจนให้กรดกลูโคนิก (gluconic acid หรือ D-glucono-δ-lactone) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เอนไซม์ชนิดนี้ถูกนำมาใช้ในการขจัดกลูโคสออกจากไข่ ป้องกันปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard browning reaction) และขจัดออกซิเจนออกจากเครื่องดื่ม มีรายงานว่ากลูโคสออกซิเดสสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *C. perfringens* และ *B. cereus*¹⁵

6.2.2.3 ทรานส์เฟอริน (transferrin)

การเจริญและการอยู่รอดของแบคทีเรียก่อโรคขึ้นอยู่กับปริมาณของเหล็ก การจับของธาตุเหล็กผ่านการคีเลชัน (chelation) โดยพอลิเปปไทด์ที่จับกับเหล็ก (iron-binding polypeptides) เช่น ทรานส์เฟอรินและโปรตีนที่เกี่ยวข้องเป็นกลไกการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องใช้ธาตุเหล็ก มีรายงานว่าโอวอทรานส์เฟอริน (ovotransferrin) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนประมาณร้อยละ 13 ในไข่ขาวสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *E. coli* และ *Shigella* ได้ แลคโตเฟอริน (lactoferrin) ที่มีอยู่ในน้ำนมและสามารถยับยั้งการเจริญ และทำลายเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่มาจากอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียได้¹⁵

6.2.3 สารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถผลิตสารต่างๆ หลายชนิดที่อาจยับยั้งตัวเซลล์ที่ผลิตสารนั่นเอง หรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ แบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Carnobacterium* ที่ใช้ในการหมักอาหารสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือเชื้อ จุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ สารยับยั้งที่แบคทีเรียประเภทนี้สร้างขึ้นเช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ไดแอซีติล (diacetyl) รูเทอริน (reuterin) แบคเทอริโอซินและอื่นๆ แบคเทอริโอซินเป็นสารที่มีโปรตีนส่วนประกอบซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดได้ สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* และจุลินทรีย์ชนิดอื่น (ตารางที่ 6.8)⁴⁷

6.2.3.1 แบคเทอริโอซิน

แบคทีเรียเป็นแหล่งของเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial peptides) ซึ่งก็คือแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) แบคเทอริโอซินประกอบด้วยกลุ่มของสารต่างชนิดกัน (heterogenous group) โดยมีโปรตีนเป็นส่วนสำคัญ และโดยทั่วไปประกอบด้วยโมเลกุลของสารคาร์โบไฮเดรต ไขมัน หรือฟอสฟอรัสอยู่ครึ่งหนึ่ง ดังนั้นสารนี้โดยทั่วไปถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน

การที่แบคทีเรียโอซินมีโมเลกุลที่ไม่ใช่โปรตีนอยู่ด้วยนี้ ยืนยันได้จากการที่แบคทีเรียโอซินถูกย่อยโดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) เอนไซม์ไลเปส (lipase) และเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) เช่น สาร bacteriocin 466 และ lactocin 27 เป็นตัวอย่างของสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนที่เชื่อมกับโมเลกุลของไขมันและคาร์โบไฮเดรต (lipocarbohydrate protein) ส่วน caseisin LHS และ leuconocin S มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน ความไวของสารแบคทีเรียโอซินต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้มาจากกระเพาะอาหารและลำไส้เป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร หมายความว่า การย่อยสลายสารแบคทีเรียโอซินในทางเดินอาหารจะไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในลำไส้ของคนและสัตว์ อย่างไรก็ตาม สารแบคทีเรียโอซินบางชนิดอาจไม่ไวต่อเอนไซม์โปรติเอสบางชนิด ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารแบคทีเรียโอซินเหล่านี้เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก⁴⁸

สารที่จัดเป็นแบคทีเรียโอซินประกอบด้วยโปรตีนขนาดต่างๆ กัน โดยอยู่ในช่วงตั้งแต่ขนาดโมเลกุลเล็กอย่างง่ายและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น streptococcin A-FF22 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8,000 ดาลตัน จนกระทั่งถึงขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ซับซ้อน เมื่อแบคทีเรียโอซินถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้น ความคงตัวจะลดลงอย่างมากและพบว่า การเติม bovine serum albumin จะช่วยป้องกันแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากการถูกยับยั้งการทำงาน สารแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดมีความคงตัวแตกต่างกัน สารนี้จะมีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอช แบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่สามารถทนกรดได้ดีกว่าด่าง⁴⁹

แบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแกรมลบได้มีการศึกษาเป็นอันดับแรกเช่น โคลิซิน (colicins) ของเชื้อ *Escherichia coli* โคลิซินประกอบไปด้วยกลุ่มของโปรตีนที่ต่อต้านแบคทีเรียซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียด้วยกลไกต่างๆ ดังเช่น ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ยับยั้งการผ่านเข้าออกของสารสู่เยื่อหุ้มเซลล์หรือยับยั้งกิจกรรมการทำงานของ Rnase และ Dnase ส่วนแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแกรมบวกเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่ต่อต้านจุลินทรีย์ซึ่งใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร⁵⁰ บางครั้งมักจะสับสนระหว่างคำว่าแบคทีเรียโอซินกับคำว่ายาปฏิชีวนะ การนำสารนี้ไปใช้ประโยชน์อาจถูกจำกัดเนื่องจากมีกฎข้อบังคับในการนำไปใช้ แบคทีเรียโอซินแตกต่างกับยาปฏิชีวนะโดยที่สารแบคทีเรียโอซินมีความปลอดภัยในการนำไปใช้ในอาหาร

แบคทีเรียโอซินใช้ได้ดีในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ค่อนข้างแคบคือ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้น้อยชนิด ส่วนยาปฏิชีวนะใช้ในการรักษาโรคและมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ผันแปรมากกว่าแบคทีเรียโอซิน⁵⁰ สารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ได้ในอาหารจะต้องผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นอันตราย เช่นแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดถูกพิจารณาว่าปลอดภัย ดังนั้นจึงได้มีการศึกษากันมากเกี่ยวกับการผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่ใช้ได้ในผลิตภัณฑ์อาหาร (food-grade bacteriocins) (ตารางที่ 6.8)

ตารางที่ 6.8 การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินซึ่งแยกได้จากอาหาร

แหล่งอาหารที่มาของจุลินทรีย์	แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซิน	การต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์
ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก	<i>Streptococcus</i> sp. CNCM 1-841	<i>Clostridium</i> sp., <i>Listeria monocytogenes</i>
เนยแข็ง Bulgarian yellow	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>
ผัก	<i>Enterococcus mundtii</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i> ,
แรดดิช (radish)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> R	<i>Clostridium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Listeria</i> และ <i>Leuconostoc</i> spp.
สลัด "Waldoff"	<i>Lactobacillus plantarum</i> BFE905	<i>L. monocytogenes</i>
เนยแข็งฝรั่งเศสชนิดอ่อนนุ่มด้วยรา (French mold-ripened soft cheese)	<i>Carnobacterium piscicola</i> CP5	<i>Carnobacterium</i> , <i>Listeria</i> และ <i>Enterococcus</i> spp.
ถั่ววอก	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (NisZ ⁺)	<i>L. monocytogenes</i> Scott A
เนยแข็ง Munster	<i>L. plantarum</i> WHE92 (PedAcH ⁺)	<i>L. monocytogenes</i>
แฮมที่เน่าเสีย	<i>C. piscicola</i> JG126	<i>L. monocytogenes</i>
เนยแข็งฝรั่งเศสดั้งเดิม	<i>Enterococcus faecalis</i> EFS2	<i>L. innocua</i>
ไส้กรอกแห้ง	<i>L. plantarum</i> UGI	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>C. sporogenes</i>
Irish kefir grain	<i>L. lactis</i> DPC3147	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.
ไส้กรอกหมักแห้ง	<i>L. lactis</i> (NisA ⁺)	<i>L. monocytogenes</i>
ไส้กรอกหมัก	<i>L. plantarum</i> SA6	<i>Lactobacillus</i> spp.
Red smear cheese	<i>Brevibacterium linens</i> M18	<i>Listeria</i> และ <i>Corynebacterium</i> spp.
เนือสัตว์	<i>Leuconostoc carnosum</i> Ta11A (LeuA ⁺)	<i>L. monocytogenes</i>
ซาวโด (sour doughs)	<i>L. bavaricus</i> (bavA ⁺)	<i>L. monocytogenes</i>
เวย์ (whey)	<i>E. faecalis</i> 226	<i>L. monocytogenes</i>
นมแพะ	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	<i>L. monocytogenes</i>
กะหล่ำปลีดอง (sauerkraut)	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (Nis)	<i>L. monocytogenes</i>

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Nanasombat และคณะ⁵¹ ที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากขึ้นปลาสดและแหนมปลาที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกัลลาเชื้ออาหารหมักคือ สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้และมีสมบัติทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีได้ดี ผลปรากฏว่าพบเชื้อที่สมบัติเหมาะสม และได้คัดเลือกมาจำแนกชนิดจำนวน 2 ไอโซเลตคือ ไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 โดยได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 คือเชื้อ *Lactococcus lactis* และ ไอโซเลต 13IS4 คือ *Lactobacillus sakei* ทั้งสองไอโซเลตแยกได้จากขึ้นปลาทรายสดและยังได้ศึกษาความสามารถในการหมักในอาหารจำลอง แหนมปลาที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35°C พบว่าการหมักโดย *L. lactis* ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดกระเทียมความเข้มข้นร้อยละ 1.0 *L. lactis* หมักคาร์โบไฮเดรตได้เร็วกว่า *L. sakei* การหมักที่อุณหภูมิ 30 และ 35°C เกิดขึ้นได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25°C การหมักโดย *L. sakei* ถูกกระตุ้นในสภาพที่มีสารสกัดกระเทียมร้อยละ 3.0

การนำแบคทีเรียโอซินไปใช้ประโยชน์

การนำแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินได้เป็นกัลลาเชื้อหรือการเติมแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ลงในอาหารก็เป็นไปได้ที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียหรือจุลินทรีย์ก่อโรค และเพื่อยืดอายุการเก็บอาหาร หลายปีที่ผ่านมาได้มีการตระหนักถึงคุณค่าของแบคทีเรียโอซินจึงมีกลุ่มนักวิจัยหลายกลุ่มที่กำลังศึกษาสารต้านจุลินทรีย์ชนิดนี้ สารแบคทีเรียโอซินชนิดใหม่ๆ กำลังได้รับความสนใจในฐานะของสารถนอมอาหารจากธรรมชาติซึ่งสามารถนำมาใช้ในรูปบริสุทธิ์ ในรูปของสารสกัดหยาบหรือสารที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่ใช้ได้ในอาหาร (ตารางที่ 6.9) การใช้กัลลาเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินได้อาจไม่ต้องการพิจารณาเป็นพิเศษมากนักถ้าจุลินทรีย์ที่ใช้ถูกพิจารณาว่าปลอดภัย (GRAS) แต่ถ้าหากใช้สารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์เป็นสารถนอมอาหาร สารนั้นอาจต้องได้รับการยืนยันจากบริษัทผู้ผลิตว่าใช้ได้อย่างปลอดภัย (GRAS)⁴⁷ ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่มีการผลิตจำหน่ายมีดังนี้

ก) ไนซิน (nisin)

ไนซินเป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่รู้จักกันดีที่สุด ไนซินถูกค้นพบเมื่อปี ค. ศ. 1928 เป็นสารแบคทีเรียโอซินชนิดที่ยอมรับในการนำมาใช้ในอาหาร ไนซินเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว ผลิตโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* บางสายพันธุ์ เป็นแลนติไบโอติก (lantibiotic) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบบ่อยซึ่งก็คือ meso-lanthionine และ 3-methyl-lanthionine ไนซินออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้นโดยจะยับยั้งแบคทีเรีย *Alicyclobacillus*, *Bacillus cereus*, *Brochothrix thermophacta*, *Clostridium botulinum*, *C. sporogenes*, *Desulfotomaculum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* และ *Staphylococcus* โดยทั่วไปไนซินไม่ยับยั้ง

การเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และเชื้อรา ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ถ้าหากใช้ร่วมกับ chelating agent เช่น EDTA การใช้ความร้อนหรือการแช่แข็ง กิจกรรมของไนซินจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชลดลงและเมื่อลดจำนวนเซลล์เริ่มต้น การมีอยู่ของสารอาหารเช่นไขมันและโปรตีนมีผลต่อกิจกรรมของไนซิน มีรายงานว่าไนซินมีประสิทธิภาพน้อยในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในนมและไอศกรีมที่เพิ่มไขมัน ซึ่งอาจเป็นเพราะไนซินจับกับเม็ดไขมัน กลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยไนซินเชื่อว่าทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียแรงขับเคลื่อนโปรตอนและสูญเสียออกซิเจนในเซลล์ กรดอะมิโนและ ATP⁵²

เมื่อคำนึงถึงจุลินทรีย์เป้าหมาย การใช้ประโยชน์ของไนซินสามารถจัดเป็น 3 แบบด้วยกันคือ 1) ป้องกันการเน่าเสียโดยแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ 2) ป้องกันการเน่าเสียโดยแบคทีเรียกรดแลคติก และ 3) ยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรคเช่น *Bacillus cereus*, *C. botulinum* และ *L. monocytogenes*⁵¹ การใช้ไนซินในอาหารเริ่มขึ้นเมื่อปี ค. ศ. 1951 ขณะนั้นได้มีการแสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ที่สร้างไนซินได้สามารถป้องกันการเน่าเสียของเนยแข็งจากการสร้างแก๊สโดย *Clostridium* ปัจจุบันได้มีการใช้ไนซินเพื่อถนอมรักษาผลิตภัณฑ์นมเช่น เนยแข็งแปรรูป (processed spread) และ cheese spreads โดยเฉพาะในประเทศสหรัฐอเมริกา ไนซินได้ถูกนำมาใช้ในทั่วโลกในผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายรวมถึงนมพาสเจอร์ไรส์ นมปรุงแต่งและนมที่มีอายุการเก็บยาวนาน รวมทั้งเนยแข็งที่ผ่านการบ่มและเนยแข็งที่ผ่านการแปรรูป ผักกระป๋องและซูปกระป๋อง เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการนำไนซินไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เป็นที่ต้องการในไวน์และเบียร์ หลายประเทศได้อนุญาตให้ใช้เป็นสารถนอมอาหาร (ตารางที่ 6.10) แต่การใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางของไนซินในอาหารบางครั้งก็จะถูกจำกัด เพราะว่าไนซินมีความสามารถในการละลายต่ำ ราคาแพง และมีความผันแปรในแง่ของความไวต่อแบคทีเรียเป้าหมายและปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น พีเอช โซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิ มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของไนซิน⁵³

6.3 สารต้านจุลินทรีย์โดยทางอ้อม (indirect antimicrobials)

สารประกอบในหัวข้อนี้ใช้เติมลงในอาหารเพื่อหวังผลด้านอื่นที่ไม่ใช่เพื่อที่จะต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงเป็นวัตถุเจือปนอาหารที่มีหน้าที่หลายประการ

6.3.1 สารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)

ถึงแม้ว่าฟีนอลิกแอนติออกซิแดนต์ (phenolic antioxidant) จะใช้ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (auto-oxidation) ของไขมัน ก็มีรายงานว่าสารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้กว้างรวมถึง ไวรัส ไมโคพลาสมา (mycoplasma) และโปรโตซัว (ตารางที่ 6.11)

ตารางที่ 6.9 การนำแบคทีเรียไปใช้ในการถนอมอาหาร

แบคทีเรีย	การประยุกต์ใช้	สรุปผล
Nisin A	การเติมไนซินลงใน meat binding system	การเติมไนซินทำให้ลดจำนวนของแบคทีเรียที่ไม่เป็นที่ต้องการใน restructured meat products
Pediocin AcH	การใช้ <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE 92 ที่สร้าง pediocin AcH โดยฉีดพ่นบน Munster cheese เมื่อเริ่มต้นการบ่ม	การฉีดพ่นป้องกันการเจริญเติบโตของ <i>Listeria monocytogenes</i>
Enterocin 4	การใช้ประโยชน์จาก <i>Enterococcus faecalis</i> INIA4 ที่ผลิต enterocin เป็นกล้ำเชื้อสำหรับผลิตเนยแข็ง Manchego	การใช้ <i>Enterococcus faecalis</i> INIA4 ยับยั้ง <i>L. monocytogenes</i> Ohio แต่ไม่ใช่ <i>L. monocytogenes</i> scott A
Linocin M-18	การใช้ประโยชน์จาก <i>Brevibacterium lines</i> เป็นกล้ำเชื้อสำหรับผลิตเนยแข็ง red smear	เป็นสาเหตุให้เกิดการลดลงของจำนวน <i>L. iranovi</i> และ <i>L. monocytogenes</i> จำนวน 2 log cycle
Nisin A	การใช้ประโยชน์ของ nisin ในการควบคุม <i>L. monocytogenes</i> ในเนยแข็ง ricotta	ไนซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง <i>L. monocytogenes</i> เป็นเวลา 8 สัปดาห์
Piscicolin 126	การใช้ piscicolin 126 ในการควบคุม <i>L. monocytogenes</i> ใน devilled ham paste	มีประสิทธิภาพมากกว่าแบคทีเรียอื่นที่จำหน่ายทางการค้า
Leucocin A	การใช้ประโยชน์ของ <i>Leuconostoc gelidum</i> UAL187 ที่สร้าง leucocine ในการควบคุมการเน่าเสียของเนื้อสัตว์	การเติมเชื้อที่มีสร้างแบคทีเรียลงไปในเนื้อที่บรรจุแบบสุญญากาศ ชะลอการเสียหายจาก <i>L. sake</i> ได้ถึง 8 สัปดาห์
Lactocin 705	การใช้ lactocin 705 เพื่อลดการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> ในเนื้อวุ้น	Lactocin 705 มีผลยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> ในเนื้อวุ้น
Pediocin AcH	การใช้ <i>P. acidilactici</i> ที่สร้าง pediocin เพื่อยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i>	กล้ำเชื้อของ <i>P. acidilactici</i> (Ped ⁺) ส่งผลให้ <i>L. monocytogenes</i> ลดลงระหว่างการผลิตไส้กรอกไก่
Pediocin PA-1	การใช้ <i>P. acidilactici</i> (Ped ⁺) เป็นกล้ำเชื้อในไส้กรอกหมัก	pediocin มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง <i>L. monocytogenes</i>

ที่มา: Chikindas และ Montville⁴⁷

ตารางที่ 6.10 ปริมาณไนซินที่หลายประเทศอนุญาตให้ใช้ได้ ในอาหาร

ประเทศ	อาหารที่อนุญาตให้เติม	ระดับสูงสุดที่ใช้ได้ (IU/g)
อาร์เจนตินา	เนยแข็งแปรรูป (processed cheese)	500
ออสเตรเลีย	เนยแข็ง เนยแข็งแปรรูป มะเขือเทศกระป๋อง	ไม่จำกัด
เบลเยียม	เนยแข็ง	100
ไต้หวัน	เนยแข็ง เนยแข็งคอตเตจ ผักกระป๋อง	ไม่จำกัด
ฝรั่งเศส	เนยแข็งแปรรูป	ไม่จำกัด
อิตาลี	เนยแข็ง	500
เม็กซิโก	ไนซินเป็นสารเจือปนอาหารที่อนุญาตให้ใช้ได้	500
เนเธอร์แลนด์	เนยแข็งจากโรงงาน เนยแข็งแปรรูป เนยแข็งผง	800
เปรู	ไนซินเป็นสารเจือปนที่อนุญาตให้ใช้ได้	ไม่จำกัด
รัสเซีย	เนยแข็งแปรรูป ผักกระป๋อง	8,000
สหราชอาณาจักร	เนยแข็ง อาหารกระป๋อง ครีมคอตเตจ	ไม่จำกัด
สหรัฐอเมริกา	Processed cheese spread ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์	10,000

ที่มา: Chikindas และ Montville ⁴⁷

บิโซเฮ (butylated hydroxyanisole, BHA) บิโซที (butylated hydroxytoluene, BHT) ที่บิโซควิน (*t*-butylhydroxyquinoline, TBHQ) ที่ความเข้มข้น 10-1000 ppm (ขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรต) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และเชื้อราได้ แบคทีเรียชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์อาจมีความไวต่างกันต่อการถูกยับยั้งโดยสารต้านออกซิเดชันเหล่านี้ ได้มีรายงานว่าบิโซเฮและบิโซควินยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและฟังไจได้ดีกว่าบิโซที แบคทีเรียแกรมบวกไวต่อการถูกยับยั้งโดย บิโซเฮ บิโซที บิโซควินและโพรพิลกาเลตมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยทั่วไปการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารต้องใช้ความเข้มข้นสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีรายงานว่า บิโซเฮ บิโซที บิโซควินและโพรพิลกาเลต (propyl gallate) ในเนื้อหมูปดมีประสิทธิภาพน้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผู้รายงานว่าการใช้บิโซเฮร่วมกับซอร์เบตและบิโซทีร่วมกับมอนอลอริน (monolaurin) ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และการใช้บิโซเฮร่วมกับซอร์เบตก็มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้ง *S. Typhimurium* ด้วย นอกจากนี้การ

ใช้ปีเอชที่ร่วมกับทีปีเอชคิวก็ให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* ที่สร้างอะฟลาทอกซิน (aflatoxin)

ตารางที่ 6.11 สารต้านจุลินทรีย์โดยอ้อมที่อนุญาตให้ใช้ได้ในการอาหาร

ชนิดของสารประกอบ	จุดประสงค์หลักในการใช้	จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง
Butylated hydroxyanisole (BHA)	ต้านออกซิเดชัน	แบคทีเรีย ฟังไจบางชนิด
Butylated hydroxytoluene (BHT)	ต้านออกซิเดชัน	แบคทีเรีย ไวรัส ฟังไจ
<i>t</i> -Butylhydroxyquinoline (TBHQ)	ต้านออกซิเดชัน	แบคทีเรีย ฟังไจ
Propyl gallate (PG)	ต้านออกซิเดชัน	แบคทีเรีย
Nordihydroguaiaretic acid	ต้านออกซิเดชัน	แบคทีเรีย
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sequestrant/ stabilizer	แบคทีเรีย
โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate)	บัฟเฟอร์ / sequestrant	แบคทีเรีย
กรดลอริก (Lauric acid)	ลดการเกิดฟอง	แบคทีเรียแกรมบวก
โมโนลอรีน (Monolaurin)	อิมัลซิไฟเออร์	แบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์
ไดแอซีติล (Diacetyl)	ให้กลิ่นรส	แบคทีเรียแกรมลบ ฟังไจ
<i>d</i> -carvone และ <i>l</i> -carvone	ให้กลิ่นรส	ฟังไจ แบคทีเรียแกรมบวก
ฟีนิลแอซีตัลดีไฮด์ (phenylacetaldehyde)	ให้กลิ่นรส	ฟังไจ แบคทีเรียแกรมบวก
เมนทอล (menthol)	ให้กลิ่นรส	ฟังไจ แบคทีเรีย
วานิลลิน (vanillin) เอทิลวานิลลิน (ethyl vanillin)	ให้กลิ่นรส	ฟังไจ
ฟอสเฟต (phosphate)	ช่วยในการอุ้มน้ำ ให้กลิ่นรส	แบคทีเรีย
เครื่องเทศ / น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ	ให้กลิ่นรส	แบคทีเรีย ฟังไจ

ที่มา: Jay และคณะ¹

6.3.2 สารให้กลิ่นรส (flavoring agents)

ไดแอซีติล (diacetyl) เป็นสารให้กลิ่นรสในเนยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบและฟังไจได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก มีรายงานว่าไดแอซีติลความเข้มข้นน้อยกว่า 10 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas fluorescens*, *P. geniculata* และ *Enterococcus faecalis* ในอาหาร nutrient broth ที่มีพีเอช 6.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 5°C การที่แบคทีเรียแกรมบวกมีความต้านทานต่อไดแอซีติลสูงกว่าเนื่องมาจากไม่มี periplasmic binding protein และมีกรดอะมิโนปริมาณมากกว่า สำหรับสารประกอบที่ให้กลิ่นในเนยอีกชนิดหนึ่งคือ 2, 3-

pentanedione สารประกอบชนิดนี้ที่ความเข้มข้น 500 ppm หรือต่ำกว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและฟังไจได้¹

l-carvone ให้กลิ่น spearmintlike aroma และ *d*-carvone ให้กลิ่นคล้าย caraway สารทั้งสองชนิดนี้สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยมีประสิทธิภาพในการต้านยีสต์และเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 1000 ppm หรือต่ำกว่า โดยทั่วไป carvone ในรูปแอล-ไอโซเมอร์มีประสิทธิภาพมากกว่ารูปดี-ไอโซเมอร์ฟีนิลแอซีตัลดีไฮด์ (phenylacetaldehyde) ให้กลิ่น hyacinlike aroma สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้น 100 ppm และ *Candida albicans* ได้ที่ความเข้มข้น 500 ppm ในกรณีของเมนทอล (menthol) ซึ่งให้กลิ่นคล้าย peppermint พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ที่ความเข้มข้น 32 ppm ยับยั้ง *E. coli* และ *C. albicans* ได้ที่ความเข้มข้น 500 ppm วานิลลิน (vanillin) และเอทิลวานิลลิน (ethyl vanillin) ยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1000 ppm¹

6.3.3 ฟอสเฟต

ฟอสเฟตมีหน้าที่สำคัญในการแปรรูปอาหารได้แก่ การทำให้เป็นกรด การทำให้เป็นด่าง การเป็นบัฟเฟอร์ การทำให้เกิดอิมัลชัน สารประกอบฟอสเฟตได้แก่ sodium acid pyrophosphate ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$), tetrasodium pyrophosphate ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), sodium tripolyphosphate ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), sodium tetrametaphosphate (NaPO_3)₄, sodium hexametaphosphate ($(\text{NaPO}_3)_n$ = 13, 15, 21) และ trisodium phosphate มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ต่างกันในอาหาร⁴ โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมบวกได้รับอันตรายจากฟอสเฟตได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบ การใช้ฟอสเฟตเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อแปรรูปเพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อและยังช่วยปรับปรุงกลิ่นรส รวมทั้งช่วยต้านออกซิเดชัน ผงฟอสเฟตสำเร็จรูปที่ใช้เติมลงในอาหาร (food-grade phosphate) อาจมีฟอสเฟตตั้งแต่ 1 ชนิด เช่น ไตรโซเดียมโพลีฟอสเฟต (trisodium phosphate) จนถึงหลายชนิดเช่น โซเดียมโพลีฟอสเฟต (sodium polyphosphate) หลายการศึกษาได้แสดงให้เห็นว่า สารประกอบ polyphosphate ช่วยส่งเสริมผลของไนไตรต์ ฟิเอสและเกลือในการยับยั้ง *C. botulinum* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์รม (cured meat) ดังเช่น การศึกษาหนึ่งที่ได้รายงานว่าการเติมฟอสเฟตมีกิจกรรมต้านเชื้อ *Clostridium botulinum* โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับไนไตรต์ นอกจากนี้การศึกษาหนึ่งได้ทดลองใช้โซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 40 ppm ร่วมกับโพแทสเซียมซอร์เบตร้อยละ 0.26 และโซเดียมแอซิดไฟโรฟอสเฟตพบว่าสามารถชะลอการสร้างสารพิษจากเชื้อ *C. botulinum* ในอิมัลชันของไส้กรอกแพนเฟอโรเทอร์ได้ 12-18 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมจะเกิดการสร้างสารพิษได้เร็วกว่าคือ 6-12 วัน ที่ระดับฟิเอสเดียวกัน สารละลายฟอสเฟตที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองมีผลต้านจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารละลายฟอสเฟตที่ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ นอกจากนี้ยังได้มีรายงานว่าการเติม

ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโพลีฟอสเฟต 3 ชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก 13 ชนิดและแบคทีเรียแกรมลบ 12 ชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 25°C พบว่า สารไตรฟอสเฟต (tripolyphosphate) และเฮกซะเมตาพอสเฟต (hexametapolyphosphate) มีประสิทธิภาพมากที่สุดและพบว่าแบคทีเรียแกรมบวกไวต่อการถูกยับยั้งโดยฟอสเฟตมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และมีรายงานว่าการทำงานของสปอร์ *Bacillus cereus* และการเจริญของเชื้อนี้ถูกยับยั้งด้วยโซเดียมพอลิฟอสเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และร้อยละ 1.0 ตามลำดับ¹

6.3.4 Medium-Chain fatty acids and esters

กรดแอสติก กรดโพรพิโอนิก และกรดซอร์บิกเป็นกรดไขมันสายสั้นที่ใช้เป็นสารกันเสีย สำหรับกรดไขมันสายปานกลาง (medium-chain fatty acid) ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์หรือ surface-active agents กิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของกรดไขมันสายปานกลางเป็นที่ทราบกันดีเช่น สบู่ซึ่งเป็นเกลือของกรดไขมัน กรดไขมันชนิดที่ใช้กันมากประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 12-16 อะตอม กรดไขมันอิ่มตัวชนิดที่มีคาร์บอน 12 อะตอม (C_{12}) มีกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ดีที่สุด สำหรับกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวชนิดที่มีคาร์บอน 16 อะตอม มีพันธะคู่ 1 พันธะ ($C_{16:1}$) และชนิดที่มีคาร์บอน 18 อะตอม มีพันธะคู่ 2 พันธะ ($C_{18:2}$) มีกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ดีที่สุด โดยทั่วไปกรดไขมันมีประสิทธิภาพในการต้านแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ได้ดี มีรายงานว่ากรดไขมันที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 12-16 อะตอมมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านการเจริญของแบคทีเรีย และกรดไขมันที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน 10-12 อะตอมมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการต้านการเจริญของยีสต์¹

สารมอโนเอสเทอร์ของกลีเซอรอลและไดเอสเทอร์ของซูโครสด้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดไขมันอิสระที่มีโครงสร้างสัมพันธ์กับสารทั้งสองนี้ มอโนลอรีน (monolaurin) เป็นกลีเซอรอลมอโนเอสเทอร์ (glycerol monoester) ที่มีประสิทธิภาพที่สุดและสารซูโครสไดคาปริเลต (sucrose dicaprylate) เป็นซูโครสไดเอสเทอร์ที่มีประสิทธิภาพที่สุด มีรายงานว่ามอโนลอรีนยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดและยีสต์บางชนิดได้ที่ความเข้มข้น 5-100 ppm มอโนลอรีนต่างกับกรดไขมันสายสั้นที่จะมีประสิทธิภาพที่พีเอชต่ำ แต่สารนี้มีประสิทธิภาพในช่วงพีเอช 5.0-8.0¹

เนื่องจากการที่กรดไขมันและเอสเทอร์มีประสิทธิภาพค่อนข้างแคบประกอบกับสารที่อนุญาตให้ใช้ได้ในการเช่น EDTA ซิเตรตและฟีนอลิกแอนติออกซิแดนต์เมื่อใช้เดี่ยวๆ เพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์จะมีข้อจำกัดในการใช้ ดังนั้นจึงได้มีผู้เสนอให้ใช้สารหลายๆ ชนิดร่วมกันในการถนอมอาหาร เช่น อาจใช้สารร่วมกัน 3 ชนิดในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น มอโนลอรีนร่วมกับ EDTA และ BHA เป็นต้น ถึงแม้ว่า EDTA จะมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้น้อย แต่ก็ทำให้แบคทีเรียแกรมลบไวต่อการถูกยับยั้งโดยไปทำลายเยื่อหุ้มชั้นนอกของเซลล์ ดังนั้นจึงให้ผล

ดีเมื่อใช้ร่วมกับกรดไขมันหรือเอสเทอร์ของกรดไขมัน สำหรับ BHA จะให้ผลด้านแบคทีเรียและเชื้อรา ในขณะที่เดียวกันก็ช่วยต้านออกซิเดชันด้วย ดังนั้นเมื่อใช้สารเหล่านี้ร่วมกันก็จะสามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ต้านทานลงได้ และค่าพีเอชของอาหารก็จะมีค่าน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของระบบการยับยั้งนี้¹

เอกสารอ้างอิง

1. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.
2. Ray, B. 2013. Fundamental Food Microbiology, 5th ed. Taylor & Francis Inc, Boca Roca, USA.
3. Barsosa-Cánovas, G. V., Pothakamury, U. R., Palou, E., Swanson, B. G. 1998. Nonthermal Preservation of foods. New York, Marcel Dekker.
4. Davidson, P.M. 2002. Control of microorganisms with chemicals, pp. 165- 190. In: Juneja, V. K., Sofos, J. N. (Eds.). Control of Foodborne Microorganisms. Marcel Dekker, New York.
5. Sofos, J.N., Busta, F.F. 1981. Antimicrobial activity of sorbate. Journal of Food Protection. 44: 614-622.
6. Nanasombat, S., Chooprang, K. 2009. Control of pathogenic bacteria in raw pork Using organic acid salts in combination with freezing and thawing. Kasetsart Journal Natural Science. 43: 576-583.
7. Davidson, P.M., Juneja, V.K. 1990. Antimicrobial agents. In: Brannen, A. L., Davidson, P. M. and Salminen, S. (Eds.). Food additives. Marcel Dekker, New York.
8. Bogaert, J-C., Naidu, A. S. 2000. Lactic acid, pp. 613-636. In: Naidu, A. S. (Ed.). Natural Food Antimicrobial, CRC Press, USA.
9. Shelef, L.A. 1994. Antimicrobial effects of lactates: a review. Journal of Food Protection. 57: 445-450.
10. Chen, N., Shelef, L. A. 1992. Relationship between water activity, salts of lactic acid, and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. Journal of Food Protection. 55: 574-578.
11. Nanasombat, S., Armeen, W., Arkom, O. 2013. Use of Thai local vegetable extracts

- as natural preservatives in dried sausage system. *Pharmacognosy Communications*. 3 (1): 37-45.
12. Martin 2001. Meat curing Technology. In Y. H. Hui, W. K. Nip, R. W. Roger, & O. A. Young, *Advances in meat science and applications* (pp. 493-497). New York: Marcel Dekker.
 13. Vigil, A. L.-M., Palou, E., Alzamora, S.M. 2005. Naturally occurring compounds-plant sources, pp. 429-451. In: Davidson, P. M., Sofos, J. N. and Branen, A. L. (Eds.). *Antimicrobials in Food*, 3rd ed. Taylor & Francis Group LLC, New York.
 14. Parthasarathy, V.A., Kandiannan, K., Srinivasan, V. 2008. *Organic spices*. New Delhi: New India.
 15. Beuchat, L.R. 2008. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials, pp. 319- 345. In: Wilson, C.L. (Ed.), *Microbial Food Contamination*, 2nd ed. CRC Press Taylor & Francis group., Boca Raton.
 16. Senanayake, U.M., Lee, T.H., Wills, R.B.H. 1978. Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26: 822-824.
 17. Nanasombat, S., Wimuttikosol, P. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology* 20(1): 45-53.
 18. Nanasombat, S., Lohasupthawee, P. 2005. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. *KMITL Science Journal* 5(3): 527-538.
 19. de Guzman, C.C., Siemonsma, J. S. 1999. *Plant Resources of South-East Asia No 13: Spices*. Prosea Foundation, Bogor, Indonesia.
 20. Beuchat, L.R., Golden, D.A. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*. 43(1), 134-142.
 21. Lawrence, B. M., Hogg, J. W., Terhune, S.T., Podimuang, V. 1970. The Leaf and Peel Oils of *Citrus hystrix* DC. ASRCT, Bangkok.
 22. Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K.H.C., Bedir, E., Khan, I.A., Wedge, D.E. 2006. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey. *Journal of Chromatography*. 1117: 194-205.

23. Hirasu, K., Takemasa, M. 1998. Spice Science and Technology. New York, Marcel Dekker Inc.
24. Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C.S., Catalan, C. 2005. Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (aril part). Journal of Food Science. 70: M141-M148.
25. Nanasombat, S., Kaewkan, K., Chanapart, P., Ketchan, S. 2006. Antimicrobial and antioxidant properties of Thai herbal tea extracts. KMITL Science Journal. 6 (2b): 642-651.
26. Nanasombat, S., Teckchuen, N. 2009. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. Journal of Medicinal Plants Research 3(5): 443-449.
27. Joseph, G.S., Jayaprakasha, G.K., Selvi, A.T., Jena, B.S., Sakariah, K.K. 2005. Antiaflatoxic and antioxidant activities of *Garcinia* extracts. International Journal of Food Microbiology. 101: 153-160.
28. Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jena B. S. 2008. Antibacterial activity of the extracts from the fruit rinds of *Garcinia cowa* and *Garcinia pedunculata* against foodborne pathogen and spoilage bacteria. LWT-Food Science and Technology. 41: 1857-1861.
29. Panthong, K., Pongcharoen, W., Phongpaichit, S., Taylor, W. C. 2006. Tetraoxygenated xanthenes from the fruits of *Garcinia cowa*. Phytochemistry. 67: 999-1004.
30. Mahabusarakam, M., Chairerk, P., Taylor, W.C. 2005. Xanthenes from *Garcinia cowa* Roxb. Latex. Phytochemistry. 66: 1148-1153.
31. Bui, M-L., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kite, G.C., Tran, H., Nguyen, Q.K. 2004. Uncommon 8-oxygenated flavonoids from *Limnophila aromatica* (Scrophulariaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 32: 943-947.
32. Starkenmann, C., Luca, L., Niclass, Y., Praz, E., Roguet, D. 2006. Comparison of volatile constituents of *Persicaria odorata* (Lour.) Soják (*Polygonum odoratum* Lour.) and *Persicaria hydropiper* L. Spach (*Polygonum hydropiper* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 3067-3071.
33. Thongsard, W., Chainakul, S., Bennett, G.W., Marsden, C.A. 2001. Determination of barakol extracted from *Cassia siamea* by HPLC with electrochemical detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 25: 853-859.
34. Mayachiew, P., Devahastin, S. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of

- Indian gooseberry and galangal extracts. Food Science and Technology. 41: 1153-1159.
35. Nanasombat, S., Khanha, K., Phan-im, J., Jitaied, J., Wannasomboon, S., Patradisakorn, S., Wongsil, A. 2012. Antimicrobial and antioxidant activities of Thai local fruit extracts: application of a selected fruit extract, *Phyllanthus emblica* Linn. as a natural preservative in raw ground pork during refrigerated storage. The Online Journal of Science and Technology. 2(1): 1-7.
 36. Nanasombat, S., Bubpasawan, T., Tamaput, N., Srimakhan, Y. 2014. Antimicrobial activity of Thai medicinal plants against beverage spoilage microorganisms and their potential in retarding Alzheimer's disease progression. Pharmacognosy Communications 4 (3): 77-87 .
 37. Gyawali, R., Kim, K. S. 2009. Volatile organic compound of medicinal values from Nepalese *Acorus calamus* (L.). Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology. 5 (2): 51-65.
 38. Pongpaichit, S., Pujenjob, N., Rukachaisirikul, V., Ongsakul, M. 2005. Antimicrobial activities of the crude methanol extract of *Acorus calamus* Linn. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 27 (2): 517-523.
 39. Rajput, S.B., Karuppayil, S.M. 2013. β -asarone, an active principle of *Acorus calamus* rhizome, inhibits morphogenesis, biofilm formation and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. Phytomedicine. 20: 139-142.
 40. Rahman, M.S., Ali, M.Y., Ali, M.U. 2008. *In vitro* screening of two flavonoid compounds isolated from *Cassia alata* L. leaves for fungicidal activities. Journal of Bio-Sci. 16: 139-142.
 41. Liu, X., Zhao, M., Wang, J., Luo W. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of *Emblica* extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction and methanol extraction. Journal of Food Biochemistry. 33: 307-330.
 42. Pintado, C., de Miguel, A., Acevedo, O., Nozal, L., Novella, J.L., Rotger, R. 2011. Bactericidal effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on *Salmonella enterica* during storage. Food Control. 22: 638-642.
 43. Akinjogunla, O.J., Yah, C.S., Eghafona, N.O., Ogbemudia, F.O. 2010. Antibacterial activity of leave extracts of *Nymphaea lotus* (Nymphaeaceae) on methicillin resistant

- Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) isolated from clinical samples. Annals of Biological Research. 1: 174-184.
44. Nattakorn, K, Ritcharoon, B., Paweena Sukcharoen, P., Nanasombat, S. 2014. Antimicrobial activity of Thai medicinal plants against pathogenic bacteria in gastrointestinal tract, p. 158. In The 8th Botanical Conference of Thailand: BCT8, Department of Biology, Chiang Mai University 2-4 April, 2014.
 45. Hashim, S. T. 2013. Bacteriological and biochemical study for effect of phenolic extract of *Quercus infectoria* against some food-born pathogenic bacteria. Indian Journal of Applied Research. 3 (7): 52-55.
 46. Wang, J.B., Qin, Y., Kong, W.J., Wang, Z.W., Zeng, L.N., Fang, F., Jin, C., Zhao, Y. L., Xiao, X. H. 2011. Identification of the antidiarrhoeal components in official rhubarb using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Chemistry. 129: 1737-1743.
 47. Chikindas, M.L., Montville, T.J. 2002. Perspectives for application of bacteriocins as food preservatives, pp. 303-321. In: Juneja, V.K., Sofos, J.N. (Eds.). Control of Foodborne Microorganisms. Marcel Dekker, New York.
 48. De Vuyst, L., Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria Microbiology: Genetics and Applications. Blackie Academic and Professional, New York.
 49. Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocin of gram positive bacteria. Bacteriological Reviews. 40(3) : 722-756.
 50. Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I. F., Chikidas, M. L. 2001. Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 7: 1-20.
 51. Nanasombat, S., Phunpruch, S., Sriwong, N., Jaichalad, T., Onnom, W., Odthon, S. 2008. Characterization of the antibacterial activity and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from raw fish and Nham-Plaa. Kasetsart Journal Natural Science. 42(4): 747-757.
 52. Davidson, P.M. 2003. The use of natural antimicrobial, pp. 5-30. In: Zeuthen, P. and Bøgh-Sørensen, L. (Eds.). Food Preservation Techniques. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.
 53. Muriana, P.M., Luchansky, J.B. 1993. Biochemical methods for purification of

bacteriocins. In: Hoover, D.G., Steenson, L.R. (Eds.) *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Academic Press, San diego.

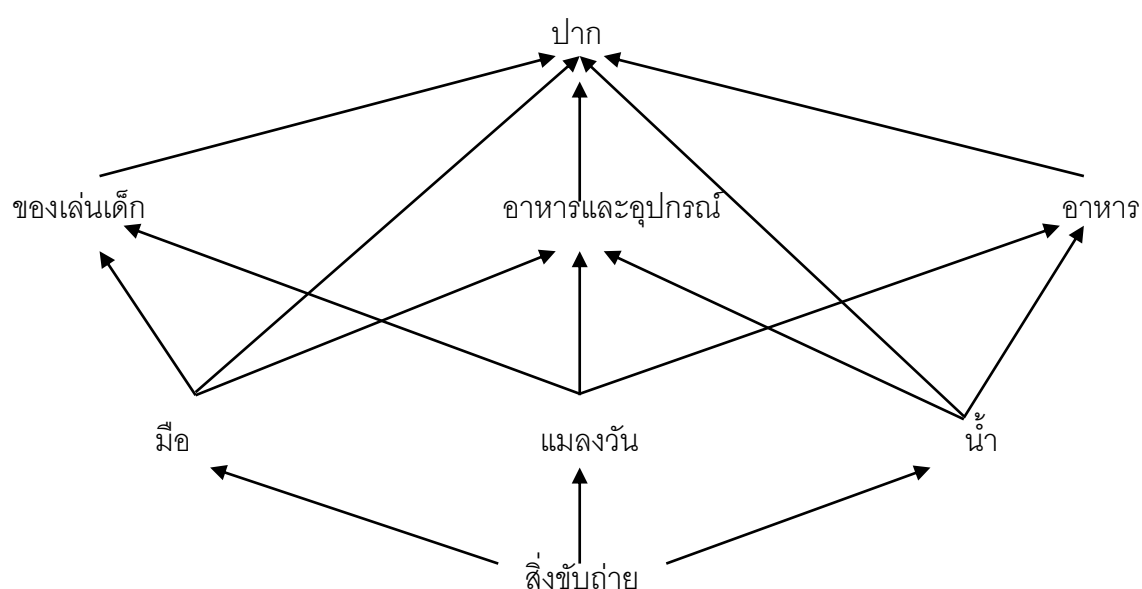
บทที่ 7

โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุจากจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

จุลินทรีย์หลายชนิดอาจปนเปื้อนในอาหาร เมื่อคนรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์เข้าไปอาจทำให้ป่วยเป็นโรค ตัวอย่างของโรคที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารเช่น โรคฮีโมลาจิกโคไลติส (hemorrhagic colitis) ลิสเทอเลียซิส (listeriosis) โบทูลิซึม (botulism) และโรคอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* (staphylococcal food poisoning) สำหรับโรคแอนแทรกซ์ (anthrax) และบรูเซลโลซิส (brucellosis) เป็นโรคที่เกิดขึ้นจากการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ป่วยเป็นโรค แต่การแพร่กระจายเชื้อทั้งสองชนิดนี้ค่อนข้างต่ำ จุลินทรีย์ก่อโรคที่รู้จักกันดีได้แก่ ปรสิตหลายเซลล์ในสัตว์ (multicellular animal parasites) โปรโตซัว เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และอื่นๆ (ตารางที่ 7.1) ¹

7.1 การแพร่กระจายของจุลินทรีย์ก่อโรคจากสิ่งขับถ่ายสู่ปาก

การที่จุลินทรีย์ก่อโรคหรือสารพิษที่สร้างขึ้นจะก่อโรคได้นั้นจำเป็นต้องเข้าสู่ร่างกาย โดยจุลินทรีย์ก่อโรคอาจแพร่กระจายจากสิ่งขับถ่ายผ่านมือของผู้จับอาหาร แมลงวันหรือแมลงที่ไต่อาหาร หรือจากน้ำ (รูปที่ 7.1) ¹



รูปที่ 7.1 เส้นทางแพร่กระจายของจุลินทรีย์ก่อโรคจากสิ่งขับถ่ายสู่ปาก

ที่มา: Jay และคณะ¹

ตารางที่ 7.1 กลุ่มของเชื้อก่อโรคที่มาจากอาหาร (Foodborne Pathogens)

ชนิดของเชื้อก่อโรค	ชนิดของเชื้อก่อโรค
<u>Flatworms</u>	<u>แบคทีเรีย</u>
-Flukes	-แบคทีเรียแกรมบวก
<i>Fasciola</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Fasciolopsis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Paragonimus</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Clonorchis</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
-Tapeworms	<i>Clostridium argentinensis</i>
<i>Diphyllobothrium</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Taenia</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
<u>Roundworms</u>	-แบคทีเรียแกรมลบ
<i>Trichinella</i>	<i>Salmonella</i>
<i>Ascaris</i>	<i>Shigella</i>
<i>Anisakis</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Pseudoterranova</i>	<i>Yersinia</i> และ <i>Brucella</i>
<i>Toxocara</i>	<i>Vibrio</i> และ <i>Campylobacter</i>
<u>โปรโตซัว (Protozoa)</u>	<u>ไวรัส</u>
<i>Giardia</i>	Hepatitis A
<i>Entamoeba</i>	Noroviruses (เช่น Norwalk)
<i>Toxoplasma</i>	Rotaviruses
<i>Sarcocystis</i>	<u>ไพรออน (Prions)</u>
<i>Cryptosporium</i>	Creutzfeldt-Jakob disease (new variant form)
<i>Cyclospora</i>	
<u>เชื้อรา (Fungi)</u>	<u>Toxigenic phytoplanktons</u>
Aflatoxin	Paralytic shellfish poison
Fumonisin	Domoic acid
Alternaria toxins	<i>Pfiesteria piscicida</i>
Ochratoxins	Ciguatoxin

ที่มา: Jay และคณะ¹

7.2 การบุกรุกเข้าสู่ร่างกาย

การที่จุลินทรีย์จะก่อให้เกิดโรคได้ต้องเอาชนะสิ่งกีดขวางหลายประการเช่น 1) จุลินทรีย์ต้องอยู่รอดผ่านสภาพที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร จุลินทรีย์บางชนิดถูกปกป้องโดยอาหารและบางชนิดอาจอยู่รอดโดยการปรับตัวต่อกรด 2) จุลินทรีย์ต้องเกาะหรือสะสมที่ผนังลำไส้ในทางที่จะสามารถเพิ่มจำนวนได้ที่ผนังลำไส้มีชั้นเมือกซึ่งเป็นด่านแรกของการป้องกันจุลินทรีย์ ในกรณีของเชื้อ *Listeria monocytogenes* มีรายงานว่าเชื้อชนิดนี้สามารถขจัดเมือกได้โดยใช้ listeriolysin O ส่วน *C. perfringens* ไม่ต้องเกาะกับผนังลำไส้ 3) จุลินทรีย์ต้องสามารถที่จะต่อต้านกลไกภูมิคุ้มกันของ host เช่น gut-associated lymphoid tissue 4) จุลินทรีย์ต้องแข่งขันกับจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่ไม่ก่อโรคในทางเดินอาหารและ 5) เมื่อจุลินทรีย์เกาะติดกับลำไส้แล้วต้องปล่อยสารพิษออกมา (เช่น เชื้อ *Vibrio cholerae* non-01) หรือไม่ก็จะต้องผ่านเข้าผนังลำไส้เข้าสู่เซลล์ร่างกายเช่น *L. monocytogenes*¹

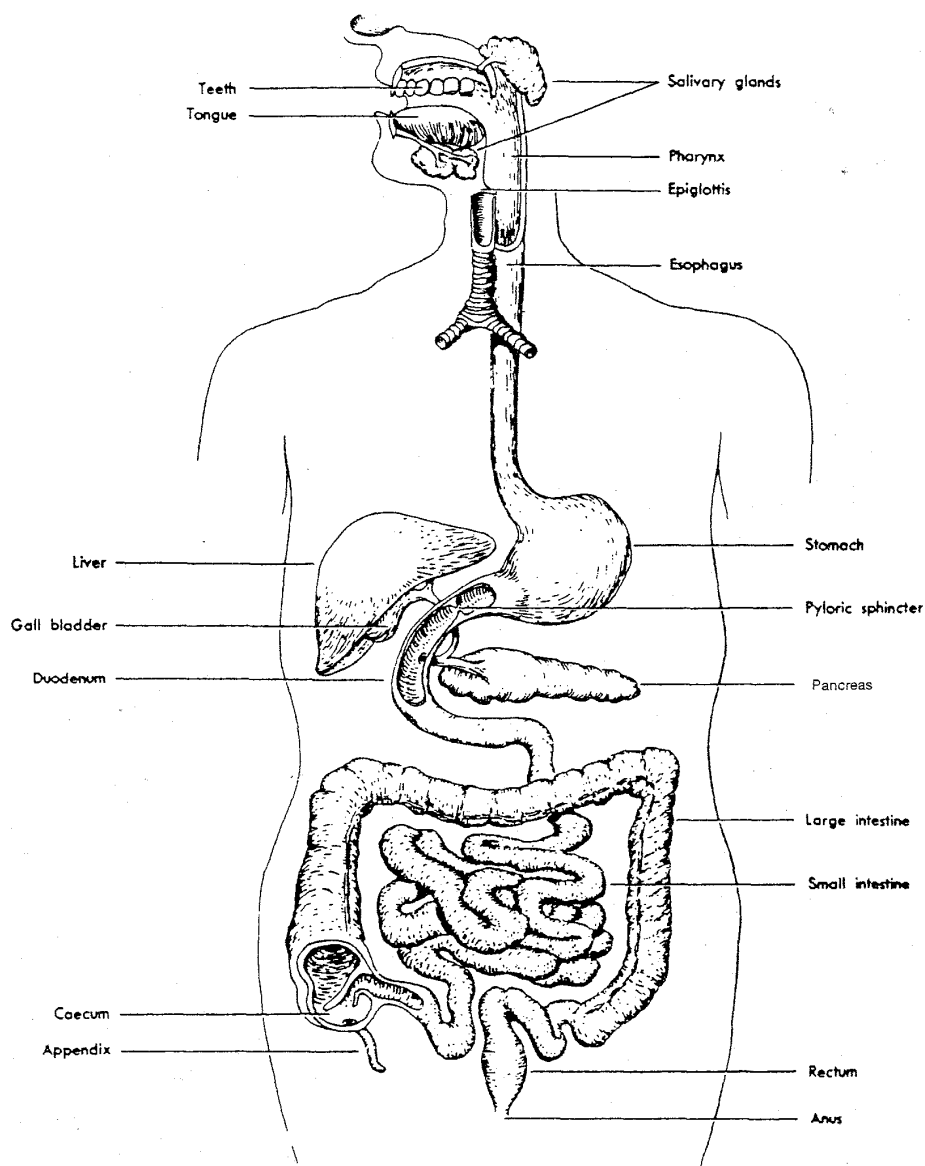
7.3 จุดที่จุลินทรีย์ก่อโรคเกาะติด (Attachment Sites)

รูปที่ 7.2 แสดงระบบย่อยอาหารของมนุษย์และตารางที่ 7.2 แสดงจุดที่จุลินทรีย์ก่อโรคแต่ละชนิดเกาะติด จะเห็นได้ว่า *Helicobacter* เป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวที่เกาะติดที่ผนังของกระเพาะอาหาร ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศที่ชื่อว่า *Sarcina ventriculi* สามารถเจริญได้ในกระเพาะอาหารของมนุษย์แต่ไม่ก่อให้เกิดโรค ค่าพีเอชของกระเพาะอาหารในช่วงที่รับประทานอาหารเข้าไปอยู่ในช่วง pH 3.0 – 5.0 แต่อาจจะต่ำได้ถึง 1.5 ระหว่างการอดอาหาร¹ สำหรับเชื้อ *Helicobacter pylori* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างโค้งงอ เคลื่อนที่ได้ ชอบเจริญในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการอักเสบและแผลในกระเพาะอาหาร (gastric ulcer) รวมทั้งมะเร็งกระเพาะอาหาร (gastric adenocarcinoma) ด้วย

7.4 ชิกมาแฟคเตอร์และการตอบสนองการทนต่อกรด

จุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดใช้อย่างน้อย 2 กลยุทธ์ในการอยู่รอดในสภาพที่มี pH ต่ำคือ 1) ใช้ rpoS gene (หรือ kat F) ซึ่งกำกับชิกมาแฟคเตอร์ (sigma factor) เช่น σ^{38} (sigma – 38) ชิกมาแฟคเตอร์คือ หน่วยย่อยของ bacterial RNA polymerase ซึ่งมีหลายขนาด σ^{38} ควบคุมการสร้างโปรตีนอย่างน้อย 30 ชนิด RpoS เป็น sigma factor ที่มีผลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียในระยะ stationary โดยเฉพาะใน enteric bacteria บางชนิดเช่น *E. coli*, *Y. enterocolitica* และ *Shigella* ทำให้เชื้อเหล่านี้สามารถอยู่รอดที่ pH 2.5 เป็นเวลากว่า 2 ชั่วโมง RpoS ช่วยชักนำยีนเฉพาะบางชุด เช่น การ

ควบคุมการสังเคราะห์ไกลโคเจน การควบคุมการทนต่อความร้อน การทนต่อไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ การอยู่รอดในระหว่างการอดอาหาร การทนต่อสภาพที่เป็นด่างสูง การทนต่อสภาพเครียดของความดันออสโมติกสูงและการทนต่อสภาพที่เป็นกรด ดังนั้นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีต่าง ๆ จึงเป็นการกระตุ้นการตอบสนองของ RpoS ดังนั้นจึงทำให้จุลินทรีย์ต้านทานสภาพเครียดต่าง ๆ ได้เพิ่มขึ้น สำหรับการตอบสนองต่อการทนกรด (Acid Tolerance Response, ATR) เป็นกลยุทธ์ในการอยู่รอดของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Shigella*, *E. coli* และ *Salmonella* ที่เผชิญกับสภาพ pH ต่ำกว่า 5.9 จะเกิดการชักนำการตอบสนองต่อการทนกรด ทำให้เซลล์อยู่รอดได้ที่ pH 3.3¹



รูปที่ 7.2 แผนภาพของระบบย่อยอาหารของมนุษย์

ที่มา: Jay และคณะ¹

ตารางที่ 7.2 จุดที่จุลินทรีย์ก่อโรคบุกรุกในร่างกายของมนุษย์และชนิดของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

จุดที่จุลินทรีย์ก่อโรคบุกรุกในร่างกาย	จุดที่จุลินทรีย์ก่อโรคบุกรุกในร่างกาย
<u>กล้ามเนื้อ (skeletal muscles)</u>	Rotaviruses
<i>Trichenella spiralis</i>	<i>Salmonella</i> (nontyphoid) – ปลาย ileum
<u>กระเพาะอาหาร (stomach)</u>	<i>Salmonella</i> Typhi
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Shigella</i> (ที่ปลาย ileum และ jejunum เมื่อ
<u>ตับ (liver)</u>	เกิดอาการท้องเสีย (watery diarrhea))
<i>Clonorchis</i> –liver flukes	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tapeworms
Hepatitis A และ Hepatitis E	<i>Vibrio cholerae</i>
<u>ลำไส้เล็ก (small intestine)</u>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Astroviruses	<i>Yersinia</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<u>ลำไส้ใหญ่ (large intestine)</u>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter</i> (ลำไส้เล็ก / ลำไส้ใหญ่)
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Escherichia coli</i> : สายพันธุ์ EHEC และ EPEC
<i>Cryptosporidium parvum</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Escherichia coli</i> : สายพันธุ์ EPEC และ ETEC	<i>Salmonella</i> Enteritidis
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Shigella</i> (โดยเฉพาะ <i>S. dysenteriae</i>)
Hepatitis A (บุกรุกที่ตับด้วย)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	

ที่มา: Jay และคณะ¹

7.5 กลไกการก่อให้เกิดโรค

เมื่อพิจารณาจุลินทรีย์หลายชนิดที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค จะพบว่ามักกลไกการก่อให้เกิดโรค (pathogenesis) หลายกลไกที่นำไปสู่การเริ่มต้นของโรคเช่น หนองตัวแบนและหนองตัวกลมจะเข้าสู่ทางเดินอาหารของร่างกายจากการรับประทานเนื้อหรือปลาที่ติดเชื้อประเภทนี้ รวมถึงการเข้าสู่กล้ามเนื้อด้วย โปรโตซัวที่ติดมากับอาหารก็จะเข้าสู่กระเพาะอาหารและข้ามสิ่งกีดขวางเข้าสู่รกและตัวอ่อนได้ กลไกการก่อให้เกิดโรคของจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันไป เช่น แบคทีเรียแกรมบวก

โดยทั่วไปจะสร้าง exocellular substances สำหรับเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่รุนแรงจะสร้างสารพิษซึ่งไม่พบในสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรงเช่น *S. aureus* ที่สร้างเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) สามารถก่อให้เกิดโรค แต่สายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนเทอโรทอกซินจะไม่ก่อโรค เช่นเดียวกับ *S. aureus* ที่ก่อโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โรคที่เกิดจากเชื้อ *C. botulinum*, *C. perfringens* และ *B. cereus* เป็นผลมาจากเอกโซทอกซิน (exotoxin) ที่เชื้อสร้างขึ้น สารพิษที่สำคัญของโรคโบทูลิซึมคือ นิวโรทอกซิน (neurotoxin) สร้างโดยเซลล์ของ *C. botulinum* ที่เจริญในอาหาร¹

7.6 โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *Staphylococcus* (Staphylococcal Gastroenteritis)

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus* (Staphylococcal food-poisoning หรือ food-intoxication syndrome) ศึกษาครั้งแรก ในปี ค. ศ. 1984 โดย J. Denys และต่อมาศึกษาโดย M.A. Barber ซึ่งตัวเขาเองมีอาการของโรคนี้จากการดื่มน้ำนมที่ปนเปื้อนแบคทีเรีย *S. aureus* โรค staphylococcal gastroenteritis มีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารที่มีเอนเทอโรทอกซินของเชื้อ *Staphylococcus* บางชนิด อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะเชื่อกันว่าเอนเทอโรทอกซินสร้างจากเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase) และเทอร์โมนิวคลีเอส (thermonuclease) แต่ก็มี *Staphylococcus* หลายชนิดที่สร้างเอนเทอโรทอกซินได้แต่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสและเทอร์โมนิวคลีเอส¹

7.6.1 *Staphylococcus* ชนิดที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

แบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* มีมากกว่า 30 ชนิด ชนิดที่มีความสำคัญในอาหารแสดงดังตารางที่ 7.3 ในบรรดา *Staphylococcus* 18 ชนิดจากตารางที่ 7.3 มีเพียง 6 ชนิดที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสได้และโดยทั่วไปก็สร้างเทอร์โมนิวคลีเอสด้วยและมี *Staphylococcus* 10 ชนิดที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสและเอนไซม์เทอร์โมนิวคลีเอส แต่พบว่าสร้างเอนเทอโรทอกซินได้ ในบรรดา *Staphylococcus* ที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสได้นั้น *S. intermedius* เป็นชนิดที่รู้จักกันดีว่าสร้างเอนเทอโรทอกซิน เชื้อชนิดนี้พบตามจมูกและผิวหนังของสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะในสุนัขรวมทั้งม้าและสายพันธุ์ของ *S. hyicus* ส่วนใหญ่สร้างเอนเทอโรทอกซินได้¹

7.6.2 แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

Staphylococcus เป็นพวกที่ปรับตัวอาศัยเฉพาะในสัตว์บางชนิด (host-adapted) ประมาณครึ่งหนึ่งของ *Staphylococcus* ชนิดที่รู้จักพบอยู่ในคนเท่านั้นเช่น *S. cohnii* ssp. *cohnii* พบที่ผิวหนังของคน ตามทางเดินปัสสาวะและบาดแผลหรือชนิดที่อาศัยอยู่ทั้งในคนและสัตว์ด้วยเช่น *S. aureus*

ซึ่งพบเซลล์ของเชื้อชนิดนี้จำนวนมากใกล้บริเวณเปิดของผิวหนังร่างกาย จำนวนที่พบอาจสูงถึง 10^3 - 10^6 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ในสภาพที่แห้งอาจพบ 10 - 10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร บริเวณจมูกและบาดแผลจะพบเชื้อชนิดนี้มาก สัตว์เลี้ยงส่วนมากเป็นแหล่งของเชื้อ *S. aureus* เช่นวัว น้ามนดิบอาจปนเปื้อนเชื้อจากวัวที่เป็นโรคเต้านมอักเสบ (staphylococcal mastitis) ถ้าดื่มมนที่ปนเปื้อนหรือใช้น้ามนที่ปนเปื้อนเชื้อนี้ไปทำเนยแข็งก็มีโอกาสเป็นโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อนี้ได้มาก¹

ตารางที่ 7.3 *Staphylococcus* ชนิดที่สร้างโคแอกกูเลส นิวกลิเอสและเอนเทอโรทอกซิน

แบคทีเรีย	Coagulase	Nuclease	Enterotoxin	Hemolysis	Mannitol	G+C of DNA
<i>S. aureus</i> ssp.						
<i>anaerobius</i>	+	TS	-	+	-	31.7
<i>aureus</i>	+	TS	+	+	+	32-36
<i>intermedius</i>	+	TS	+	+	(+)	32-36
<i>hyicus</i>	(+)	TS	+	-	-	33-34
<i>delphini</i>	+	-		+	+	39
<i>S. schleiferi</i> ssp.						
<i>coagulans</i>	+	TS		+	(+)	35-37
<i>schleiferi</i>	-	TS		+	-	37
<i>S. caprae</i>	-	TL	+	(+)	-	36.1
<i>S. chromogens</i>	-	-W	+	-	V	33-34
<i>S. cohnii</i>	-	-	+	-	V	36-38
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	V	-	30-37
<i>S. haemolyticus</i>	-	TL	+	+	V	34-36
<i>S. lentus</i>	-		+	-	+	30-36
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	+	-	+	31-36
<i>S. sciuri</i>	-		+	-	+	30-36
<i>S. simulans</i>	-	V		V	+	34-38
<i>S. warneri</i>	-	TL	+	-W	+	34-35
<i>S. xylosus</i>	-	-	+	+	V	30-36

+ = ให้ผลบวก; - = ให้ผลลบ; -W = ให้ผลลบถึงบวกอย่างอ่อน; (+) = ปฏิกริยาอ่อน; V = ผันแปร;

TS = ทนความร้อน (thermostable); TL = ไม่ทนความร้อน (thermolabile)

ที่มา: Jay และคณะ¹

สำหรับเชื้อที่ไม่ใช่ *S. aureus* บริเวณผิวหนังของคนพบ *S. cohnii* และบางครั้งพบในทางเดิน ปัสสาวะและบาดแผล ผิวหนังของคนยังเป็นแหล่งของ *S. epidermidis* และ *S. haemolyticus* ส่วน เชื้อ *S. hyicus* เคยพบที่ผิวหนังของหมู ในน้ำนมและสัตว์ปีก ผิวหนังของสัตว์พวกไพรเมต (primate) ชั้ต่ำและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ เป็นแหล่งของ *S. xylosus* ผิวหนังของคนสัตว์และสัตว์พวก ไพรเมตชนิดอื่นเป็นแหล่งของ *S. simulans* สำหรับเชื้อ *S. schleiferi* ssp. *schleiferi* เคยพบในผู้ป่วย ที่ติดเชื้อได้ง่าย นอกจากนี้เชื้อ *S. schleiferi* ssp. *coagulans* เคยแยกได้จากหูของสุนัข ส่วนเชื้อ *S. aureus* ssp. *anaerobius* เป็นสาเหตุของโรคในแกะ เชื้อ *S. delphini* เคยแยกได้จากปลาโลมา เชื้อ *S. sciuri* พบที่ผิวหนังของหนู เชื้อ *S. lentus* และ *S. caprae* เคยพบในน้ำนมแพะ¹

7.6.3 การปนเปื้อนในอาหาร

โดยทั่วไปคาดได้ว่าอาจพบ staphylococci อย่างน้อยในปริมาณต่ำในอาหารชนิดใดก็ตามที่ ผลิตมาจากสัตว์หรืออาหารที่สัมผัสด้วยมือคน ถ้าอาหารนั้นไม่ได้ผ่านความร้อนที่มีผลทำลายเซลล์ ของแบคทีเรียชนิดนี้¹

7.6.4 ความต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญ

เชื้อ staphylococci ก็เหมือนกับแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไปที่ต้องการสารประกอบอินทรีย์ บางอย่าง เช่น ต้องการกรดอะมิโน เป็นแหล่งไนโตรเจน ต้องการไทอะมีนและกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) และเมื่อเจริญในสภาพไร้อากาศต้องการยูราซิล (uracil)¹

7.6.5 ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญ

ถึงแม้ว่าเชื้อ *Staphylococcus* จะเป็นแบคทีเรียที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แต่เชื้อ *S. aureus* บางสายพันธุ์ก็สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 6.7 °C สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคซึ่งเจริญ ได้ในคัสตาสต์พบว่าเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45.6 °C แต่ลดจำนวนลงที่อุณหภูมิ 46.7-48.9 °C โดยทั่วไป *S. aureus* เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 7-47.8 °C และสร้างเอนเทอโรทอกซินในช่วงอุณหภูมิ 10-46 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนเทอโรทอกซิน คือ 40-45 °C แต่อุณหภูมิสูงและต่ำสุดสำหรับการ เจริญและสร้างสารพิษนี้คาดว่าสัมพันธ์กับปัจจัยอื่นด้วย¹

7.6.6 ผลของเกลือและสารเคมีชนิดอื่น

แม้ว่า *S. aureus* เจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีเกลือ แต่ในสภาพที่มีเกลือร้อยละ 7-10 ก็เจริญได้ ดี และบางสายพันธุ์เจริญได้ในสภาพที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 20 ความเข้มข้นของเกลือสูงสุดที่จะเจริญ ได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นเช่น อุณหภูมิ ค่า pH ค่า a_w ค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชันและรีดักชัน¹

เชื้อ *S. aureus* มีความต้านทานสูงต่อสารประกอบได้แก่ เทลลูไรท์ (tellurite) เมอคิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride) นีโอไมซิน (neomycin) โพลีไมซิน (polymyxin) และโซเดียมแอไซด์ (sodium azide) สารเหล่านี้ใช้เป็นสารคัดเลือก (selective agent) เชื้อนี้ให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปสามารถแยกความแตกต่างของเชื้อ *S. aureus* ออกจากเชื้อ *Staphylococcus* ชนิดอื่นเนื่องจาก *S. aureus* ต้านทานแคริฟลาวิน (acriflavine) ได้สูงกว่า *Staphylococcus* ชนิดอื่น *S. aureus* ไวต่อบอเรต (borate) ขณะที่เชื้อ *S. epidermidis* ทนต่อบอเรต *S. aureus* และ *S. epidermidis* ไม่ทนต่อโนโวไบโอซิน (novobiocin) ซึ่งต่างกับแบคทีเรีย *S. saprophyticus* ที่ต้านทานต่อโนโวไบโอซิน ความสามารถในการทนต่อโซเดียมคลอไรด์และสารประกอบบางชนิดที่ความเข้มข้นระดับสูงก็เป็นคุณสมบัติของ *Micrococcus* และ *Kocuria* ด้วยซึ่งพบแพร่กระจายในธรรมชาติรวมทั้งในอาหาร โดยทั่วไปพบปริมาณมากกว่า *Staphylococcus* ดังนั้นจึงทำให้แยกเชื้อดังกล่าวออกจากกันได้ง่ายมากขึ้น^{1, 2}

7.6.7 ผลของค่า pH ค่า water activity และปัจจัยอื่นๆ

S. aureus สามารถเจริญได้ในช่วง pH 4.0 – 9.8 แต่มีช่วง pH ที่เหมาะสมในช่วง 6-7 อย่างไรก็ตาม ค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อชนิดนี้จะเจริญได้ขึ้นอยู่กับการควบคุมปัจจัยอื่นๆ ให้อยู่ในสภาวะเหมาะสมด้วย *S. aureus* เริ่มสร้างเอนเทอโรทอกซินในมาयोगเนสได้ที่ค่า pH 5.15 จนถึง pH 4.7¹

7.6.7.1 ผลของ NaCl และ pH ต่อการเจริญและการสร้างเอนเทอโรทอกซิน

เมื่อเลี้ยง *S. aureus* ใน protein hydrolysate medium และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 8 วัน พบว่า *S. aureus* เจริญและสร้างเอนเทอโรทอกซิน C ได้ในช่วง pH 4.00 – 9.83 ในสภาพที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ แต่ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4 เชื้อชนิดนี้จะเจริญได้ในช่วง pH 4.4 – 9.43 และในสภาพที่มี pH 5.45 และมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซินได้ และจะไม่สามารถสร้างสารพิษชนิดนี้ได้ถ้ามีเกลือสูงถึงร้อยละ 12 (ตารางที่ 7.4)

ตารางที่ 7.4 ผลของ pH และโซเดียมคลอไรด์ต่อการสร้างเอนเทอโรทอกซิน C ของ *S. aureus* 137 ที่ 10⁸ เซลล์ต่อมิลลิลิตรใน Protein hydrolysate medium บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 8 วัน

	ช่วง pH ที่เจริญ				
	4.00-9.83	4.40-9.43	4.50-8.55	5.45-7.30	4.50-8.50
ปริมาณ NaCl (ร้อยละ)	0	4	8	10*	12
การสร้างเอนเทอโรทอกซิน	+	+	+	+	-

* เอนเทอโรทอกซินถูกตรวจพบเมื่อมีเซลล์เริ่มต้นของ *S. aureus* 3.6 x 10⁶ เซลล์ต่อมิลลิลิตรที่ pH 6.38 – 7.30 ที่มา: Jay และคณะ¹

7.6.7.2 ผลของ pH, a_w และอุณหภูมิต่อการเจริญ

ในสภาพที่มีเชื้อ *S. aureus* หลายสายพันธุ์ในอาหารเหลว BHI ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์และซูโครสเป็นสารอิมมูเนแทนท์ (humectants) ที่ a_w 0.85 pH 4.3 ที่อุณหภูมิ 8°C พบว่าไม่มีการเจริญเกิดขึ้นและไม่มีการเจริญเกิดขึ้นที่ pH น้อยกว่า 5.5 a_w 0.90 หรือ 0.93 อุณหภูมิ 12°C และเช่นเดียวกันไม่มีการเจริญเกิดขึ้นในสภาพที่มี pH ต่ำกว่า 4.9 a_w 0.96 ที่อุณหภูมิ 12°C ¹

7.6.8 สารพิษที่สร้างโดยเชื้อ *Staphylococcus* (Staphylococcal enterotoxins)

สารพิษที่สร้างโดยเชื้อ *Staphylococcus* ที่ถูกจำแนกจนกระทั่งถึงปี ค. ศ. 2001 มีทั้งหมด 13 ชนิดคือ เอนเทอโรทอกซิน A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, G, H, I, J, K และ L ทุกชนิดเป็นโปรตีนโดยทั่วไปเอนเทอโรทอกซินชนิดที่ตรวจได้บ่อยที่สุดจากการเกิดโรคระบาดคือ เอนเทอโรทอกซิน A ส่วนชนิดที่พบบ่อยรองลงมาคือ เอนเทอโรทอกซิน D¹

เอนเทอโรทอกซินสามารถต้านทานต่อการย่อยโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนเช่น ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) เรนิน (rennin) และ พาเพน (papain) แต่ไม่ทนต่อเปปซิน (pepsin) ที่ pH 2 เอนเทอโรทอกซินค่อนข้างทนความร้อน เอนเทอโรทอกซิน C ทนความร้อนได้ดีกว่าเอนเทอโรทอกซิน B และเอนเทอโรทอกซิน A เอนเทอโรทอกซินทนความร้อนได้ดีกว่าตัวเซลล์ เซลล์ของ *S. aureus* ถูกทำลายได้ง่ายโดยความร้อนมากกว่าเอนเทอโรทอกซินค่อนข้างมาก¹

7.6.9 อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus* (Gastroenteritis syndrome)

อาการของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Staphylococcus* จะเกิดขึ้นภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไป จากรายงานกล่าวว่าเกิดอาการภายใน 1-6 ชั่วโมงอาการที่เกิดขึ้นได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน เป็นตะคริวที่ท้อง (abdominal cramp) มักจะรุนแรง ท้องเสีย เหงื่อออก ปวดหัว บางครั้งอุณหภูมิของร่างกายลดลง โดยทั่วไปกินเวลา 24-48 ชั่วโมง อัตราการตายต่ำมากรักษาโดยให้พักผ่อนมาก ๆ และรักษาสมดุลของของเหลวในร่างกาย เมื่อหายจากโรคผู้ป่วยจะไม่มีภูมิคุ้มกันต่อการเกิดโรคอีกครั้ง แต่ในสัตว์จะมีความต้านทานต่อเอนเทอโรทอกซินเมื่อได้รับอีกครั้ง เนื่องจากอาการที่เกิดขึ้นมาจากการได้รับสารพิษ ดังนั้นอาจตรวจไม่พบเชื้อในสิ่งขับถ่าย การพิสูจน์ว่าโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดขึ้นมาจากเชื้อ *Staphylococcus* ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อที่ได้จากอาหารที่เหลือจากการรับประทานและเลี้ยงเชื้อจากสิ่งขับถ่ายของผู้ป่วย¹

7.6.10 การป้องกันโรคอาหารเป็นพิษจาก *Staphylococcus* และโรคอาหารเป็นพิษชนิดอื่น

เมื่ออาหารปนเปื้อนด้วย *Staphylococcus* ในปริมาณต่ำ ถ้าเก็บอาหารไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 4.4°C หรือเก็บไว้สูงกว่าอุณหภูมิ 60°C จนกระทั่งรับประทาน อาหารนั้นจะปราศจาก

เอนเทอโรทอกซินและอันตรายจากโรคอาหารเป็นพิษอื่น ๆ ในปี ค. ศ. 1961-1972 พบว่ามีโรคระบาดจากอาหารเป็นพิษเกิดขึ้นมากกว่า 700 ครั้ง และได้มีความพยายามที่จะสืบหาปัจจัยที่นำไปสู่การเกิดโรคระบาด พบว่ามีหลายปัจจัย โดยปัจจัยที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคระบาดบ่อยที่สุดได้แก่ การให้ความเย็นกับอาหารไม่เพียงพอ การเตรียมอาหารไว้ล่วงหน้านานเกินไป การปนเปื้อนเชื้อจากบุคคลที่มีสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่ดี การให้ความร้อนกับอาหารอย่างไม่เพียงพอและการเก็บอาหารไว้ในเครื่องอุ่นอาหารที่มีอุณหภูมิไม่สูงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์¹

7.7 โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Clostridium perfringens*

เชื้อ *Clostridium perfringens* (welchii) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสร้างสปอร์ได้แพร่กระจายอยู่ตามธรรมชาติ สามารถแบ่งแบคทีเรียชนิดนี้ออกได้เป็น 5 ชนิดตามความสามารถในการสร้างเอกโซทอกซิน (exotoxin) คือ ชนิด (type) A, B, C, D และ E สายพันธุ์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษคือ ชนิด A ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคไฟลามทุ่ง (gas gangrene) ด้วยซึ่งต่างกับสายพันธุ์อื่นโดยทั่วไปชนิด A จะทนความร้อนและสร้างสารพิษเพียงเล็กน้อย ส่วนชนิด C บางสายพันธุ์สร้างเอนเทอโรทอกซินได้และอาจเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ¹

7.7.1 การแพร่กระจายของ *C. perfringens*

C. perfringens สายพันธุ์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ พบในดิน น้ำ อาหาร ผุน เครื่องเทศและทางเดินอาหารของคนและสัตว์ ชนิดที่ทนความร้อนได้ดีพบได้บ่อยในทางเดินอาหารของคน เชื้อ *C. perfringens* ปนเปื้อนสู่เนื้อโดยตรงจากสัตว์ที่ถูกฆ่าหรือปนเปื้อนในเวลาต่อมาจากภาชนะบรรจุ ผู้ปฏิบัติงานหรือฝุ่น เนื่องจากเชื้อชนิดนี้สามารถสร้างสปอร์ได้จึงทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีเช่น ในระหว่างการทำแห้ง การให้ความร้อนและสภาพที่มีสารพิษบางชนิด¹

7.7.2 คุณลักษณะของ *C. perfringens*

C. perfringens เหมือนกับเชื้อโรคอาหารเป็นพิษชนิดอื่นซึ่งเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดถ้าบ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศหรือบ่มในสภาวะรีดิวซ์อย่างเพียงพอ มีผู้รายงานว่า *C. perfringens* ที่แยกจากเนื้อม้าเจริญได้ดีโดยที่ระยะเวลาในช่วง lag phase ไม่เพิ่มขึ้นในสภาพที่มีค่า Eh เท่ากับ -45 หรือต่ำกว่า แต่ในสภาพที่มีค่า Eh เป็นบวกมากกว่านี้มีผลทำให้ระยะเวลาช่วง lag phase ยาวนานขึ้น ถึงแม้ว่าตัวเซลล์ของเชื้อนี้จะเจริญได้ไม่ยากบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด แต่การสร้างสปอร์เกิดขึ้นได้ยากและต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ¹

C. perfringens เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 37-45°C อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญประมาณ 20°C และ

อุณหภูมิสูงสุดที่จะเจริญได้ประมาณ 50°C ถ้าเจริญที่อุณหภูมิ 45°C ภายใต้สภาวะเหมาะสมจะทำให้มีระยะเวลาในการแบ่งตัวเป็นสอง (generation time) สั้นถึง 7 นาที สำหรับช่วง pH ที่เชื้อชนิดนี้จะเจริญได้พบว่า หลายสายพันธุ์เจริญได้ในช่วง pH 5.5 – 8.0 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ pH ไม่ต่ำกว่า 5.0 และไม่สูงกว่า 8.5 ส่วนค่า a_w ต่ำสุดที่เชื้อชนิดนี้จะเจริญและสร้างสปอร์ได้อยู่ระหว่าง 0.95-0.97 ในสภาพที่มีซูโครสหรือไซเตียมคลอไรด์ และค่า a_w ต่ำสุดเป็น 0.93 ในสภาพที่มีกลีเซอรอลในอาหาร thioglycollate การสร้างสปอร์ต้องการ a_w สูงกว่าค่า a_w ต่ำสุดดังกล่าวข้างต้น เชื้อชนิดนี้เริ่มเจริญได้ที่ค่า $E_h + 320$ mV ในการเจริญต้องการกรดอะมิโนอย่างน้อย 13 ชนิด รวมทั้งไบโอติน (biotin) แพนโททีเนต (pantothenate) ไพริดอกซอล (pyridoxal) อะดีนีน (adenine) และสารประกอบอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เชื้อ *C. perfringens* เป็นแบคทีเรียที่จัดเป็นประเภท heterofermentative ซึ่งหมักสารคาร์โบไฮเดรตให้สารหลายชนิด สามารถกระทำต่อสารคาร์โบไฮเดรตได้จำนวนมาก ในสภาพที่มีไซเตียมคลอไรด์ร้อยละ 5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดนี้ เอนโดสปอร์ของสายพันธุ์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษด้านทานความร้อนได้แตกต่างกัน บางสายพันธุ์ทนความร้อนได้ตามปกติเหมือนกับเชื้อที่สร้างสปอร์ทั่วไป แต่บางสายพันธุ์ด้านทานความร้อนได้สูง¹

7.7.3 เอนเทอโรทอกซิน

เอนเทอโรทอกซินของ *C. perfringens* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษซึ่งมีความไม่ธรรมดา ก็คือ เป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะกับสปอร์ (spore – specific protein) การสร้างสารเอนเทอโรทอกซินเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการสร้างสปอร์ โรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดที่เคยเกิดขึ้นมีสาเหตุมาจากสายพันธุ์ที่เป็นชนิด A ส่วนโรคที่ไม่เกี่ยวข้อง เช่น necrotic enteritis (โรคที่ทำให้เกิดอาการท้องเสีย) มีสาเหตุมาจากเบต้าทอกซินสร้างขึ้นโดยสายพันธุ์ *C. perfringens* ชนิด C ซึ่งมีรายงานไว้น้อยมาก โรคนี้แม้ว่าจะเกิดจากเชื้อชนิด C แต่ก็มีอัตราการตายร้อยละ 35-40 สำหรับโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อชนิด C ก็เคยทำให้มีการตายในผู้ป่วยสูงอายุและผู้ที่ย่างกายไม่แข็งแรงสมบูรณ์ สายพันธุ์ของชนิด C บางสายพันธุ์ ก็เคยมีรายงานว่าสร้างเอนเทอโรทอกซินได้แต่บทบาทในการเกิดโรคยังไม่กระจ่างชัด¹

เอนเทอโรทอกซินของเชื้อชนิด A ที่บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 35,000 ดาลตัน และมีจุดไอโซอิเล็กทริก 4.3 ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที ไวต่อเอนไซม์โปรเนส (pronase) แต่ทนต่อเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และพาเพน¹

เอนเทอโรทอกซินถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยเซลล์ที่สร้างสปอร์ในช่วงสุดท้ายของการสร้างสปอร์ การสร้างสารพิษสูงสุดเกิดขึ้นก่อนที่สปอร์จะแตกออก เอนเทอโรทอกซินจะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับสปอร์ สภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์นั้นจะเหมาะสมต่อการสร้างสารเอนเทอโรทอกซินด้วย เอนเทอโรทอกซินอาจปรากฏขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของเชื้อและการสร้างสปอร์ประมาณ 3 ชั่วโมงหลังจากเติมเซลล์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ¹

เอนเทอโรทอกซินของ *C. perfringens* ไม่ใช่ superantigens เหมือนกับเอนเทอโรทอกซินของ *Staphylococcus* แต่เป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 319 ตัว ซึ่งจะจับกับ Claudine และ/หรือ 50 kDa eukaryotic membrane receptor ซึ่งจะทำให้สร้างเกิดการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของเอนเทอโรทอกซินขนาด 90 – kDa (*C. perfringens* enterotoxin – containing complex) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของ host สารประกอบเชิงซ้อนที่ใหญ่กว่า 160 kDa อาจถูกสร้างขึ้นได้จากโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ของ host ซึ่งจะชักนำให้เปลี่ยนแปลงความสามารถการผ่านเข้าออกของสาร (permeability) จากเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์ของ host ตายในที่สุด¹

7.7.4 อาหารที่เป็นพาหะและอาการของโรคที่เกิดขึ้น

อาการของโรคจะเกิดขึ้นในระหว่าง 6-24 ชั่วโมง โดยเฉพาะในช่วง 8-12 ชั่วโมงหลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อนี้เข้าไป โดยจะเกิดอาการปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย คลื่นไส้ เป็นไข้ ไม่ค่อยมีอาการอาเจียน อาการป่วยเกิดขึ้นในช่วงสั้นๆ ในผู้สูงอายุและผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ อัตราการตายต่ำมาก ไม่มีภูมิคุ้มกันเกิดขึ้นหลังจากได้รับเชื้อ¹

อาหารที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคระบาดจากเชื้อ *C. perfringens* มักเป็นอาหารเนื้อที่เตรียมขึ้นวันนั้นแต่รับประทานพรุ่งนี้โดยมีการให้ความร้อนไม่เพียงพอที่จะทำลายเอนโดสปอร์ที่ทนความร้อน เมื่ออาหารเย็นลงและถูกนำมาอุ่นอีกครั้ง เอนโดสปอร์จะงอกและเจริญ¹

7.7.5 การป้องกันโรคอาหารเป็นพิษจาก *C. perfringens*

โรคอาหารเป็นพิษจาก *C. perfringens* (*C. perfringens* gastroenteritis) ป้องกันได้โดยการเรียนรู้ถึงสาเหตุของการเกิดโรคนี้และระมัดระวังไม่ให้เกิด ซึ่งการระบาดมักเกิดขึ้นในโรงอาหารของสถาบันต่าง ๆ เช่น ตามโรงเรียน จึงได้มีผู้แนะนำข้อควรปฏิบัติ 9 ประการในการเตรียมอาหารจากไก่วงและน้ำปรุงรส ดังนี้¹

1. ให้ความร้อนไก่วงจนอุณหภูมิภายในสูงขึ้นอย่างน้อย 74 °C หรือสูงกว่านี้
2. ล้างทำความสะอาด ฆ่าเชื้อภาชนะอุปกรณ์ซึ่งมีการสัมผัสกับไก่ดิบมาก่อน
3. ล้างมือให้สะอาดและใช้ถุงมือที่ใช้แล้วทิ้งเลยในขณะที่ทำอาหาร
4. แยกเนื้อไก่และน้ำซุปร่อนนำไปแช่เย็น
5. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วหลังจากให้ความร้อน
6. ให้ความร้อนกับน้ำซุปร่อนที่เก็บไว้จนเดือดก่อนทำน้ำเกรวี่ (gravy)
7. ให้ความร้อนจนอุณหภูมิภายในสูงถึง 165°F หรือสูงกว่า
8. ก่อนที่จะรับประทาน ให้ความร้อนเนื้อไก่กับน้ำเกรวี่รวมกันจนกระทั่งขึ้นเนื้อไก่ส่วนใหญ่มีอุณหภูมิสูงถึง 165°F

7.8 โรคที่มีสาเหตุมาจาก *Clostridium botulinum* (Botulism)

โรคโบทูลิซึมมีสาเหตุมาจากการรับประทานสารพิษที่มีความพิษสูงมากเข้าไป สารพิษนี้เป็นเอกโซทอกซิน (exotoxin) ที่ละลายน้ำได้ เกิดขึ้นระหว่างที่เชื้อ *Clostridium botulinum* เจริญในอาหารซึ่งต่างกับโรคอาหารเป็นพิษจาก *C. perfringens* ที่ต้องกินตัวเซลล์ที่มีชีวิตจำนวนมากเข้าไป เชื้อ *C. botulinum* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนสร้างสปอร์ได้ สปอร์รูปไข่ถึงรูปทรงกระบอกอยู่ตรงปลายเซลล์หรือใกล้ปลายเซลล์ เมื่อจำแนกชนิดตามความจำเพาะด้านซีโรวิทยาของสารพิษแล้วสามารถแบ่งเชื้อนี้ได้เป็น 7 ชนิด (type) คือชนิด A, B, C, D, E, F และ G ชนิด A, B, E, F และ G ก่อให้เกิดโรคในคน ส่วนชนิด C ทำให้เกิดโรคในสัตว์เช่น สัตว์ปีก โค กระบือ มิงค์ (mink) และสัตว์อื่นๆ *C. botulinum* ชนิด D พบได้ในหญ้าหมักที่ให้วัวกินโดยเฉพาะในประเทศแอฟริกาใต้ แต่ละชนิดแยกความแตกต่างได้ตามกิจกรรมการย่อยโปรตีน ชนิด A และ G เป็นชนิดที่ย่อยสลายโปรตีนได้ (proteolytic) เช่นเดียวกับชนิด B และ F บางสายพันธุ์ สำหรับชนิด E นั้นจะย่อยโปรตีนไม่ได้ (nonproteolytic) รวมทั้งชนิด B และ F บางสายพันธุ์ด้วย กิจกรรมการย่อยโปรตีนของชนิด G ช้ากว่าของชนิด A เชื้อชนิด G ทุกสายพันธุ์ที่ผลิตสารพิษได้ถูกจำแนกใหม่เป็น *C. argentinense* เชื้อนี้เคยแยกได้จากดินในอาเจนตินา สวิตเซอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกา¹

เชื้อทุกสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งใน 4 กลุ่มคือ กลุ่ม I, II, III หรือ IV โดยกลุ่ม I เป็นเชื้อที่ย่อยโปรตีนได้ กลุ่ม II เป็นเชื้อที่ย่อยโปรตีนไม่ได้ กลุ่ม IV เป็นพวกที่เกิดปฏิกิริยาซีโรวิทยาของชนิด G กลุ่ม III ประกอบด้วยเชื้อชนิด C และ D สารพิษชนิด F สร้างขึ้นโดย *Clostridium baratii* และ neurotoxin ที่มีลักษณะของแอนติเจนคล้ายแต่ไม่เหมือนกับของชนิด E จะถูกสร้างขึ้นโดย *Clostridium butyricum*¹

7.8.1 การแพร่กระจายของ *C. botulinum*

เชื้อชนิดนี้ปกติอยู่ในดินและน้ำ ในสหรัฐอเมริกา *C. botulinum* ชนิด A เกิดขึ้นบ่อยในดินของรัฐแถบตะวันตก *C. botulinum* ชนิด B พบบ่อยในรัฐแถบตะวันออกและในยุโรป มีรายงานว่าดินและสิ่งขับถ่ายในหลาย ๆ ประเทศมีสปอร์ของเชื้อชนิด A ร้อยละ 18 ชนิด B ร้อยละ 7 ดินที่ใช้เพาะปลูกมีเอนโดสปอร์ของเชื้อชนิด A ร้อยละ 7 ชนิด B ร้อยละ 6 สปอร์ของชนิด E มีแนวโน้มที่จะพบมากในน้ำโดยเฉพาะน้ำทะเล เชื้อชนิดนี้ย่อยโปรตีนไม่ได้และพบในน้ำมากกว่าในดิน¹

7.8.2 การเจริญของ *C. botulinum*

การเจริญและลักษณะของ *C. botulinum* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุของโรคโบทูลิซึมในคนแสดงในตารางที่ 7.5 *C. botulinum* สายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนได้ต่างกับสายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนไม่ได้

คือ ย่อยเคซีนและสร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ สายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนไม่ได้จะหมักแมนโนสได้ แต่สายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนได้จะหมักแมนโนสไม่ได้ สายพันธุ์ทั้งสองประเภทนี้ยังแบ่งออกได้เป็นกลุ่มๆ ตามโซมาติกแอนติเจนโดยอาศัยการทดสอบปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination test)¹

C. botulinum ต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อน โดยเฉพาะอาหารที่มีกรดอะมิโน วิตามินบีและเกลือแร่ สารคาร์โบไฮเดรตไม่ส่งเสริมการเจริญของกลุ่มที่ย่อยโปรตีนแต่จะส่งเสริมการเจริญของกลุ่มที่ไม่ย่อยโปรตีน และกลุ่มที่ไม่ย่อยโปรตีนมีแนวโน้มที่จะทำปฏิกิริยาการหมักได้ดีกว่า โดยทั่วไปกลุ่มที่ย่อยโปรตีนไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 12.5°C อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญของชนิด A และชนิด B ซึ่งย่อยโปรตีนได้คือ 50°C ขณะที่สายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนไม่ได้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 3.3°C และมีอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญต่ำกว่าอุณหภูมิสูงสุดที่สายพันธุ์ย่อยโปรตีนเจริญได้ประมาณ 5°C นอกจากนี้ อุณหภูมิต่ำสุดและอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ ด้วย โดยทั่วไป *C. botulinum* ไม่เจริญที่ pH ต่ำกว่า 4.5 ดังนั้นในการฆ่าเชื้ออาหารที่มี pH ต่ำกว่า 4.5 จึงอาจใช้ความร้อนในระดับต่ำกว่าความร้อนที่ใช้กับอาหารที่มี pH สูงกว่า 4.5 ได้ ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญและการสร้างสารพิษของ *C. botulinum* ชนิด A และชนิด B คือ 0.94 ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับชนิด E ประมาณ 0.97 สายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนได้จะต้านทานความร้อนได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนไม่ได้¹

7.8.3 สารพิษที่สร้างโดย *C. botulinum*

สารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (neurotoxin) ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ที่เจริญในสภาวะเหมาะสมและปล่อยออกมาเมื่อเซลล์มีการย่อยสลายตัวเอง สารพิษ botulinal neurotoxin (BoNT) ที่บริสุทธิ์เป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษสูงที่สุด มีรายงานว่าโดสต่ำสุด (minimum lethal dose) ที่ทำให้หนูตาย มีค่าต่ำถึง 0.4-2.5 นาโนกรัมต่อกิโลกรัมโดยการฉีดเข้าเส้นเลือดหรือฉีดเข้าช่องท้อง และร้อยละ 50 ของ human lethal dose อยู่ที่ประมาณ 1 นาโนกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม¹

สารพิษ BoNT สร้างขึ้นในรูปของสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวประกอบด้วย 100-kDa heavy chain ต่อกับ 50-kDa light chain ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ สารพิษของ *C. botulinum* ชนิด A มีรายงานว่าทำให้ตายได้มากกว่าสารพิษจากชนิด B และชนิด E สารพิษนี้เข้าสู่กระแสเลือดทางเยื่อบุเมือกของระบบทางเดินหายใจหรือเข้าทางผนังของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก สารพิษนี้ไม่ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกระเพาะอาหาร แต่สารพิษจากเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่ย่อยโปรตีนอาจถูกกระตุ้นได้ หลังจาก que สารพิษนี้เข้าสู่กระแสเลือดและเข้าสู่ระบบประสาทแล้วจะจับกับ presynaptic terminal membrane ที่จุดต่อของเส้นประสาทกับกล้ามเนื้อเป็นที่ซึ่งการปล่อย acetylcholine ถูกขัดขวาง ทำให้เป็นอัมพาต (flaccid paralysis) สารพิษจาก *C. botulinum* ไม่ทนความร้อน อาจถูกทำลายที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาทีหรือที่อุณหภูมิน้ำเดือดเพียง 2-3 นาที¹

ตารางที่ 7.5 การเปรียบเทียบลักษณะของ *C. botulinum* สายพันธุ์ต่าง ๆ และสารพิษที่สร้างขึ้น

คุณลักษณะ	Serologic types						
	A	B	B	E	F	F	G
ปีที่พบ (ค. ศ.)	1904	1896	1960	1936	1960	1965	1969
กลุ่มที่ย่อยสลาย	+	+	-	-	+	-	+ (weak)
โปรตีน: +, ย่อยได้ ; -, ย่อยไม่ได้							
กลุ่ม	I	I	II	II	I	II	IV
แหล่งที่อยู่อาศัย	พื้นดิน	พื้นดิน	ในน้ำ	ในน้ำ	ในน้ำ	ในน้ำ	พื้นดิน
อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับ การเจริญ (°C)	~ 10	~ 10	3.3	3.3	~ 10	3.3	~ 12
อุณหภูมิสูงสุดสำหรับ การเจริญ (°C)	~ 50	~ 50	~ 45	~ 45	~ 50	~ 45	ไม่มีข้อมูล
ค่า pH ต่ำสุดสำหรับ การเจริญ	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.8	4.8
ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับ การเจริญ	0.94	0.94	~ 0.97	~ 0.97	0.94	~ 0.97	ไม่มีข้อมูล
Thermal D value ของ เอนโดสปอร์ (°C)	$D_{110} =$ 2.72-2.89	$D_{110} =$ 1.34-1.37	ไม่มีข้อมูล	$D_{80} =$ 0.80	$D_{110} =$ 1.45-1.82	$D_{82.2} =$ 0.25-0.84	$D_{110} =$ 0.45-0.54
Radiation D value ของสปอร์ (kGy)	1.2-1.5	1.1-1.3	ไม่มีข้อมูล	1.2	1.1 ; 2.5	1.5	ไม่มีข้อมูล
NaCl สูงสุดสำหรับการ เจริญ (ร้อยละ)	~ 10	~ 10	5-6	5-6	8-10	5-6	ไม่มีข้อมูล
ความบ่อยในการเกิด โรคระบาด	สูง	สูง	ไม่มีข้อมูล	สูงสุดใน อาหาร ทะเล	1 โรค ระบาด	1 โรค ระบาด	ไม่มี ข้อมูล
การสร้าง H_2S	+	+	-	-	+	-	++
การไฮโดรไลส์เคซีน	+	+	-	-	+	-	+
การสร้างไลเปส	+	+	+	+	+	+	-
การหมักกลูโคส	+	+	+	+	+	+	-
การหมักแมนโนส	-	-	+	+	-	+	-
การสร้างกรดไพรูวิก	+	+	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล	+	ไม่มีข้อมูล	ไม่มีข้อมูล

หมายเหตุ : + = positive ; ++ = strongly positive ; - = negative

ที่มา : Jay และคณะ¹

7.8.4 โรคโบทูลิซึมในผู้ใหญ่ (Adult botulism)

อาการของโรคโบทูลิซึมอาจเกิดขึ้นในช่วง 12 ถึง 72 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่มีสารพิษนี้เข้าไป อาการที่เกิดขึ้นได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน เมื่อยล้า มึนงง ปวดศีรษะ ผิวหนัง ปาก และคอแห้ง ไม่มีไข้ กล้ามเนื้อเป็นอัมพาต เห็นภาพซ้อน ระบบหายใจล้มเหลวและตายในที่สุด ระยะเวลาที่ป่วย 1-10 วันหรือนานกว่า ขึ้นอยู่กับความต้านทานของร่างกายและปัจจัยอื่น อัตราการตายผันแปรระหว่างร้อยละ 30-65 อาการทั้งหมดเกิดขึ้นโดยเอกซิทอกซิน การรักษาทำได้โดยให้ antisera ชนิดพิเศษ เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ อาหารเคยเป็นสาเหตุของโรคระบาดได้แก่ เห็ดกระป๋อง ตับบด กระเทียมสับในน้ำมันถั่วเหลืองบรรจุขวด ซูชิ (izushi) ที่ทำจากปลาดิบ ผัก ข้าวสุก โคจิ เกลลี่และน้ำส้มสายชูเล็กน้อย ซึ่งทำเก็บไว้ในภาชนะบรรจุที่ทำด้วยไม้มีฝาปิดเก็บไว้ 3 สัปดาห์¹

7.8.5 โรคโบทูลิซึมในเด็กทารก (Infant botulism)

โรคโบทูลิซึมในเด็กทารกได้รับการยืนยันครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 ในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา โรคโบทูลิซึมในเด็กต่างกับโรคนี้ในผู้ใหญ่ที่ได้รับสารพิษเข้าไป ในเด็กถ้าได้รับสปอร์ที่มีชีวิตของ *C. botulinum* เข้าไป สปอร์จะงอกในทางเดินอาหารและสร้างสารพิษ อาการของโรคไม่รุนแรงในเด็กบางคนแต่ในเด็กบางคนก็อาจรุนแรง พบสปอร์จำนวนมากในอุจจาระของทารกในช่วงที่รุนแรงของโรค อาหารที่พบบ่อยว่าเป็นพาหะคือ น้ำเชื่อมและน้ำผึ้ง¹

7.9 โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *Bacillus cereus* (*Bacillus cereus* Gastroenteritis)

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนขนาดใหญ่ ปกติมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0-1.2 ไมโครเมตร ยาว 3.0-5.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ต้องการอากาศในการเจริญและสร้างสปอร์ได้ โดยทั่วไปพบในดิน ฟุน และน้ำ อาจพบในอาหาร ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในยุโรปตั้งแต่ปี ค.ศ. 1906 ส่วนในสหรัฐอเมริกา มีการยืนยันครั้งแรกว่าเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อชนิดนี้ในปี ค.ศ. 1969 และในประเทศอังกฤษพบโรคระบาดจากเชื้อชนิดนี้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1971^{1,3}

มีรายงานการพบ *B. cereus* ปริมาณต่ำในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งอาหารสดและอาหารแปรรูป จากการศึกษาพบว่าในเนื้อสดพบแบคทีเรียชนิดนี้ร้อยละ 6.6 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ 534 ตัวอย่าง ในผลิตภัณฑ์เนื้อพบร้อยละ 18.3 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ 820 ตัวอย่าง และในส่วนผสมที่เติมลงในผลิตภัณฑ์พบร้อยละ 39.1 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ 609 ตัวอย่าง โดยจำนวนที่พบอยู่ในช่วง 10^2 - 10^4 เซลล์ต่อกรัม แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นสายพันธุ์ที่

สร้างเอนโทโรทอกซินหรือไม่ ส่วนอีกการศึกษาหนึ่ง มีการแยกเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างเอนโทโรทอกซินได้จากอาหารหลายชนิด *Bacillus* ชนิดที่สร้างเอนโทโรทอกซินได้มีดังนี้¹

นอกจาก *B. cereus* แล้วมีรายงานว่า *Bacillus mycoides* ที่แยกได้จากน้ำนมก็สร้างสารพิษเอนโทโรทอกซินที่ทำให้เกิดโรคท้องเสียได้ภายใน 9 วันที่อุณหภูมิ 6-21 °C¹

7.9.1 การเจริญและการอยู่รอด

เชื้อ *B. cereus* มีอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญประมาณ 4-5 °C อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญเท่ากับ 48-50 °C เจริญอย่างรวดเร็วในอาหารเจริญที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30-40 °C เจริญได้ในช่วง pH 4.9-9.3 เมื่อพิจารณาการพบเชื้อ *B. cereus* ทั้งในอาหารดิบและอาหารปรุงสุก จึงไม่น่าแปลกใจเลยว่าแบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญในอาหารที่เก็บในสภาวะอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ถ้ามีการเจริญเกิดขึ้นก็เป็นไปได้ที่เชื้อนี้จะสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดโรคระบาด เชื้อ *B. cereus* สร้างสปอร์ที่ทนความร้อน ผลิตสารพิษ (extracellular toxins) และเอนไซม์หลายชนิดได้แก่ เลซิทินเนส (lecithinase) โปรติเอส (proteases) เบต้า-แลคตาเมส (β -lactamase) สฟริงโกไมอีลิเนส (sphingomyelinase) ซีลีโอไลซิน (cereolysin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ทำให้หนูตายและฮีโมไลซินบีแอล (hemolysin BL) ซีลีโอไลซินเป็น thiol-activated toxin ที่เหมือนกับ perfrinolysin O มีน้ำหนักโมเลกุล 55 กิโลดาลตัน (kDa) ไม่มีบทบาทต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ *B. cereus* หลายสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษสามารถสร้างสารพิษที่อุณหภูมิ 6-21 °C โรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้มี 2 ประเภทคือ^{1, 3}

7.9.2 โรคที่มีสาเหตุมาจาก *Bacillus cereus*

7.9.2.1 Diarrheal syndrome

โรคอาหารเป็นพิษชนิดนี้มีอาการไม่รุนแรงเกิดอาการภายใน 8-16 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อที่พบบ่อยมักเกิดอาการภายใน 12-13 ชั่วโมง ระยะเวลาที่เกิดอาการคือ 6-12 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ (ไม่ค่อยอาเจียน) ปวดท้องคล้ายเป็นตะคริวที่ท้องและท้องเสียอุจจาระเหลวมีน้ำมาก โดยทั่วไปไม่มีไข้ มีอาการคล้ายกับอาการของโรคที่เกิดขึ้นจาก *Clostridium perfringens* อาหารที่เป็นพาหะเช่น อาหารที่มีส่วนประกอบของธัญชาติเช่น ข้าวโพดและสตาร์ชจากข้าวโพด (cornstarch) มันฝรั่งบด (mashed potatoes) ผัก เนื้อสัตว์ใส่กรอกตับ นำนม เนื้อสุก อาหารข้าวอินโดนีเซีย พุดดิ้ง ชูป จากการรายงานการเกิดโรคระบาดในปี ค. ศ. 1950-1978 พบว่าเมื่อตรวจนับจำนวนเชื้อในอาหารที่เหลือจากการรับประทานพบว่าเชื้อ *B. cereus* มีจำนวน 10^5 ถึง 9.5×10^5 เซลล์ต่อกรัม พบมากในช่วง 10^7 - 10^8 เซลล์ต่อกรัม เอนไซม์ฮีโมไลซินบีแอลมีบทบาทต่อการเกิดอาการของโรคชนิดนี้¹

7.9.2.2 Emetic syndrome

โรคอาหารเป็นพิษจาก *B. cereus* ชนิดนี้มีอาการรุนแรงกว่าแบบแรก ระยะเวลาหลังจากได้รับเชื้อจนกระทั่งเกิดอาการ (incubation period) อยู่ในช่วง 1-6 ชั่วโมง พบบ่อยในช่วง 2-5 ชั่วโมง มีอาการคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *Staphylococcus* อาหารที่เกี่ยวข้องคือ ข้าวผัด อาหารจากข้าวสุก ครีมพาสเจอร์ไรส์ สเปกเก็ตตี้ มันฝรั่งบด และผักตบชวาชนิดต่าง ๆ ได้เคยมีรายงานการเกิดโรคระบาดนี้ในประเทศอังกฤษ แคนาดา ออสเตรเลีย เนเธอร์แลนด์ ฟินแลนด์ ญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา โรคระบาดชนิดนี้เกิดขึ้นครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 1975 จากการรับประทานมันฝรั่งบดจำนวนเซลล์ของ *B. cereus* ที่จะทำให้เกิดโรคชนิดนี้สูงกว่าแบบแรก เคยพบว่าผู้ป่วยได้รับเซลล์สูงถึง 2×10^9 เซลล์ต่อกรัม¹

7.10 โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *Listeria* (Foodborne Listeriosis)

Listeria เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปท่อน เคยถูกจัดอยู่ในสกุล *Listerella* และเปลี่ยนชื่อสกุลเป็น *Listeria* ในปี ค.ศ. 1940 มีลักษณะคล้าย *Brochothrix* ในหลาย ๆ ด้าน แบคทีเรียทั้งสองสกุลนี้เป็นพวกที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ (catalase positive) มีแนวโน้มว่าจะเกี่ยวข้องซึ่งกันและกันในธรรมชาติและเกี่ยวข้องกับ *Lactobacillus* ด้วย แบคทีเรียทั้งสามสกุลนี้สร้างกรดแลคติกจากกลูโคสและน้ำตาลชนิดอื่นที่หมักได้ เชื้อ *Listeria* และ *Brochothrix* สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ แต่ *Lactobacillus* ไม่เหมือนกับ *Listeria* และ *Brochothrix* ตรงที่ *Lactobacillus* ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ (catalase negative) ครั้งหนึ่งเชื่อว่า *Listeria* เกี่ยวข้องกับ coryneform bacteria จึงถูกจัดอยู่ในวงศ์ Corynebacteriaceae แต่ปัจจุบันเป็นที่กระจ่างชัดว่า *Listeria* มีความเกี่ยวพันอย่างใกล้ชิดกับ *Bacillus*, *Lactobacillus* และ *Streptococcus* มากกว่า เชื้อ *Listeria* มี 6 species ซึ่งจัดจำแนกตามแอนติเจนของเชื้อได้แก่ *Listeria monocytogenes* (ชนิดที่ก่อโรค) *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* และ *L. grayi*¹

เชื้อ *Listeria* ถูกจัดจำแนกเป็น 6 สปีชีส์ (ตารางที่ 7.6) เนื่องจากการมีแอนติเจนซึ่งทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ถูกจัดจำแนกได้ถึง 17 ซีโรไทป์ (serotype) หรือซีโรวาร (serovar) ชนิดหลักๆ ที่ก่อให้เกิดโรคคือ *L. monocytogenes* มีถึง 13 ซีโรวาร *Listeria innocua* มี 2 ซีโรวาร คือ 6a/6b บางครั้งจัดเป็นสายพันธุ์ของ *L. monocytogenes* ที่ไม่ก่อโรค ซีโรไทป์ของ *Listeria* ที่แยกได้บ่อยที่สุดคือ ซีโรไทป์ 1/2 และ ซีโรไทป์ 4 เชื้อ *L. murrayi* เดิมได้ถูกรวมเข้ากับ *L. grayi* เชื้อ *L. ivanovii* แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดย่อยคือ *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* และ *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*¹ *Listeria* ถูกจัดจำแนกชนิดได้โดยอาศัยการทดสอบทางชีวเคมีได้แก่ การสร้างกรดจากดี-ไซโลส (D-xylose) แอล-รามโนส (L-rhamnose) แอลฟา-เมทิล-ดี-แมนโนไซด์ (α -methyl-D-mannoside) และ

ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ความสามารถของ *L. monocytogenes* ในการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกเป็นสิ่งที่ใช้แยกความแตกต่างของเชื้อชนิดนี้ออกจาก *Listeria* ชนิดที่ไม่ก่อโรค (ตารางที่ 7.6)⁴ เชื้อที่ให้ผลลบกับ CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen) test ไม่ว่าจะให้ผลลบกับ *S. aureus* หรือ *R. equi* จัดเป็น presumptive *L. monocytogenes* isolate แต่ไม่จำเป็นต้องเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคที่รุนแรง การกระตุ้น hemolysis ในสภาพที่มี *S. aureus* เนื่องจากการมีเอนไซม์ phosphatidylinositol-specific phospholipase C หรือ ไม่ ก็มี phosphatidyl-choline-specific phospholipase C จาก *L. monocytogenes* และเอนไซม์ sphingomyelinase จาก *S. aureus*¹

ตารางที่ 7.6 คุณลักษณะที่แตกต่างกันของ *Listeria* แต่ละชนิด

Species	Xyl	Lac	Gal	Rham	Man	Hip	CAMP test		Beta Hemolysis	Serovars
							Hyd	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	-	V	v	+	-	+	+	+	+	*
<i>L. innocua</i>	-	+	-	(+)	-	+	-	-	+	4ab, 6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	+			-	-		+	-	W	†
<i>L. welshimeri</i>	+			v	-		-	-	-	6a, 6b
<i>L. ivanovii</i>	+	+	v	-	-	+	-	+	++	5
<i>L. grayi</i>	-	+	+	-	+	-	-	-	-	

Xyl = Xylose; Lac = Lactose; Gal = Galactose; Rham = Rhamnose; Man = Mannitol; Hip Hyd = Hippurate Hydrolysis;

v = variable; w = weak; + = สายพันธุ์ส่วนใหญ่ให้ผลบวก

* 1/2a, b, c; 3a, b, c; 4a, ab, b, c, d, e, "7"

† เหมือนกับ *L. monocytogenes* และ *L. innocua*

ที่มา : Jay และคณะ¹

7.10.1 การเจริญ

ความต้องการสารอาหารของ *Listeria* เหมือนกับแบคทีเรียแกรมบวกทั่ว ๆ ไปคือเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติที่ใช้กันมากได้แก่ Brain Heart Infusion (BHI) และ Trypticase Soy Broth (TSB) ต้องการวิตามินอย่างน้อย 4 ชนิดได้แก่ไบโอติน (biotin) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ไทอะมีน (thiamine) และ ไทโอติก (thioctic acid) (กรดแอลฟา-ลิโปอิก (α -lipoic acid) เป็น growth factor ของแบคทีเรียบางชนิดและโปรโตซัว ต้องการกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) กลูตามีน (glutamine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ลิวซีน (leucine) และวาลีน (valine) น้ำตาลกลูโคสส่งเสริมการเจริญของ *Listeria* ทุก species เชื้อนี้ผลิต L(+)-lactic acid ถึงแม้ว่า *Listeria* ทุกชนิดใช้กลูโคสผ่านวิถี Embden-Meyerhof แต่ *Listeria* บางชนิดใช้สารคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ซับซ้อนอื่นๆ อีกหลายชนิด *Listeria* spp. เหมือนกับ enterococci ส่วนใหญ่ตรงที่สามารถไฮโดรไลส์เอสคิวลิน (esculin) และ

เจริญในสภาพที่มีน้ำดี (bile) ร้อยละ 10 หรือ 40 (น้ำหนักโดยปริมาตร) มีโซเดียมคลอไรด์ประมาณ ร้อยละ 10 มี thallos acetate ร้อยละ 0.025 และมีโพแทสเซียมเทลลูไรด์ร้อยละ 0.04 แต่ไม่เหมือน enterococci ตรงที่ไม่เจริญในสภาพที่มีโซเดียมแอไซด์ (sodium azide) ร้อยละ 0.02 เชื้อ *Listeria* สร้างเอนไซม์ bile-salt hydrolase ซึ่งทำให้เจริญได้ในถุงน้ำดี (gall bladder) เชื้อ *Listeria* ต่างกับ แบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นส่วนใหญ่ตรงที่ไม่สามารถเจริญบน MacConkey agar¹

โดยทั่วไป *Listeria* บางสายพันธุ์เจริญที่อุณหภูมิ 4.1-9.6°C และจะเจริญได้ในช่วง 1-45°C อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญของ *L. monocytogenes* พบว่าเท่ากับ $1.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากช่วงอุณหภูมิ 0.5-3.0°C สำหรับ pH ต่ำสุดสำหรับการเจริญขึ้นอยู่กัอุณหภูมิที่ใช้บ่ม สารอาหารสำหรับการเจริญ ค่า a_w การมีเกลือหรือสารยับยั้ง เชื้อ *L. monocytogenes* เจริญได้ที่ อุณหภูมิต่ำกว่า *Listeria* ชนิดอื่นประมาณ 0.6°C อาจเนื่องมาจากเชื้อชนิดนี้สามารถสร้างฮีโมไลซิน (hemolysin) ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญและการอยู่รอดที่อุณหภูมิต่ำ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรีย ชนิดที่สองรองจาก *Staphylococcus* ที่สามารถเจริญได้ที่ a_w ต่ำกว่า 0.93 บางสายพันธุ์อาจเจริญได้ที่ a_w ต่ำถึง 0.90 แต่จะเจริญได้ดีที่สุดที่ระดับ $a_w \geq 0.97$ เชื้อ *L. monocytogenes* เจริญได้สูงสุดใน สภาพที่มีเกลือระดับปานกลางคือร้อยละ 6.5 แต่ก็สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือสูงถึงร้อยละ 10-12 โดยจะอยู่รอดได้เป็นเวลานานในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นสูง การลดอุณหภูมิลงช่วยเพิ่มการอยู่รอดในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นสูง ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์บ่ม (cured meat products) ได้แก่ ฮอทดอก โบโลญญา และแฮมมีสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Listeria*^{1,4}

7.10.2 การแพร่กระจาย

Listeria แพร่กระจายตามธรรมชาติ สามารถพบได้ตามผักเน่า ในดิน ในอุจจาระของสัตว์ น้ำเสีย หญ้าหมัก และในน้ำ โดยทั่วไปคาดว่าจะพบ *Listeria* ในที่ที่มี *Brochothrix* แบคทีเรียกรดแลคติก และแบคทีเรีย coryneform บางชนิด เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ *Listeria* เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นมบาง ชนิดและหญ้าหมัก ในอาหารสดชนิดใดก็ตามที่มาจากสัตว์และพืชอาจมีเชื้อ *L. monocytogenes* โดยทั่วไปพบแบคทีเรียชนิดนี้ในน้ำนมดิบ เนยแข็งชนิดอ่อน (soft cheese) เนื้อสัตว์ทั้งประเภทสด และแช่แข็ง เนื้อสัตว์ปิ้ง ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ การแพร่กระจายของ *Listeria* ในนมและผลิตภัณฑ์นมได้รับความสนใจมากเนื่องจากก่อให้เกิดโรคระบาดในช่วงแรกๆ¹

7.10.3 ความรุนแรงในการก่อโรค

ในบรรดา *Listeria* ทั้งหมด มีเฉพาะ *L. monocytogenes* ที่ก่อให้เกิดโรคในคน *L. innocua*, *L. welshimeri* และ *L. seeligeri* เป็นเชื้อที่ไม่ก่อโรค ถึงแม้ว่า *L. seeligeri* จะสร้างฮีโมไลซิน (hemolysin) ก็ตาม virulence factor ที่สำคัญที่สุดของ *L. monocytogenes* คือลิสเทอรีโอไลซิน โอ

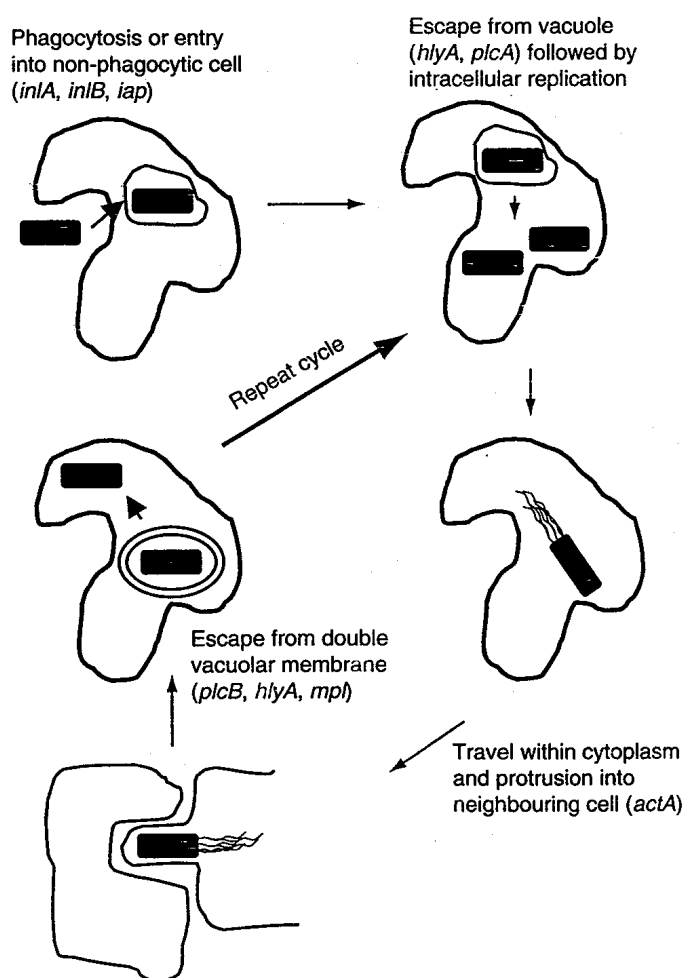
(listeriolysin O) โดยทั่วไป *L. monocytogenes* สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคจะผลิตบีต้า-ฮีโมไลซิน (beta-hemolysin) บนอาหาร blood agar และสร้างกรดจากแรมโนสแต่ไม่สร้างกรดจากไซโลส¹

เมื่อได้รับเชื้อ *L. monocytogenes* เข้าสู่ร่างกายทางปาก เชื้อจะเข้าไปเกาะและสะสมในลำไส้เล็ก แบคทีเรียชนิดนี้จะบุกรุกเข้าสู่เนื้อเยื่อรวมทั้งรกในหญิงมีครรภ์และเข้าสู่กระแสเลือด จากนั้นจะเข้าถึงเซลล์อื่นๆในร่างกาย เนื่องจากเชื้อชนิดนี้เป็นแบคทีเรียก่อโรครภายในเซลล์ ชั้นแรกจะเข้าสู่เซลล์ที่ได้รับอันตรายได้ง่ายก่อน ขั้นต่อไปจะมีการเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ ดังนั้นขั้นแรกของการทำให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิส จะมีการเข้าของเชื้อสู่เซลล์ก่อนซึ่งเกิดขึ้นหลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ *L. monocytogenes* โดยเชื่อกันว่าแบคทีเรียนี้จะบุกรุกเข้าสู่เซลล์อพิเทเลียมของลำไส้เล็ก (intestinal epithelium) จากนั้นเซลล์ของแบคทีเรียนี้จะอยู่รอดจากกลไกของระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะ (non-specific immune system defenses) ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเชื้อ *L. monocytogenes* นี้จะสามารถเพิ่มจำนวนและถูกปล่อยออกมาในอุจจาระของเจ้าของร่างกายได้และนอกจากนี้ที่จุดในทางเดินอาหารนี้แบคทีเรียนี้ยังสามารถเข้าสู่ต่อมน้ำเหลือง (lymph nodes) และเข้าสู่กระแสเลือดไปยังตับและม้าม เมื่อถึงตับและม้าม เชื้อลิสเทอริโอซิสส่วนใหญ่จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว เซลล์ที่รอดชีวิตจะเคลื่อนไปยังสมองและรุกรานทางกระแสเลือด ส่วนใหญ่การติดเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* จะเกิดอาการในบุคคลที่มีภูมิคุ้มกันอ่อน (immunocompromised persons) เช่น คนชรา หญิงมีครรภ์ และทารกแรกเกิด อย่างไรก็ตามโรคลิสเทอริโอซิสที่เกิดขึ้นจากการติดเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* เป็นหนึ่งในโรคที่ก่อให้เกิดอัตราการตายสูงสุดในบรรดาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่มีอาหารเป็นสื่อ⁵

L. monocytogenes สามารถที่จะบุกรุกเข้าสู่ phagocytic cell และ non-phagocytic cell อยู่รอดและเพิ่มจำนวนภายในเซลล์ ใน phagocytic cell แบคทีเรียนี้อยู่ภายในแวคคิวโอลที่มีเยื่อหุ้ม (membrane-bound vacuole) ดังรูปที่ 7.3 ได้มีผู้คาดคะเนว่าประมาณร้อยละ 10-15 ของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สามารถหลบหนีออกจากแวคคิวโอลภายในเวลาประมาณ 30 นาทีผ่านการกระทำของโปรตีนฮีโมไลซิน (hemolysin protein) ที่เรียกว่าลิสเทอริโอไลซิน โอ ส่วนใน non-phagocytic cell แบคทีเรีย *L. monocytogenes* เข้าสู่เซลล์จากการกระทำของ internalin protein จำนวน 2 ชนิดคือ In1A และ In1B ซึ่งถูกกำกับโดยยีน inlA และยีน inlB โปรตีน Inl A ช่วยในการนำเชื้อเข้าสู่เซลล์อพิเทเลียม ขณะที่ InlB เกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์หลายชนิดเช่น hepatocyte และ fibroblast⁵

เมื่อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ออกจากแวคคิวโอลแล้วก็จะเข้าสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ของเจ้าของร่างกายที่ซึ่งแบคทีเรียนี้จะเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน เมื่ออยู่ในไซโทพลาสซึมแบคทีเรียนี้จะถูกล้อมรอบด้วยโปรตีนแอกตินของเซลล์เจ้าของร่างกาย (polymerized host cell actin) เซลล์ของลิสเทอริโอซิสมีความสามารถที่จะใช้โมเลกุลแอกตินของเจ้าของร่างกายในการขับเคลื่อนเซลล์ของเชื้อ

แบคทีเรีย *Listeria* เองข้ามผ่านเซลล์ของเจ้าของร่างกาย โปรตีนแอกตินและโปรตีนไมโอซิน (myosin) เป็นองค์ประกอบสำคัญในกลไกเนื้อของมนุษย์ ยีน *actA* ในลิสทีเรียกำกับโปรตีน ActA ซึ่งถูกสร้างขึ้นที่ปลายด้านหนึ่งของเซลล์แบคทีเรีย โปรตีน ActA ทำให้แอกตินช่วยเคลื่อนตัวเซลล์แบคทีเรียไปด้านหน้า แรงที่สร้างโดยแอกตินช่วยผลักเซลล์ของลิสทีเรียข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ติดเชื้อของเจ้าของร่างกายไปยังเซลล์ถัดไป ยีนตัวสุดท้ายที่จำเป็นต่อการทำให้เกิดโรคคือ ยีน *plcB* ยีนนี้กำกับเอนไซม์ที่ไฮโดรไลสเยื่อหุ้ม (membrane-hydrolyzing enzyme) ซึ่งช่วยให้ลิสเทอริโอไลซิน โอ ปล่อยแบคทีเรีย *Listeria* เข้าไปในไซโทพลาสซึมของเซลล์เจ้าของร่างกายที่อยู่ติดกัน⁴



รูปที่ 7.3 ขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับวงจรชีวิตภายในเซลล์และการกระจายแพร่ของ *L. monocytogenes* จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง ซึ่งชี้ให้เห็นถึงยีนที่เกี่ยวข้องในแต่ละขั้นตอน
ที่มา: Pagotta และคณะ⁵

7.10.4 อาการของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes เป็นสาเหตุของโรคลิสเทอริโอซิสในคนกลุ่มที่มีความเสี่ยงสูงเช่น หญิงมีครรภ์ เด็กแรกเกิดและบุคคลที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอ บางครั้งก่อโรคในคนที่มีสุขภาพแข็งแรง ในคนที่ไม่ได้ตั้งครรรภ์เชื้อชนิดนี้ทำให้เกิดอาการตั้งแต่อาการอาเจียน คล้ายไข้หวัดและท้องเสียไปจนถึงภาวะติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) เยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) และ ภาวะที่มีการอักเสบของทั้งสมองและเยื่อหุ้มสมอง (meningoencephalitis) มีอัตราการตายร้อยละ 20-25 สภาวะของกลุ่มคนที่เกิดโรคลิสเทอริโอซิสถ้าหากติดเชื้อนี้ได้แก่ ผู้ที่เป็นโรคร้าย ผู้ที่ผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ คนที่ติดเชื้อไวรัสจากระบบภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้สูงอายุ หญิงตั้งครรรภ์ที่ติดเชื้อซึ่งตั้งครรรภ์ในช่วงไตรมาสที่ 3 (เดือนที่ 7-9) อาจมีอาการคล้ายโรคหวัด เชื้ออาจเข้าสู่รกทำให้เกิดการแท้งหรือคลอดออกมาหลังจากตั้งครรรภ์ไม่ต่ำกว่า 28 สัปดาห์แล้วไม่แสดงอาการของการมีชีวิตได้ ถึงแม้ว่าการติดเชื้อในผู้ป่วยบางรายจะเกี่ยวข้องกับการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ แต่ที่มาของการติดเชื้อในผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่อาจทราบได้และการติดเชื้อในผู้ป่วยหลายรายบางครั้งไม่เกี่ยวข้องกับอาหาร ระยะเวลาตั้งแต่ได้รับเชื้อจนกระทั่งเกิดอาการอาจยาวนานถึง 5 สัปดาห์ทำให้ยากที่จะได้ข้อมูลในด้านประวัติการรับประทานอาหารและยากที่จะตรวจสอบอาหารที่สงสัย⁴ Infective dose ของเชื้อนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าต้องได้รับเซลล์เข้าไปปริมาณเท่าใดจึงจะเกิดโรค แต่จำนวน *L. monocytogenes* ที่พบในอาหารที่เป็นสาเหตุของโรคระบาดบ่อยครั้งมากกว่า 100 CFU ต่อกรัม ส่วนระยะเวลาที่ได้รับเชื้อจนกระทั่งเกิดอาการของโรคลิสเทอริโอซิสขึ้นกับบุคคลแต่ละคนว่าได้รับอันตรายได้ง่ายเพียงใดและขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียที่กินเข้าไป แต่มีรายงานว่าอยู่ในช่วง 1-91 วัน ไม่เป็นที่ทราบว่าทำไมช่วงเวลาจึงกว้างนัก แต่น่าจะเกี่ยวข้องกับจำนวนเชื้อที่ได้รับและระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายผู้ที่ติดเชื้อ การที่มีระยะฟักตัวยาวนานมากทำให้ยากที่จะหาแหล่งที่มาของการติดเชื้อ⁶

7.11 โรคที่มีสาเหตุมาจาก *Salmonella* (Salmonellosis)

แบคทีเรียในสกุล *Salmonella* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนชนิดที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหาร เชื้อชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ พบทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในคนและสัตว์เป็นแหล่งของเชื้อชนิดนี้ที่สำคัญเป็นอันดับแรก โรคอาหารเป็นพิษจาก *Salmonella* เป็นผลมาจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อชนิดนี้ในปริมาณพอเหมาะ โดยทั่วไปการแพร่กระจายของเชื้อปกติแพร่จากสัตว์มาสู่คนจากการรับประทานอาหารที่ผลิตจากสัตว์^{1, 5}

ในปัจจุบันการเรียกชื่อแบคทีเรียในสกุล *Salmonella* ได้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมซึ่งได้เรียกชื่อ *Salmonella* ที่พบมากกว่า 2,400 ซีโรวาร์ เหมือนกับเป็นสปีชีส์ (ชนิด) ซึ่งจริงๆ แล้วเชื้อ *Salmonella* มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นคือ *S. enterica* และ *S. bongori* เชื้อ *S. enterica* แบ่งได้เป็นอีก 5 ชนิดย่อย

(subspecies) หรือ group ได้แก่ *S. enterica* subsp. *salamae* (Group II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (Group IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (Group IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (Group IV) และ *S. enterica* subsp. *indica* (Group VI) ซึ่งเชื้อ *Salmonella* ในอดีตที่เคยจัดเป็น Group V ได้ถูกยกระดับเป็นสปีชีส์ คือ *S. bongori* การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาศัยคุณลักษณะของผลจากการทำ DNA-DNA hybridization และ multilocus enzyme electrophoresis ดังนั้นเมื่อได้มีการนำระบบจำแนกชนิดระบบใหม่เข้ามาใช้ การเขียนชื่อซีโรวาร์ของเชื้อ *Salmonella* เหมือนกับเป็นชื่อสปีชีส์จึงไม่ถูกต้องอีกต่อไป ตัวอย่างการเขียนชื่อแบบเดิม เช่น *S. typhimurium* ที่ใช้กันมานานนั้นไม่ถูกต้อง ควรเขียนดังนี้คือ *S. enterica* serovars Typhimurium หรือ *Salmonella* Typhimurium (สังเกตว่า Typhimurium ไม่เขียนตัวเอน) โดยทั่วไป เชื้อ *Salmonella* แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มได้แก่¹

ก) *Salmonella* ที่ติดเชื้อเฉพาะในคน ได้แก่ *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* และ *S. Paratyphi C* แบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) และไข้พาราไทฟอยด์ (paratyphoid fever) ซึ่งเป็นโรคที่รุนแรงที่สุดที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Salmonella* โรคไข้ไทฟอยด์เป็นโรคที่มีระยะฟักตัว (incubation time) ยาวนานที่สุด ทำให้ร่างกายมีอุณหภูมิสูงสุดและทำให้มีอัตราการตายสูงสุด *S. Typhi* อาจแยกได้จากเลือด อุจจาระ ปัสสาวะของผู้ป่วยก่อนมีอาการของ enteric fever นี้ สำหรับไข้พาราไทฟอยด์มีอาการไม่รุนแรงเท่าไข้ไทฟอยด์¹

ข) *Salmonella* ซีโรวาร์ที่ปรับตัวอยู่ได้ในสิ่งมีชีวิตเฉพาะบางชนิด (host-adapted serovars) แบคทีเรีย *Salmonella* บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในคน ตัวอย่างของ *Salmonella* กลุ่มนี้ได้แก่ *S. Gallinarum* ในสัตว์ปีก *S. Dublin* ในโค กระบือ *S. Abortus-equi* ในม้า *S. Abortus-ovis* ในแกะ และ *S. Choleraesuis* ในหมู¹

ค) *Salmonella* ซีโรวาร์ที่ไม่เจาะจงอยู่ในสัตว์ชนิดใด (unadapted serovars) ทำให้เกิดโรคในคนและสัตว์ ส่วนใหญ่ปนเปื้อนมากับอาหาร¹

7.11.1 การทดสอบทางซีโรวิทยา

การทดสอบทางซีโรวิทยา (serotyping หรือ serological test) เป็นการทดสอบใช้กันมากกับแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม enteric ที่ก่อโรคเช่น *Salmonella* และ *Escherichia* ส่วนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก การทดสอบทางซีโรวิทยามีความสำคัญในการจำแนกชนิดของ *Listeria* การทดสอบนี้เป็นการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะ (specific antibodies หรือ antiserum) ในการจำแนกชนิดของ homologous antigens โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกาะกลุ่ม (agglutination reaction) การจำแนกชนิดของ *Salmonella* ทางซีโรวิทยา เริ่มขึ้นโดย Kauffmann ช่วงต้นปีแรกๆ ในระหว่างปี ค. ศ. 1940-1949 เขาได้ให้คำจำกัดความและให้หมายเลข O groups จำนวน 20 กลุ่ม (group) แรกซึ่งทำให้ทราบว่ามี

3 antigenic sites คือ somatic (O) antigen, capsular (K) antigen และ flagellar (H) antigen โยแอนติเจนประกอบด้วย O polysaccharide side chains ที่ผิวของเยื่อหุ้มชั้นนอกของแบคทีเรีย (รูปที่ 7.4) ซึ่งในแบคทีเรียแต่ละชนิดมีโครงสร้างและองค์ประกอบของน้ำตาลที่เชื่อมต่อกัน (O group sugar) แตกต่างกันทำให้เกิดความจำเพาะของแอนติเจน การเกิดการผ่าเหล่า (mutation) มีผลต่อน้ำตาลและการต่อของน้ำตาลในเยื่อหุ้มชั้นนอก ทำให้เกิดแอนติเจนใหม่ โยแอนติเจนทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ น้ำเดือด ส่วนเคแอนติเจนและเฮซแอนติเจนไม่ทนความร้อน (heat labile) ปัจจุบันพบ *Salmonella* มากกว่า 2400 ซีโรวาร์และพบเชื้อ *E. coli* มากกว่า 200 ซีโรวาร์ สำหรับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบอยู่ในแฟลกเจลลามีความต่างกันอย่างน้อยกว่าสายคาร์โบไฮเดรตในเยื่อหุ้มชั้นนอก ดังนั้น H antigenic type จึงมีน้อยกว่า O antigenic type¹

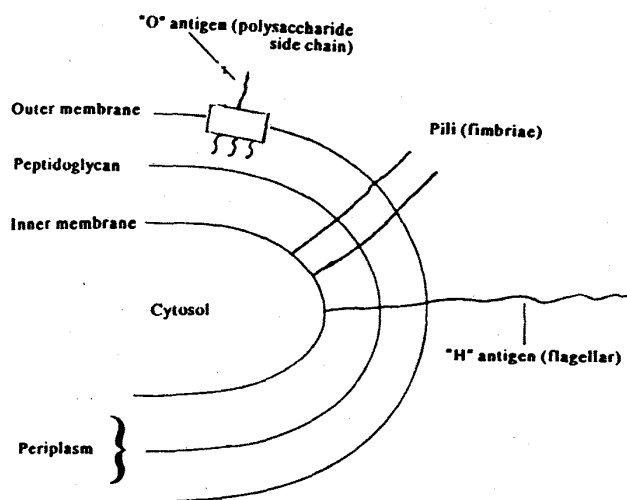
เมื่อทำการทดสอบทางซีโรวิทยา กับ *Salmonella* จะจัดสปีชีส์และซีโรวาร์ให้อยู่กลุ่ม (Group) ต่างๆ โดยให้สัญลักษณ์ของกลุ่มเป็น A, B, C, ... ตามความเหมือนกันของโอยแอนติเจน 1 โอยแอนติเจน หรือมากกว่า 1 โอยแอนติเจนเช่น เชื้อ *S. Hirschfeldii*, *S. Choleraesuis*, *S. Oranienburg* และ *S. Montevideo* จัดอยู่ในกลุ่ม C₁ เนื่องจากแบคทีเรียทั้งหมดนี้มีโอยแอนติเจน 6 และ 7 เหมือนกัน ส่วนเชื้อ *S. Newport* ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม C₂ เนื่องจากมีโอยแอนติเจน 6 และ 8 (ตารางที่ 7.7) ในการจัดจำแนกชั้นต่อไปจะให้แฟลกเจลลาแอนติเจนหรือเฮซแอนติเจน ซึ่งเฮซแอนติเจนมี 2 ชนิดด้วยกันคือ 1) specific phase (phase 1) เขียนแทนด้วยอักษรตัวพิมพ์เล็ก และ 2) group phase (phase 2) เขียนแทนด้วยตัวเลข arabic ซึ่งค่อนข้างผันแปร *Salmonella* บางชนิดหรือบางสายพันธุ์เท่านั้นที่มี phase 1 เหมือนกัน ส่วน phase 2 ค่อนข้างแพร่กระจายในหลายๆ ชนิดมากกว่า¹

สำหรับการตั้งชื่อซีโรวาร์ (serovar) อาจตั้งตามชื่อตกลองนานาชาติหรือตั้งตามสถานที่แรกที่แยกเชื้อได้เช่น *S. London*, *S. Miami*, *S. Richmond* และอื่นๆ ก่อนที่จะมีการใช้ระบบนี้ ได้มีการตั้งชื่อซีโรวาร์ในหลาย ๆ รูปแบบ เช่นตั้งชื่อ *S. Typhimurium* เพราะเป็นสาเหตุของไข้ไทฟอยด์ (typhoid fever) ในหนู¹

7.11.2 การแพร่กระจายของ *Salmonella*

แหล่งที่อยู่อาศัยของ *Salmonella* คือทางเดินอาหารของสัตว์เช่น นก สัตว์เลี้ยงคณาน สัตว์เลี้ยงในฟาร์ม คนและแมลง ถึงแม้ว่า แหล่งที่อยู่อาศัยแรกจะมาจากทางเดินอาหาร แต่บางครั้งอาจพบได้ตามส่วนอื่นของร่างกาย เนื่องจากเชื้ออยู่ในทางเดินอาหารจึงถูกปล่อยออกมาในอุจจาระและอาจถูกแพร่กระจายโดยแมลงและสัตว์ชนิดอื่น เมื่อแมลงหรือสัตว์อื่นสัมผัสน้ำและอาหาร น้ำและอาหารก็อาจถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อนี้ คนและสัตว์รับประทานอาหารและดื่มน้ำที่ปนเปื้อนเข้าไป เชื้อก็จะถูกปล่อยออกมาอีกทางอุจจาระดังนี้เป็นวัฏจักร เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของวัฏจักรการปนเปื้อน ในที่สุดเมื่ออาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์ถูกส่งออกไปจำหน่ายยังประเทศต่างๆ จึงทำให้เกิดปัญหาการแพร่ระบาด

ของโรคจากที่มีสาเหตุมาจาก *Salmonella* (salmonellosis) การติดเชื้อ *Salmonella* ในประชากรของสัตว์ที่มีโอกาสรับเชื้อได้ง่ายพบว่าบางส่วนมาจากการติดเชื้อจากสัตว์ด้วยกันเองโดยเฉพาะสัตว์ที่เป็นพาหะ (carrier) ซึ่งมีการปล่อยเชื้อ *Salmonella* ออกมาหลายๆ ครั้งทางอุจจาระโดยไม่แสดงอาการ¹



รูปที่ 7.4 ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบแสดงตำแหน่งของโอแอนติเจนและเอชแอนติเจน
ที่มา: Jay และคณะ¹

ตารางที่ 7.7 โครงสร้างแอนติเจนิก (antigenic structure) ของ *Salmonella* บางชนิด

กลุ่ม	ซีโรวาร์ (ซีโรไทป์)	โอแอนติเจน	เอชแอนติเจน	
			เฟส 1	เฟส 2
A	<i>S. Paratyphi A</i>	1, 2, 12	A	(1, 5)*
B	<i>S. Schottmuelleri</i>	1, 4, (5), 12	B	1, 2
	<i>S. Typhimurium</i>	1, 4, (5), 12	I	1, 2
C ₁	<i>S. Hirschfeldii</i>	6, 7, (vi)	C	1, 5
	<i>S. Choleraesuis</i>	6, 7	(c)	1, 5
	<i>S. Oranienburg</i>	6, 7	m, t	-
	<i>S. Montevideo</i>	6, 7	g, m, s (p)	(1, 2, 7)
C ₂	<i>S. Newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
D	<i>S. Typhi</i>	9, 12, (Vi)	D	-
	<i>S. Enteritidis</i>	1, 9, 12	g, m	(1, 7)
	<i>S. Gallinarum</i>	1, 9, 12	-	-
E ₁	<i>S. Anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6

*() = อาจมีหรือไม่มี; ที่มา: Jay และคณะ¹

7.11.3 อาการของโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Salmonella* (Salmonella Food-Poisoning Syndrome)

โรคอาหารเป็นพิษอาจเกิดขึ้นได้ถ้ารับประทานอาหารที่ปนเปื้อน *Salmonella* ชนิดที่ไม่จำเพาะจงอยู่ในสัตว์ชนิดใดลงไปจำนวนหนึ่ง ระยะเวลาตั้งแต่รับประทานอาหารที่ปนเปื้อนจนกระทั่งเกิดอาการมักอยู่ในช่วง 12-14 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง (ไม่รุนแรงเท่าอาการจาก *Staphylococcus*) อาจมีอาการอ่อนเพลีย มึนงง มีไข้ ปานกลางร่วมด้วย มักมีอาการประมาณ 2-3 วัน อัตราการตายเฉลี่ยร้อยละ 4.1 ในบรรดาสปีชีส์ต่างๆ กันของ *Salmonella* มีรายงานว่า *S. Choleraesuis* ทำให้มีอัตราการตายสูงสุดคือร้อยละ 21 ถึงแม้ว่า *Salmonella* จะหายไปอย่างรวดเร็วจากทางเดินอาหาร แต่ก็พบว่าประมาณร้อยละ 5 ของผู้ป่วยจะกลายเป็นพาหะของโรคนี้หลังจากหายป่วย¹

การเกิดโรคจาก *Salmonella* จำเป็นต้องได้รับเชื้อเข้าไปปริมาณมากถึง 10^7 - 10^9 เซลล์ต่อกรัมของอาหาร อย่างไรก็ตามมีรายงานจำนวนเซลล์ของ *Salmonella* เพียงไม่มากก็ทำให้เกิดโรคระบาดได้เช่น *S. Eastbourne* ในซ็อกโกแลต 100 เซลล์ต่อ 100 กรัมของซ็อกโกแลต โดยทั่วไปปริมาณต่ำสุดของ *Salmonella* ที่จะทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารอยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 เซลล์ต่อกรัมสำหรับ *S. Bareilly* และ 10^9 - 10^{10} เซลล์ต่อกรัมสำหรับ *S. Pullorum*¹

7.11.4 อาหารที่เป็นพาหะ

อาหารที่เคยเป็นพาหะทำให้เกิดโรคระบาดจากเชื้อ *Salmonella* ในสหรัฐอเมริกาได้แก่ ไอศกรีมที่ทำจากนม (*Salmonella* ที่ปนเปื้อนคือ เชื้อ *S. Enteritidis*) นมพร้อมดื่ม (*Salmonella* ที่ปนเปื้อนคือ *S. Typhimurium*) สลัดมันฝรั่ง (*Salmonella* ที่เป็นสาเหตุคือ *S. Newport*) ซีโรวาร์ที่เคยแยกได้บ่อยที่สุดตั้งแต่ปี ค. ศ. 1975 คือ *S. Typhimurium* ซีโรวาร์ที่เคยแยกได้บ่อยเป็นอันดับสองคือ *S. Enteritidis* เชื้อนี้เกี่ยวข้องกับการรับประทานไข่ดิบหรือไข่ที่ให้สุกเพียงบางส่วน นอกจากนี้เชื้อ *S. Enteritidis* ยังแยกได้บ่อยที่สุดในประเทศสเปนและอังกฤษ หน่วยงานควบคุมและป้องกันโรคของสหรัฐอเมริกา (CDCP) ได้ให้คำแนะนำว่า 1) ควรหลีกเลี่ยงการรับประทานไข่ดิบหรือไข่ที่ให้สุกเพียงบางส่วนโดยเฉพาะเด็ก คนชราและคนที่ภูมิคุ้มกันบกพร่อง 2) เมื่อไม่สามารถใช้วิธีการที่เหมาะสมในการทำให้ไข่สุกได้ก็ควรใช้ไข่ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ 3) ควรให้ความร้อนกับไข่ที่อุณหภูมิ $\geq 145^{\circ}\text{C}$ (63°C) เป็นเวลา 15 วินาทีหรือจนกระทั่งไข่แดงและไข่ขาวแข็งคงตัว จากนั้นจึงรับประทานทันที 4) อาหารที่มีไข่ดิบเป็นส่วนผสมควรให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 160°C (71°C) และ 5) ควรเก็บไข่ดิบไว้ที่อุณหภูมิ $\leq 45^{\circ}\text{C}$ (7.2°C) ตลอดเวลา¹

7.11.5 การเจริญและการทำลายเชื้อ *Salmonella*

Salmonella เหมือนกับแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นคือ เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สร้างโคโลนีให้เห็นได้ภายใน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C หมักกลูโคส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอื่นๆได้โดยทำให้เกิดแก๊ส ปกติไม่สามารถหมักแลคโตส ซูโครสและซาลิซินแต่บางซีโรวาร์อาจหมักแลคโตสได้ และโดยส่วนใหญ่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนแต่ในกรณีของเชื้อ *S. Typhimurium* จะใช้ไนเตรต ไนไตรต์และแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน¹

pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ประมาณ pH เป็นกลาง ช่วง pH 6.6-8.2 เจริญได้ดีที่สุด ถูกทำลายได้ที่ pH ต่ำกว่า 4.0 และสูงกว่า 9.0 ระดับ pH ต่ำสุดที่เจริญได้อยู่ที่ 4.05 ในสภาพที่มีกรดไฮโดรคลอริกและกรดซิตริก (ตารางที่ 7.8) อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญตามที่มีรายงานคือ 5.3°C สำหรับ *S. Heidelberg* และ 6.2°C สำหรับ *S. Typhimurium* อุณหภูมิสูงที่สุดสำหรับการเจริญตามที่มีรายงานคือ 45°C และการเจริญจะถูกยับยั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า a_w ต่ำกว่า 0.94 ในสภาพที่มี pH เป็นกลาง เชื้อ *Salmonella* เจริญได้ในสภาพ $a_w \geq 0.93$ ไม่ทนเกลือความเข้มข้นสูงโดยทั่วไปในสภาพที่มีเกลือความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 3 น้ำหนักโดยปริมาตรจะยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* เชื้อชนิดนี้ถูกทำลายในน้ำเกลือเข้มข้นร้อยละ 9 ไนไตรต์มีประสิทธิภาพยับยั้ง *Salmonella* ได้โดยเฉพาะที่ pH ต่ำประสิทธิภาพจะดีขึ้น *S. Thompson* และ *S. Typhimurium* ทนต่อการทำลายด้วยกรดได้ดีกว่า *S. Senftenberg* ส่วนใหญ่ *Salmonella* ไม่ทนความร้อน ถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิของการพาสเจอร์ไรส์นม *S. Senftenberg* ทนความร้อนได้ดีกว่า *Salmonella* ซีโรไทป์อื่น อาหารบางชนิดถูกเก็บรักษาไว้ในสภาพปรับบรรยากาศ(modified atmosphere packaging, MAP) ซึ่งมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจนและออกซิเจนซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสีย การใช้คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 50 ปริมาตรโดยปริมาตรที่ปกติใช้กันในการปรับบรรยากาศสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ได้^{1, 6}

7.11.6 การอยู่รอดของ *Salmonella*

การที่เชื้อ *Salmonella* สามารถอยู่รอดได้เป็นเวลานานในสภาพที่ไม่เหมาะสมมีความสำคัญต่อความปลอดภัยด้านอาหาร การได้รับเชื้อนี้เพียงไม่กี่เซลล์ก็สามารถทำให้เกิดโรคได้ซึ่งต่างกับเชื้ออื่นที่ต้องได้รับเชื้อปริมาณมากจึงจะก่อให้เกิดโรค การที่เชื้อจะอยู่รอดในสภาพแช่แข็งได้นานเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร โดยปกติการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C หรือต่ำกว่าทำให้ *Salmonella* อยู่รอดได้ดีกว่าการเก็บใกล้อุณหภูมิของการแข็งตัวของน้ำแข็ง *Salmonella* มีกลไกการตอบสนองต่อสภาพที่เป็นกรดเช่น ในอาหารหมัก ถึงแม้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นกรดจะช่วยเพิ่มการตายของแบคทีเรีย แต่สำหรับเชื้อ *Salmonella* การทำให้เป็นกรดอย่างช้าๆ ช่วยส่งเสริมการทนต่อกรดและการอยู่รอด เชื้อ *Salmonella* มีกลไกการตอบสนองต่อการทนกรด (acid

tolerance response, ATR) ซึ่งช่วยป้องกันเซลล์จากสภาพที่มีกรดสูงโดยการชักนำการสังเคราะห์ acid-shock proteins การให้เชื้อ *Salmonella* ในระยะ log เติบโตกับสภาพที่มีพีเอช 4.3 ภายในช่วงเวลาสั้นๆ จะทำให้เชื้อนี้อยู่รอดได้ดีในสภาพที่มีกรดสูงที่จะทำให้เซลล์ตายเช่น ในสภาพที่มีพีเอช 3.0 นอกจากนี้พบว่าถ้าให้ *Salmonella* เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติเล็กน้อยเช่น 37-43°C เชื้อนี้จะทนกรดได้ดีกว่าการที่ให้เซลล์ที่เจริญที่อุณหภูมิห้อง⁶

ตารางที่ 7.8 ค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อ *Salmonella* จะเจริญได้ภายใต้สภาวะเหมาะสมที่มีกรดชนิดต่างๆ

ชนิดของกรด	ค่าพีเอชต่ำสุดที่ <i>Salmonella</i> จะเจริญได้
กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)	4.05
กรดซิตริก (citric acid)	4.05
กรดทาร์ทาริก (tartaric acid)	4.10
กรดกลูโคนิก (gluconic acid)	4.20
กรดฟูมาลิก (fumaric acid)	4.30
กรดมาลิก (malic acid)	4.30
กรดแลคติก (lactic acid)	4.40
กรดซัคซินิก (succinic acid)	4.60
กรดกลูทาริก (glutaric acid)	4.70
กรดแอดิพิก (adipic acid)	5.10
กรดพิมลิก (pimelic acid)	5.10
กรดแอซีติก (acetic acid)	5.40
กรดโพรพิโอนิก (propionic acid)	5.50

ที่มา: Jay และคณะ¹

7.12 โรคที่มีสาเหตุมาจาก *Shigella* (Shigellosis)

แบคทีเรีย *Shigella* อยู่ในแฟมิลี Enterobacteriaceae เช่นเดียวกับเชื้อ *Salmonella* และ *Escherichia* เชื้อ *Shigella* มีเพียง 4 สปีชีส์ ชนิดที่รู้จักกันดีคือ *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* และ *S. sonnei* สำหรับ *S. dysenteriae* เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคบิด (classic bacillary dysentery) ในคนอ่อนแอเชื้อเพียง 10 CFU ก็ทำให้เกิดโรคได้¹

เชื้อ *Shigella* อีก 3 สปีชีส์ที่เกี่ยวข้องกับโรคในระบบทางเดินอาหารสามารถแบ่งได้ตาม serologic group โดยอาศัยโอแอนติเจนได้ดังนี้คือ *S. flexneri* group B, *S. boydii* group C และ *S.*

sonnei group D เชื้อทั้งหมดนี้ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส สร้างกรดจากน้ำตาล ไม่เจริญ ถ้าหากมีซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งเดียว ไม่เจริญบน KCN agar ไม่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ โดยทั่วไปถ้าเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นได้ไม่มากเท่า *Escherichia*¹

Shigella ต้องการสภาพในการเจริญเหมือนกับ enteric bacteria ชนิดอื่น ๆ มีรายงานว่าเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 10°C และสูงถึง 48°C เชื้อ *S. sonnei* เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า *Shigella* อีก 3 สปีชีส์ มีรายงานว่าเจริญได้ที่ pH 5.0 เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 6-8 สำหรับ *S. flexneri* มีรายงานว่าไม่เจริญใน BHI broth ที่มี pH 5.5 อุณหภูมิ 19°C ทนความร้อนได้ระดับเดียวกับ *E. coli*¹

ปัจจัยที่นำไปสู่การติดเชื้อที่พบบ่อยคือการมีสุขลักษณะส่วนบุคคลไม่ดี อาหารที่มักพบว่าเป็นพาหนะของเชื้อนี้คือ สัตว์น้ำที่มีเปลือกแข็ง ผัก ผลไม้ ไข่ และสลัด โดยการแพร่กระจายจากสิ่งขับถ่ายไปสู่ปาก *Shigella* ทนสภาพเค็มในสิ่งแวดล้อมได้ดีเท่ากับ *Salmonella* และ *Escherichia*¹

7.13 โรคอาหารเป็นพิษ (Foodborne Gastroenteritis) ที่มีสาเหตุมาจาก *Escherichia coli*

Escherichia coli ถูกแยกได้และอธิบายโดย Escherich ในปี ค.ศ. 1895 และเป็นที่ยอมรับกันว่าจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นส่วนหนึ่งของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่นรวมทั้งคน⁹ และถูกพิจารณาว่าเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอาหารเป็นสื่อตั้งแต่ปี ค.ศ. 1971 เมื่อมีการนำเข้าเนยแข็งมายังสหรัฐอเมริกา 14 รัฐ เนยแข็งนี้ปนเปื้อนด้วย *E. coli* สายพันธุ์ enteroinvasive ทำให้มีผู้ป่วยประมาณ 400 คน ก่อนปี ค.ศ. 1971 ก็ได้มีโรคระบาดจากเชื้อ *E. coli* อย่างน้อย 5 ครั้งในประเทศอื่น เริ่มแรกที่สุดในประเทศอังกฤษเมื่อปี ค.ศ. 1947 ในช่วงต้น ค.ศ. 1700 พบว่า *E. coli* เป็นสาเหตุของโรคท้องเสียในเด็กทารก¹

7.13.1 ลักษณะทั่วไปของ *Escherichia coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae แบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน มีขนาด 1.1-1.5 × 2.0-6.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นคู่หรืออยู่เดี่ยวๆ อาจเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์หรือบางชนิดอาจไม่เคลื่อนที่เพราะไม่มีแฟลกเจลลา อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือที่ 37°C แบคทีเรีย *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ซึ่งมีทั้งเมแทบอลิซึมของการหมักและการหายใจ⁹

สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *E. coli* แสดงในตารางที่ 7.9 ประมาณร้อยละ 99 ของสายพันธุ์ทั้งหมดของ *E. coli* มีรูปแบบของปฏิกิริยา IMViC (indole, methyl red, Voges-Proskauer และ citrate เป็น +++ (biotype 1) ส่วนที่เหลือมีรูปแบบของปฏิกิริยาเป็น -+- (biotype 2)

7.13.2 การจำแนกชนิดด้วยวิธีทางซีโรวิทยา

สายพันธุ์ของ *Escherichia* ที่ก่อโรค สามารถจำแนกได้ด้วยวิธีทางซีโรวิทยาเช่นเดียวกับเชื้อ enterobacteria ชนิดอื่น สำหรับเชื้อ *E. coli* จนถึงปัจจุบันได้พบถึงมากกว่า 200 โอซีโรไทป์ (O serotype) เนื่องจากแฟลกเจลลาโปรตีนมีความแตกต่างกันน้อยกว่า carbohydrate side chains ที่ทำให้เกิดเป็น O groups จึงทำให้มี H antigenic type น้อยกว่ามาก (ประมาณ 30) ¹

7.13.3 กลุ่มที่มีความรุนแรง

เมื่อพิจารณาคุณลักษณะการก่อโรค serological groupings สามารถแบ่ง *E. coli* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคได้เป็น 5 กลุ่ม คือ 1) enteroaggregative (EAggEC) 2) enterohemorrhagic (EHEC) 3) enteroinvasive (EIEC) 4) enteropathogenic (EPEC) และ 5) enterotoxigenic (ETEC) ¹

ตารางที่ 7.9 คุณลักษณะทางชีวเคมีของ *Escherichia coli*

คุณลักษณะทางชีวเคมี	ผลการทดสอบ
Indole reaction	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer (การผลิต acetoin จากกลูโคส)	-
การใช้ซิเตรท (citrate utilization)	-
การทำให้เจลาตินเหลวที่อุณหภูมิ 22°C	-
การผลิตกรดและแก๊สจากกลูโคส	+
การผลิตกรดและแก๊สจากแลคโตส ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ดี-ซอร์บิทอล (D- sorbitol) แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) มอลโตส ดี-ไซโลส (D-xylose) ทรีฮาโลส (trehalose) และดี-แมนโนส (D-mannose)	+
การผลิตกรดและแก๊สจากแอล-แรมโนส (L- rhamnose) และเมลลิไบโอส (melibiose)	[+]
การผลิตกรดและแก๊สจากซูโครส ดัลซิทอล (dulcitol) ซาลิซิน (salicin) และราฟฟิโนส	D
การผลิตกรดและแก๊สจากดี-อะโดนิทอล (D-adonitol) ไมโอ-อินซิทอล (myo-inositol) เซลโลไบโอส (cellobiose) แอลฟา-เมทิล-ดี-กลูโคไซด์ (α-methyl-D-glucoside) ดี-อะราบิทอล (D-arabitol)	-
การรีดิวซ์ไนเตรตเป็นไนไตรต์	+
ONPG hydrolysis	+
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	-
การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	+

ที่มา: Fratamico และคณะ⁹

7.13.3.1 Enteroaggregative *E. coli* (EAggEC)

E. coli สายพันธุ์นี้มีพลาสมิดขนาด 60 MDa ซึ่งจำเป็นต่อการสร้าง fimbriae ที่มีผลต่อ aggregative expression เชื้อกลุ่มนี้บางสายพันธุ์สร้างเอนเทอโรทอกซินที่ทนความร้อน (heat-stable enterotoxin) โดย enterotoxin /cytotoxin ที่สร้างขึ้นมีขนาด 108 kDa อยู่บน virulence plasmid ขนาดใหญ่ ทำให้เกิดอาการท้องเสียยาวนานมากกว่า 14 วัน โดยเฉพาะในเด็กและยังไม่มีเป็นที่ทราบแน่ชัดว่า สายพันธุ์เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่มากับอาหารหรือไม่¹

7.13.3.2 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)

สายพันธุ์นี้มีทั้งคล้ายและไม่คล้ายสายพันธุ์ EPEC คล้าย EPEC ตรงที่มียีน *eaeA* แต่ที่ต่างจาก EPEC คือ สายพันธุ์ EHEC มีผลต่อเฉพาะลำไส้ใหญ่เท่านั้น จะสร้างสารพิษที่เหมือนกับสารพิษที่สร้างโดยเชื้อ *Shigella* (Shiga-like toxin) และสร้าง 60-MDa plasmid ที่กำกับ fimbriae เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเซลล์¹

เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์นี้สร้างสารพิษที่คล้ายกับสารพิษที่ *Shigella dysenteriae* สร้างขึ้นซึ่งเรียกว่า Shiga toxin (ตั้งชื่อตามผู้ที่แยกเชื้อและศึกษาเชื้อนี้เป็นครั้งแรกคือ K. Shiga) ดังนั้นสารพิษที่ *E. coli* สายพันธุ์ EHEC สร้างขึ้นจึงเรียกว่า Shiga-like toxins (หรือ verotoxin หรือ verocytotoxin) ตัวอย่างเชื้อก่อโรคที่เป็นอันตรายมากในกลุ่มนี้คือ *E. coli* O157:H7 สัญลักษณ์ O คือโอแอนติเจน (O antigen) ที่อยู่ที่ส่วนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เยื่อหุ้มชั้นนอกรอบๆ ผนังเซลล์ และ H หมายถึง แฟลกเจลลาแอนติเจน (flagella antigen) ถ้าเชื้อสายพันธุ์ *E. coli* O157:NM (NM หมายถึง nonmotile คือเคลื่อนที่ไม่ได้) จะไม่มีแฟลกเจลลา¹

มีรายงานเป็นครั้งแรกว่า *E. coli* O157:H7 ก่อให้เกิดโรคระบาดในปี ค. ศ. 1982 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการรับประทานแฮมเบอร์เกอร์ที่ไม่สุก ซึ่งทำจากเนื้อบดที่ปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157:H7 และผ่านความร้อนไม่สูงพอ การติดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารตั้งแต่ไม่แสดงอาการ จนถึงมีอาการท้องเสียไม่รุนแรงและไม่มีเลือดออก หรือแม้แต่มีอาการของโรคท้องเสียที่รุนแรงและมีเลือดออก (severe hemorrhagic colitis, HC) ระยะพักตัวเฉลี่ยประมาณ 3-8 วัน อาจสั้นถึง 1-2 วันผู้ป่วยที่เป็นโรค HC จะเริ่มมีอาการปวดท้องรุนแรง ท้องเสียมีน้ำออกมามาก (watery diarrhea) บริเวณกระพุ้งลำไส้ใหญ่ (cecum) และลำไส้ใหญ่ด้านที่เอนลงเป็นบริเวณหลักที่ติดเชื้อ หลังจากนั้น 1-3 วัน อาการจะรุนแรงขึ้นจนมีเลือดออก (bloody diarrhea) โดยไม่มีไข้หรือมีไข้เล็กน้อย ซึ่งผู้ป่วย 1 ใน 3 หรือ 1 ใน 4 จะมีอาการนี้ ประมาณครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยจะอาเจียนด้วย¹

หลังจากที่มีอาการท้องเสียได้ประมาณ 7-10 วัน ผู้ป่วยประมาณร้อยละ 50 โดยเฉพาะในเด็กที่มีอายุน้อยกว่า 10 ปี จะมีอาการรุนแรงขึ้นเป็น hemolytic uremic syndrome (HUS) นำไปสู่การเกิดไตวาย (acute renal failure) ในที่สุด การสร้าง Shiga toxin โดยเชื้อสายพันธุ์นี้มีบทบาทในการก่อโรค HC และ HUS¹ Shiga toxin เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค HC โดยร่วมกับ pro-inflammatory

EHEC virulence factors ดังนั้นจึงทำให้เกิดการตอบสนองต่อการติดเชื้อเพิ่มขึ้นโดยเกิดการอักเสบในลำไส้เล็กและเป็นผลให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อในที่สุดทำให้เกิดอาการท้องเสียและมีเลือดออก ส่วน HUS เกิดขึ้นเมื่อ Shiga toxin แพร่กระจายทั่วร่างกายผ่านระบบหมุนเวียน การที่สารพิษเข้าสู่ระบบหมุนเวียนได้อย่างไรนั้นยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดแต่เชื่อกันว่าเกิดขึ้นโดยอาศัยหลายวิถี โดยเอนโดทอกซินซึ่งถูกปล่อยออกมาระหว่างการติดเชื้อนี้อาจมีส่วนในการทำให้เกิดโรค HUS โดยไปกระตุ้นโมโนไซต์ (monocyte) ลิวโคไซต์ (leucocyte) และ endothelial cells ดังนั้นจึงทำให้การตอบสนองต่อการอักเสบเพิ่มมากขึ้น¹⁰

7.13.3.3 Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)

โดยทั่วไปเชื้อสายพันธุ์นี้ไม่สร้างเอนเทอโรทอกซินเหมือนกับที่พวก ETEC สร้าง แต่เชื้อเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และเพิ่มจำนวนใน colonic epithelial cells และแพร่ไปยังเซลล์ติดกันในทำนองเดียวกับ shigellae ก่อนปี ค. ศ. 1970 จุลินทรีย์เหล่านี้ถูกเรียกว่า “paracolons” เชื้อสายพันธุ์ EIEC เหมือนกับ *Shigella* ตรงที่มี enteroinvasive plasmids ขนาด 140 MDa (pINV) ซึ่งค่อนข้างเหมือนกับที่พบใน *Shigella flexneri* พลาสมิดนี้มีความสำคัญต่อการบุกรุกของเชื้อ โดยพบว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีพลาสมิดจะไม่บุกรุกและไม่ก่อโรค เชื้อในกลุ่มนี้จะบุกรุกเข้าที่ลำไส้ใหญ่ มีผลให้เกิดอาการท้องเสีย อาจมีเลือดหรือไม่มีเลือดปนออกมา เด็กเล็กมากๆ และคนแก่จะติดเชื้อได้ง่าย ระยะเวลาหลังได้รับเชื้อจนกระทั่งเกิดอาการระหว่าง 2-48 ชั่วโมงเฉลี่ยประมาณ 18 ชั่วโมง¹

7.13.3.4 Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)

แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ปกติไม่สร้างเอนเทอโรทอกซินแม้ว่าจะเป็นสาเหตุของอาการท้องเสีย เชื้อจะมีพลาสมิดที่ทำให้สามารถเกาะติดและเพิ่มจำนวนที่ intestinal mucosa เชื้อนี้จะปล่อยโปรตีนที่ขัดขวาง phagocytosis และทำให้เกิด cytoskeletal rearrangement และการทำลาย brush border microvilli เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์นี้พบครั้งแรกในปี ค. ศ. 1955 ทำให้เด็กอายุน้อยกว่า 1 ปี ท้องเสีย¹

7.13.3.5 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)

เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์นี้จะเกาะติดและเพิ่มจำนวนที่ลำไส้เล็กโดยอาศัย fimbrial colonization factor antigens (CFAs) ซึ่งมี 4 ชนิด คือ CFA-I, CFA-II, CFA III และ CFA IV แอนติเจน CFAs ถูกกำกับโดยพลาสมิด เมื่อเชื้อแบคทีเรียเกาะติดแล้วจะสร้างเอนเทอโรทอกซินจำนวน 1 หรือ 2 ชนิด¹

เชื้อนี้ไม่เหมือนกับ EPEC ที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียในเด็กเล็กมากๆ แต่สายพันธุ์ ETEC นี้จะทำให้เกิดอาการท้องเสียทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ เป็นสาเหตุหลักของ travelers' diarrhea โรคที่เกิดจาก ETEC มักไม่ค่อยมีไข้แต่จะมีอาการท้องเสียเฉียบพลัน ต้องได้รับเชื้อปริมาณมาก 10^8 - 10^{10} cfu จึงจะเกิดอาการท้องเสียในผู้ใหญ่¹

7.13.4 การป้องกัน

ในการป้องกันการติดเชื้อ ควรให้ความร้อนอาหารอย่างเหมาะสมและทั่วถึง เชื้อนี้ถูกทำลายได้ง่ายโดยต่อความร้อนถ้าให้ความร้อนอย่างทั่วถึงก็ไม่น่าจะมีปัญหา ในกรณีของเนื้อบด แนะนำว่าควรให้ความร้อนจนถึง 160°F (71.1°C) หรืออย่างน้อย 155°F (58.3°C) เป็นเวลานานอย่างน้อย 15 วินาที จนน้ำที่ออกจากเนื้อใส เมื่อให้ความร้อนแฮมเบอร์เกอร์แล้วไม่ควรทิ้งไว้อุณหภูมิระหว่าง 40°F - 140°F เป็นเวลานานกว่า 3-4 ชั่วโมง

7.14 โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *Vibrio* (Vibriosis)

แบคทีเรียในสกุลวิบริโอ (*Vibrio*) มีอย่างน้อย 28 ชนิด ชนิดที่มักจะเกี่ยวข้องกับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่พบในสิ่งแวดล้อมในน้ำและอาหารทะเลมี 3 ชนิดได้แก่เชื้อ *V. vulnificus*, *V. alginolyticus* และ *V. cholera* ความแตกต่างของเชื้อ *Vibrio* เหล่านี้แสดงในตารางที่ 7.10¹

7.14.1 *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อน พบได้บ่อยในน้ำในมหาสมุทรและน้ำแถบชายฝั่งทะเล การพบเชื้อชนิดนี้เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิของน้ำโดยจะตรวจไม่พบเชื้อชนิดนี้จนกว่าอุณหภูมิของน้ำทะเลจะสูงขึ้นถึงประมาณ $19-20^{\circ}\text{C}$ จากการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ชนิดนี้ในบริเวณแม่น้ำ Rhode และอ่าว Chesapeake ในสหรัฐอเมริกาพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้อยู่รอดได้ในตะกอนในทะเลช่วงฤดูหนาวและต่อมาถูกปล่อยออกในน้ำและยังพบเชื้อนี้อยู่กับ zooplankton ระหว่างเดือนเมษายนถึงต้นเดือนมิถุนายน ในน้ำในมหาสมุทรมีแนวโน้มที่จะพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* อยู่กับสัตว์น้ำเปลือกแข็งมากกว่าสิ่งอื่น มีรายงานว่าเชื้อชนิดนี้อาศัยอยู่บนอนุภาคไคติน (chitin)¹

7.14.1.1 การเจริญ

V. parahaemolyticus เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1-8 เจริญได้ดีถ้ามีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2-4 เมื่ออยู่ในน้ำกลั่นจะค่อยๆ ตาย ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 4°C แต่มีรายงานการเจริญของเชื้อชนิดนี้ในช่วงอุณหภูมิ $5-9^{\circ}\text{C}$ ในสภาพที่มี pH 7.2-7.3 และมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 หรือที่ pH 7.6 และมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 (ตารางที่ 7.11) *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วง $30-35^{\circ}\text{C}$ มีรายงานว่าเจริญได้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่เก็บที่อุณหภูมิ $9.5-10^{\circ}\text{C}$ ถึงแม้ว่าจะพบว่าอุณหภูมิต่ำสุดของน้ำในทะเลที่เชื้อนี้จะเจริญได้คือ ที่อุณหภูมิ 10°C ส่วนอุณหภูมิสูงสุดที่จะเจริญได้คือ $42-44^{\circ}\text{C}$ อุณหภูมิสูงสุดที่แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้จะผันแปรเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดต่าง ๆ กันที่เป็นองค์ประกอบของ cell envelop ซึ่งช่วยเพิ่มการต้านทานความร้อน^{1, 11}

ช่วง pH ที่ *V. parahaemolyticus* เจริญได้คือ 4.8-11.0 มี pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ เป็น 7.6-7.8 จากตารางที่ 7.11 จะเห็นได้ว่า pH ต่ำสุดที่เชื้อนี้จะเจริญได้เกี่ยวข้องกับอุณหภูมิและ ปริมาณเกลือ โดยสังเกตได้ว่าการเจริญในระดับปานกลางของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์หนึ่ง เกิดขึ้นในสภาพ pH 4.8 ที่อุณหภูมิ 30°C และมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 แต่ในสภาพที่มีโซเดียม คลอไรด์ร้อยละ 7 ค่า pH ต่ำสุดสำหรับการเจริญเป็น 5.2 ส่วนในเชื้อสายพันธุ์อื่นอีก 5 สายพันธุ์พบว่า ให้ผลเหมือนกัน ภายใต้สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญแบคทีเรียชนิดนี้มี generation time 9-13 นาที (เมื่อเปรียบเทียบกับ *E. coli* ซึ่งมี generation time 20 นาที) เชื้อ *V. parahaemolyticus* มีระดับ a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญเป็น 0.992 ซึ่งสัมพันธ์กับค่า generation time ที่สั้นที่สุด (ในสภาพที่มี โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.9 ในอาหาร Tryptic Soy Broth) และเมื่อเลี้ยงเชื้อนี้ในอาหาร TSB ที่มี โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.9 โดยใช้ตัวถูกละลายหลายชนิดในการควบคุมค่า a_w พบว่าเชื้อแบคทีเรีย ชนิดนี้จะมีความสัมพันธ์กับค่า a_w ต่ำสุดในการเจริญเป็น 0.937 (เมื่อใช้กลีเซอรอลปรับค่า a_w) a_w ต่ำสุดในการเจริญ เป็น 0.945 (เมื่อใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ปรับค่า a_w) a_w ต่ำสุดในการเจริญเป็น 0.948 (เมื่อใช้โซเดียม คลอไรด์ปรับค่า a_w) a_w ต่ำสุดในการเจริญเป็น 0.957 (เมื่อใช้ซูโครสปรับค่า a_w) a_w ต่ำสุดในการเจริญ เป็น 0.983 (เมื่อใช้กลูโคสปรับค่า a_w) และ a_w ต่ำสุดในการเจริญเป็น 0.937 (เมื่อใช้โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) ปรับค่า a_w)¹

7.14.1.2 ความไวต่อความร้อน

เชื้อ *V. parahaemolyticus* ถูกทำลายได้ง่ายโดยความร้อน มีรายงานว่าค่า $D_{47^\circ\text{C}}$ ผันแปรอยู่ ในช่วง 0.8-65.1 นาที เซลล์ของ *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์หนึ่งปริมาณ 500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในกึ่งบดถูกทำลายที่อุณหภูมิ 60°C ภายในเวลาเพียง 1 นาที Nanasombat และคณะ¹² รายงานว่า *V. parahaemolyticus* จำนวน 3 สายพันธุ์ที่แยกได้จากกุ้ง ปลาและปลาหมึกสดที่จำหน่ายในตลาดสดในกรุงเทพมหานครไวต่อความร้อน โดยมีค่า $D_{55^\circ\text{C}}$, $D_{75^\circ\text{C}}$ และ $D_{95^\circ\text{C}}$ ในกุ้ง ปลาและปลาหมึกสด ไกล่เคียงกันดังนี้ $D_{55^\circ\text{C}}$ 107.3-125.0 วินาที $D_{75^\circ\text{C}}$ 25.2-27.5 วินาทีและ $D_{95^\circ\text{C}}$ 16.1-16.5 วินาที *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ต่างๆ มี Z value อยู่ที่ 5.5-12.4°C เชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เกิดการบาดเจ็บแต่ยังไม่ตายสามารถฟื้นคืนสภาพได้ในอาหาร nonselective media หรือ TCBS agar ที่ มีการเติมแมกนีเซียมคลอไรด์เนื่องจากแมกนีเซียมคลอไรด์มีส่วนช่วยในการฟื้นคืนสภาพ จากการศึกษาเกี่ยวกับสารปฏิชีวนะพบว่าการสังเคราะห์ DNA, RNA และโปรตีน จำเป็นต่อการฟื้นคืน สภาพจากการบาดเจ็บจากความร้อน¹¹

ตารางที่ 7.10 คุณลักษณะของ *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio* ชนิดอื่น

คุณลักษณะ	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. cholera</i>
การมีแฟลกเจลลา (lateral flagella)	+	+	-	-
บนอาหารแข็ง				
รูปร่างท่อน	ท่อนตรง	ท่อนตรง	ท่อนโค้ง	D
ปฏิกิริยา Voges-Proskauer (VP)	-	+ *	-	V
การเจริญใน NaCl 10%	-	+	-	-
การเจริญใน NaCl 6 %	+	+	+	D
Swarming	-	+	-	-
การสร้างแอสโตติน/ ไดแอสติล	-	+	-	+
การใช้ซูโครส	-	+	-	+
การใช้เซลโลไบโอส	-	-	+	-
การใช้พิวทรินีน (putrescine)	+	D	-	-
สีบนอาหาร TCBS	เขียว	เหลือง	เขียว	เหลือง

* 24 ชั่วโมง; D = 11-90% ของสายพันธุ์ให้ผลบวก; V = ผันแปร

ที่มา : Jay และคณะ¹

ตารางที่ 7.11 ค่า pH ต่ำสุดสำหรับการเจริญของ *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 107914
ในอาหาร TSB ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 และร้อยละ 7 ที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	pH ต่ำสุดที่ความเข้มข้นของ NaCl 2 ระดับ	
	NaCl ร้อยละ 3	NaCl ร้อยละ 7
5	7.3	7.6
9	7.2	7.1
13	5.2	6.0
21	4.9	5.3
30	4.8	5.2

ที่มา: Jay และคณะ¹

แบคทีเรียชนิดนี้ไม่ทนต่อสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อนี้มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ อุณหภูมิต่ำที่สุดที่แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเท่าที่มีการบันทึกไว้คือ 5°C ปกติเชื้อ *V. parahaemolyticus* จะมีจำนวนลดลงเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 10°C หรือต่ำกว่า มีรายงานการแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่มีชีวิตจำนวนมากจากกุ้ง หอยนางรม และปลาบดที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ หรือจากหอยนางรมที่เก็บไว้ทั้งเปลือก บริเวณแรกที่เกิดการบาดเจ็บจากความเย็นคือที่เยื่อหุ้มเซลล์¹

7.14.1.3 กลไกการก่อความรุนแรง

V. parahaemolyticus เกือบทุกสายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนแตก (hemolytic) ขณะที่สายพันธุ์ส่วนใหญ่ของเชื้อนี้ที่แยกได้จากปลาทะเลและสิ่งแวดล้อมในทะเลไม่สามารถ ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (nonhemolytic) ปฏิกริยาในการทำให้เม็ดเลือดแดงของคนแตกนี้ เรียกว่า ปฏิกริยาคานากาวา (Kanagawa reaction) ซึ่งเป็นการทดสอบที่ใช้กันมากในการตรวจหาความสามารถในการก่อความรุนแรงของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โปรตีนที่ทนความร้อนซึ่งเรียกว่า thermostable direct hemolysin (TDH) มีบทบาทต่อการเกิดปฏิกริยานี้ TDH เป็นไซโตทอกซิกโปรตีน (cytotoxic protein) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 42,000 ดาลตัน สามารถทำให้หนูตายได้ สายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับปฏิกริยาคานากาวาสามารถผลิต TDH ได้ การทดสอบปฏิกริยาคานากาวาทำได้โดยเติมเซลล์เม็ดเลือดแดงในอาหาร Wagatsuma's agar แล้วทำการเลี้ยงเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูการแตกของเม็ดเลือดแดง (beta hemolysis) จากการทดลองในอาสาสมัครพบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกกับปฏิกริยาคานากาวาสามารถทำให้เกิดโรคอักเสบของกระเพาะและลำไส้ (gastroenteritis) ขณะที่สายพันธุ์ที่ให้ผลลบกับปฏิกริยาคานากาวาไม่ทำให้เกิดโรคนี้ มีรายงานว่า *V. parahaemolyticus* ร้อยละ 96 จากจำนวนทั้งหมด 2,720 ไอโซเลตที่แยกได้จากผู้ป่วยให้ผลบวกกับปฏิกริยาคานากาวา ขณะที่ร้อยละ 1 ของเชื้อนี้จำนวน 650 ไอโซเลตที่แยกได้จากปลาให้ผลบวกกับปฏิกริยาคานากาวา ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ TDH จะเกี่ยวข้องกับการก่อโรคทางเดินอาหารนี้

7.14.1.4 การแพร่กระจายของ *V. parahaemolyticus*

โรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อ *V. parahaemolyticus* มักเกี่ยวข้องกับอาหารทะเลทั้งทางตรงและทางอ้อม ปลาดิบและสัตว์น้ำเปลือกแข็งเป็นพาหะที่สำคัญของเชื้อนี้ในประเทศญี่ปุ่น แต่ในยุโรปและประเทศอื่น การติดเชื้อ *Vibrio* อาจพบไม่มากนักเนื่องจากมักจะให้ความร้อนอาหารทะเลก่อนรับประทาน อย่างไรก็ตามการติดเชื้อเกิดขึ้นได้หลังจากให้ความร้อน ถ้าหากมีการปนเปื้อนอีกครั้งจากสิ่งอื่นเช่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการประกอบอาหาร¹³

7.14.1.5 อาการของโรคอาหารเป็นพิษและอาหารที่เป็นพาหะ

V. parahaemolyticus ที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษพบครั้งแรกในปี ค. ศ. 1951 ขณะนั้นการเกิดโรคนี้นับน้อยในสหรัฐอเมริกาและยุโรป แต่พบมากในญี่ปุ่นโดยในระหว่างปี ค. ศ. 1965-1974 พบโรคอาหารเป็นพิษจากเชื้อชนิดนี้ถึงร้อยละ 24 ของโรคอาหารเป็นพิษทั้งหมดที่เกิดขึ้นในญี่ปุ่น อาหารที่เคยพบว่าเป็นพาหะของเชื้อซึ่งทำให้เกิดโรคระบาดคือ ปลาซาร์ดีนกึ่งแห้ง สลัดปู ปูหนึ่ง หอยนางรมดิบ ระยะฟักตัวของเชื้อ (incubation period) อยู่ในช่วง 3-76 ชั่วโมง เฉลี่ย 16.7 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นเป็นเวลา 1-8 วัน เฉลี่ย 4.6 วัน ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย (ร้อยละ 95) เป็นตะคริวที่ท้อง (ร้อยละ 92) อ่อนเพลีย (ร้อยละ 95) คลื่นไส้ (ร้อยละ 72) หาว (ร้อยละ 55) ปวดหัว (ร้อยละ 48) และอาเจียน (ร้อยละ 12)¹³

7.14.1.6 การควบคุมและการป้องกัน

การที่เชื้อ *Vibrio* มีอยู่ตามธรรมชาติในทะเลและสภาพแวดล้อมตามชายฝั่งทะเลจึงเป็นไปได้เลยที่จะไม่พบแบคทีเรียชนิดนี้ในอาหารทะเล จากการเกิดโรคระบาดจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในปี ค. ศ. 1997 และปี ค. ศ. 1998 ทำให้สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) จัดให้มีการแนะนำแนวทางการจัดการกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ต่อ Interstate Shellfish Sanitation Conference (ISSC) ซึ่งได้จำกัดให้มี *V. parahaemolyticus* ที่มีชีวิตได้ถึง 10,000 เซลล์หรือน้อยกว่าในอาหารทะเล 1 กรัม อย่างไรก็ตามจากการตรวจสอบอาหารทะเลที่ดำเนินการโดยรัฐและเจ้าหน้าที่ส่วนกลางหลังเกิดการระบาดในปี ค. ศ. 1998 พบว่าจำนวนเซลล์ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมส่วนใหญ่ในพื้นที่ที่หอยนางรมเจริญนั้นมีเซลล์ *Vibrio* ที่มีชีวิตน้อยกว่า 1,000 เซลล์ต่อกรัมและในบางบริเวณอาจพบต่ำกว่า 100 เซลล์ต่อกรัม การตรวจพบนี้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ว่าปริมาณที่พบเชื้อปริมาณต่ำนี้เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อของสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค และแนวทางของ FDA อาจจะไม่เพียงพอในการป้องกันผู้บริโภคจากการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเกี่ยวกับการบริโภคหอยนางรมดิบ¹⁴

เพื่อที่จะจำกัดการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในหอยนางรมหน่วยงาน The National Shellfish Sanitation Program Guide for the Control of Molluscan Shellfish จึงได้กำหนดเกณฑ์ของเวลากับอุณหภูมิซึ่งจะจำกัดเวลาสูงสุดที่หอยนางรมอยู่ที่อุณหภูมิสูง สัตว์น้ำเปลือกแข็งที่ถูกเก็บมาเพื่อบริโภคดิบ ๆ จำเป็นที่จะต้องทำให้เย็นลงถึง 10°C (50°F) ภายใน 10 ชั่วโมงหลังเก็บเมื่ออุณหภูมิอากาศเฉลี่ยสูงสุดของทุกเดือนคือ $\geq 27^{\circ}\text{C}$ (81°F) ภายใน 12 ชั่วโมงหลังเก็บเมื่ออุณหภูมิของอากาศอยู่ระหว่าง 19 และ 27°C (66-80°F) และภายใน 36 ชั่วโมงหลังเก็บเมื่ออุณหภูมิของอากาศต่ำกว่า 18°C (66°F) ในการพยายามที่จะลดการติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เกี่ยวข้องกับการบริโภคหอยนางรม ซึ่งหอยนางรมสำหรับการบริโภคดิบในรัฐ Mississippi ของอเมริกาถูกกำหนดให้เก็บได้ในช่วงกลางเดือนกันยายนถึงเดือนเมษายน ไม่ให้เก็บ

หอยนางรมที่ก้นทะเลในช่วงฤดูร้อนและเวลาอื่น ๆ เมื่อฝนตกหนักซึ่งจะมีการไหลของน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อเข้ามา การวางแผนการเก็บหอยนางรมแบบนี้จะช่วยลดการเจ็บป่วยจากโรคอาหารเป็นพิษโดยเชื้อ *V. parahaemolyticus* ให้น้อยลงจากการบริโภคหอยนางรม¹⁴

ก) Relaying และ Depuration

Relaying และ Depuration เป็นวิธีการที่ช่วยในการลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในสัตว์น้ำเปลือกแข็ง ในกระบวนการ relaying จะทำการย้ายสัตว์น้ำเปลือกแข็งก่อนที่จะเก็บผลผลิตจากพื้นที่ที่สกปรกไปยังแหล่งน้ำตามธรรมชาติแหล่งอื่นที่ปราศจากมลภาวะ อย่างไรก็ตามมีการเพิ่มขึ้นของมลพิษตามชายฝั่งทะเลเกิดขึ้นจากของเสียจากสัตว์ในสถานที่เพาะเลี้ยง สภาพแวดล้อมทางทะเลมีผลทำให้พื้นที่ในการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำเปลือกแข็งสกปรก การรักษาความสะอาดที่ไม่ดีพอทำให้เกิดความสกปรกในสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำที่มีสัตว์น้ำเปลือกแข็งเจริญอยู่ ทำให้ต้องมีการปฏิบัติตามกระบวนการ relaying¹⁴

Depuration เป็นกระบวนการควบคุมในการกำจัดทรายและกรวดออกจากลำไส้ของสัตว์น้ำเปลือกแข็งในน้ำทะเลที่สะอาด กระบวนการนี้ทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในสัตว์น้ำเปลือกแข็งลดลง กระบวนการนี้ช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำแช่เย็น ส่วนใหญ่หลังจากการทำ depuration จำนวนแบคทีเรียที่ต้องการอากาศทั้งหมดจะลดลง 1 log cycle อย่างไรก็ตามมีรายงานน้อยมากถึงการลดจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ถึงน้อยกว่า 10^4 เซลล์ต่อกรัม มีจากรายงานการศึกษาพบว่า หอยนางรมที่ปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* ในห้องทดลองจะต้องผ่านการ depuration เป็นเวลา 16 วัน แบคทีเรียชนิดนี้จึงจะลดจำนวนลงถึงตรวจไม่พบ และมีการศึกษาล้ำๆ กันที่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในค่าเฉลี่ยของจำนวน *V. parahaemolyticus* ของหอยนางรมที่ผ่านและไม่ผ่านการ depuration¹⁴

ได้มีผู้ทำการศึกษาคำ depuration ร่วมกับการใช้คลอรีน แสงอัลตราไวโอเลต ไอโซน หรือ iodophors เพื่อลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในหอยนางรมอย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามวิธีการทั้งหมดนี้ไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัด *V. parahaemolyticus* ในสัตว์น้ำเปลือกแข็ง ได้มีผู้ศึกษาคำ depuration ของหอยแมลงภู่ซึ่งทำให้ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในน้ำที่มีไอโซน ผลปรากฏว่าเชื้อ *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ในหอยแมลงภู่ลดลงประมาณ 1 log cycle ซึ่งลดลงน้อยกว่าเชื้อ *E. coli* (ลดประมาณ 3 log cycle) หลังจากเวลาผ่านไป 44 ชั่วโมง นอกจากนี้มีรายงานการใช้น้ำที่ผ่านกระบวนการ electrolyzed oxidizing ในการ depuration พบว่าการลดลงของจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ที่ปนเปื้อนในหอยนางรม และยังพบว่าแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์จะลดลงประมาณ 1 log cycle หลังจากอยู่ที่อุณหภูมิห้อง 8 ชั่วโมง¹⁴

ข) การให้ความร้อน

กระบวนการลดและเพิ่มความร้อนเช่น การแช่เย็น การแช่แข็ง และการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิต่ำสามารถทำให้เชื้อ *Vibrio* ในหอยนางรมลดลงได้สำเร็จ มีรายงานว่าจำนวนของ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมลดลงจากน้อยกว่า 11,000 เป็น 0.36 MPN ต่อกรัม หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 3°C เป็นเวลา 7 วัน และมีรายงานอีกว่าเซลล์ที่มีชีวิตของ *V. parahaemolyticus* (10^5 - 10^7 CFU ต่อกรัม) ในหอยนางรมบดจะถูกยับยั้งการเจริญอย่างสมบูรณ์โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C และ -24°C เป็นเวลา 15-28 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับจำนวนของเชื้อเริ่มต้นและอุณหภูมิในการแช่แข็ง นอกจากนี้ยังได้มีผู้ทดลองพาสเจอร์ไรส์หอยนางรมที่เก็บทั้งเปลือกด้วยความร้อนต่ำในน้ำที่มีอุณหภูมิ 55°C เพื่อให้อุณหภูมิกายในหอยนางรมเป็น 48-50°C เป็นเวลา 5 นาที พบว่ากระบวนการนี้สามารถทำให้ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมลดลงจากจำนวน 1.2×10^5 MPN ต่อกรัม จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ (น้อยกว่า 3 MPN ต่อกรัม) ประโยชน์อีกประการหนึ่งของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิไม่สูงก็คือ หอยนางรมจะตายและส่วนที่ยืดจะถูกเปิดออกเองในระหว่างการให้ความร้อน แต่หอยนางรมจำเป็นที่จะต้องปิดอยู่ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการผลิต เพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำภายในของหอยนางรมในระหว่างการดำเนินการ ข้อเสียหลักของการพาสเจอร์ไรส์ด้วยกระบวนการนี้คือ อาจจะเป็นสาเหตุทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของหอยนางรมเปลี่ยนไป เนื่องจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพในระหว่างการให้ความร้อน¹⁴

ค) กระบวนการให้ความดันสูง

กระบวนการให้ความดันสูงเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ความร้อน (non-thermal process) ซึ่งสามารถใช้ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์โดยจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางอาหาร รสชาติ และลักษณะที่ปรากฏดั้งเดิมของอาหาร จากการศึกษพบว่า กระบวนการให้ความดันสูง (high-pressure processing) มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม มีรายงานว่า การให้ความดันสูงที่ 300 MPa เป็นเวลา 180 วินาที เพียงพอที่จะทำให้ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมลดลงมากกว่า 5 log CFU ต่อกรัม รวมถึง *V. parahaemolyticus* O3:K6 ในหอยนางรมด้วย และการให้ความดันสูงที่ 345 MPa เป็นเวลา 30 และ 90 วินาทีเป็นสภาพที่เหมาะสมในการทำให้ *V. parahaemolyticus* ลดลงจากจำนวน 7.6×10^6 – 5.5×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร จนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจพบได้ (น้อยกว่า 10 CFU ต่อ มิลลิลิตร หรือ CFU ต่อกรัม) เช่นเดียวกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำ การใช้ความดันสูงจะทำให้เปลือกหอยนางรมเปิดโดยการทำลายกล้ามเนื้อที่ยึดติดซึ่งจำเป็นที่จะต้องปิดอยู่เพื่อป้องกันการหลุดออกมาของเนื้อในระหว่างดำเนินการ มีรายงานว่า การให้ความดันสูงที่ 240-275 MPa เป็นช่วงที่เหมาะสมซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏของหอยนางรมเพียงเล็กน้อย ข้อเสียหลักของการ

ใช้ความดันสูงในการทำให้ *V. parahaemolyticus* ลดลงในหอยนางรมคือ ระบบความดันสูงจะใช้ ต้นทุนสูง¹⁴

ง) การใช้รังสี

การใช้รังสีเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ไม่อาศัยความร้อน แต่สามารถทำลายแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้ จากการศึกษพบว่า การใช้รังสีในปริมาณต่ำ (ต่ำกว่า 3 kGy) จะไม่สามารถฆ่าหอยนางรม หรือมีผลต่อคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของหอยนางรม มีรายงานว่าตามธรรมชาติในหอยนางรม จะมี *V. vulnificus* (10^3 CFU ต่อกรัม) ซึ่งการฉายรังสีแกมมา Cobalt 60 ที่ 0.75 kGy ทำให้เชื้อนี้ ลดจำนวนลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ นอกจากนี้พบว่า การเติมเชื้อ *V. parahaemolyticus* O3:K6 (10^4 เซลล์ต่อกรัม) ลงในหอยนางรมแล้วฉายรังสีที่ 1.0-1.5 kGy สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อลง ได้จนตรวจไม่พบเชื้อ ผู้ตรวจสอบสรุปว่า การฉายรังสีที่น้อยกว่า 2 kGy ในหอยนางรมจะทำให้มี อัตราการอยู่รอดสูงและไม่มีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส การวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัสโดยใช้อาสาสมัคร 146 คน ซึ่งใช้การทดสอบเพื่อสืบหาความแตกต่าง (difference tests) พบว่าไม่สามารถแยกแยะหอยนางรมที่ฉายรังสีออกจากหอยนางรมที่ไม่ฉายรังสี ถึงแม้ว่าการฉายรังสี จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรม แต่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ อาหารที่ผ่านกัมมันตภาพรังสีและจำเป็นจะต้องทราบขีดจำกัดในการใช้วัสดุกัมมันตภาพรังสีเพื่อ ความปลอดภัย¹⁴

7.14.2 *Vibrio cholerae*

V. cholerae เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอหิวาต์ในคน ปนเปื้อนมากับน้ำที่มีมลภาวะ แบคทีเรียชนิดนี้ถ้าจำแนกโดยการทดสอบทางซีโรวิทยาจะแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่ 1) *V. cholerae* O1 (serovar O group 1) เป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคระบาดที่เกิดขึ้นทั่วโรคก่อนปี ค. ศ. 1992 เชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ O1 นี้ยังแบ่งได้เป็นอีก 2 ไบโอไทป์ (biotype) คือ ไบโอไทป์ classic และไบโอไทป์ E1 Tor และสายพันธุ์ O1 ยังแบ่งได้ 3 ซีโรไทป์ คือ Inaba, Ogawa และ Hikojima และ 2) *V. cholerae* non-O1 เป็นเชื้อที่ไม่เกิดปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มกับโอแอนติซีรัม กลุ่ม 1 (O group 1 antiserum) โดยทั่วไปเชื้อกลุ่มนี้ไม่ก่อโรคที่รุนแรง เพียงแต่ก่อให้เกิดโรค อาหารเป็นพิษ การติดเชื้อที่เนื้อเยื่ออ่อนและเกิด septicemia ในคน^{1, 15}

ในการเกิดโรคอหิวาต์ระบาดทั่วโลกครั้งที่ 7 ในปี ค. ศ. 1961 มีสาเหตุมาจากเชื้อ *V. cholerae* สายพันธุ์ O1 ไบโอไทป์ E1 Tor และในปี ค. ศ. 1992 เกิดโรคอหิวาต์ระบาดในประเทศ อินเดียมีสาเหตุมาจาก *V. cholerae* non-O1 สายพันธุ์ใหม่คือ O139 จากการศึกษพบว่าสายพันธุ์ O139 นี้ มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายเชื้อสายพันธุ์ O1 ไบโอไทป์ E1 Tor ที่เป็นสาเหตุของ โรคอหิวาต์ที่ระบาดครั้งที่ 7 เชื่อว่าสายพันธุ์ O139 มีวิวัฒนาการมาจากเชื้อไบโอไทป์ E1 Tor นี้

เชื้อ *V. cholera* O139 เหมือนกับ *V. cholera* O1 ตรงที่ประกอบขึ้นสำหรับการสร้าง cholera toxin แต่ไม่เหมือนกันที่สายพันธุ์ O139 สร้างแคปซูลและไลโปพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย sugar colitose¹

7.14.2.1 ลักษณะของเชื้อและการเจริญ

V. cholerae มีรูปร่างท่อน เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาเส้นเดียวที่อยู่ขั้วเซลล์ (single polar flagellum) สามารถเจริญได้ในสารละลายเปปโตनที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0-6 ทนต่างได้ดี¹⁵

7.14.2.2 อาการของโรค

V. cholerae O1 ทำให้เกิดอาการตั้งแต่ไม่รุนแรงไปจนถึงรุนแรง อัตราส่วนของผู้ป่วยที่จะเกิดอาการรุนแรงต่อผู้ป่วยที่จะเกิดอาการไม่รุนแรงโดยทั่วไปอยู่ระหว่าง 1:5 ถึง 1:10 สำหรับไบโอไทป์ classic ส่วนกรณีของไบโอไทป์ E1 Tor อัตราส่วนเป็น 1:25 ถึง 1:100 ระยะฟักตัว 1-5 วัน โดยทั่วไปมีอาการอาเจียนอย่างฉับพลันและท้องเสียมีน้ำออกมากแต่ไม่ปวดท้อง (painless watery diarrhea) ถ้าไม่ได้รับการรักษาตั้งแต่เริ่มเกิดอาการอาจตายอย่างรวดเร็วเพราะขาดน้ำอย่างรุนแรง¹⁵

7.14.2.3 กลไกการเกิดความรุนแรงของโรค

V. cholera สร้างเอนเทอโรทอกซิน (cholera toxin, CT) เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคอหิวาต์ สารพิษ CT ประกอบด้วยหน่วยย่อย A จำนวน 1 หน่วย หน่วยย่อย B จำนวน 5 หน่วย สารพิษนี้ไม่ทนความร้อน หน่วยย่อย B ของสารพิษนี้จะจับกับ GM1 ganglioside ซึ่งเป็น membrane receptor บนมิวโคซอลเซลล์ (mucosal cells) ในลำไส้เล็ก จากนั้นหน่วยย่อย A จะเข้าสู่เซลล์ของร่างกายได้และกระตุ้นอะดีนิเลตไซเคเลส (adenylate cyclase) ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มปริมาณ cAMP ภายในเซลล์ในเวลาต่อมา เป็นสาเหตุของอาการท้องเสียที่เพิ่มความรุนแรงมากขึ้นของโรคอหิวาต์ *V. cholera* สายพันธุ์ O1 เชื้อ *V. cholera* สายพันธุ์ non-O1 บางชนิดเช่น O139 สร้างสารพิษ CT ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษ CT ไม่ก่อให้เกิดโรคอหิวาต์¹⁵

7.14.2.4 การแพร่กระจาย

V. cholerae แพร่กระจายตามสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะน้ำที่ปนเปื้อน จากการศึกษารวดเร็ว ๆ นี้ ได้พบว่า *V. cholerae* เป็นเชื้อที่อยู่ได้อย่างอิสระ อาจพบในลักษณะที่มีชีวิตแต่ตรวจไม่พบเนื่องจากไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (viable but nonculturable) เชื้อ *V. cholerae* ชอบที่จะเกาะอยู่ที่ผิวของ zooplankton และหอยโดยแบคทีเรียชนิดนี้สร้างเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) ได้¹⁵

นอกจากนี้ *V. cholerae* ยังเกาะกับทางเดินอาหารของสัตว์น้ำเปลือกแข็ง เนื่องจากสัตว์กิน zooplankton เข้าไป *V. cholerae* สามารถมีชีวิตอยู่ได้หลายสัปดาห์ในตัวสัตว์ ดังนั้นสัตว์น้ำเปลือกแข็งที่มีเชือนี้จึงเป็นพาหะสำคัญในการแพร่เชื้อโรคอหิวาต์ การแพร่เชื้อ *V. cholerae* ไม่เสมอไปที่เกี่ยวข้องกับติดเชื้อจากสิ่งขับถ่ายของผู้ป่วยโรคอหิวาต์ แต่การติดเชื้อาจเกิดได้จากการใช้น้ำ

ที่ปนเปื้อนในการประกอบอาหาร อาบน้ำและชะล้างสิ่งต่างๆ นอกจากนี้เครื่องมือที่ทำจากน้ำแข็งที่ปนเปื้อนก็เป็นพาหะของเชื้ออหิวาต์ได้ในบริเวณที่มีการแพร่ระบาด¹⁵

7.14.2.5 การป้องกัน

พาหะที่สำคัญของการแพร่กระจายของเชื้ออหิวาต์ได้แก่ น้ำและอาหารทะเล ดังนั้นวิธีการป้องกันที่มีประสิทธิภาพก็คือ จะต้องขจัดแหล่งทุกแหล่งที่อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนน้ำที่ใช้สำหรับสาธารณูปโภค ควรระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนของน้ำเสียในบริเวณที่มีการระบาดของโรคอหิวาต์ รักษาความสะอาดของอุปกรณ์ต่าง ๆ จัดการให้ถูกสุขลักษณะ ไม่ควรรับประทานผักสดและอาหารทะเลที่ไม่สุก¹⁵

7.14.3 *Vibrio vulnificus*

แบคทีเรียชนิดนี้พบในน้ำทะเลและเคยแยกได้จากอาหารทะเลบางชนิดเช่น หอยแมลงภู่ หอยนางรมและหอยแครง มักแยกได้เมื่อน้ำทะเลมีอุณหภูมิ 15-22°C *V. vulnificus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างแคปซูลได้ เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1-6 เป็นสาเหตุของการติดเชื้อบริเวณเนื้อเยื่ออ่อนและทำให้เกิดโรค septicemia โดยเฉพาะในกลุ่มคนที่มีภูมิคุ้มกันอ่อน ผู้ป่วยที่เป็นโรค septicemia จะมีอัตราการตายร้อยละ 50 เชื้อชนิดนี้บุกรุกค่อนข้างรุนแรง สร้างไซโตทอกซิน (cytotoxin) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 56 kDa ซึ่งเป็นพิษกับเซลล์และทำให้เกิดเลือดแดงแตกได้และยังสามารถติดเชื้อทางบาดแผลได้ ดังนั้นเพื่อป้องกันการติดเชื้อนี้จึงไม่ควรรับประทานอาหารทะเลที่ไม่สุกและควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับน้ำทะเลถ้าหากมีบาดแผล¹

7.15 Yersiniosis (โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *Yersinia enterocolitica*)

Yersinia เป็นแบคทีเรียในแฟมิลี Enterobacteriaceae จนถึงปัจจุบันพบ 11 สปีชีส์ และ 5 ไบโอฟาร์ (biovar) รวมทั้ง *Y. pestis* ซึ่งเป็นสาเหตุของ plague สปีชีส์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารคือ *Yersinia enterocolitica* ซึ่งแยกได้ครั้งแรกที่รัฐนิวเจอร์ซีย์ สหรัฐอเมริกาในปี ค. ศ. 1933 เชื้อ *Y. enterocolitica* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ชอบอุณหภูมิต่ำ ค่อนข้างไม่เหมือนชนิดอื่นคือเคลื่อนที่ได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 30°C แต่ไม่เคลื่อนที่ที่อุณหภูมิ 37°C สร้างโคโลนีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตรบนอาหาร Nutrient Agar ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและยูรีเอส ไม่สร้างเอนไซม์ phenylalanine deaminase หมักกลูโคสให้แก๊สเล็กน้อยหรือไม่ให้แก๊ส *Y. enterocolitica* สร้างสารเอนเทอโรทอกซินที่ทนความร้อนซึ่งไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที¹

7.15.1 การเจริญ

Y. enterocolitica เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ -2°C ถึง 45°C อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง $22-29^{\circ}\text{C}$ บางสายพันธุ์ไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า $4-5^{\circ}\text{C}$ และสูงกว่า 40°C อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อนี้จะเจริญได้จะสูงขึ้นถ้าเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการรายงานเมื่อปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและบ่มเป็นเวลา 21 วันพบว่าค่า pH ต่ำสุดสำหรับการเจริญของเชื้อ *Y. enterocolitica* 6 สายพันธุ์อยู่ที่ระดับพีเอช 4.42-4.80 อุณหภูมิ 4°C พีเอช 4.36-4.83 อุณหภูมิ 7°C พีเอช 4.26-4.50 อุณหภูมิ 10°C และพีเอช 4.18-4.36 อุณหภูมิ 20°C เชื้อ *Y. enterocolitica* ถูกทำลายด้วยความร้อนภายใน 1-3 นาทีที่อุณหภูมิ 60°C ค่อนข้างทนต่อการแช่แข็งโดยจำนวนเซลล์ลดลงเล็กน้อยในไก่ที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ -18°C เป็นเวลา 90 วัน *Y. enterocolitica* สร้างเอนเทอโรทอกซินที่ทนความร้อน ไม่ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที มีน้ำหนักโมเลกุล 9,000-9,700 Da ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เคยแยกได้จากขนมเค้ก เนื้อที่เก็บในสภาพสุญญากาศ เนื้อวัว เนื้อหมู อาหารทะเล ผัก นมและผลิตภัณฑ์อื่น ๆ¹

7.15.2 การแพร่กระจาย

Y. enterocolitica และสปีชีส์ใกล้เคียงได้แก่ *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. bercovieri* และ *Y. mollaretti* (ตารางที่ 7.12) แพร่กระจายทั่วไปในสิ่งแวดล้อมตามทะเลสาบ อ่างเก็บน้ำ แม่น้ำซึ่งเป็นแหล่งที่จะแพร่สู่สัตว์เลื้อยคลาน *Y. enterocolitica* เป็นเชื้อที่ปรับตัวอยู่อาศัยในร่างกายสัตว์และแยกได้จากคนบ่อยกว่าสปีชีส์อื่น สัตว์ชนิดที่เคยเป็นแหล่งที่มาของ *Y. enterocolitica* ที่แยกได้คือ แมว นก สุนัข หมู หนู อูฐ ม้า ไก่ กวาง โค กระบือ แกะ ปลาและหอยนางรม *Y. enterocolitica* ซีโรวาร์ที่พบบ่อยว่าติดเชื้อในคนคือ ซีโรวาร์ 0:3, 0:5, 27, 0:8 และ 0:9¹

7.15.3 การปนเปื้อนในอาหาร

Y. enterocolitica เคยพบว่าปนเปื้อนในเค้ก เนื้อที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ อาหารทะเล ผัก นมและผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น และเคยแยกได้จากเนื้อวัว เนื้อแกะและเนื้อหมูดิบ หมู (swine) เป็นแหล่งที่สำคัญของ *Y. enterocolitica* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในคน มีรายงานว่า ต่อมทอนซิลของหมู (pig tonsils) เป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้ตับ หัวใจและไตปนเปื้อนด้วยเชื้อชนิดนี้¹

7.15.4 การเกิด Gastroenteritis syndrome

การเกิดโรคสูงสุดพบบ่อยเด็กที่เล็กมากและผู้สูงอายุที่ชราามากๆ อาหารที่เป็นพาหะได้แก่ นมดิบ นมพาสเจอร์ไรส์ที่ผ่านความร้อนด้วยกรรมวิธีไม่เหมาะสม หรือนมที่ปนเปื้อนอีกครั้งหลังผ่านความร้อน เป็นพาหะที่พบบ่อย อาการที่พบคือ เป็นไข้ ท้องเสีย ปวดท้องอย่างรุนแรง เป็นตะคริวที่ท้อง อาเจียน¹

ตารางที่ 7.12 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Yersinia* สปีชีส์ที่เกี่ยวข้องกับ *Yersinia enterocolitica* ในสิ่งแวดล้อมและในอาหาร

Species	Voges-Proskauer reaction	Sucrose	Rhamnose	Raffinose	Melibiose
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	-	-	-
<i>Y. kristensenii</i>	-	-	-	-	-
<i>Y. frederiksenii</i>	+	+	+	-	-
<i>Y. intermedia</i>	+	+	+	+	+
<i>Y. bercovieri</i>	-	+	-	-	-
<i>Y. mollaretti</i>	-	+	-	-	-

+ = ให้ผลบวก; - = ให้ผลลบ

ที่มา: Jay และคณะ¹

7.16 โรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *Campylobacter jejuni* (Campylobacteriosis)

แบคทีเรียในสกุล *Campylobacter* มีอย่างน้อยหนึ่งสปีชีส์ที่มีความสำคัญในอาหารซึ่งก็คือ *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* แบคทีเรียชนิดนี้สามารถต้านทานเซฟฟาโลทริน (cephalothin) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 42°C และสามารถรื้อชีวิตในเตรตได้ *C. jejuni* เป็นแบคทีเรียรูปท่อนโค้งเป็นเกลียว ผอมบาง มีแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้าง สร้างเอนไซม์อะซิเตสและออกซิเดสได้ ชอบเจริญในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophile) ต้องการออกซิเจนเพียงร้อยละ 3-6 สำหรับการเจริญ ไม่เจริญในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3.5 หรือ 25°C ในสภาพที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญ (40°C) แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.0 และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ถึงร้อยละ 1.75 การเจริญของ *C. jejuni* ถูกยับยั้งในสภาพที่มีออกซิเจนร้อยละ 21 ในสภาพที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (ประมาณร้อยละ 10) ช่วยให้ *C. jejuni* เจริญได้ดี นอกจาก *C. jejuni* แล้วยังมี *Campylobacter* ชนิดอื่นที่ทำให้เกิดอาการท้องเสียในคนได้แก่ *C. coli*, *C. intestinalis* และ *Campylobacter* ชนิดอื่นอีกหลายชนิด แต่ *C. jejuni* เป็น *Campylobacter* ชนิดที่สำคัญที่สุด *C. jejuni* สร้างเอนโทโรทอกซินที่ไม่ทนความร้อน¹

7.16.1 การแพร่กระจาย

C. jejuni ต่างกับ *Y. enterocolitica* และ *V. parahaemolyticus* ตรงที่ไม่ใช่จุลินทรีย์ที่จะพบในสิ่งแวดล้อม แต่จะพบว่าเกี่ยวข้องกับสัตว์เลือดอุ่น เชื้อที่นี้พบมากในสัตว์โดยเฉพาะในอุจจาระของสัตว์ซึ่งพบบ่อยในสัตว์ปีก เคยมีรายงานการแยกเชื้อ *C. jejuni* ได้จากลำไส้ไก่และหมู อุจจาระหมู และแกะ ซากแกะ ซากหมู ไก่และไก่วงที่เอาเครื่องในออกแล้ว¹

7.16.2 อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *C. jejuni*

โรคระบาดที่เกิดจาก *C. jejuni* ครั้งแรกที่เกิดขึ้นในประเทศสหรัฐอเมริกา มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนในน้ำดื่ม น้ำใช้ มีผู้ติดเชื้อ 2000 คน โดยเกิดอาการดังนี้ ปวดท้อง ท้องเสีย ปวดศีรษะ และเป็นไข้ มีอาการประมาณ 1-4 วัน รายที่รุนแรงถ่ายอุจจาระมีเลือดปน ระยะพักตัวผันแปรในช่วง 48-82 ชั่วโมงหรืออาจนานถึง 7-10 วันหรือนานกว่านั้น อาจมีอาการท้องเสียประมาณ 2-7 วัน หลังจากอาการดีขึ้นเชื้ออาจแพร่ออกจากผู้ป่วยได้นาน 2 เดือน¹

7.16.3 การป้องกัน

C. jejuni, *Y. enterocolitica* และ *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่ไวต่อความร้อนทั้งหมด ถูกทำลายที่อุณหภูมิของการพาสเจอร์ไรส์นม การหลีกเลี่ยงการรับประทานอาหารทะเลดิบ และการป้องกันการปนเปื้อนข้าม (cross-contamination) จะช่วยจัดหรือลดการเกิดโรคอาหารเป็นพิษที่มีสาเหตุมาจาก *Y. enterocolitica* และ *V. parahaemolyticus* ผู้ที่มีบาดแผลควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสกับน้ำทะเลจะช่วยป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio* ส่วนโรคที่เกิดจาก *Yersinia* สามารถลดหรือหลีกเลี่ยงได้จากการไม่ดื่มน้ำที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้สะอาดอย่างเหมาะสม การไม่ดื่มนมดิบ หรือนมที่ผ่านความร้อนไม่เพียงพอ ส่วนโรคที่เกิดจาก *Campylobacter* สามารถหลีกเลี่ยงได้จากการไม่รับประทานอาหารที่มาจากสัตว์¹

เอกสารอ้างอิง

1. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.
2. Wong, A.C.L., Bergdoll, M.S. 2002. Staphylococcal food poisoning. In: Cliver, D.O., Rieman, H.P. (Eds.), Foodborne Diseases, 2nd ed. Academic Press, Barcelona, Spain, pp. 231-248.

3. Bennett, R.W. 2001. *Bacillus cereus*, pp. 51-60. In: Labbé, R.G., Garcia, S. (Eds.), Guide to Foodborne Pathogens. A John Wiley & Sons, Inc., New York.
4. Montville, T.J., Matthews, K. 2005. Food Microbiology: an Introduction. ASM Press, Washington, DC.
5. Pagotto, F., Corneau, N., Farber, J. 2006. *Listeria monocytogenes* infections, pp. 313-340. In: Riemann, H.P., Cliver, D.O. (Eds.), Foodborne Infections and Intoxication. Elsevier, Inc., San Diego, California, USA.
6. Harris, L.J. 2002. *Listeria monocytogenes*, pp. 137-150. In: Cliver, D. O., Rieman, H. P. (Eds.), Foodborne Diseases, 2nd ed. Academic Press, Barcelona, Spain.
7. Banwart, G.J. 1989. Basic Food Microbiology, 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York
8. D'Aoust, J.-Y., 2001. *Salmonella*, pp. 163-191. In: Labbé, R. G., Garcia, S. (Eds.), Guide to Foodborne Pathogens. A John Wiley & Sons, Inc., New York.
9. Fratamico, P.M., Smith, J.L., Buchanan, R.L. 2002. *Escherichia coli*, pp. 79-102. In: Cliver, D. O. and Rieman, H. P. (Eds.), Foodborne Diseases, 2nd ed. Academic Press, Barcelona, Spain.
10. Armstrong, G.D. 2008. Pathogenic mechanisms of the enterohemorrhagic *Escherichia coli*-some new insights, pp. 31-53. In: Wilson, C.L. (Ed.), Microbial Food Contamination, 2nd ed. CRC Press Taylor & Francis group., Boca Raton.
11. Schultz, F. J., Smith, J. L. 1994. Foodborne Disease Handbook Volume 1. Marcel Dekker, Inc. New York.
12. Nanasombat, S., Potiraj, N., Sanma, P., Hapermpool, W., Sirisorchai, S. 2010. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* contaminated in seafoods sold in Bangkok and thermal inactivation study. In: The 11th Asean Food Conference, 21-23 October 2009, Bandar Seri Begawan, Brunei Darussalam.
13. Oliver, J.D., Kaper, J. B. 2001. *Vibrio* species, pp. 263-300. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
14. Su, Y.C., Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. Food Microbiology. 24(6): 549-558.
15. Sakazaki, R. 2002. *Vibrio*, pp.128-136. In: Cliver, D.O., Rieman, H.P. (Eds.), Foodborne Diseases, 2nd ed. Academic Press, Barcelona, Spain.

บทที่ 8

การควบคุมคุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา

การควบคุมคุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา เป็นการควบคุมคุณภาพตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการแปรรูปจนกระทั่งถึงผลิตภัณฑ์สุดท้าย ควรใช้วิธีการวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพ ให้ผลการวิเคราะห์ที่เชื่อถือได้ ซึ่งจะให้การตรวจสอบที่เหมือนกันไม่ว่าจะวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการใดก็ตาม สิ่งนี้สำคัญต่อการส่งสินค้าออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศหรือส่งสินค้าเข้า ผลการวิเคราะห์จะเป็นสิ่งที่ใช้ในการตัดสินใจคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารนั้น แต่ละประเทศจึงได้ตระหนักถึงความสำคัญของการควบคุมคุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา จึงได้จัดทำคู่มือวิเคราะห์อาหารทางจุลินทรีย์ขึ้นเช่น คู่มือวิเคราะห์ที่จัดทำโดย 1) องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration) ได้จัดทำคู่มือ FDA Bacteriological Analytical Manual Online (BAM) 2) American Public Health Association ได้จัดทำคู่มือ Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 3) AOAC INTERNATIONAL ได้จัดทำคู่มือ Official Method of Analysis 4) Food Safety and Inspection Service, USDA ได้จัดทำคู่มือ USDA/FSIS Microbiological Laboratory Guidebook 5) กรมวิทยาศาสตร์บริการ 6) กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และ 7) สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม สามารถอ่านคู่มือวิเคราะห์ได้ทางอินเทอร์เน็ต¹

การวิเคราะห์หาการมีอยู่ของจุลินทรีย์ในอาหาร ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์เป็นพื้นฐานของจุลชีววิทยาทางอาหาร ถึงแม้ว่าวิธีการวิเคราะห์จะมีความสำคัญแต่ก็ไม่มีวิธีใดที่จะสามารถหาจำนวนจุลินทรีย์ในอาหารได้อย่างแน่นอนครบถ้วน แต่ละวิธีการล้วนมีข้อจำกัดด้วยกันทั้งสิ้น แม้ว่าวิธีหนึ่งจะดีกว่าอีกวิธีหนึ่งก็ตาม ในการวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาควรตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เพื่อเป็นดัชนีบ่งชี้ว่าอาหารนั้นผลิตมาอย่างถูกสุขลักษณะหรือไม่ การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในวัตถุดิบมีประโยชน์ในการคำนวณหาเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำลายจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจมีในตัวอย่อาหารที่จะวิเคราะห์ด้วย ควรสอบถามชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีแนวโน้มว่าจะปนเปื้อนในอาหารนั้นเช่น อาหารทะเล ควรตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus* สัตว์ปีกและไข่ ควรตรวจหา *Salmonella* อาหารกระป๋อง ควรตรวจหาจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเช่น *Clostridium botulinum* และ *C. thermosaccharolyticum* เป็นต้น ในการวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาจะต้องทำการเก็บตัวอย่าง ทำการเตรียมตัวอย่าง ดำเนินการวิเคราะห์และแปลผลการวิเคราะห์ ในกรณีที่เป็นผู้ซื้อวัตถุดิบและส่วนผสมอาหารเพื่อนำมาใช้ในโรงงานแปรรูปอาหารจำเป็นต้องคำนึงถึงคุณภาพทางจุลชีววิทยาของวัตถุดิบได้แก่ อาหารสดและส่วนผสมอาหารที่จะรับซื้อ²

8.1 วัตถุดิบ: อาหารสดและส่วนผสมอาหาร

อาหารบางชนิดอาจไม่ได้มีการผลิตในบางประเทศ ประเทศที่ไม่สามารถผลิตอาหารที่ต้องการได้จะต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ อาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ เมล็ดธัญชาติ น้ำตาล โกโก้ ไข่ สัตว์ปีก เนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ ปลาและหอย นํ้านม ผัก ผลไม้ ไขมัน น้ำมัน เครื่องเทศ อาจมีการนำอาหารเหล่านี้มาปรุงเป็นผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ตามความต้องการของผู้บริโภค อาหารเหล่านี้ อาจปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค อาหารหลายชนิดมีรายงานว่า เคยเป็นพาหะของจุลินทรีย์ก่อโรคทำให้เกิดโรคระบาด (ตารางที่ 8.1)²

ตารางที่ 8.1 แบคทีเรียก่อโรคและอาหารที่เป็นพาหะซึ่งเคยเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคระบาด

ชนิดของแบคทีเรียก่อโรค	อาหารที่เป็นพาหะ
<i>Bacillus cereus</i>	ข้าว
<i>Campylobacter jejuni</i>	สัตว์ปีก นํ้านม
<i>Clostridium botulinum</i>	ผัก ถั่วลิสง ปลาแชลมอน น้ำผึ้ง
<i>Clostridium perfringens</i>	ผัก
	เนื้อสัตว์
Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	เนื้อสัตว์
	ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักสลัด
	นมและผลิตภัณฑ์นม
<i>Listeria monocytogenes</i>	นํ้านม เนยแข็ง
	ผลิตภัณฑ์นม
<i>Salmonella</i>	พริก มะพร้าว ผลไม้และน้ำผลไม้
	สัตว์ปีก ไข่ไก่
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	หอย

ที่มา: Bell และคณะ²

เมื่อวัตถุดิบมาถึงโรงงานแปรรูปอาหาร พนักงานที่ทำหน้าที่ควรพิจารณาถึงข้อกำหนด (specification) ของวัตถุดิบที่จะรับซื้อเกี่ยวกับลักษณะและคุณภาพของวัตถุดิบ ภาชนะบรรจุที่เหมาะสม สภาพการขนส่งและการเก็บรักษา รวมทั้งข้อมูลเกี่ยวกับอายุการเก็บรักษาก็มีความสำคัญ ถ้าวัตถุดิบเน่าเสียได้ง่ายและจะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตโดยที่ไม่มีการควบคุมจุลินทรีย์อีกและควร

บ่งบอกข้อมูลทางจุลินทรีย์และทางเคมีด้วยเช่น มีจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์ดัชนีหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสียอยู่ในระดับที่ยอมรับได้หรือไม่ ผู้ขายควรบอกถึงแผนการสุ่มตัวอย่างและวิธีการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาจำนวนจุลินทรีย์ที่ได้ทำการตรวจสอบด้วย ผู้ขายอาจต้องมีใบรับรองการวิเคราะห์ (Certificate of Analysis หรือ อาจเรียกว่า Certificate of Conformance หรือ Certificate of Examination) ของสินค้าแต่ละชุด ใบรับรองนี้จะบันทึกผลการวิเคราะห์ทางเคมีหรือทางจุลินทรีย์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสินค้ามีคุณภาพตามข้อกำหนด ผู้ซื้อและผู้ขายต้องตรวจสอบกันเกี่ยวกับข้อกำหนดนี้²

วัตถุดิบและส่วนผสมอาหารที่จะต้องมีใบรับรองการวิเคราะห์ ส่วนใหญ่มักจะมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคเช่น ผลิตภัณฑ์ไข่เหลว มะพร้าว เครื่องเทศ ซ็อกโกเลตหรือแม้แต่อาหารที่ผ่านความร้อนแล้วเช่น เนื้อสุกและไข่ต้มที่ใส่ในแซนวิช ดังนั้นเมื่อจะรับซื้อวัตถุดิบก่อนอื่นจะต้องมีการตรวจสอบด้วยตาก่อนโดยการสังเกต ตรวจวัดอุณหภูมิและสุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์หรือตรวจสอบเพื่อจุดประสงค์ก่อนการรับซื้อ²

8.2 เกณฑ์กำหนดทางจุลชีววิทยา (Microbiological Criteria)

เกณฑ์กำหนดทางจุลินทรีย์ใช้กับอาหารบางชนิดเพื่อให้เกิดความปลอดภัย หรือเพื่อควบคุมคุณภาพของอาหารโดยรวม ใช้จัดการด้านความเสี่ยงซึ่งบ่งชี้ถึงการยอมรับได้ของอาหาร หลักการทางด้านข้อกำหนดทางจุลินทรีย์เสนอโดย Marxer ในปี ค. ศ. 1903 ซึ่งเขาได้แนะนำว่า เนื้อที่ใช้ทำแฮมเบอเกอร์ควรมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดไม่เกิน 10^6 เซลล์ต่อกรัม หลังจากนั้นในช่วงอีก 20-30 ปีต่อมาได้มีการเสนอให้ใช้ข้อกำหนดทางจุลินทรีย์กับน้ำ นมพาสเจอร์ไรส์ซึ่งได้ยอมรับโดยทั่วกัน²

เกณฑ์กำหนดทางจุลินทรีย์แบ่งเป็น 2 ด้านหลัก ๆ ได้แก่ เกณฑ์ที่ใช้บังคับและเกณฑ์ที่ให้ข้อเสนอแนะ สำหรับเกณฑ์ที่ใช้บังคับนั้นเป็นมาตรฐานอาหารทางจุลชีววิทยาซึ่งเป็นกฎหมายใช้บังคับจำนวนสูงสุดของจุลินทรีย์ ส่วนเกณฑ์ที่ให้ข้อเสนอแนะอาจเป็นข้อกำหนดด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ (microbiological end product specification) โดยมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มหลักประกันด้านสุขลักษณะการผลิตหรือเป็นแนวปฏิบัติทางด้านจุลินทรีย์ (microbiological guideline) ซึ่งเป็นข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการยอมรับจำนวนจุลินทรีย์สูงสุดที่ให้มีได้ในอาหารหรือจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญในอาหารแต่ละประเภท²

Codex ได้กล่าวว่าเกณฑ์กำหนดทางจุลินทรีย์ประกอบด้วย

1. ข้อความที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์และสารพิษจากจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องนั้น
2. วิธีการที่ใช้ตรวจหาหรือเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ชนิดนั้น
3. แผนการสุ่มตัวอย่าง (sampling plan) รวมทั้งเวลาและสถานที่ที่เก็บตัวอย่าง
4. ข้อกำหนดทางจุลินทรีย์ (microbiological limits) ในอาหารเพื่อใช้ในการประเมินผล

5. คำแนะนำในการแปลผลการวิเคราะห์เช่น จำนวนตัวอย่างที่ต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ตรงตามข้อกำหนด

เกณฑ์กำหนดทางจุลชีววิทยาประกอบด้วยสิ่งต่างๆเหล่านี้ประกอบด้วย

- 1.วัตถุประสงค์ของเกณฑ์กำหนด
- 2.ระบบควบคุมความปลอดภัยของอาหาร กระบวนการ ที่มีการประยุกต์ใช้เกณฑ์กำหนดนี้
- 3.จุดเฉพาะในห่วงโซ่อาหารที่ซึ่งมีการประยุกต์ใช้เกณฑ์กำหนดนี้
- 4.ขีดจำกัดด้านจุลินทรีย์ (m , M) หรืออื่นๆ เช่นระดับของความเสีย
- 5.แผนการสุ่มตัวอย่างซึ่งบอกถึงจำนวนตัวอย่างที่จะต้องเก็บ (n) ปริมาณของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์และจำนวนที่เหมาะสมซึ่งยอมรับได้ (c)

เกณฑ์กำหนดทางจุลชีววิทยามักใช้ในข้อตกลงการรับซื้อวัตถุดิบและส่วนผสมอาหารจากผู้ขายเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้ขายต้องปฏิบัติตาม ถ้าสินค้าไม่มีคุณภาพตามที่ระบุ สินค้านั้นอาจถูกปฏิเสธที่จะรับซื้อ เกณฑ์กำหนดทางจุลชีววิทยาอาจได้แก่ ขีดจำกัดของจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรค จุลินทรีย์ดัชนี และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย ปริมาณสารพิษจากจุลินทรีย์ เกณฑ์กำหนดควรกล่าวถึง¹

1. ความบ่อยครั้งในการเก็บตัวอย่าง จุดที่เก็บตัวอย่างเช่น บริเวณที่ทำการแปรรูปหรือบริเวณที่ทำการบรรจุหรือจากห้องเก็บผลิตภัณฑ์สุดท้าย เป็นต้น และบอกจำนวนตัวอย่างที่จะเก็บด้วย
2. มีคำอธิบายของอาหารหรือตัวอย่างที่จะตรวจสอบอย่างชัดเจน เช่น ตัวอย่างที่วิเคราะห์เก็บมาจากจุดเดียวและเก็บครั้งเดียวหรือเป็นตัวอย่างที่เก็บหลาย ๆ ครั้งจากส่วนของสินค้าทั้งหมดในโรงงานแล้วนำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง สิ่งนี้สำคัญโดยเฉพาะอาหารที่มีส่วนประกอบต่างกันเช่นอาหารที่ผลิตตามสูตร ขึ้นต่างๆ ของอาหารอาจมีส่วนผสมต่างกัน เช่น ซอสเนื้อกับมันฝรั่งที่ราดหน้า
3. ควรมีคำอธิบายอย่างชัดเจนของจุลินทรีย์และสารพิษที่เกี่ยวข้อง
4. ต้องมีแผนการสุ่มที่ชัดเจนเช่น ข้อความที่บอกถึงจำนวนและชนิดของตัวอย่างที่สุ่มมาจากโรงงาน ปริมาณที่ต้องตรวจวิเคราะห์ ซึ่งมักได้มาจากการวิเคราะห์อันตรายและข้อกำหนดทางจุลินทรีย์ที่ต้องปฏิบัติตามเพื่อจะได้ไม่ต้องทำการแก้ไขกระบวนการผลิต

8.3 การเก็บตัวอย่าง

สภาพของตัวอย่างที่ได้รับสำหรับการตรวจวิเคราะห์มีความสำคัญมาก ถ้าเก็บตัวอย่างมาอย่างไม่เหมาะสมหรือขนส่งในสภาพที่ไม่เหมาะสม จะไม่สามารถใช้ตัวอย่างนั้นเป็นตัวแทนของชุดผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากผลการวิเคราะห์จะเชื่อถือไม่ได้ ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนมีความสำคัญเมื่อจุลินทรีย์ก่อโรคหรือสารพิษกระจายตัวอย่างเบาบางและไม่สม่ำเสมอในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือกรณีที่

จุลินทรีย์ในตัวอย่างเป็นสิ่งที่ชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างนั้นมีคุณภาพทางจุลินทรีย์ตรงตามข้อกำหนดหรือตรงตามมาตรฐานที่กฎหมายกำหนดหรือไม่ นอกจากนี้จำนวนตัวอย่างที่จะเก็บและวิธีการเก็บตัวอย่างจะต้องเหมาะสมตามหลักสถิติ ต้องคำนึงถึงสถานะของตัวอย่างด้วยว่าเป็นของแข็ง กึ่งแข็ง ขึ้น หรือเหลว¹

โดยทั่วไปอาหารชนิดต่าง ๆ มักจะมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนในปริมาณต่างกันขึ้นอยู่กับสุขลักษณะในกระบวนการผลิต การแปรรูป และการขนส่งอาหาร จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอาจเพิ่มจำนวนขึ้นได้ระหว่างการเก็บตัวอย่างและการขนส่ง ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างและการขนส่งจึงควรทำอย่างระมัดระวัง ถ้าอาหารอยู่ในถังใหญ่ควรเก็บตัวอย่างใส่ในภาชนะเก็บตัวอย่างขนาดเล็กที่มีฝาปิดสนิท ถ้าเป็นตัวอย่างเหลว ควรเก็บเพิ่มมากขึ้นสำหรับใช้ควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่าง วัดอุณหภูมิของตัวอย่าง ณ จุดที่เก็บตัวอย่าง ภาชนะบรรจุตัวอย่างจะต้องเป็นภาชนะปากกว้าง สะอาดแห้ง ไม่รั่ว ปราศจากเชื้อและมีขนาดเหมาะสม ไม่ควรใช้ภาชนะบรรจุที่เป็นแก้วเพราะอาจแตกและทำให้ตัวอย่างปนเปื้อนได้ สำหรับของแห้ง อาจใช้ภาชนะที่เป็นกล่องหรือกระป๋องโลหะ ขวดหรือถุงพลาสติกที่ปิดได้สนิท ถุงพลาสติกปลอดเชื้อเหมาะสมกับของแห้งที่ไม่ได้แช่แข็งเท่านั้น ไม่ควรใส่ตัวอย่างมากเกินไปจนทำให้เกิดรูเมื่อมัดปากถุง ควรเก็บตัวอย่างอย่างน้อย 100 กรัม และเขียนรายละเอียดของตัวอย่างกำกับบน อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างเช่น ช้อน มีดกรรไกร ปากคีบ และ spatula ควรทำด้วยโลหะปลอดสนิมและทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อหรือตู้อบลมร้อน การฆ่าเชื้อโดยการจุ่มด้วยแอลกอฮอล์แล้วฉีกไฟอาจไม่เพียงพอ ควรมีฉลากบันทึกข้อมูลต่างๆ เช่น น้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่าง ชื่อผู้เก็บตัวอย่าง ชนิดของตัวอย่างอาหารและอื่นๆ ข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประกอบการแปลผลการวิเคราะห์²

ในการขนส่งและเก็บรักษาตัวอย่าง อาหารกระป๋องและอาหารแห้งที่ไม่เน่าเสียเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ไม่จำเป็นต้องเก็บในตู้เย็น ควรขนส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการที่ใกล้ที่สุดทันทีโดยพยายามให้ตัวอย่างอยู่ในสภาพเดิมมากที่สุดที่จะเป็นไปได้ และเมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการ ควรวัดอุณหภูมิของตัวอย่าง บันทึกวันและเวลาที่ตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการ สำหรับอาหารแช่แข็งหรืออาหารแช่เย็นควรขนส่งในรถขนส่งตัวอย่างที่มีฉนวนกันความร้อนเข้าออก ควรเก็บตัวอย่างอาหารแช่แข็งใส่ในภาชนะบรรจุที่มีการแช่เย็นมาก่อน เก็บในลักษณะแช่แข็งตลอดการขนส่ง ส่วนอาหารแช่เย็นควรเก็บในสภาพแช่เย็นในน้ำแข็ง 0-4°C ตลอดระยะเวลาการขนส่งจนกระทั่งอาหารมาถึงห้องปฏิบัติการยกเว้นตัวอย่างสัตว์น้ำเปลือกแข็งและของเหลวที่มาจากสัตว์น้ำนั้น อย่าเอาตัวอย่างอาหารแช่เย็นไปแช่แข็งและไม่ควรทิ้งอาหารแช่เย็นไว้นานเกิน 36 ชั่วโมงหลังเก็บตัวอย่าง สำหรับตัวอย่างสัตว์น้ำเปลือกแข็งและของเหลวที่มาจากสัตว์น้ำนั้นควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10°C แต่เหนือจุดเยือกแข็งตลอดระยะเวลาการขนส่ง³

เมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการ ควรทำการวิเคราะห์ทันทีหรือวิเคราะห์ภายในเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมงหลังจากที่ได้รับตัวอย่าง ควรตรวจดูว่าถุงพลาสติกหรือขวดบรรจุตัวอย่างนั้นมีรอยแตก มีรูรั่วหรือรอยฉีกขาดหรือไม่ ฝาปิดขวดเก็บตัวอย่างหายไปหรือไม่ ถ้าหากตรวจพบลักษณะตำหนิดังกล่าว ตัวอย่างที่ตรวจสอบอาจเกิดการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์จากแหล่งอื่นทำให้ไม่สามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้นั้นอาจจะมีจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนรวมอยู่ด้วย นอกจากนี้ตัวอย่างที่ส่งมา²

8.4 แผนการสุ่มตัวอย่าง

แผนการสุ่มตัวอย่างเป็นข้อกำหนดของการยอมรับซึ่งใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารในชุด (lot) นั้น เมื่อตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างในจำนวนที่เหมาะสมด้วยวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสม แผนการสุ่มชั้นสาม (three-class sampling plan) ได้ถูกอธิบายโดย International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF) ซึ่งประกอบด้วยข้อกำหนด n , c , m และ M เป็นสัญลักษณ์ที่ใช้ อธิบายจำนวนตัวอย่างที่ใช้สุ่มมาวิเคราะห์และขีดจำกัดที่ยอมรับได้ ตัวอย่างเช่น เกณฑ์กำหนดทั่วไปของแบคทีเรียโคลิฟอร์มที่ตรวจหาโดยใช้ Violet Red Bile Agar ด้วยเทคนิค pour plate บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับตัวอย่างอาหารแซนวิชที่มีผักสลัดเป็นส่วนประกอบ มี เกณฑ์กำหนดดังนี้ $n = 5$, $m = 100$ CFU ต่อกรัม $M = 1,000$ CFU ต่อกรัม และ $C = 2$ เมื่²

n = จำนวนตัวอย่างที่จะต้องวิเคราะห์ตามแผนการสุ่มตัวอย่าง

c = จำนวนตัวอย่างสูงสุดที่ยอมให้มีจำนวนจุลินทรีย์ที่เกินเกณฑ์กำหนด m และต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ไม่เกิน M

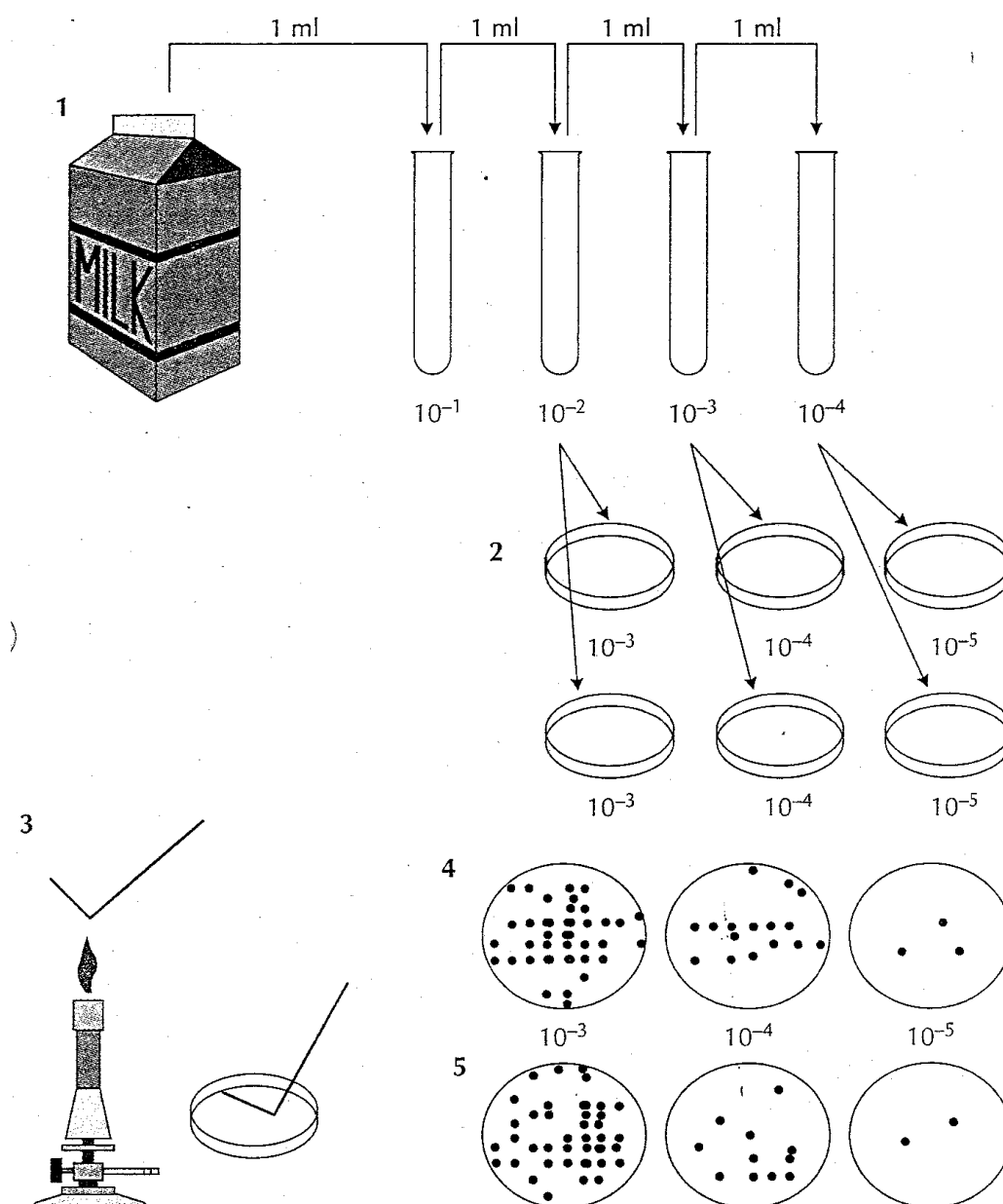
m = จำนวนจุลินทรีย์สูงสุดต่อกรัมที่ยอมให้มีได้ในตัวอย่าง ถ้ามีจำนวนสูงกว่านี้อาจยอมรับหรือไม่ยอมรับก็ได้ในแผนการสุ่มชั้นสาม (three-class sampling plan) ใช้แยกอาหารที่คุณภาพดีออกจากอาหารที่คุณภาพยอมรับได้ ตามเกณฑ์กำหนด

M = จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่าง ถ้าอาหารมีจำนวนจุลินทรีย์สูงกว่า M จะยอมรับไม่ได้ เพราะเกี่ยวข้องกับอันตรายต่อสุขภาพ สุขลักษณะ หรือการเน่าเสียซึ่งเป็นจำนวนที่ใช้แยกอาหารที่มีคุณภาพยอมรับได้ตามเกณฑ์กำหนดออกจากอาหารที่มีคุณภาพยอมรับไม่ได้

8.5 การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์

เมื่อตัวอย่างมาถึงห้องปฏิบัติการควรวิเคราะห์เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ ซึ่งตัวอย่างด้วยเทคนิค ปลอดภัย ปกติใช้ 25 กรัม ถ้าตัวอย่างเป็นของแข็งอาจเจือจางด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น

ร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร หรือใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ก่อนทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวโดยการตีปั่นด้วย stomacher เพื่อว่าจุลินทรีย์จะได้กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอมากที่สุด แล้วเจือจางต่อไปที่ระดับความเจือจางสูงขึ้นจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (รูปที่ 8.1) หรือการวิเคราะห์เพื่อหาจุลินทรีย์เฉพาะ วิธีการพื้นฐานในการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีดังนี้⁴



รูปที่ 8.1 การเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในน้ำนม
ที่มา: Montville และ Matthews⁴

8.5.1 Standard Plate Count (SPC)

วิธีนี้อาจเรียกว่า aerobic plate count (APC) ทำให้ทราบจำนวนจุลินทรีย์โดยประมาณในอาหาร ดังชื่อวิธีวิเคราะห์ที่บ่งบอก จุลินทรีย์พวกที่ไม่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง (strict anaerobe) จะไม่เจริญบนจานเพาะเชื้อ ฉะนั้นผลการตรวจนับที่ได้จึงไม่รวมจุลินทรีย์ประเภทนี้ วิธีนี้เป็นวิธีดั้งเดิมโดยนำอาหารส่วนหนึ่งมาตีปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงทำการเจือจางด้วยสารละลายทำเจือจางที่เหมาะสม แล้วเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม บ่มไว้ระยะเวลาหนึ่งจนกระทั่งเห็นโคโลนีขึ้น ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้น วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุดในการหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต หรือ colony-forming units (CFU) ในผลิตภัณฑ์อาหาร สามารถทำได้โดยใช้เทคนิค pour plate หรือเทคนิค spread plate ซึ่งเทคนิค spread plate จะใช้ได้ดีในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ไซโครโทรฟที่ไวต่อความร้อนเพราะจุลินทรีย์จะไม่สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ยังหลอมเหลวอยู่เหมือนกับกรณี pour plate การใช้เทคนิค spread plate ยังมีความจำเป็นถ้าต้องสังเกตลักษณะของโคโลนีบน selective media เพื่อการจำแนกชนิด เทคนิคนี้ยังเหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริง (strict aerobe) แต่จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) จะเจริญได้ช้าถ้าใช้เทคนิค spread plate ข้อเสียของเทคนิค spread plate ก็คือ การปัญหาการเจริญแผ่ (spreader) โดยเฉพาะเมื่อผิวหน้าอาหารไม่แห้งและปัญหาโคโลนีที่เจริญติดกันแน่น ทำให้นับจำนวนโคโลนีได้ยาก⁵

8.5.2 Most Probable Number (MPN)

วิธีนี้จะเตรียมตัวอย่างและเจือจางตัวอย่างเหมือนกับวิธี SPC ทุกประการ โดยอาจเติมตัวอย่างที่เจือจางแล้วในอาหารเหลวชุดละ 3 หลอด ทั้งหมด 3 ระดับความเจือจางหรือ 5 ระดับความเจือจาง หรืออาจเติมในอาหารเหลวชุดละ 5 หลอดหรือชุดละ 10 หลอดก็ได้ แล้วแต่ชนิดของตัวอย่าง และจำนวนจุลินทรีย์ที่คาดว่าจะมีในตัวอย่าง จะคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้ตาราง MPN โดยทั่วไป ผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้วิธี MPN จะมีค่าสูงกว่าผลจากวิธี SPC การใช้วิธี MPN มีข้อได้เปรียบดังนี้ คือ เป็นวิธีที่ง่าย ผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการหนึ่งมีแนวโน้มว่าจะตรงกับผลจากอีกห้องปฏิบัติการหนึ่งมากกว่าวิธี SPC สามารถใช้วิธี MPN ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะชนิดได้โดยเลือกใช้ selective media ที่เหมาะสมและสามารถใช้วิธี MPN ตรวจหา fecal coliform ได้⁴

8.5.3 Direct Microscopic Count (DMC)

ในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยกล้องจุลทรรศน์ จะต้องเกลี่ยตัวอย่างอาหารให้เป็นฟิล์มบางๆ บนกระจกสไลด์ แล้วย้อมด้วยสีย้อมที่เหมาะสมจากนั้นจึงนับจำนวนเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เทคนิคนี้ใช้กันมากในอุตสาหกรรมนมสำหรับประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำนมดิบ

และผลิตภัณฑ์นมชนิดอื่น วิธีนี้ทำได้โดยบีบน้ำนม 0.01 มิลลิลิตรใส่ในช่องสีเหลี่ยมขนาด 1 ตารางเซนติเมตรบนกระดาษกรอง จากนั้นทำการตรึงเซลล์ ขจัดไขมัน ย้อมสี และทิ้งให้แห้งจึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ข้อดีของวิธีนี้คือ สะดวกรวดเร็ว สามารถสังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์ สามารถใช้ fluorescent probe ได้เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพ ส่วนข้อเสียของวิธีนี้ก็คือ ผู้วิเคราะห์จะเกิดความเมื่อยล้าในการใช้สายตา ผลที่ได้คือ จำนวนเซลล์จุลินทรีย์ทั้งหมดรวมเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว บางครั้งไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างอนุภาคของอาหารและเซลล์จุลินทรีย์ได้ เซลล์ของจุลินทรีย์ไม่กระจายสม่ำเสมอ เซลล์บางเซลล์อาจติดสีย้อมได้ไม่ดี บางเซลล์อาจไม่ถูกนับ ปกติจำนวนจุลินทรีย์ที่นับด้วยวิธี DMC มักสูงกว่าวิธี SPC อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าจะมีข้อเสีย แต่วิธีนี้ยังคงเป็นวิธีที่เร็วที่สุดในการประเมินจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร⁵

8.5.4 Dye Reduction Test

Dye Reduction Test เป็นการทดสอบที่ทำค่อนข้างง่าย Dye Reduction Test ซึ่งใช้ตรวจสอบด้านสุขภาพลักษณะการผลิตนมดิบทำได้ 2 วิธีได้แก่ ใช้สีเมทิลีนบลู (methylene blue test) หรือ เรซาซูลิน (resazurin test) ในการวิเคราะห์จะต้องผสมสีดังกล่าว 1 มล.เข้ากับน้ำนม 10 มล. แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาหนึ่ง จับเวลาที่ใช้ในการทำให้น้ำนมเปลี่ยนสีโดยปฏิกิริยาที่มีผลมาจากแบคทีเรียที่มีอยู่ในน้ำนม ถ้าหากน้ำนมมีคุณภาพต่ำซึ่งมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์จำนวนมาก สีจะเปลี่ยนแปลงเร็ว ในทางตรงข้ามถ้าหากน้ำนมมีคุณภาพสูงซึ่งถูกปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียจำนวนน้อยสีจะเปลี่ยนแปลงช้าอาจใช้เวลาหลายชั่วโมงจึงจะเปลี่ยนสี วิธีนี้ที่ใช้กันมากในการตรวจหาจุลินทรีย์ในน้ำนมเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็วและประหยัด จุลินทรีย์ที่มีชีวิตเท่านั้นที่จะรีดิวซ์สี โดยเมทิลีนบลูจะถูกรีดิวซ์จากสีฟ้าไปเป็นไม่มีสี (เห็นสีขาวของน้ำนม) และเรซาซูลินจะถูกรีดิวซ์จากสีเทาไปเป็นสีชมพูหรือขาว ข้อเสียของวิธีนี้คือ จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถรีดิวซ์สีได้ไม่เท่ากัน⁵

เอกสารอ้างอิง

1. ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. 2528. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหาร เล่ม 2. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
2. Bell, C., Neaves, P., Williams, A. P. 2005. Food Microbiology and Laboratory Practice. Blackwell Science Ltd., UK.
3. Andrews, W.H., Hammack, T.S. 2003. Food sampling and preparation of sample Homogenate. In: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/
4. Montville, T.J., Matthews, K. 2005. Food Microbiology: an Introduction. ASM Press, Washington, DC.
5. Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Science+Business Media, Inc., New York.

บทที่ 9

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ในอาหารด้วยวิธีที่รวดเร็ว

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารได้นำระบบการจัดการคุณภาพและความปลอดภัยตลอดกระบวนการมาใช้นั้นมากกว่าในอดีตซึ่งมักจะทดสอบเฉพาะผลิตภัณฑ์สุดท้าย รวมทั้งการตรวจสอบด้วยสายตา หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับกฎข้อบังคับจึงได้นำระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP) มาใช้เพื่อจัดการเกี่ยวกับคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร การที่ระบบ HACCP จะมีประสิทธิภาพนั้นจำเป็นต้องทำการตรวจติดตามและทำการทวนสอบ ในการตรวจติดตามมักใช้การตรวจสอบทางกายภาพหรือทางเคมีเช่น วัดอุณหภูมิและเวลาในการให้ความร้อนและวัดค่า pH ขณะที่การทวนสอบระบบ HACCP จำเป็นต้องทดสอบว่าอาหารนั้นปราศจากจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* และอื่นๆ ซึ่งมีข้อจำกัดว่า วิธีการตรวจหาเชื้อเหล่านี้ต้องใช้เวลานานจึงจะทราบผล¹

การวิเคราะห์อาหารทางจุลชีววิทยาเป็นสิ่งที่ทำได้ไม่ถนัดเนื่องจากอาหารประกอบด้วยสารอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน วัตถุกันเสียและสารเคมีชนิดอื่น และอาหารยังมีลักษณะทางกายภาพที่ต่างกันเช่น ของแข็ง ของแข็ง ของเหลว หรือกึ่งแข็ง ถ้ารวมลักษณะต่างๆ เหล่านี้เข้าด้วยกันอาจทำให้ยากที่จะตรวจหาจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้การใช้กระบวนการต่าง ๆ ที่จะควบคุมจุลินทรีย์ในอาหารอาจทำให้จุลินทรีย์บางชนิดโดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคเหลือรอดในปริมาณต่ำมาก ทำให้การตรวจหาจุลินทรีย์พวกนี้ต้องใช้วิธีการที่ซับซ้อนยิ่งขึ้น เสียเวลาหลายวันกว่าจะได้ทราบผลการวิเคราะห์ ดังนั้นจึงได้มีผู้พัฒนาวิธีการตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหารด้วยวิธีที่รวดเร็วขึ้น²

วิธีที่รวดเร็ว (rapid methods) หมายถึง วิธีที่ลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ลง และได้ผลรวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม (conventional method) ซึ่งจะเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สิ่งสำคัญสำหรับวิธีการวิเคราะห์ใดๆ ก็คือจะต้องมีความถูกต้องแม่นยำ (accuracy) ซึ่งรวมถึง ความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ความไว คือความสามารถของวิธีการวิเคราะห์ที่จะตรวจหาจุลินทรีย์เป้าหมายที่ต้องการตรวจหาที่มีอยู่จำนวนน้อยในตัวอย่างได้ วิธีการวิเคราะห์ที่ดีควรมีความไวสูงมากเท่าที่จะเป็นไปได้ และความจำเพาะ (specificity) คือความสามารถในการแยกความแตกต่างของจุลินทรีย์เป้าหมายออกจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น วิธีการวิเคราะห์ที่ไม่ดีอาจทำให้เกิดผลลบหลอก (false-negative result) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ไม่สามารถตรวจหาจุลินทรีย์เป้าหมายที่มีอยู่ได้ และผลบวกหลอก (false-positive result) ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ให้ผลบวก (บอกว่ามีเชื้อ) ทั้ง ๆ ที่ไม่มีเชื่อนั้นอยู่ในตัวอย่าง²

9.1 การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธีที่รวดเร็ว

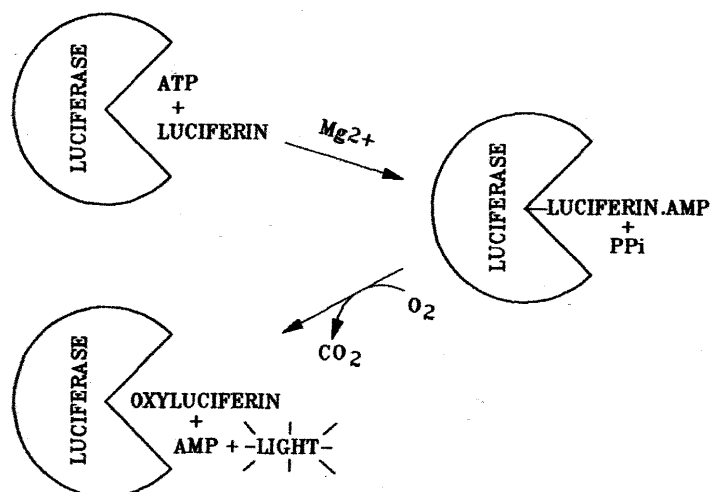
9.1.1 การวัดปริมาณแอดีนอซีนไตรฟอสเฟต (Adenosine Triphosphate Measurement)

วิธีนี้อาศัยประโยชน์จากความจริงที่ว่า เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดประกอบด้วย ATP ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานแหล่งแรกสำหรับสิ่งมีชีวิต หลังจากเซลล์ตาย ATP จะหายไปอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสามารถใช้ปริมาณ ATP เป็นสิ่งบ่งบอกถึงชีวมวลและการมีชีวิตของเซลล์ได้ โดยทั่วไปปริมาณ ATP ต่อเซลล์ค่อนข้างคงที่โดยมีปริมาณ 10^{-18} - 10^{-17} โมลต่อแบคทีเรีย 1 เซลล์ซึ่งคิดเป็น 4×10^4 โมลาร์ต่อแบคทีเรีย 10^5 CFU ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตพวกโพรคาริโอต ATP ในเซลล์ระยะ log phase ปกติมีประมาณ 2-6 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งโดยที่ไม่คำนึงถึงสารอาหารที่เซลล์ได้รับ³

วิธีที่ง่ายในการวัด ATP ก็คือการใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์กับสับสเตรท (firefly luciferin-luciferase) ที่มีอยู่ในหางของแมลงวัน ช่วยในการเปลี่ยนพลังงานเคมีใน ATP ให้เป็นแสง ปฏิกิริยาไบโอลูมิเนสเซนซ์ (bioluminescence reaction) ถูกเร่งโดย *Photinus* enzyme ซึ่งก็คือเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (luciferase) ปฏิกิริยานี้ใช้พลังงานเคมีที่มีอยู่ในโมเลกุลของ ATP ในการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟดีคาร์บอกซิเลชัน (oxidative decarboxylation) ของลูซิเฟอริน (luciferin) เป็นผลให้เกิดการปล่อยแสงออกมาซึ่งวัดได้โดยใช้เครื่องมือ scintillation spectrophotometer หรือที่เรียกว่าลูมิโนมิเตอร์ (luminometer) ปริมาณแสงที่สร้างโดย firefly luciferase เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ ATP ที่เติมลงไป กลไกการเกิดปฏิกิริยาที่รวดเร็วนี้นี้แสดงดังภาพที่ 9.1^{3,4}

ลูซิเฟอรินเป็นสารประกอบที่เดิมแยกได้จากแมลงวันแถบอเมริกาเหนือ (North American firefly) ชื่อ *Photinus pyralis* แต่ปัจจุบันผลิตจากจุลินทรีย์ที่มีการตัดต่อทางพันธุกรรม (genetic-engineered microorganism) วิธีการวัดปริมาณ ATP เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว ในจุลชีววิทยาคลินิก (clinical microbiology) ใช้วิธีนี้ในการคัดเลือกว่าตัวอย่างยูรีน (urine) นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการประมาณชีวมวลใน activated sludge และมีประโยชน์ในการประมาณจำนวนแบคทีเรียในอาหารด้วย แต่ปัญหาคือจะต้องขจัด ATP ที่ไม่ใช่ ATP ของจุลินทรีย์ (nonmicrobial ATP) เสียก่อน ซึ่งมีผู้ใช้ Triton X-100 และอะไพเรส (apyrase) ในการทำลาย ATP ที่ไม่ได้มาจากแบคทีเรียในตัวอย่างยูรีน ในตัวอย่างเนื้อ มีผู้ทดลองขจัด ATP ที่ไม่ใช่ ATP ของจุลินทรีย์โดยใช้ 3 ขั้นตอน คือ 1) การเซนตริฟิวส์ (centrifugation) 2) การใช้ cation exchange resin และ 3) การกรองเพื่อกำจัดอนุภาคของอาหารและเก็บรวบรวมเซลล์ของแบคทีเรียบนแผ่นกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน จากนั้นจึงวิเคราะห์หาปริมาณ ATP จากแบคทีเรียที่อยู่บนแผ่นกรอง ซึ่งพบว่าแบคทีเรียร้อยละ 70-80 ของแบคทีเรียทั้งหมดบนแผ่นกรองได้ถูกทำให้พื้นถิ่นสภาพ จากนั้นจึงนำปริมาณ ATP ที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียปริมาณในช่วง 10^6 - 10^9

CFU ต่อกรัมจะให้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง จากการใช้วิธีนี้ตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อมดพบว่า
ทราบผลภายใน 20-25 นาที³



ภาพที่ 9.1 ปฏิกริยา ATP bioluminescence

ATP = adenosine triphosphate; Luciferin.AMP = luciferyl adenylate;

PPi = pyrophosphate; AMP = adenosine monophosphate

ที่มา: Kyriakides และ Patel⁴

9.1.2 *Limulus* amoebocyte lysate test สำหรับการตรวจหาเอนโดทอกซิน

แบคทีเรียแกรมลบมีเอนโดทอกซิน(endotoxin) ซึ่งส่วนประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอก ทำให้
เกิดไข้เพราะเอนโดทอกซินเข้าสู่กระแสเลือด การทดสอบนี้ใช้เฉพาะแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้นในการ
ทดสอบนี้จะใช้ไลเซตโปรตีน (lysate protein หรือ *Limulus* lysate) ที่ได้จากเซลล์เม็ดเลือด (ที่จริงก็
คือ hemolymph) หรือ อะมีโบไซต์ (amoebocytes) ของ horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) เท่าที่
ทราบไลเซตโปรตีนนี้ เป็นสารที่ไวที่สุดต่อเอนโดทอกซินโดยสามารถกระทำกับเอนโดทอกซิน 1 พิ
โคกรัม (picogram) ซึ่งเท่ากับปริมาณของเอนโดทอกซินของ *E. coli* 300 เซลล์ ถ้าต้องการทดสอบหา
จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ต้องเติมตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ลงไปผสมสารที่ทำให้เซลล์แตก
รวมทั้งลึมูลัสไลเซตลงไป (*Limulus* lysate) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที ถ้า
หากมีเอนโดทอกซินจะเกิดเจลขึ้น แล้วจับเวลาที่เกิดเจล (coagulate) เวลาที่ใช้ในการเกิดเจลจะสัมพันธ์
กับจำนวนแบคทีเรียแกรมลบ จากการศึกษาพบว่าการใช้วิธีนี้สามารถตรวจพบ *Pseudomonas* ในเนื้อ
ได้ในปริมาณต่ำถึง 10² CFU ต่อกรัม การทดสอบนี้ใช้กันไม่มากเพราะทำยากแต่มีศักยภาพถ้าสนใจ
เฉพาะแบคทีเรียแกรมลบซึ่งอาจจะเป็นจุลินทรีย์ไซโครโทรฟที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีข้อเสียคือ

การทดสอบนี้ตรวจหาทั้งแบคทีเรียแกรมลบที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารไปพร้อม ๆ กัน^{1,3}

วิธีนี้ประยุกต์ใช้ในอาหารเป็นครั้งแรกโดยใช้ตรวจสอบการเน่าเสียของเนื้อมด เนื่องจากการเน่าเสียของเนื้อสดแช่เย็นปกติมีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ การทดสอบนี้จึงใช้ได้ดีและได้ผลรวดเร็วในการหาจำนวนแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด นอกจากนี้ยังใช้ได้สำเร็จในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมโดยใช้ประเมินคุณภาพด้านสุขลักษณะของน้ำนมจากการตรวจหาโคลิฟอร์มทั้งก่อนและหลังการพาสเจอร์ไรส์และการประเมินคุณภาพทางจุลินทรีย์ของปลาดิบและผลิตภัณฑ์ไก่วงสุก³

9.1.3 Direct Epifluorescent Filter Technique (DEFT)

Direct epifluorescent filter technique (DEFT) เป็นวิธีทางตรง (direct method) ในการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ที่รวดเร็ว เริ่มแรก Pettipher และคณะ⁵ ได้ทดลองใช้ DEFT ในการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียในน้ำนมดิบ สามารถทำการตรวจนับได้ภายใน 25-30 นาที และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีในน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นมชนิดอื่นได้ต่ำถึง 6.0×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถแยกความแตกต่างของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้วได้

ความไว (sensitivity) ของเทคนิค DEFT เป็นผลมาจากเซลล์ถูกทำให้เข้มข้นโดยการกรองก่อนที่จะย้อมสี ความสามารถในการที่จะแยกความแตกต่างของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายมีผลมาจากสีย้อม nucleophilic fluorochrome ชนิดแอคริดีนออเรนจ์ (acridine orange) ซึ่งจะเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ทำให้เห็นเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญที่ต่างกันมีสีต่างกัน การที่เซลล์จะเรืองแสงทำให้เห็นเป็นสีได้นั้นขึ้นกับปริมาณ RNA และ DNA ที่มีอยู่ในเซลล์ โดย RNA จะเรืองแสงสีแดงและ DNA จะเรืองแสงสีเขียว นอกจากนี้ยังขึ้นกับความสามารถในการผ่านเข้าออกของสีย้อมแอคริดีนออเรนจ์ โดยทั่วไปเซลล์ที่มีชีวิตจะเรืองแสงสีแดงและส่วนเซลล์ที่ตายแล้วจะเรืองแสงสีเขียว กฎนี้ใช้ได้เฉพาะกับแบคทีเรีย แต่มีข้อยกเว้นเช่น เซลล์ที่ถูกทำลายด้วยความร้อนอาจเรืองแสงสีแดง⁶

การใช้ DEFT ในการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียในน้ำนม ก่อนอื่นจะต้องนำน้ำนม 2 มิลลิลิตรมาเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน (trypsin) 0.5 มิลลิลิตรและสารละลาย Triton X-100 นำไปปั่นที่อุณหภูมิ $50 \pm 1^\circ\text{C}$ เพื่อป้องกันการอุดตันของแผ่นกรองอันเนื่องมาจากโซมาติกเซลล์ (somatic cells) และเม็ดไขมันในน้ำนม จากนั้นนำมารองผ่านแผ่นกรอง (Nucleopore membrane filter) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมครอนสำหรับกรองแบคทีเรีย โดยใช้เครื่องกรองที่มีชื่อว่า five-way filter manifold ต่อกับปั๊มสุญญากาศที่ความดัน 100 KPa ก่อนกรองควรอุ่นเครื่องกรองด้วยสารละลาย Triton X-100 ที่อุณหภูมิ 50°C ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นย้อมสีด้วยแอคริดีนออเรนจ์ นำแผ่นกรองมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์^{5,6}

9.1.4 Fluorescent Antibody technique

วิธีนี้ใช้กันมากทั้งในทางจุลชีววิทยาคลินิกและจุลชีววิทยาทางอาหาร ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค. ศ. 1942 โดยจะเติมแอนติบอดีลงไปจับกับแอนติเจนก่อนจากนั้นทำให้เรืองแสงได้โดยเติมสารประกอบฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent compound) ซึ่งตรวจสอบได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ สารประกอบฟลูออเรสเซนต์ที่ใช้กันมากได้แก่ โรดามีน (rhodamine) ฟลูออเรสซินไอโซไซยาเนต (fluorescein isocyanate) และฟลูออเรสซินไอโซไทโอไซยาเนต (fluorescein isothiocyanate)³

9.2 การตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธีที่รวดเร็ว

การวิเคราะห์อาหารถึงการมีอยู่ของจุลินทรีย์ก่อโรคเป็นสิ่งที่ปฏิบัติกันทั่วไปในปัจจุบัน เพื่อเป็นหลักประกันว่า อาหารนั้นมีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีวิธีการพื้นฐานดั้งเดิมหลายวิธีที่ใช้กันในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค ส่วนใหญ่จะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตให้เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อมาเมื่อมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาใช้ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงวิธีการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ในอาหารเป็นวิธีที่เฉพาะมากขึ้น ได้ผลรวดเร็วขึ้นและมีความไวมากกว่าวิธีพื้นฐาน ซึ่งมักจะเรียกวิธีการที่พัฒนาขึ้นว่า “วิธีที่รวดเร็ว (rapid methods)” โดยมีการใช้เทคโนโลยีในการพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเช่น ใช้สารตั้งต้น (substrate) และเอนไซม์ชนิดพิเศษ ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) กรดนิวคลีอิกและ PCR (Polymerase Chain Reaction)^{2, 7, 8}

การตรวจหาจุลินทรีย์ในอาหารโดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ยังคงมีปัญหามากหลายประการ ตัวอย่างเช่น การกระจายของจุลินทรีย์ที่ไม่สม่ำเสมอในอาหาร นอกจากนั้นอาหารที่ใช้วิเคราะห์ยังมีส่วนประกอบซับซ้อนเช่น มีส่วนผสมหลายชนิดรวมถึง โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน น้ำมัน สารเคมี วัตถุกันเสียและสารประกอบอื่นๆ รูปแบบของอาหารที่แตกต่างกันเช่น เป็นผง ของเหลว เจล ของแข็ง กึ่งแข็ง และรูปแบบอื่นๆ การที่อาหารประกอบด้วยไขมันและน้ำ ทำให้ยากที่จะผสมอาหารให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้เกิดปัญหาในการวิเคราะห์หรือการแยกจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนี้อาหารที่นำมาวิเคราะห์อาจมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ปกติเจริญในอาหารนั้น ในอาหารสดบางชนิดได้แก่ ผักงอก (sprouts) อาจมีเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากถึง 10^8 เซลล์ต่อกรัม จุลินทรีย์เหล่านี้ที่มีอยู่ตามปกติ โดยทั่วไปไม่มีอันตรายต่อสุขภาพ แต่มักจะขัดขวางการแยกเชื้อและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งมักพบในปริมาณต่ำมาก การขัดขวางของจุลินทรีย์ประจำถิ่นนี้มีความสำคัญเมื่อตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น *Shigella* sp. และ *Escherichia coli* O157:H7 การรับประทานเซลล์ของจุลินทรีย์ชนิดนี้เข้าไปในปริมาณน้อย ก็ทำให้เกิดโรคได้^{2, 7, 8} จุลินทรีย์ปกติที่มีอยู่และอนุภาคของอาหารที่ซับซ้อนยังคงเป็นปัญหาต่อไปถ้าจุลินทรีย์ก่อโรคนั้นเกิดการบาดเจ็บ กระบวนการแปรรูปที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารหลายกระบวนการเช่น การให้ความร้อน การแช่เย็น การแช่แข็ง การทำแห้ง การใช้ความดันออสโมติก การใช้สารเคมี วัตถุกันเสีย และปัจจัยอื่นๆ สามารถทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์บาดเจ็บได้แต่ไม่ตาย ซึ่ง

เซลล์ที่บาดเจ็บนี้จะไวต่อสารยับยั้งหลายชนิดหรือไวต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้เป็นส่วนผสมใน selective enrichment media^{2, 7, 8}

ดังนั้นเพื่อที่จะแก้ไขปัญหาดังกล่าว จะต้องทำการดัดแปลงวิธีการวิเคราะห์พื้นฐานที่ใช้กันอย่างสม่ำเสมอ วิธีหนึ่งที่ใช้กันอย่างมีประสิทธิภาพก็คือการ enrichment ตัวอย่างอาหารที่จะวิเคราะห์เพื่อส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งวิธีการมักจะเริ่มด้วยขั้นตอน “preenrichment” ซึ่งเป็นขั้นตอนที่จะต้องบ่มอาหารใน nonselective media เพื่อที่จะให้เซลล์ที่บาดเจ็บหรือเซลล์ที่ได้รับสภาพเครียดเกิดการรักษาตัวเองและเพิ่มจำนวนขึ้น จากนั้นจึงถ่ายตัวอย่างไปยังอาหารในขั้นตอนที่ 2 คือ “selective enrichment” ในขั้นนี้จุลินทรีย์ก่อโรคที่ต้องการตรวจหาจะเจริญขึ้นขณะที่จุลินทรีย์ประจำถิ่นถูกยับยั้ง ในบางครั้งอาจมีขั้นตอน “post enrichment” อีกหนึ่งขั้นตอน ก็เพื่อเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรคจนถึงระดับที่ตรวจสอบได้ จากนั้นจึงเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกความแตกต่าง (selective and/or differential media) ซึ่งโคโลนีที่ขึ้นจะถูกยืนยันอย่างคร่าวๆ ก่อนที่จะทดสอบทางชีวเคมีและทดสอบทางซีโรวิทยา (serological typing) ต่อไป ถึงแม้ว่าวิธีการพื้นฐานที่กล่าวมานี้จะมีประสิทธิภาพและใช้กันมากสำหรับแยกเชื้อและจำแนกชนิดจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร แต่มีข้อเสียคือสิ้นเปลืองแรงงานและใช้เวลานานกว่าจะทราบผล ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วขึ้น^{2, 7, 8}

วิธีที่รวดเร็ว อาจเป็นวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีพื้นฐาน ซึ่งจะทำให้ใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นกว่าการใช้วิธีพื้นฐาน ดังนั้นวิธีการใดๆ ที่ดัดแปลงเพื่อให้ลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ลงจะเรียกว่า วิธีที่รวดเร็ว (rapid method) แต่เดิมไม่มีการใช้วิธีที่รวดเร็วจนกระทั่งช่วงปลาย ค.ศ. 1940 – 1947 Weaver และผู้ร่วมงานได้พัฒนาวิธีการที่ใช้ในการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ โดยใช้เซลล์ที่เข้มข้นกับสารที่ใช้ทดสอบปริมาณน้อย เพื่อเร่งเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งทำให้มีการผลิตชุดทดสอบทางชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิด ซึ่งชุดทดสอบนี้เป็นที่นิยมมากในการทดสอบทางจุลชีววิทยาคลินิกในช่วงกลางระหว่างปี ค.ศ. 1970 – 1979 และนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจจุลินทรีย์ในอาหาร ในช่วงปี ค.ศ. 1980 -1989 นอกจากนี้ยังมีการคิดค้นวิธีอื่น แต่การพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วในการตรวจหา (detection) และจำแนกชนิด (identification) ของเชื้อจุลินทรีย์เป็นไปอย่างช้าจนกระทั่งมีการพัฒนาด้านเทคโนโลยีชีวภาพ^{2, 7, 8}

วิธีที่รวดเร็วมักเป็นวิธีที่มีความไว และมีความจำเพาะมากกว่าวิธีพื้นฐาน ในการตรวจหาหรือจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร วิธีที่รวดเร็วสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) วิธีการใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีขนาดเล็ก (miniaturized biochemical identification kits) 2) วิธีพื้นฐานดัดแปลง (modification of conventional microbiological methods) 3) nucleic acid – based assays และ 4) antibody - acid based assays แม้ว่าวิธีการเหล่านี้ จะใช้นานน้อยกว่าวิธีพื้นฐาน แต่ในการจำแนกชนิดวิธีการที่ใช้อาจรวดเร็วจริง แต่จำเป็นต้องใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการตรวจสอบ จึงต้องใช้เวลาในการทำให้เชื้อเจริญและแยกให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคจำเป็นต้องอาศัยขั้นตอนการ enrichment ตัวอย่างอาหาร ก่อนการตรวจสอบ ซึ่งเวลาที่ใช้ทั้งหมดโดยรวมแล้ว ต้องใช้เวลา 2-3 วัน

หรือนานกว่า บางวิธีอาจลดระยะเวลาในขั้นตอนการ preenrichment ลง ทำให้ใช้เวลาโดยรวมสั้นกว่าวิธีพื้นฐาน^{2, 7, 8}

9.2.1 การใช้ชุดทดสอบทางชีวเคมีมีขนาดเล็ก (Miniaturized Biochemical and other Identification Assays)

เมื่อแยกแบคทีเรียจากอาหารได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปต้องนำมาจำแนกชนิด โดยการทดสอบทางชีวเคมีซึ่งจะสิ้นเปลือง อาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้แรงงานมาก ดังนั้นในช่วงปี ค. ศ. 1940 – 1949 จึงได้มีผู้ริเริ่มที่จะใช้วิธีการทดสอบทางชีวเคมีที่รวดเร็วโดยใช้หลอดเล็กๆ ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่จะทดสอบและใช้สารแขวนลอยของเซลล์ที่เข้มข้น เพื่อลดเวลาการบ่มลง วิธีนี้นิยมใช้ในจุลชีววิทยาคลินิกและต่อนานิยมใช้ การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหาร¹

ชุดทดสอบทางชีวเคมีขนาดเล็ก (miniaturized biochemical test kit) ใช้สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากอาหาร ชุดทดสอบส่วนใหญ่ประกอบด้วยอุปกรณ์ที่แบ่งเป็นช่องเล็กๆ สามารถใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือสารตั้งต้นได้ 15-30 ชนิด ใช้สำหรับการจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเฉพาะ ส่วนใหญ่ต้องบ่มนาน 18-24 ชั่วโมง ยกเว้นบางชุดทดสอบสามารถทราบผลภายใน 4 ชั่วโมงโดยทั่วไป ชุดทดสอบขนาดเล็กนี้ ให้ความถูกต้อง 90-99% เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีพื้นฐาน¹

9.2.2 การดัดแปลงวิธีพื้นฐานและใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษ

วิธีที่รวดเร็วก่อนนี้มีหลายวิธีตั้งแต่การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพิเศษในการดัดแปลงวิธีพื้นฐานเป็นผลให้ใช้เวลา วัสดุและแรงงานลดลง วิธีนี้ได้แก่ 1) การใช้แผ่นฟิล์มแห้ง (rehydratable dry film) ที่ประกอบด้วยแผ่นฟิล์มพลาสติก 2 แผ่น ด้านหนึ่งเชื่อมติดกับอีกแผ่นหนึ่งที่เคลือบด้วยส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และเจลที่ละลายน้ำเย็นได้เช่น แผ่นเพตริฟิล์ม (Petrifilm) ของบริษัท 3M ซึ่งมีทั้งแผ่นฟิล์มสำหรับการตรวจหาจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศทั้งหมดและแผ่นฟิล์มที่มีส่วนผสมที่ใช้คัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับการตรวจหาจุลินทรีย์บางชนิด วิธีนี้ลดขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประหยัดเนื้อที่ในการบ่มและเก็บรักษา 2) Isogrid tests วิธีนี้ใช้ hydrophobic grid membrane filters (HGMF) ที่ออกแบบพิเศษ ทำให้สามารถตรวจนับจำนวนเซลล์ที่หนาแน่นมาก ซึ่งจะลดระดับความเจือจางที่ต้องทำลงก่อนที่จะกรอง วิธีนี้สามารถวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ได้ในตั้งแต่ 80-1,600 CFU ต่อมิลลิลิตร ในการวิเคราะห์จะทำการเจือจางตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:10 จากนั้นจึงกรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรอง (filter membrane) ตามด้วยการนำแผ่นกรองไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมนำไปบ่มทั้งคืนเพื่อให้โคโลนีขึ้นและหาจำนวนโคโลนีบนแผ่นกรอง³

9.2.3 Nucleic acid – based assays

9.2.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายได้รวดเร็วที่สุดในบรรดาวิธีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลในการตรวจหาและจำแนกชนิดของแบคทีเรียและไวรัสในอาหาร การที่มีการใช้วิธีนี้มากขึ้นเนื่องจากวิธีนี้มีความไว และความจำเพาะสูง เทคนิคนี้ที่ถูกเผยแพร่ครั้งแรกในปี ค. ศ. 1971 ใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ในอาหาร ได้มากกว่าการตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์

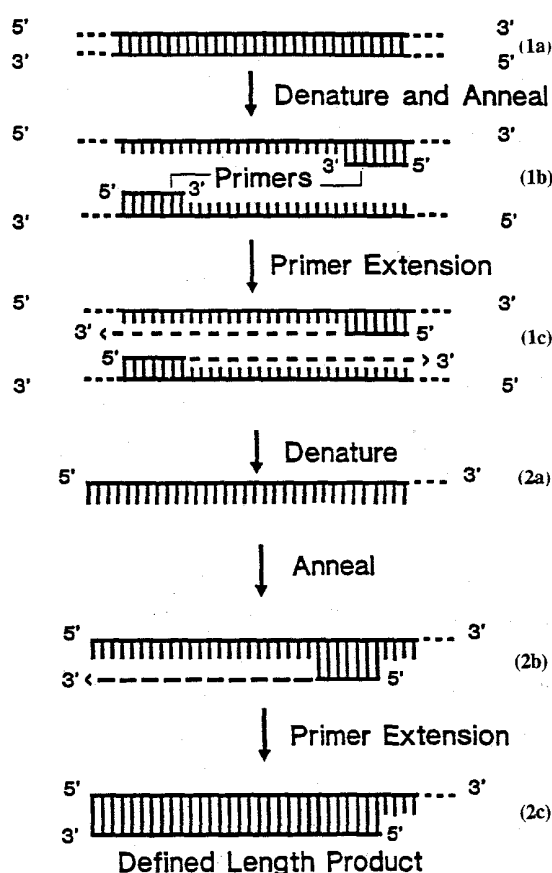
วิธี PCR เป็นวิธีรวดเร็วมาก ได้ถูกพัฒนาใช้ในการเพิ่มจำนวนสาย DNA ภายในระยะเวลาอันสั้นโดยสามารถใช้วิธีนี้ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารได้ภายในเวลา 3-4 ชั่วโมง วิธี PCR เป็นวิธีที่มีการเพิ่มจำนวนสาย DNA จำเพาะที่ต้องการใช้เป็น DNA เป้าหมาย (target DNA) ที่จะตรวจหาจากตัวอย่าง โดยบริเวณหนึ่งของสาย DNA ที่จะทำให้เพิ่มจำนวนจะถูกจับกับ oligonucleotide primers คู่หนึ่ง ปลาย 3' จะเป็นจุดเริ่มต้นของการของดีเอ็นเอเรพริเคชัน (DNA replication) ในเฟสแรก ในสภาพที่มีไพเมอร์มากเกินพอเป็นพันล้านเท่ารวมทั้งมีเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนเช่น *Taq polymerase* ที่ได้จากแบคทีเรียชอบความร้อน (thermophilic bacteria) ชื่อ *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีและทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง เอนไซม์นี้ช่วยเร่งการสังเคราะห์ DNA สายใหม่หลังจากสายคู่ของ DNA จะถูกทำให้เสียสภาพและแยกออกจากกัน จากนั้นจึงถูกทำให้เย็นลง (ภาพที่ 9.2) เมื่อเย็นลงจะมี DNA เป้าหมายที่จับอยู่กับไพเมอร์จำนวนมาก จากนั้นดีเอ็นเอเรพริเคชันจึงเริ่มขึ้นในที่สุดก็จะได้ DNA สายดั้งเดิมกับ DNA สายใหม่ อุณหภูมิในขั้นตอน annealing นี้สำคัญต่อการควบคุมความถูกต้องของกระบวนการเพิ่มจำนวน DNA (amplification process) ถ้าใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ต่ำเกินไปเป็นผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนอย่างไม่จำเพาะ (non-specific amplification) แต่ถ้าใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing สูงเกินไป ไพเมอร์จะไม่จับกับ DNA เป้าหมายอย่างคงตัวเป็นผลให้ไม่เกิดการเพิ่มจำนวนของสาย DNA ในการทำ PCR การให้ความร้อนทั้งกระบวนการจะถูกควบคุมโดยโปรแกรมการให้ความร้อนที่ได้ตั้งไว้โดยเครื่อง thermocycler ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถปรับอุณหภูมิให้ได้ที่ระดับที่ต้องการอย่างรวดเร็ว อุณหภูมิจะเพิ่มขึ้นเพื่อแยกสาย DNA จากนั้นทำให้เย็นลงเพื่อให้ไพเมอร์เข้าจับและเกิดดีเอ็นเอเรพริเคชัน สาย DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในรอบแรกจะเป็นแม่แบบของรอบถัดไป ซึ่ง thermocycling ปกติจะเกิดซ้ำประมาณ 30-40 รอบทำให้มี DNA เพิ่มจำนวนขึ้นเป็นล้านเท่า^{7,9}

ในการทำ PCR ถ้าใช้เชื้อบริสุทธิ์จะมีความไวสูงมาก แต่เมื่อตรวจสอบจุลินทรีย์ในอาหารซึ่งมีสารอาหารซับซ้อนยังคงต้องทำ preenrichment ตัวอย่าง สรุปก็คือ ปรึกษาของวิธีการนี้จะนับเป็นรอบ (cycle) ในแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ 1) Denaturation ขั้นนี้ DNA เป้าหมายจะถูกทำให้เสียสภาพ (denature) โดยถูกแยกเป็น DNA สายเดี่ยว 2) Primer Annealing ขั้นนี้ต้องเติมไพเมอร์ (primer) ที่จำเพาะซึ่งมีลำดับเบสตรงกับลำดับเบสด้านข้างของส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อปล่อยให้จับกับลำดับเบสที่เข้าคู่กัน และ 3) Primer Extension ขั้นนี้จะเกิดการ สร้าง DNA สายใหม่ต่อจากไพเมอร์ที่เข้าจับกับ DNA ต้นแบบ (template) แล้วได้เป็น DNA สายใหม่ที่มีลำดับเบสเหมือนกับสายแรก

ในการทำ PCR เมื่อสารพันธุกรรมเริ่มต้นเป็น dsDNA ซึ่งจะถูกให้ความร้อนที่ 95°C เพื่อแยก DNA สายคู่ (double-stranded DNA) ให้เป็นสายเดี่ยว แต่เมื่อสารพันธุกรรมเริ่มต้นเป็น RNA เช่น RNA viruses จะถูกเปลี่ยนเป็น dsDNA โดยการใช้ reverse transcriptase (RT-PCR) หลังจากให้ความร้อนเพื่อแยกสาย DNA จะถูกทำให้เย็นลงถึง 55°C ในสภาพที่มี oligonucleotide primers ซึ่งจะเข้าจับกับ DNA สายเดี่ยวทั้งสอง จากนั้นจึงเติมเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) รวมทั้ง dATP, dCTP, dTTP และ dGTP (“d” = deoxynucleotide; A = adenine; TP = triphosphate และอื่นๆเป็นต้น สารเหล่านี้เป็น precursors สำหรับการสังเคราะห์ DNA) เป็นผลให้เกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ (complementary strands) เมื่อทำปฏิกิริยาครบทั้ง 3 ขั้นตอนนี้เรียกว่า 1 รอบ จะได้ DNA 2 สายคู่ กระบวนการจะเริ่มเกิดขึ้นซ้ำ เมื่อทำครบ 2 รอบ จาก DNA 2 สายคู่จะได้เป็น DNA 4 สายคู่และถ้าทำครบ 3 รอบจาก DNA 4 สายคู่จะได้ DNA 8 สายคู่ดังนี้ไปเรื่อยๆ สาย DNA ที่ได้ทั้งหมดรวมเรียกว่า ผลิตภัณฑ์ของการทำ PCR (PCR products) ภายใน 2 ชั่วโมงจะได้สาย DNA ล้วนจากสาย DNA เพียงคู่เดียว ปริมาณของ DNA ที่เพิ่มขึ้นสามารถสังเกตเห็นได้จาก band ที่เกิดขึ้นบน ethidium bromide-stained electrophoresis gel ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันมากในการตรวจสอบผลผลิตของการทำ PCR ชุดทดสอบที่มีจำหน่ายได้แก่ 1) BAX system (ของบริษัท Qualicon, Dupont Corp.) ใช้ตรวจหา *E. coli* O157: H7, *Salmonella* และ *Listeria* 2) Probelia (ของบริษัท Sanofi Diagnostics Pasteur) และ 3) Foodproof (ของบริษัท Bioteccon Diagnostics) ชุดทดสอบเหล่านี้จะมีสารที่ต้องใช้ทั้งหมดให้มากับชุดทดสอบด้วยเช่น ไพเมอร์ เอนไซม์และ deoxyribonucleosides รวมทั้งหลอดทดสอบด้วย^{2, 7, 9}

ปัจจุบันมีชุดทดสอบ PCR ที่มีการผลิตขึ้นจำหน่ายเพื่อการจำแนกชนิดแบคทีเรียก่อโรค ถึงแม้ว่าวิธี PCR จะ มีความไวสูงมากแต่ก็มีข้อเสียได้แก่ อุปกรณ์ที่จำเป็นต้องใช้สำหรับการทำ PCR ก่อนข้างแพงและต้องอาศัยความชำนาญในการทำ ความซับซ้อนขององค์ประกอบอาหารเช่น การมีไขมัน โปรตีนสูงและสารประกอบอื่นๆ รวมทั้งสารยับยั้งจะมีผลต่อการจับของไพเมอร์หรือมีผลต่อประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวน DNA ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดผลลบหลอก (false negative) ในการทดสอบทางจุลชีววิทยาคลินิกมีรายงานการพบตัวยับยั้ง PCR (PCR inhibitor) ในอุจจาระ ชีรุมและเลือด ในดินที่มีธาตุเหล็กมีผลต่อการจับของไพเมอร์หรือการยับยั้งการเพิ่มจำนวน DNA (PCR amplification) การใช้ PCR ในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยเฉพาะอาหารที่มีโปรตีนไขมันสูงเช่น ไข่ เนื้อ เนยแข็งชนิดอ่อน หอยนางรม มีแนวโน้มที่จะมีปัญหาการขัดขวางการเพิ่มจำนวน DNA ซึ่งอาจเป็นเพราะเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteinase) ในตัวอย่าง ซึ่งสามารถย่อยสลายเอนไซม์ที่ใช้ได้ อย่างไรก็ตามมีข้อยกเว้นเช่น ในถั่วอกซึ่งมีไขมันต่ำ ก็พบว่ามีกการยับยั้งการเพิ่มจำนวน DNA เช่นกัน นอกจากส่วนประกอบของอาหารแล้ว การมีส่วนผสมบางชนิดมากเกินไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือในอาหารที่ใช้ enrichment หรือในสารประกอบที่ใช้สกัด DNA จากอาหารก็ขัดขวางการทำ PCR เช่นกัน ด้วยเหตุนี้ตัวอย่างอาหารหรือตัวอย่างที่ผ่าน enrichment มักต้องถูก treat หรือสกัดก่อนที่จะให้ DNA ต้นแบบที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ PCR ยิ่งกว่านั้น วิธีการเตรียม

ตัวอย่างสำหรับอาหารชนิดหนึ่งอาจใช้ไม่ได้กับอาหารอีกอย่างหนึ่ง เนื่องจากมีองค์ประกอบที่ซับซ้อนแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การยับยั้ง PCR ในอาหารที่มีไขมันและโปรตีนสูงอาจลดลงได้ ถ้าในขั้นตอนในการสกัดใช้ดีเทอเจนท์ (detergent) ทำให้มีสภาพปั่นด้าง แต่สำหรับอาหารชนิดอื่นอาจต้องทำการเจือจาง ล้าง กรองหรือเซนตริฟิวส์ ในขั้นตอนการเตรียมเพื่อขจัดผลของการยับยั้ง^{2,8}



ภาพที่ 9.2 กลไกพื้นฐานของ Polymerase Chain Reaction

(1a) บริเวณบน DNA ถูกเลือกสำหรับแอมพลิฟิเคชัน (1b) DNA สายคู่ถูกทำให้แยกออกโดยความร้อน จากนั้นทำให้เย็นลงในสภาพที่มีไพเมอร์มากเกินพอเป็นล้านถึงพันล้านเท่า เมื่อปฏิกิริยาถูกทำให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิของการ annealing ไพเมอร์จะเข้าจับกับ DNA ต้นแบบ (1c) อุณหภูมิจะถูกปรับให้สูงขึ้นถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ DNA polymerase ที่ทนความร้อนและไพเมอร์จะต่อขยายออกไปโดยในลำดับเบสของ DNA ต้นแบบ (เส้นปะที่มีลูกศรชี้ให้เห็นทิศทางของการขยายออก) ถึงจุดนี้เป็นการสิ้นสุดรอบที่ 1 ได้ DNA ได้ DNA 2 สายคู่ซึ่งจะเป็นต้นแบบให้กับรอบต่อไป

ที่มา: Hill และ Olsvik⁹

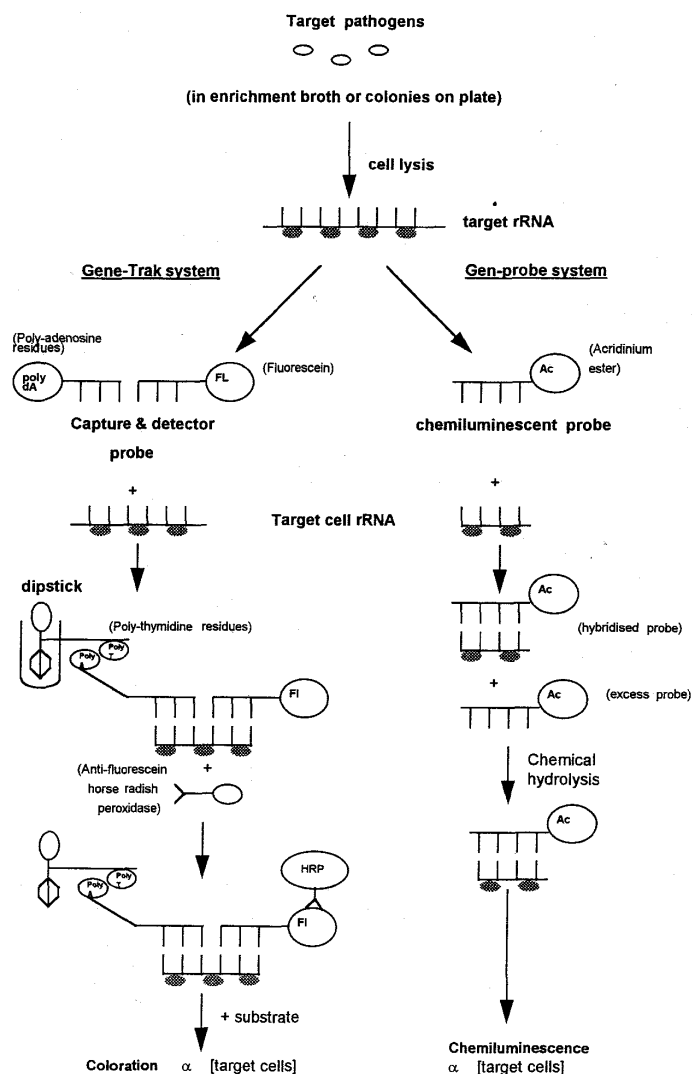
9.2.3.2 Nucleic acid (DNA) probes

วิธีนี้ใช้ DNA probes เป็น DNA สายสั้น (DNA sequence) จากจุลินทรีย์ที่สนใจซึ่งจะจำเพาะเจาะจงต่อ DNA เป้าหมายหรือสามารถใช้ตรวจหา DNA หรือ RNA ที่เข้าคู่กันได้ เพื่อป้องกันมิให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเจ้าของยีนนั้น DNA probes อาจประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์เป็นร้อย แต่ปกติจำกัดอยู่ที่ 15-30 นิวคลีโอไทด์เรียกว่าโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบ (oligonucleotide probes) ปัจจุบันมี DNA probe ที่สร้างไว้แล้วพร้อมใช้งานมากมายเช่น 1) ยีนที่กำกับการสร้างสารพิษ (toxin genes) ของ enterotoxigenic *E. coli* 2) cytotoxin gene ของ *Vibrio vulnificus* และอื่นๆ⁷

ในการทดสอบจะต้องนำสายคู่ของ DNA probe และสาย DNA ของจุลินทรีย์เป้าหมายที่มีอยู่ในอาหาร (target DNA) มาแยกออกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นนำสายเดี่ยวของ DNA ทั้งสองมาผสมกัน ถ้า DNA เป้าหมายสามารถจับคู่กับ DNA ของ probe ได้ แสดงว่า target DNA สายนั้นมาจากจุลินทรีย์ชนิดเดียวกับจุลินทรีย์ที่เป็นเจ้าของ probe วิธีการที่ให้มีการจับคู่กันของ DNA probe และ DNA เป้าหมายนั้นเรียกว่า ไฮบริไดเซชัน (hybridization) วิธีการที่จะตรวจหาว่า DNA เป้าหมายจากจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารได้มาจับคู่กับ DNA จาก probe หรือไม่นั้น จะต้องทำการติดฉลาก (labeling) เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจหาหรือเพื่อบ่งบอกว่า probe ได้จับกับ DNA เป้าหมายแล้ว การติดฉลากนิยมใช้สารรังสี (radioisotope) เช่น ^{32}P , ^3H , ^{125}I และ ^{14}C ชนิดที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ ^{32}P สารรังสีนี้เป็นสารอันตรายต้องระวังมากในการใช้ ดังนั้นจึงมีการนำเอา probe ที่ติดฉลากด้วยสารที่ไม่ใช่สารรังสี (non-radioactively labeled probe) มาใช้เช่น ติดฉลากเบสที่ใช้สร้าง probe ด้วย hapten หรือ receptor molecule หรืออาจใช้ horseradish peroxidase (HRP) และ alkaline phosphatase ติดเข้าที่นิวคลีโอไทด์โดยตรง Oligonucleotide probes อาจถูกสร้างขึ้นด้วยเบส 20 - 50 ตัว ภายใต้สภาวะเหมาะสมเป็นไปได้ที่จะใช้เวลาในการทำให้เกิดไฮบริไดเซชันภายใน 30-60 นาที²

ในการตรวจสอบด้วยวิธี nucleic acid probe มี 2 วิธี (colorimetric และ chemiluminescent) ซึ่งมีผู้ผลิตชุดทดสอบสำหรับตรวจหา *Salmonella* และ *Listeria* (ภาพที่ 9.3) ตัวอย่างชุดทดสอบจุลินทรีย์ก่อโรคสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายได้แก่ Gene-Trak assay ใช้หลักการของ DNA hybridization และ enzyme immunoassay ในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร องค์ประกอบที่สำคัญของชุดทดสอบ ก็คือ capture probe ที่มีหางเป็น polydeoxyadenosine (polydeoxyadenosine-tailed capture probe) และ detector probe ที่ติดฉลากด้วย fluorescein (fluorescein-labeled detector probe) probe ทั้งสองนี้มีความจำเพาะกับ rRNA เป้าหมาย (target rRNA) (ภาพที่ 9.3) หลังจากที่ทำ enrichment ตัวอย่างอาหารและทำให้เซลล์แตกแล้ว rRNA เป้าหมายจะถูกจับ (hybridize) ด้วย probe ทั้ง 2 ชนิดพร้อมๆ กันและต่อมา rRNA เป้าหมายที่จับกับ probe (hybrid complex) นี้ก็จะเข้าจับกับ polydeoxythymidine coated dipstick สารใดที่ไม่ถูกจับหรือการจับที่ไม่จำเพาะจะถูกขจัดออกในขั้นตอนการล้าง และสุดท้ายจะทำการประเมินถึงการมี rRNA เป้าหมายโดยเติม enzyme-labelled anti-fluorescein antibody รวมทั้งสารตั้งต้น (substrate) เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นทำให้เกิดสีขึ้น นำไปวัดค่า absorbance ถ้าหาก

ได้ค่ามากกว่าชุดควบคุมแสดงว่าตัวอย่างมีเชื้อที่ต้องการตรวจหา มีรายงานว่าการใช้ Gene-Trak test ในการตรวจหา *Salmonella* พบว่าร้อยละ 99 ของสายพันธุ์ *Salmonella* ทั้งหมด 294 ตัวอย่างที่ทดสอบให้ผลบวกและมี 3 สายพันธุ์ที่เป็น *Salmonella* sub-group V ให้ผลลบหลอก (false-negative results) ส่วนตัวอย่างที่ไม่ใช่ *Salmonella* 100 ตัวอย่างให้ผลลบทั้งหมด¹⁰

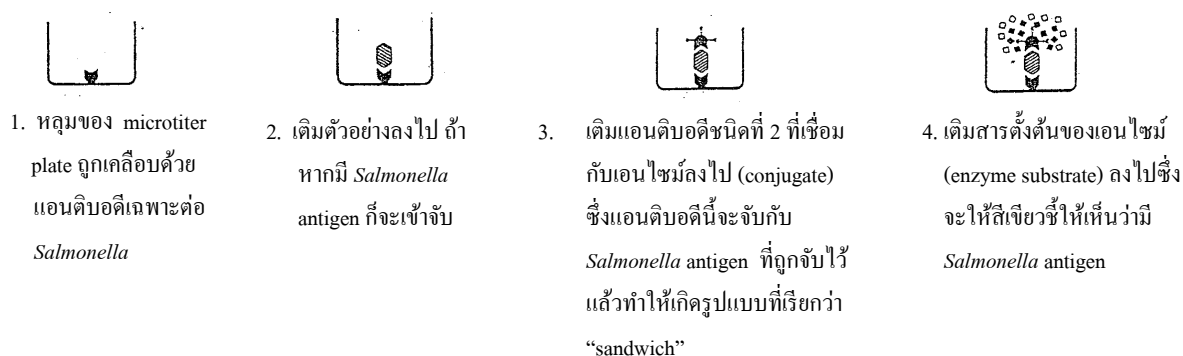


ภาพที่ 9.3 หลักการพื้นฐานสำหรับตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี nucleic acid probe
ที่มา: Patel และ Williams¹⁰

9.2.4 Antibody-Based Assays

วิธีนี้เป็น immunoassay ซึ่งมีการใช้แอนติบอดีในการตรวจหาแบคทีเรียหรือสารพิษ สามารถทำได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณอาศัยคุณลักษณะของอิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) ในการเข้าจับกับแอนติเจน ในระยะแรกมีการใช้เทคนิค immunodiffusion เทคนิคนี้แอนติบอดีและ

แอนติเจนจะแพร่ผ่านตัวกลางกึ่งแข็ง (semisolid medium) ทำให้เกิด precipitin line เมื่อเกิดการจับกันระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนที่ความเข้มข้นเหมาะสม ต่อมาก็มีการพัฒนาโดยให้มีการเกาะของแอนติบอดีกับ latex particles เมื่อแอนติบอดีที่เกาะกับ latex particles ถูกผสมเข้ากับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงก็จะเกิดการเข้าจับกัน (agglutination reaction) ซึ่งจะสังเกตเห็นได้ เร็วๆ นี้มีการใช้วิธีที่รวดเร็วได้แก่ วิธี Enzyme Immunoassay (EIA) ตัวอย่างเช่น Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) การใช้ประโยชน์ของ immunoassays วิธีต่าง ๆ เพื่อความปลอดภัยด้านอาหารแสดงในตารางที่ 9.1 วิธี ELISA เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด ในการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรค ชุดทดสอบที่มีจำหน่ายมักจะเป็น “sandwich assay” ในขั้นแรกจะทำการเคลือบแอนติบอดีที่จำเพาะตัวที่ 1 (specific antibody) บนกันหลุม (solid phase ที่ทำด้วย polystyrene) ของจานทดสอบ (microtiter plate) สิ่งนี้ทำขึ้นระหว่างการผลิตชุดทดสอบ เมื่อจะทำการทดสอบด้วยวิธีนี้ก็จะเตรียมตัวอย่างขึ้นตามคำแนะนำของผู้ผลิตชุดทดสอบโดยจะเติมตัวอย่างที่จะทดสอบลงไปหลุม ถ้ามีแอนติเจนที่ต้องการตรวจหาอยู่ (เช่นแบคทีเรียหรือสารพิษ) แอนติเจนนั้นก็จะเข้าจับกับแอนติบอดีตัวที่ 1 จากนั้นก็จะล้างเอาแอนติเจนใดๆ ที่ไม่ถูกจับออกไปแล้วจึงเติมแอนติบอดีตัวที่ 2 ที่จับอยู่กับเอนไซม์ (นิยมใช้ alkaline phosphatase หรือ horseradish peroxidase) ซึ่งเรียกว่า antibody-enzyme conjugate แล้วล้างอีกครั้ง เอนไซม์ที่ยังคงมีอยู่ในหลุมจะถูกวิเคราะห์โดยการเติมสารตั้งต้น (substrate) ลงไป สารตั้งต้นนี้จะไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีที่อาจสังเกตด้วยตาแล้วบันทึกผลหรือใช้ spectrophotometer (ภาพที่ 9.4) ความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติเจนที่มีอยู่ วิธี ELISA มีประโยชน์ในการตรวจหา *Salmonella* และ *Listeria monocytogenes* ปกติความไวในการทดสอบของวิธี ELISA ก่อนข้างคำคือจะต้องมีเซลล์จุลินทรีย์เป้าหมายอยู่ที่ $10^4 - 10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตรจึงจะให้ผลบวกขึ้นอยู่ กับชนิดหรือซีโรไทป์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงต้องทำการ enrichment ตัวอย่างในขั้นแรกเหมือนกับวิธีการพื้นฐานการตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธี ELISA เป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้ผลรวดเร็ว ส่วนใหญ่จะทราบผลภายในเวลาประมาณ 52 ชั่วโมง ชุดทดสอบสำหรับตรวจหา *Salmonella* ที่มีจำหน่ายเช่น ชุดทดสอบของ TECRA-*Salmonella* และ *Salmonella*-Tek ขั้นตอนการทดสอบแสดงดังภาพที่ 9.5^{2, 8, 10}



ภาพที่ 9.4 การทำ ELISA สำหรับตรวจหา *Salmonella* antigen

Pre-enrichment

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ตีปนกับ Pre-enrichment medium เช่น Lactose broth (225 มิลลิลิตร)

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

**Selective-enrichment**

ปิเปตตัวอย่างจาก Pre-enrichment ที่บ่มแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน Selective enrichment broth

(เช่น RV-broth) 9.9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 14-18 ชั่วโมง

**Post-enrichment**

ปิเปตตัวอย่าง Selective enrichment broth ที่บ่มแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ใน M-broth 10 มิลลิลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

**ELISA**

ปิเปตตัวอย่าง M-broth ที่บ่มแล้ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบหลอดเชื้อ

ปิดฝาหลอดแล้วต้มในน้ำเดือด (100°C) เป็นเวลา 20 นาที



ปิเปตตัวอย่างจาก M-broth ที่ให้ความร้อนแล้วและตัวอย่างควบคุมมาอย่างละ 100 ไมโครลิตร ใส่ใน หลุมของ microtitre plate ที่เคลือบด้วย specific antibody บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที



ล้างหลุมด้วย Wash Solution จำนวน 6 ครั้ง

แล้วเติมสารละลาย antibody-enzyme conjugate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร



ล้างหลุมด้วย Wash Solution จำนวน 6 ครั้ง เติม TMB substrate solution

บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที



เติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากันดี

นำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร



(ค่าเฉลี่ยของ negative control (NCX) = < 0.3; positive control = > 0.7; Cut-off value = NCX + 0.25)

ภาพที่ 9.5 การตรวจหา *Salmonella* ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบของ *Salmonella*-Tek

ที่มา: Patel และ Williams¹⁰

ตารางที่ 9.1 การใช้ประโยชน์ของ immunoassays เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร

วิธีการทดสอบสำหรับตรวจหาจุลินทรีย์/สารพิษ	ความไว (sensitivity)
Latex agglutination	
<i>E. coli</i> heat-labile enterotoxin	32 ng/ml
<i>Salmonella</i>	NA
Immunodiffusion	
<i>Staphylococcus</i> enterotoxins	32 ng/ml
<i>Salmonella</i>	NA
Direct microscopic detection (FA)	
<i>Salmonella</i>	NA
<i>E. coli</i> O157: H7	16 CFU/g
Enzyme-linked immunosorbent assay	
สารพิษ	
Aflatoxin	10-250 pg/ml
Botulinum toxin	50-100 mouse LD ₅₀
<i>Staphylococcus</i> enterotoxins	0.1 ng/ml
จุลินทรีย์	
<i>Salmonella</i>	10 ⁵ -10 ⁶ CFU/ml
<i>Listeria</i>	1 CFU/ml

NA= ไม่มีข้อมูล; FA = fluorescent antibody; LD₅₀ = 50% lethal dose

ที่มา: Barbour และ Tice⁷

เอกสารอ้างอิง

1. Feng, P. 2001. Development and impact of rapid methods for detection of foodborne pathogens, pp. 775-796. In: Doyle, M.P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. Food Microbiology: Fundamental and Frontiers, 2 nd ed. ASM press, Washington, D.C.
2. Montville, T. J. and Matthews, K. 2005. Food Microbiology: an Introduction. ASM Press, Washington, DC.
3. Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.

4. Kyriakides, A. L. and Patel, P. D. 1994. Luminescence techniques for microbiological analysis of foods, 196-231. In: Patel, P. D. (Ed.). *Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
5. Pettipher, G. L., Mansell, R., McKinnon, C. H. and Cousins C. M. 1980. Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 39: 423-429.
6. Share, A. N. 1994. Development and evaluation of membrane filtration techniques in microbial analysis, pp. 29-60. In: Patel, P. D. *Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
7. Barbour, W. M. and Tice, G. 1997. Genetic and immunologic techniques for detecting foodborne pathogens and Toxins, pp. 710-727 In: Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, DC.
8. Bell, C., Neaves, P. and Williams, A. P. 2005. *Food Microbiology Laboratory Practice*. Blackwell Science Ltd., UK.
9. Hill, W. E. and Olsvik, Ø. 1994. Detection and identification of foodborne microbial pathogens by polymerase chain reaction: food safety application, pp. 268-289. In: Patel, P. D. *Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
10. Patel, P. D. and Williams, D. W. 1994. Evaluation of commercial kits and instruments for the Detection of foodborne bacterial pathogens and toxins, 61-103. In: Patel, P. D. (Ed.). *Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology*. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

บทที่ 10

ระบบ HACCP เพื่อความปลอดภัยด้านอาหาร

แต่เดิมในการตรวจสอบความปลอดภัยด้านจุลินทรีย์ในอาหาร ความคงตัวในการเก็บรักษา และคุณภาพด้านสุขลักษณะของอาหารจะทำการตรวจหาจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในผลิตภัณฑ์ เช่น *Salmonella* หรือจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดเช่น *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio parahaemolyticus* กลุ่มของจุลินทรีย์บางชนิดเช่น จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (aerobic plate counts) จุลินทรีย์ที่ชอบเจริญในสภาพอุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic counts) จุลินทรีย์ทนความร้อน (thermoduric counts) เชื้อราและยีสต์ แบคทีเรียดัชนี (indicator bacteria) เช่น แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliforms) และ enterococci ข้อเสียของการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ก็คือไม่ได้ให้หลักประกันด้านความปลอดภัยสูงใกล้เคียง 100% สิ่งนี้ค่อนข้างสำคัญมากในกรณีของจุลินทรีย์ก่อโรคที่อันตราย ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารจึงได้เริ่มให้ความสำคัญกับการประกันคุณภาพที่เน้นการป้องกันอันตราย โดยให้มีการดำเนินงานที่ถูกต้องตั้งแต่เริ่มต้นและตลอดเวลาทั้งกระบวนการผลิตมากกว่าที่จะให้ความสำคัญต่อการตรวจสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย¹

ระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP) ได้เริ่มพัฒนาขึ้นโดยบริษัท Pillsbury ซึ่งร่วมมือกับองค์การ NASA (The National Aeronautics and Space Agency) ของสหรัฐอเมริกาเมื่อปี ค. ศ. 1959 เกี่ยวข้องโดยตรงกับการผลิตอาหารสำหรับนักบินอวกาศ ระบบนี้เป็นระบบการป้องกันอันตรายที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหาร สามารถใช้ได้เหมาะสมในการควบคุมบริเวณหรือจุดต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตที่อาจก่อให้เกิดอันตรายในรูปแบบต่าง ๆ เช่น สิ่งปนเปื้อน จุลินทรีย์ก่อโรค สารพิษจากเชื้อรา เศษวัสดุต่าง ๆ สารเคมีและอื่น ๆ ระบบ HACCP เกี่ยวข้องกับการศึกษากรรมวิธีการผลิตต่าง ๆ ทุกขั้นตอนตั้งแต่ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์อาหาร สภาวะที่ใช้ในการแปรรูป การดำเนินงาน การบรรจุ การเก็บรักษาและแจกจ่ายไปยังผู้บริโภค การวิเคราะห์ทั้งกระบวนการนี้จะทำให้สามารถบ่งชี้ได้ถึงจุดหรือขั้นตอนที่อาจก่อให้เกิดอันตราย จากข้อมูลที่ได้จะทำให้สามารถหาจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Critical Control Point) ได้ซึ่งเป็นจุดที่ถ้าไม่ได้รับการควบคุมแล้วอาจก่อให้เกิดอันตราย² จากข้อดีของระบบนี้ทำให้หลาย ๆ ประเทศได้กำหนดให้มีกฎหมายบังคับให้ผู้ประกอบการต้องนำเอาระบบ HACCP มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้ผู้บริโภค ในปี พ. ศ. 2540 โครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO ได้นำระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุมมาใช้เป็นข้อกำหนดสากลอย่างเป็นทางการ โดยรวมไว้เป็นส่วนหนึ่งของหลักเกณฑ์ทั่วไปเกี่ยวกับสุขลักษณะอาหาร²

10.1 Prerequisite Programs

การจัดการพื้นฐานที่ดีเช่น การจัดสุขลักษณะของโรงงานมีผลต่อสิ่งแวดล้อมในการผลิตเพื่อให้ได้อาหารที่ปลอดภัย ลดความเสี่ยงของการเกิดอันตรายทางชีวภาพ อันตรายทางเคมีและอันตรายทางกายภาพ การที่จะนำระบบ HACCP มาใช้อย่างมีประสิทธิภาพและบรรลุเป้าหมายได้นั้น จำเป็นต้องสร้างระบบพื้นฐานที่มั่นคง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมี Prerequisite Program ซึ่งเป็นโปรแกรมที่เกี่ยวข้องกับการจัดการสิ่งแวดล้อมก่อนที่จะเริ่มระบบ HACCP จะเริ่มขึ้น ระบบนี้รวมถึงความเหมาะสมของอุปกรณ์ต่าง ๆ การควบคุมความปลอดภัยและการบำรุงรักษาอุปกรณ์ การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนอุปกรณ์ วัสดุและเครื่องใช้ต่างๆ สุขลักษณะส่วนบุคคลของพนักงาน การควบคุมสารเคมีและแมลง การกำจัดของเสียสิ่งปฏิกูลและอื่น ๆ เป็นต้น ตัวอย่างของโปรแกรมนี้ได้แก่ 1) หลักเกณฑ์และวิธีการที่ดีในการผลิต (Good Manufacturing Practices, GMPs) 2) หลักการทั่วไปด้านสุขลักษณะอาหารของ Codex (Codex General Principles of Food Hygiene) 3) วิธีการปฏิบัติด้านสุขลักษณะ (Sanitation Standard Operating Procedures, SSOPs) และ 4) วิธีปฏิบัติมาตรฐานในการผลิต (Standard Operating Procedures, SOPs) ซึ่งจะต้องนำระบบการจัดการที่ดีมาปฏิบัติจนเป็นที่ยอมรับตามมาตรฐานก่อนที่จะเริ่มใช้ระบบ HACCP^{3, 4}

10.2 การจัดเตรียมทีมงาน HACCP และการฝึกอบรม

ระบบ HACCP ไม่สามารถทำได้โดยคนเพียงคนเดียวแต่ต้องทำโดยกลุ่มของบุคคลที่มีความรู้ในด้านต่างๆ ดังนั้นขั้นแรกจะต้องทำการระบุตัวบุคคลคนที่ทำงานและทำการฝึกอบรมคนเหล่านั้น การฝึกอบรมนั้นจำเป็นสำหรับหัวหน้าทีมงาน HACCP พร้อมสมาชิกทีมงาน วิธีที่ดีคือให้ความรู้เกี่ยวกับการจัดทำระบบ HACCP แก่บุคคลเหล่านี้ การมีความรู้เพียงพอเพื่อที่จะให้เข้าใจทั้งทฤษฎีและปฏิบัติเป็นสิ่งสำคัญมากก่อนที่จะเริ่มงาน แนะนำว่าอย่างน้อยสมาชิกทีมงานหลักๆ จะต้องประกอบด้วยผู้เชี่ยวชาญซึ่งมีความรู้และประสบการณ์ในด้านต่างๆ ดังต่อไปนี้⁵

- ก) การประกันคุณภาพ (Quality Assurance/ Technical) – ควรเป็นผู้ที่มีความรู้ มีความเชี่ยวชาญด้านจุลชีววิทยา มีความเข้าใจเกี่ยวกับอันตรายทางชีวภาพ อันตรายทางเคมี และอันตรายทางกายภาพ การประเมินความเสี่ยงและความสำคัญของอันตรายพร้อมทั้งมีความรู้เกี่ยวกับการวิเคราะห์หรือการวัดค่าต่างๆ ซึ่งใช้ในการควบคุมอันตราย
- ข) การปฏิบัติงาน (Operation) หรือการผลิต (Production) – ควรเป็นผู้ที่รับผิดชอบและมีความรู้ในรายละเอียดต่างๆ ของกิจกรรมที่ปฏิบัติในการผลิตผลิตภัณฑ์ในแต่ละวัน
- ค) วิศวกรรม (Engineering) – ควรเป็นผู้ที่มีความรู้เกี่ยวกับเครื่องมือที่ใช้ในการแปรรูปและสิ่งแวดล้อมซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการผลิตและการออกแบบด้านสุขลักษณะ

- ง) ผู้ที่มีความรู้ ความเชี่ยวชาญในด้านอื่นๆ –ควรเป็นผู้ที่ให้คำปรึกษาซึ่งอาจเป็นผู้คนภายในบริษัทหรือภายนอกบริษัทก็ได้ เช่น
- Supplier Quality Assurance –ประเมินอันตรายและความเสี่ยงที่เกี่ยวข้องกับวัตถุดิบ
 - Research and Development – ช่วยให้ข้อมูลเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์
 - Distribution/Logistics – มีความรู้ด้านการเก็บ การขนส่ง จำหน่ายตลอดกระบวนการ
 - Procurement – มีส่วนร่วมเกี่ยวกับการจัดซื้อ ซึ่งมีการตระหนักถึงความเสี่ยงด้านต่างๆ
 - Microbiologist – ถ้าบริษัทมีนักจุลชีววิทยาก็ควรเป็นหนึ่งในบุคคลที่อยู่ในทีมงาน
 - Toxicologist – มีความรู้ด้านพิษวิทยาเช่นในด้านอันตรายทางเคมีและวิธีการควบคุม
 - Statistical process control – มีความรู้ที่จะฝึกอบรมทีมงานด้านการควบคุมระบบนี้
 - HACCP experts – จำเป็นที่จะได้รับคำปรึกษาจากผู้เชี่ยวชาญภายนอกด้าน HACCP

10.3 การจัดทำแผน HACCP

จุดเริ่มต้นของงานที่หัวหน้าทีมงาน HACCP พร้อมสมาชิกทีมงานต้องทำคือการการพัฒนาแผน HACCP สำหรับผลิตภัณฑ์ที่จะจัดทำ แผน HACCP คือเอกสารที่เขียนขึ้นโดยอาศัยหลักการของ HACCP ซึ่งได้กำหนดขั้นตอนการดำเนินงานไว้ดังต่อไปนี้⁶

ก) จัดตั้งคณะทำงาน HACCP และกำหนดหน้าที่ที่ต้องรับผิดชอบ กำหนดรายละเอียดของผลิตภัณฑ์อาหารที่จะจัดทำแผน HACCP การแจกจ่าย วิธีการนำไปใช้และกลุ่มผู้บริโภค

ข) เขียนแผนภูมิการผลิตตามลำดับขั้นตอนการผลิตและทวนสอบความถูกต้องของแผนภูมิ

ค) จัดทำตารางสรุปแผน HACCP ซึ่งรวมถึงข้อมูลเช่น ขั้นตอนในกระบวนการผลิตซึ่งเป็นจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (critical control point, CCP) อันตรายที่เกี่ยวข้อง ค่าจำกัดวิกฤต (critical limits) การตรวจติดตาม (monitoring) การแก้ไข (corrective action) การทวนสอบ (verification procedure) และการแก้ไข (record-keeping procedure)

10.4 ตัวอย่างการใช้ระบบ HACCP ในกระบวนการแปรรูปกุ้งแช่แข็ง⁴

ชื่อบริษัท: ABC Shrimp Company

ผลิตภัณฑ์สุดท้าย: กุ้งสุกแช่แข็ง (IQF cooked, headless, peeled and deveined shrimp)

10.4.1 วัตถุดิบที่รับเข้ามา

กุ้งแช่แข็ง ซื้อมาเป็นบล็อค (block) หรือก้อนจากต่างประเทศและในประเทศขนาด 5 ปอนด์ (2.27 กิโลกรัม) ในถุงพลาสติกบรรจุ 8-10 บล็อค อาจมีจำนวนกุ้งน้อยกว่า 15 ตัวถึงมากกว่า 500 ตัว

ต่อไปจนถึงขั้นกับข้อกำหนดของผลิตภัณฑ์กุ้งไม่แกะเปลือก เมื่อรับซื้อแล้วจะนำกุ้งแช่แข็งมาใส่รหัสและเก็บในห้องแช่แข็ง

ข้อกำหนดในการรับซื้อ (buying specification) สำหรับกุ้งแช่แข็ง จะต้องไม่มีซัลไฟต์ตกค้าง (sulfite residual) และต้องมีใบรับรองจากผู้ขาย (supplier certification) ยืนยันถึงการไม่มีซัลไฟต์

กุ้งสด ซื้อโดยตรงจากเรือประจำท้องถิ่น กุ้งที่จับมามากนำมาเติมหรือจุ่มด้วยสาร sulfiting agents เช่น โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite) เพื่อยับยั้งการเกิดจุดดำ (black spot) หรือเมลานอยดิน (melanodin) โดยจะถ่ายกุ้งผสมน้ำแข็งจากเรือลงในถังบรรจุน้ำใส่น้ำแข็ง

วัสดุภาชนะบรรจุ (packaging material) ถูกส่งมาโดยจะตรวจสอบของทั้งหมดว่าตรงตามข้อกำหนด (specifications) หรือไม่ นำมาใส่รหัสและเก็บในโกดังเก็บของ (dry-storage warehouse)

10.4.2 กระบวนการผลิตกุ้งแช่แข็ง

1) การละลายน้ำแข็ง (thawing process)

สำหรับกุ้งแช่แข็งในบล็อค (block frozen shrimp) ทำให้ละลายถึงอุณหภูมิ 50-65°F ในถังที่มีน้ำหมุนเวียน โดยนำบล็อคของกุ้งแช่แข็งออกมาจากที่เก็บ นำมาวางในถังทำให้ละลาย คนงานจะเอาสิ่งแปลกปลอมออกและจะส่งกุ้งที่ละลายแล้วไปยังเครื่องคัดขนาด (รูปที่ 10.1)

2) เครื่องคัดขนาด (size grader)

เครื่องจะคัดขนาดกุ้ง โดยกุ้งจะถูกส่งผ่านไปยังชุดลูกกลิ้งหมุนลาดเอียงที่ตั้งไว้เพื่อแยกกุ้งแต่ละตัวโดยที่ลูกกลิ้งมีความแตกต่างของความกว้าง เมื่อกุ้งผ่านลูกกลิ้ง คนงานจะโยนกุ้งขนาดต่าง ๆ ใส่ตะกร้า กุ้งขนาดต่างกันจะถูกแยกออกจากสำหรับการเติมน้ำแข็ง

3) การแกะเปลือก (peeling procedure)

ขั้นตอนนี้ใช้กระบวนการทางกล (mechanical process) โดยจะลำเลียงกุ้งไปบนชุดลูกกลิ้งหมุนลาดเอียงเป็นที่ซึ่งเปลือกกุ้งจะถูกทำให้แตก แยกและหลุดออก เมื่อกุ้งผ่านลูกกลิ้ง กุ้งจะถูกย้ายผ่านชุดอุปกรณ์ทำความสะอาดและผ่านไปยังขั้นตอนการผ่าเอาเส้นดำออก

4) การผ่าเอาเส้นดำออก (deveining process)

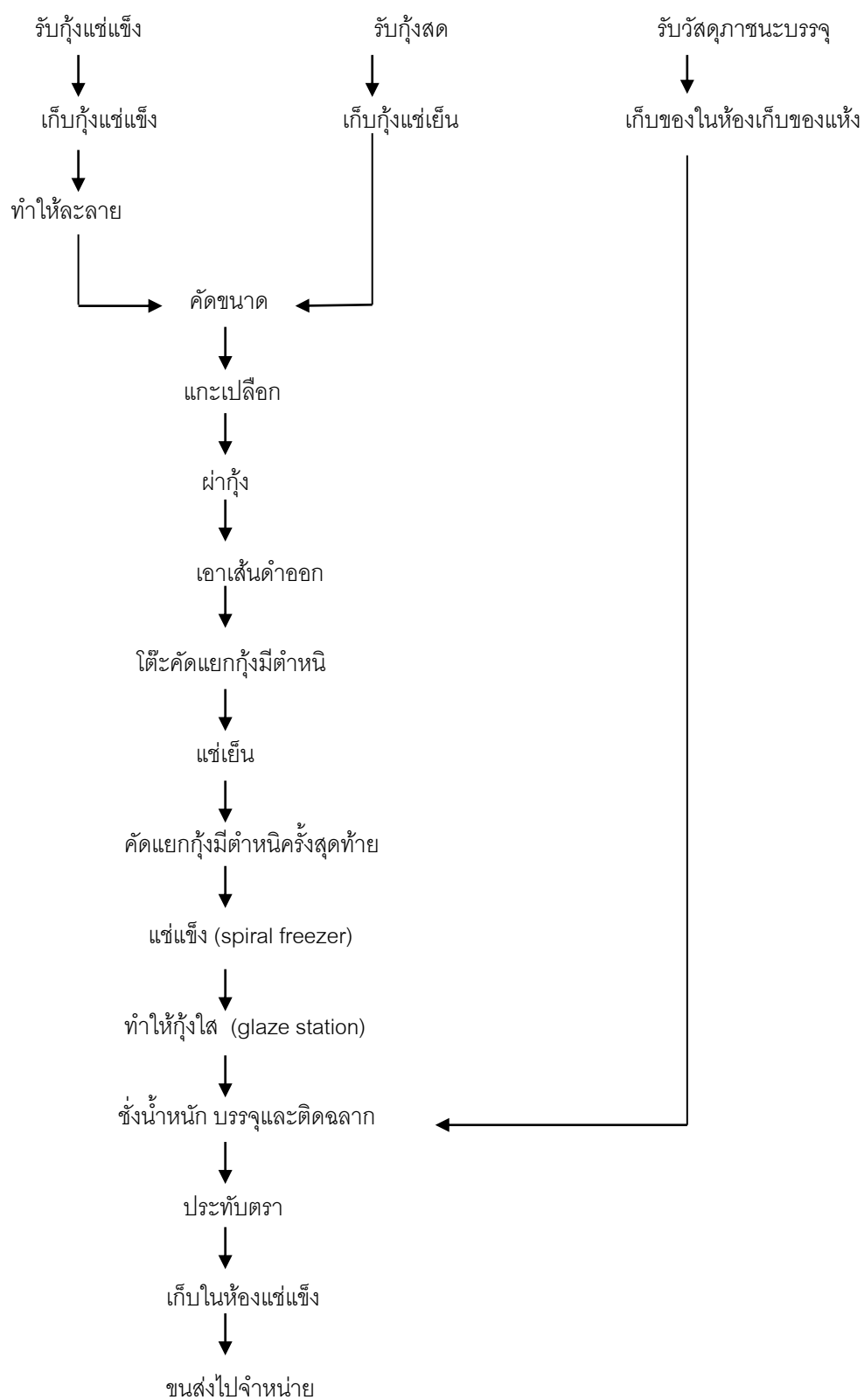
ขั้นตอนนี้ใช้ใบมีดตั้งที่ 45 องศา เพื่อผ่ากุ้งและเอาเส้นดำออกเมื่อกุ้งผ่านเข้าไป

5) โต๊ะคัดแยกกุ้งมีตำหนิ (cull table)

คนงานที่ยืนอยู่ทั้งสองข้างของสายพานจะเลือกกุ้งที่เป็นตำหนิออกเช่น กุ้งที่แตก ชื้นกุ้ง กุ้งที่ยังไม่แกะเปลือกหรือยังไม่ได้ผ่าเอาเส้นดำและกุ้งที่มีจุดดำ นำกุ้งที่ดีมาใส่น้ำแข็งก่อนเข้าห้องแช่เย็น

6) การทำให้สุก (cooking)

ก่อนทำให้กุ้งสุกจะเอาน้ำแข็งออกจากกุ้งเย็น จากนั้นกุ้งดิบจะถูกนำผ่านไปยังอุปกรณ์ทำให้สุก (steam injection cooker)



รูปที่ 10.1 กระบวนการผลิตกึ่งแช่แข็ง
ที่มา: Huang⁴

7) โต๊ะคัดแยกตำหนักสุดท้าย (final cull table)

เมื่อกุ้งสุกแล้วจะตกลงในอุปกรณ์ที่เรียกว่า shuffler ซึ่งจะเคลื่อนกุ้งไปยังโต๊ะคัดแยกตำหนักสุดท้าย (final cull table) ขณะเดียวกันจะฉีดน้ำเย็นไปที่กุ้งเพื่อให้ผลิตภัณฑ์เย็นและคงตัวก่อนที่สายพานจะนำกุ้งไปสู่ชุดแช่แข็ง (spiral freezing unit) คนงานจะคัดเลือกกุ้งที่มีตำหนิออกเช่น กุ้งที่เกาะกัน กุ้งที่ถูกตัดออก กุ้งที่มีจุดดำและกุ้งที่แกะเปลือกไม่ดี

8) การแช่แข็ง (spiral freezer)

การแช่แข็งแบบต่อเนื่อง อาหารสัมผัสกับอากาศที่ถูกทำให้เย็นโดย standard ammonia refrigeration เมื่อกุ้งถูกแช่แข็งแล้วจะลำเลียงไปยัง glazing station ทันที (ทำให้ใสเหมือนแก้ว)

9) glaze station

glaze station ประกอบด้วย โต๊ะสแตนเลสซึ่งจะฉีดน้ำลงไปบนตัวกุ้ง น้ำจะแข็งตัวอย่างสม่ำเสมอ

10) การบรรจุ (packaging)

ผลิตภัณฑ์จะถูกลำเลียงไปยังแผนกบรรจุและติดฉลาก ที่จุดนี้ใช้ระบบคอมพิวเตอร์ช่วยในการชั่งและบรรจุกุ้งในถุงที่ได้ติดฉลากมาแล้ว ใส่รหัส วันที่ผลิตและหมายเลขรุ่น (lot number) จากนั้นผลิตภัณฑ์ที่บรรจุแล้วทั้งหมดจะถูกประทับตรา (mastercase) ตามความต้องการของลูกค้า

11) การเก็บรักษา (storage) และการขนส่ง (shipping)

ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะถูกนำมาเก็บในห้องแช่แข็ง ก่อนที่จะขนส่งในสภาพที่มีอุณหภูมิ $\leq 0^{\circ}\text{F}$

10.4.3 ระบบ HACCP

10.4.3.1 หลักการที่ 1 การวิเคราะห์อันตรายและการหามาตรการป้องกัน (Hazard Analysis and Preventive Measures)

ขั้นตอนการวิเคราะห์อันตรายเป็นพื้นฐานของระบบ HACCP ในการที่จะวางแผนการป้องกันอันตรายอย่างมีประสิทธิภาพ มีความสำคัญที่จะต้องระบุอันตรายทั้งหมดและหามาตรการป้องกัน

อันตราย (hazard) คือ ปัจจัยใด ๆ ที่อาจมีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารที่อาจก่อให้เกิดอันตรายกับผู้บริโภคไม่ว่าจะเป็นการบาดเจ็บ (injury) หรือการเจ็บป่วย (illness) อันตรายที่อาจเกิดขึ้นได้แก่ อันตรายทางชีวภาพ อันตรายทางเคมี หรืออันตรายทางกายภาพที่อาจจะเป็นสาเหตุทำให้อาหารไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค⁴

ก) อันตรายทางชีวภาพ (biological hazards)

การปฏิบัติงานในการแปรรูปอาหารส่วนใหญ่มีความเสี่ยงต่ออันตรายทางชีวภาพไม่ว่าจะมาจากวัตถุดิบหรือการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตก็ตาม มักจะทำการออกแบบแผน HACCP

เพื่อให้ควบคุมอันตรายเหล่านี้ อันตรายทางชีวภาพอาจได้แก่ จุลินทรีย์ที่ก่อโรคทั้งหลายเช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัสและพยาธิ มักเกี่ยวข้องกับมนุษย์ วัตถุติดและสิ่งแวดล้อม ส่วนใหญ่อันตรายทางชีวภาพ มักถูกทำลายโดยการให้ความร้อนหรือลดจำนวนลงโดยอาศัยมาตรการควบคุมเช่น การควบคุม อุณหภูมิ เวลา การจัดการด้านสุขลักษณะ แผลงและสัตว์น้ำโรค⁵ ถึงแม้ว่าจะมีจุลินทรีย์อยู่มากมาย หลายพันชนิดแต่ก็จุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่จะก่อให้เกิดอันตราย (ตารางที่ 10.1) เมื่อมีการพัฒนา โปรแกรม HACCP ผู้ผลิตอาหารควรมีจุดประสงค์พื้นฐาน 3 ประการคือ 1) ทำลาย ขจัดและลด อันตราย 2) ป้องกันการปนเปื้อนอีกครั้งและ 3) ยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ Preventive measures ควรจะต้องบรรลุจุดมุ่งหมายเหล่านี้⁷

จุลินทรีย์สามารถถูกทำลายหรือขจัดโดยกระบวนการให้ความร้อน การแช่แข็งและการทำแห้ง หลังจากขจัดจุลินทรีย์แล้ว ควรป้องกันการปนเปื้อนอีกครั้ง สุดท้ายถ้าไม่สามารถขจัดอันตรายออกจากอาหารได้ทั้งหมดควรยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ การเจริญสามารถถูกยับยั้งโดยปัจจัย ภายในของอาหารเช่น ค่าพีเอชและปริมาณน้ำอิสระ (a_w) หรือโดยการเติมเกลือหรือสารกันเสียอื่นๆ อาจใช้สภาวะการบรรจุอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เช่น ในสภาพมีอากาศหรือใน สภาพสุญญากาศ รวมทั้งอุณหภูมิในการเก็บอาหารเช่น แช่เย็นหรือแช่แข็ง⁷

- อันตรายจากแบคทีเรีย

อันตรายจากแบคทีเรียสามารถทำให้เกิด foodborne infections หรือ foodborne intoxications โดย foodborne infections มีสาเหตุมาจากการได้รับเชื้อก่อโรคเข้าไปกับอาหารที่รับประทานในจำนวนมากพอที่จะทำให้เกิดการติดเชื้อ เกิดปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อที่มีเชื้ออยู่ เชื้อเกิดการเพิ่มจำนวนและสร้างสปอร์ ส่วน foodborne intoxications มีสาเหตุมาจากการรับประทานสารพิษที่ เชื้อสร้างขึ้นเข้าไป ซึ่งสารพิษนี้สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์บางชนิดที่ปนเปื้อนและเจริญในอาหาร⁷

- อันตรายจากไวรัส

ไวรัสเป็นปรสิตภายในเซลล์อย่างแท้จริง ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ภายนอกเซลล์ของเจ้าของร่างกาย ไม่เพิ่มจำนวนในอาหารแต่แพร่กระจายสู่อาหารได้ผ่านทางสิ่งขับถ่ายสู่ปากไม่ว่าจะเป็นทางตรงหรือทางอ้อม ไวรัสที่มักจะเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคโดยมีอาหารเป็นสื่อ ได้แก่ ไวรัสตับอักเสบ (hepatitis A virus) ทำให้เกิดการไข้ ปวด ไม่สบาย คลื่นไส้ ไม่อยากรับประทานอาหาร ไม่สบายท้องและเกิดภาวะดีซ่าน นอร์วอล์กไวรัส (the Norwalk virus family) ทำให้เกิดโรค gastroenteritis มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ปวดท้อง อาจปวดหัวและมีไข้อื่นๆ ด้วย โรต้าไวรัส (rotavirus) ทำให้เกิดโรค gastroenteritis อย่างรุนแรง

- อันตรายจากโปรโตซัว หนอนพยาธิ

สิ่งมีชีวิตที่ก่ออันตรายกลุ่มนี้เช่น โปรโตซัว nematodes (roundworms), cestodes (tapeworm) และอื่นๆ (ตารางที่ 10.2)

ตารางที่ 10.1 จุลินทรีย์และปรสิตที่เป็นอันตรายแบ่งกลุ่มตามความรุนแรง

กลุ่มที่	ระดับความรุนแรงของอันตราย	ชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ก่อให้เกิดอันตราย
1	อันตรายรุนแรงมาก	<i>Clostridium botulinum</i> type A, B, E และ F <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Salmonella</i> Typhi, <i>Salmonella</i> Paratyphi A, B Hepatitis A และ B <i>Brucella abortis</i> ; <i>B. suis</i> <i>Vibrio cholerae</i> O1, <i>Vibrio vulnificus</i> <i>Taenia solinum</i> <i>Trichinella spiralis</i>
2	อันตรายปานกลาง (แพร่กระจายมาก)	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. Enterovirulent <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> Rotavirus, Norwalk virus group <i>Entamoeba histolytica</i> <i>Diphyllobothrium latum</i> <i>Ascaris lumbricoides</i> <i>Cryptosporidium parvum</i>
3	อันตรายปานกลาง (แพร่กระจายอย่างจำกัด)	<i>Bacillus cereus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vibrio cholera</i> non-O1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Taenia saginata</i>

ตารางที่ 10.2 ปรสิตที่ก่อให้เกิดอันตราย

กลุ่มที่	ปรสิตที่ก่อให้เกิดอันตราย	อาการของโรค
1	<u>Protozoa</u>	
	<i>Giardia lamblia</i> – ก่อโรค giardiasis	เป็นตะคริวที่ท้อง คลื่นไส้ น้ำหนักตัวลด
	<i>Entamoeba histolytica</i> – ก่อโรคบิด amebiasis (amoebic dysentery)	ถ่ายอุจจาระเหลว มีมูก เลือด ต่อมาปวดท้อง เป็นไข้ ท้องเสียรุนแรง คลื่นไส้ ปวดเอว
	<i>Cryptosporidium parvum</i> – ก่อโรค Cryptosporidiosis	ท้องเสีย บางครั้งมีมูก ไม่ค่อยมีเลือดปน
	<i>Toxoplasma gondii</i> – ก่อโรค Toxoplasmosis	ส่วนใหญ่ไม่มีอาการ เมื่อมีอาการจะเป็นไข้ ปวดหัว ปวดกล้ามเนื้อ ต่อม่าน้ำเหลืองบวม
	<i>Cyclospora cayetanensis</i> – ก่อโรค Cyclosporiasis	ท้องเสีย ไม่อยากกินอาหาร เมื่อยล้า และ น้ำหนักตัวลด
2	<u>Nematodes (roundworms) พยาธิตัวกลม</u>	
	<i>Trichinella spiralis</i> – ก่อโรค trichinosis	ระยะแรกท้องเสีย ปวดท้อง อาเจียน มีไข้ หลังกินเนื้อสัตว์ติดเชื้อ 2-3 วัน ระยะที่ 2 ตัว อ่อนเข้ามาในเลือดและกล้ามเนื้อ บวมรอบ ลูกตา กล้ามเนื้ออักเสบ อ่อนแรง
3	<u>Cestodes (tapeworms): พยาธิตัวตืด</u>	
	<i>Taenia saginata</i> – ก่อโรค taeniasis ชนิดโรคพยาธิตืดวัว เกิดจากการกินเนื้อวัว (cysticercus) ของพยาธิตืดวัวปนกับเนื้อวัวไม่สุก	อาการของ taeniasis คือ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน เบื่ออาหาร อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ มึนงง ถ้ามีหลายตัวอาจเกิดอาการ intestinal obstruction และไส้ติ่งอักเสบ
	<i>Taenia solium</i> – ก่อโรค taeniasis ชนิดโรคพยาธิตืดหมู เกิดจากการกินเนื้อวัวของพยาธิตืดหมูปนกับเนื้อหมูไม่สุก	โรคที่เกิดจาก cysticercus ของ <i>T. solium</i> ที่อาศัยในอวัยวะเช่น ตา (ปวดตา อักเสบ) สมอง (ปวดหัวรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียน ลมชัก สมองบวม) และเนื้อเยื่อใต้หนัง (เกิดตุ่มนูน)
4	<u>พยาธิใบไม้</u>	
	<i>Opisthorchiasis viverrini</i> (พยาธิใบไม้ตับ) เกิดจากการกินปลาไม่สุก	ทำให้เกิดการอักเสบของพ่อน้ำดีและมะเร็งพ่อน้ำดี

ที่มา: Jay และคณะ³ ; การประชุมเชิงปฏิบัติการปรสิตวิทยา⁸

ข) อันตรายทางเคมี (chemical hazards)

การปนเปื้อนจากสารเคมี สามารถเกิดขึ้นได้ในทุกๆ ขั้นตอนของกระบวนการแปรรูปอาหาร อาจเติมสารเคมีเพื่อให้เกิดประโยชน์เช่น เติมน้ำตาลในผักและผลไม้ สารเคมีที่ใช้ อาจไม่ทำให้เกิดอันตรายถ้าหากมีการใช้หรือควบคุมที่ถูกต้อง แต่ถ้าหากใช้อย่างไม่ถูกต้องหรือละเมิดข้อกำหนดก็อาจเกิดความเสี่ยงกับผู้บริโภค สารเคมีที่มีอยู่นั้นอาจไม่ทำให้เกิดอันตรายถ้าหากมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งปริมาณของสารเคมีอาจบ่งบอกได้ว่าสารเคมีนั้นเป็นอันตรายหรือไม่ สารเคมีอาจทำให้เกิดอันตราย ถ้าหากได้รับสารเคมีนั้นเป็นเวลานาน อันตรายจากสารเคมีแบ่งออกได้ 3 ประเภท⁵

1. สารเคมีที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (naturally occurring chemicals)

สารเคมีประเภทนี้มาจากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์หลายชนิด ส่วนใหญ่สารเคมีที่เกิดขึ้นตามธรรมชาตินี้อาจพบก่อนหรือระหว่างการเก็บเกี่ยว⁵

1.1 สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins)

สารพิษจากเชื้อราเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม ของเชื้อราบางชนิด ชนิดที่มีการศึกษากันมากคือ อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) ซึ่งผลิตโดยเชื้อราบางสายพันธุ์ได้แก่ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus* เชื้อราเหล่านี้จะเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในสภาวะที่มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสม โดยพบว่าเจริญและสร้างสารพิษบนอาหารบางชนิดเช่น เมล็ดธัญชาติ ถั่วและอาหารสัตว์ การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินพบบ่อยในถั่วลิสง เมล็ดข้าวโพดและเมล็ดฝ้ายที่ให้น้ำมัน ชนิดของอะฟลาทอกซินที่มักเกี่ยวข้องคือ อะฟลาทอกซิน B₁, B₂, G₁ และ G₂ โดยพบในอาหารคนและอาหารสัตว์ในสัดส่วนต่างกัน อย่างไรก็ตามอะฟลาทอกซิน B₁ พบได้บ่อยที่สุดและเป็นพิษมากที่สุด⁵

1.2 สคอมโบรอกซิน (scombrototoxin) หรือ ฮีสตามีน (histamine)

Scombroid poisoning หรือ histamine poisoning เกิดขึ้นเมื่ออาหารมีปริมาณฮีสตามีนในระดับสูง ฮีสตามีนเกิดจากการสลายฮิสติดีน (histidine) โดยจุลินทรีย์ ฮิสติดีนเป็นกรดอะมิโนที่พบมากในปลาที่มีเนื้อสีคล้ำ (dark-fleshed fish) ได้แก่ ปลาในกลุ่ม Scombridae family จากบริเวณเขตอบอุ่นและเขตร้อน ปลาที่เก็บที่อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมอาจพบฮีสตามีนในระดับสูงนอกจากนี้ ได้มีรายงานว่าเนยแข็งสวิส (Swiss cheese) เป็นสาเหตุของการป่วยเช่นกัน ปลาที่มักพบฮีสตามีน ได้แก่ ปลามาฮิมาฮิ (mahi mahi) ปลาทูน่า ปลาแมคเคอเรล (mackerel) ปลาลูฟิช (bluefish) และปลาแอมเบอร์แจ็ค (amberjack)⁵

1.3 ซิกัวเทอรา (ciguatera)

ซิกัวเทอรา เป็นรูปแบบหนึ่งของการเกิดความเป็นพิษในคนซึ่งมีสาเหตุมาจากการกิน ปลาในเขตร้อนซึ่งมีการสะสมสารพิษตามธรรมชาติจากอาหารของปลา สารพิษนี้มีต้นกำเนิดมาจากสาหร่ายหลายชนิดในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต (dinoflagellate species) ซึ่งมักพบในบริเวณที่มีการ

ระบาดของสารพิษซีกัวเทอร่าและมีการสะสมผ่านห่วงโซ่อาหาร อาการของโรคชนิดนี้ในคนได้แก่ การผิดปกติของระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาท และหัวใจ ปลาทะเล (marine finfish) ที่มักพบว่าเป็นสาเหตุของการเกิดความเป็นพิษ (ciguatera fish poisoning) ได้แก่ ปลาที่เป็นผู้ล่าซึ่งรวมถึงปลากะพง (groupers) ปลาบาราคิวดา (barracudas) ปลาสเนปเปอร์ (snappers) ปลาแจ๊ค (jacks) ปลาแมคเคอเรล ทริกเกอร์ฟิช (triggerfish) และปลาน้ำอุ่นชนิดอื่นๆได้มีการรายงานเช่นกันว่าสะสมสารพิษซีกัวเทอร่า สารพิษจากปลาพบเป็นบางครั้งบางคราว ปลาไม่ทุกตัวที่จะเป็นพิษ⁵

1.4 สารพิษจากเห็ด (mushroom toxins)

โรคอาหารเป็นพิษจากเห็ด เกิดขึ้นโดยการรับประทาน fruiting bodies ของเห็ดที่ดิบหรือเห็ดสุกบางชนิดซึ่งไม่เหมือนกับอะพลาทอกซินที่เป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ แต่ตัวเห็ดเองที่เป็นพิษมีเห็ดหลายชนิดที่เป็นพิษแต่ไม่มีหลักในการแยกเห็ดที่กินได้กับเห็ดพิษออกจากกันและไม่สามารถกำจัดความเป็นพิษของเห็ดโดยการนำไปต้ม บรรจุกะป๋องหรือแช่แข็ง⁵

1.5 สารพิษจากสัตว์น้ำประเภทที่มีเปลือกแข็ง (shellfish toxins)

Shellfish poisoning มีสาเหตุจากกลุ่มของสารพิษจากสาหร่ายส่วนใหญ่เป็นไดโนแฟลกเจลเลตซึ่งกินสัตว์น้ำประเภทที่มีเปลือกแข็งเข้าไป ในสภาพที่เหมาะสมพวกไดโนแฟลกเจลเลตที่เป็นพิษอาจเพิ่มจำนวนขึ้นถึงระดับสูงและคงอยู่หลายสัปดาห์ สัตว์อาจสะสมและเมแทบอลิซึมสารพิษเหล่านี้ในระหว่างการกินอาหารของมัน (filter feeding) shellish poisoning มี 4 ชนิดได้แก่⁵

1.5.1 Paralytic shellfish poisoning (PSP) เกี่ยวข้องกับหอยแมลงภู่ (mussels) หอยแครง (clams) cockles และ scallops

1.5.2 Diarrhetic shellfish poisoning (DSP) เกี่ยวข้องกับหอยแมลงภู่ หอยนางรมและ scallops

1.5.3 Neurotoxic shellfish poisoning (NSP) เกี่ยวข้องกับสัตว์น้ำประเภทที่มีเปลือกแข็งที่พบแถบชายฝั่งรัฐฟลอริดาและอ่าวเม็กซิโก

1.5.4 Amnesic shellfish poisoning (ASP) เกี่ยวข้องกับหอยแมลงภู่ การกินสัตว์น้ำประเภทที่มีเปลือกแข็งที่ปนเปื้อนมีผลทำให้เกิดอาการหลายอย่างขึ้นกับสารพิษและความเข้มข้นของสารพิษในตัวสัตว์ทั้งหมด(filter-feeding mollusks) ซึ่งอาจเป็นพิษ

1.6 สารที่ทำให้เกิดการแพ้ (allergens)

องค์ประกอบของอาหารบางชนิดอาจเป็นสาเหตุของการแพ้ในคนที่ไวปฏิกิริยานี้อาจเกิดขึ้นปานกลางจนถึงรุนแรงขึ้นกับปริมาณและความไวต่อสารนั้นในแต่ละคน สารที่ทำให้เกิดการแพ้หลักๆ รวมถึงถั่วลิสงป่น ถั่วต่างๆ (tree nuts) เช่น วอลนัท (walnuts) ฮาเซลนัท (hazelnuts) พีแคน (pecans) เกาลัด (cashews) ผลัดกัทธันมและสัตว์น้ำเปลือกแข็ง อาหารชนิดที่ทำให้เกิดการแพ้ไม่มากรองลงมาได้แก่ ถั่วเหลือง กลูเต็นจากข้าวสาลี (wheat gluten) สีบางชนิด ซัลไฟต์ (sulphites)

และถั่วต่างๆ ผู้ผลิตควรควบคุมวัตถุดิบ แฉ่งให้ทราบบนฉลากถึงการมีสารที่อาจทำให้เกิดอาการแพ้ ควบคุมการทำความสะอาดวัสดุอุปกรณ์ ควรคำนึงถึงการปนเปื้อนข้าม (cross-contamination) ของสารที่อาจทำให้เกิดอาการแพ้ลงในผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น⁵

ผู้ผลิตอาจควบคุมอันตรายจากสารเคมีตามธรรมชาติได้ โดยเรียนรู้ว่าอาหารชนิดไหนที่น่าจะเกิดอันตรายขึ้นได้ การมีข้อกำหนดของวัตถุดิบ ประกาศนียบัตรของผู้ขายและการรับประกันว่ามีการตรวจสอบที่จุดต่างๆ จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนของสารเคมีจากธรรมชาติในโรงงานเช่นกัน การขนย้ายและเก็บในที่ถูกต้องเหมาะสมจะป้องกันอันตรายจากสารเคมีเช่น การเก็บเมล็ดธัญชาติและอาหารสัตว์ในที่ที่เหมาะสมจะป้องกันอะฟลาทอกซิน⁵

2. สารเคมีที่เติมลงไป (intentionally added chemicals)

สารเคมีชนิดนี้เป็นชนิดที่จงใจเติมลงในอาหารระหว่างการผลิตและการจำหน่าย สารเคมีชนิดนี้ปลอดภัยเมื่อใช้ในระดับที่ปลอดภัยแต่อาจเป็นอันตรายถ้าหากใช้เกินระดับ⁵

3. สารเคมีที่ไม่ตั้งใจเติมลงไป (unintentionally or incidentally added chemicals)

สารเคมีอาจมีอยู่ในอาหารโดยไม่ได้ตั้งใจเติม ซึ่งอาจอยู่ในส่วนผสมของอาหารเช่น อาหารทะเลบางชนิดอาจมีสารปฏิชีวนะ วัสดุภาชนะบรรจุซึ่งสัมผัสกับส่วนผสมอาจเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนของสารทำความสะอาดหรือหมักพิมพ์ ส่วนใหญ่ไม่มีผลต่อความปลอดภัยในอาหาร ยกเว้นถ้ามีในปริมาณสูง สารเคมีประเภทนี้รวมถึงสารพิษหรือยาฆ่าแมลงซึ่งไม่อนุญาตให้มีได้เลย⁵

ค) อันตรายทางกายภาพ (Physical Hazards)

อันตรายทางกายภาพสามารถเข้าสู่ผลิตภัณฑ์อาหารได้ที่ขั้นตอนใดๆของกระบวนการผลิต มีวัสดุหลากหลายชนิดที่จะเป็นสิ่งแปลกปลอมที่สามารถเข้าสู่อาหารได้ สิ่งแปลกปลอมที่จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ถ้าหากตรงกับ 1 ลักษณะหรือมากกว่า 1 ลักษณะดังนี้คือ 1) มีความแหลมคมและสามารถก่อให้เกิดการบาดเจ็บ 2) มีความแข็งและสามารถทำให้ฟันเสียหาย และ 3) ไปขวางทางเดินหายใจทำให้ไม่สามารถหายใจได้ อันตรายประเภทนี้อาจสังเกตเห็นได้ ได้แก่⁵

1. เศษแก้ว: เศษแก้วสามารถบาดที่ปากของผู้บริโภคและสามารถทำอันตรายที่รุนแรงมาก ถ้าหากกลืนลงไป เศษแก้วอาจอยู่ในวัตถุดิบ หรืออาจมาจากภาชนะบรรจุที่ใส่วัตถุดิบ ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงภาชนะบรรจุที่ทำด้วยแก้วและเอาจากบริเวณพื้นที่การผลิต
2. โลหะ: โลหะจากวัตถุดิบเช่นเดียวกับเศษแก้วที่สามารถเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ได้และสามารถก่อให้เกิดอันตรายหากแหลมคมหรือไปขวางทางเดินหายใจทำให้หายใจไม่ได้ ควรมั่นใจว่าได้ใช้อุปกรณ์อย่างเหมาะสมเพื่อที่ว่าชิ้นส่วนบางชิ้นจะไม่หลุดปนไปในผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นทั้งหมดควรถูกนำมาผ่านเครื่องตรวจจับโลหะอย่างน้อย 1 ครั้ง
3. หิน: หินส่วนมากจะปนมาในวัตถุดิบโดยอาจติดมากับพีชระหว่างการเก็บเกี่ยว หินทำให้ฟันของผู้บริโภคเสียหาย หรือไปขวางทางเดินหายใจ ควรนำวัตถุดิบมาผ่านตะแกรงร่อน

4. ไม้: เศษไม้ที่แหลมคมสามารถทำอันตรายแก่ผู้บริโภคโดยไปบาดที่ปากและลำคอ เศษไม้ อาจไปขวางลำคอทำให้หายใจไม่ได้ เศษไม้อาจติดมากับวัตถุดิบ
5. พลาสติก: ส่วนมากจะนำพลาสติกมาใช้แทนแก้วและไม้ เศษพลาสติกแข็งอาจมาจาก อุปกรณ์ที่แตกหัก
6. แมลง: อาจพิจารณาว่าแมลงเป็นอันตรายทางกายภาพได้ถ้าหากทำให้เกิดการบาดเจ็บ หรือทำให้หายใจไม่ได้
7. วัตถุภายในอาหาร: กระดูกในผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา เปลือกหอย วัตถุที่มาจากผักจัดอยู่ในกลุ่มนี้ การควบคุมทำได้โดยนำผลิตภัณฑ์มาผ่านเครื่องเอกซเรย์ (X-ray detector)

ข้อพิจารณาสำหรับทีมงาน HACCP

ในระหว่างการวิเคราะห์อันตราย ควรประเมินความสำคัญของอันตรายแต่ละอย่างโดยการพิจารณาความเสี่ยง (โอกาสที่จะเกิดขึ้น) และความรุนแรง การประเมินความเสี่ยงควรพิจารณา ร่วมกันระหว่างประสบการณ์กับข้อมูลเกี่ยวกับการระบาด (epidemiological data) และข้อมูลทาง วิชาการที่ได้เคยมีผู้ศึกษามาแล้ว⁴

ในระหว่างการวิเคราะห์อันตรายจะมีการพิจารณาปัจจัยซึ่งอาจจะควบคุมได้ทันทีเช่น การ กระจายผลิตภัณฑ์ที่เหนือการควบคุมของผู้ผลิต ผู้ผลิตจำเป็นต้องมีความชำนาญในการประเมิน ความเสี่ยงของการเกิดอันตรายและความรุนแรงของอันตรายอย่างเหมาะสม ทีมงาน HACCP มีความรับผิดชอบเบื้องต้นที่จะตัดสินว่าอันตรายจุดไหนที่สำคัญและต้องระบุไว้ในแผน HACCP ผู้ร่วม งานในทีมงานอาจมีความคิดเห็นต่างกัน⁴

ในการวิเคราะห์อันตรายจะต้องทำสิ่งต่อไปนี้

1. การรวบรวมกำลังความคิด (brainstorming) การรวบรวมกำลังความคิดเป็นผลให้ สามารถระบุอันตรายที่มีความสำคัญในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิต (ตามแผนภูมิกระบวนการ ผลิต) ตั้งแต่รับวัตถุดิบถึงการปล่อยผลิตภัณฑ์

2. การพิจารณาถึงความร้ายแรงและประเมินความเสี่ยง (risk assessment) หลังจากที รวบรวมกำลังความคิดแล้ว ทีมงานต้องวิเคราะห์อันตรายและความรุนแรงของอันตรายในแต่ละจุด เพื่อหาอันตรายที่มีความสำคัญ สิ่งนี้ค่อนข้างสับสนเพราะเป็นเรื่องง่ายที่จะชี้ว่าอันตรายใด ๆ เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยซึ่งควรถูกควบคุม อย่างไรก็ตาม HACCP จะเน้นเฉพาะอันตรายที่มี ความสำคัญ (significant hazards) เท่านั้นซึ่งเป็นอันตรายที่มีเหตุผลที่น่าจะเกิดและน่าจะมีผลต่อ ความเสี่ยงต่อสุขภาพของผู้บริโภค ถ้าไม่เน้นสิ่งนี้อาจจะพยายามที่จะควบคุมมากเกินไปและมองไม่ เห็นอันตรายที่ตรงประเด็นจริง ๆ

แนวทางปฏิบัติที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางในแง่ของการประเมินความเสี่ยงทางจุลินทรีย์และ การจัดการเป็นของ Codex Alimentarius Commission โดย Codex ได้ให้คำจำกัดความของการ

ประเมินความเสี่ยงว่าเป็นกระบวนการที่มีพื้นฐานตามหลักวิทยาศาสตร์ซึ่งประกอบด้วย 1) hazard identification 2) hazard characterization 3) exposure assessment และ 4) risk characterization ถึงแม้ว่ากระบวนการดังกล่าวเพิ่งได้มีการนำมาใช้เร็ว ๆ นี้ซึ่งก็เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการประเมินความเสี่ยง ช่วยให้จัดการความเสี่ยงได้ง่ายขึ้น แต่จริง ๆ แล้วกระบวนการเหล่านี้ได้ถูกประยุกต์ใช้มานานแล้ว ตั้งแต่ในช่วงต้น ๆ ที่นักวิทยาศาสตร์เริ่มทำงานที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหารทางจุลินทรีย์ เช่น ในช่วงปี ค. ศ. 1921-1929 ได้มีการให้ความร้อนอย่างเพียงพอในการทำลายสปอร์ของ *Clostridium botulinum* กระบวนการให้ความร้อนได้ทำขึ้นจากข้อสังเกตซึ่งได้เชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างการป่วยเป็นโรคโบทูลิซึมกับการบริโภคอาหารกระป๋องหรืออาหารที่บรรจุในขวดที่ผ่านความร้อนอย่างไม่เพียงพอ ซึ่งทำให้สปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้อยู่รอดในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาและสร้างสารพิษ⁹

ขั้นตอนนี้จะมีการจัดทำ Hazard - Analysis Worksheet (ตารางที่ 10.3) ซึ่งจะต้องเขียนชื่อกระบวนการผลิตแต่ละขั้นตอน บันทึกผลของการรวบรวมกำลังความคิด วิเคราะห์ผลของการประเมินความเสี่ยงและมีการตัดสินใจว่าจะยอมรับหรือปฏิเสธอันตรายที่มีความสำคัญ

การหามาตรการป้องกัน (Preventive Control Measures)⁴

มาตรการป้องกันคือกิจกรรมที่สามารถใช้ในการป้องกันหรือขจัดอันตรายหรือลดอันตรายจนถึงระดับที่ยอมรับได้

ใน Hazard - analysis worksheet สำหรับการผลิตกุ้งแช่แข็ง (IQF cooked shrimp) วัตถุดิบที่รับซื้ออาจอยู่ในรูปสดหรือแช่แข็งซึ่งอาจมีอันตรายทางชีวภาพได้แก่ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Vibrio* มักปนเปื้อนมากับกุ้งดิบ

ส่วนอันตรายทางเคมีได้แก่ สารซัลไฟต์ (sulfiting agent) ที่ใช้ยับยั้งการเกิดจุดดำ การมีสารนี้เป็นอันตรายที่สำคัญควรหามาตรการป้องกันโดยการติดฉลากให้ทราบถึงการมีสารนี้ สำหรับกุ้งดิบจากเรือของบริษัท ABC จะทดสอบหาสารซัลไฟต์ ส่วนกุ้งแช่แข็งจากบริษัทผู้จำหน่ายอื่นๆการมีสารนี้ทราบได้จากการติดฉลากแจ้งให้ทราบ (supplier declaration) ทางบริษัท ABC จะตรวจหาสารซัลไฟต์ ตกค้างที่จุดซัง บรรจุ และติดฉลาก

การเก็บรักษากุ้งแช่แข็งเป็นขั้นตอนที่สำคัญอาจเกิดอันตรายได้ถ้าไม่รักษาอุณหภูมิให้คงที่ โดยจำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นการรักษาสภาพการแช่เย็นเป็นมาตรการป้องกันโดยบริษัท ABC ควรมีมาตรการป้องกันเกี่ยวกับอันตรายในขั้นตอนการทำให้กุ้งสุก (cooking step) ซึ่งจะเกี่ยวกับการอยู่รอดของจุลินทรีย์ของจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งจะป้องกันโดยให้ความร้อนกับกุ้งที่อุณหภูมิและเวลาพอ เหมาะจะมีการตรวจติดตามเพื่อให้แน่ใจว่าได้ให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่กำหนด

ตารางที่ 10.3 Hazard-Analysis Worksheet ของการผลิตกุ้งแช่แข็ง

(1) ขั้นตอนการผลิต	(2) อันตรายที่อาจเกิดขึ้น ในขั้นนี้	(3) มีอันตราย ใดที่สำคัญ หรือไม่	(4) ให้เหตุผลการตัดสินใจใน คอลัมน์ที่ 3	(5) มีมาตรการป้องกันอะไร ที่ใช้ป้องกันอันตรายที่มี ความสำคัญ	(6) ขั้นตอนนี้เป็น จุดวิกฤตที่ต้อง ควบคุมหรือไม่
รับกุ้งสด	อันตรายทางชีวภาพ (แบคทีเรียก่อโรค) อันตรายทางเคมี (สารซัลไฟต์) อันตรายทางกายภาพ (ไม่มี)	ใช่ ใช่	อาหารทะเลดิบเป็นแหล่ง ของ <i>Vibrio</i> และขึ้น กับคุณภาพในการจับ สัตว์ทะเลโดยอาจ ปนเปื้อนแบคทีเรียที่ เป็นอันตรายเช่น <i>Salmonella</i> สารซัลไฟต์อาจทำให้ เกิดปฏิกิริยาการแพ้	การให้ความร้อนใน ขั้นตอนถัดไปจะ ทำลายจุลินทรีย์ เขียนบอกการมี sulfiting agent	
การเก็บรักษากุ้งสด โดยการแช่เย็น	อันตรายทางชีวภาพ (การเจริญของจุลินทรีย์ ก่อโรค) ทางเคมี (ไม่มี) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ใช่	ถ้าไม่มีการควบคุม อุณหภูมิ แบคทีเรียก่อ โรคอาจเพิ่มจำนวน	การให้ความร้อนใน ขั้นตอนถัดไปช่วย ทำลายแบคทีเรีย	
ชื่อบริษัท _____ ที่อยู่ _____ _____	คำอธิบายผลิตภัณฑ์ _____ _____				
_____	วิธีการเก็บรักษาและแจกจ่าย _____ _____				
ลายเซ็น _____	การนำไปใช้และผู้บริโภค _____				
วันที่ _____	_____				

ตารางที่ 10.3 Hazard-Analysis Worksheet ของการผลิตกุ้งแช่แข็ง (ต่อ)

(1) ขั้นตอนการผลิต	(2) อันตรายที่อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนนี้	(3) มีอันตรายใดที่มี ความสำคัญหรือไม่	(4) ให้เหตุผลการตัดสินใจใน คอลัมน์ที่ 3	(5) มีมาตรการป้องกัน อะไรที่ใช้ป้องกัน อันตรายที่มี ความสำคัญ	(6) ขั้นตอนนี้เป็น จุดวิกฤตที่ ต้องควบคุม หรือไม่
รับกุ้งแช่แข็ง	อันตรายทางชีวภาพ (แบคทีเรียก่อโรค) อันตรายทางเคมี (สารซัลไฟต์) อันตรายทางกายภาพ (ไม่มี)	ใช่ ใช่	อาหารทะเลแช่แข็งอาจเป็น แหล่งของ <i>Vibrio</i> และ ขึ้นกับคุณภาพในการจับ สัตว์ทะเลโดยอาจ ปนเปื้อนแบคทีเรียที่เป็น อันตรายเช่น <i>Salmonella</i> สารซัลไฟต์อาจทำให้เกิด ปฏิกิริยาการแพ้	การให้ความร้อนใน ขั้นตอนถัดไปจะ ทำลายจุลินทรีย์ ควบคุมการติดฉลาก บอกการมีสาร ซัลไฟต์ของผู้ขาย	
การเก็บ รักษาใน สภาพแช่แข็ง	อันตรายทางชีวภาพ (ไม่มี) ทางเคมี (ไม่มี) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่ ไม่ ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้น ไม่น่าจะเกิดขึ้น ไม่น่าจะเกิดขึ้น		
รับวัสดุ ภาชนะบรรจุ	อันตรายทางชีวภาพ (แบคทีเรียก่อโรค) อันตรายทางเคมี (การปนเปื้อนสารเคมี) อันตรายทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่ ไม่ ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้น ไม่น่าจะเกิดขึ้น ไม่มีประวัติการเกิด		
เก็บรักษาใน สภาพแห้ง	อันตรายทางชีวภาพ (ไม่มี) ทางเคมี (ไม่มี) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่ ไม่ ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้น ไม่น่าจะเกิดขึ้น ไม่น่าจะเกิดขึ้น		
การละลาย	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญและการปนเปื้อน ของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (ไม่มี) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ใช่ ไม่	ถ้าไม่ควบคุมอย่างเหมาะสม แบคทีเรียก่อโรคสามารถ เจริญได้ในระหว่างการทำให้ ละลาย ควบคุมโดย SSOP	การให้ความร้อนใน ขั้นตอนถัดไปจะ ทำลายจุลินทรีย์	

ตารางที่ 10.3 Hazard-Analysis Worksheet ของการผลิตกุ้งแช่แข็ง (ต่อ)

(1) ขั้นตอนการ ผลิต	(2) อันตรายที่อาจเกิดขึ้นในขั้นนี้	(3) มีอันตรายใด ที่มี ความสำคัญ หรือไม่	(4) ให้เหตุผลการตัดสินใจใน คอลัมน์ที่ 3	(5) มีมาตรการป้องกันอะไร ที่ใช้ป้องกันอันตรายที่มี ความสำคัญ	(6) ขั้นตอนนี้ เป็นจุด วิกฤตที่ ต้อง ควบคุม หรือไม่
คัดขนาด	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญและการปนเปื้อน ของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่ ไม่ ไม่	ไม่ น่าจะเกิดเนื่องจากเป็น ระบบต่อเนื่อง ควบคุมโดย SSOP ควบคุมโดย SSOP		
แกะเปลือก	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญและการปนเปื้อน ของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่ ไม่ ไม่	ไม่ น่าจะเกิด (ดูการคัดขนาดของกุ้ง) (ดูการคัดขนาดของกุ้ง) ควบคุมโดย SSOP		
ผ่ากุ้ง	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญและของแบคทีเรีย ก่อโรค -การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อ โรค ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ชิ้นส่วนโลหะ)	ไม่ ไม่ ไม่ ไม่	ไม่ น่าจะเกิดขึ้น (ดูการคัดขนาดของกุ้ง) (ดูการคัดขนาดของกุ้ง) ควบคุมโดย SSOP การแปรรูปขั้นต่อไปช่วย ขจัดเศษวัสดุไม่มี ประวัติการเกิดปัญหา		

ตารางที่ 10.3 Hazard-Analysis Worksheet ของการผลิตกุ้งแช่แข็ง (ต่อ)

(1) ขั้นตอนการ ผลิต	(2) อันตรายที่อาจเกิดขึ้นในขั้นนี้	(3) มีอันตรายใด ที่มี ความสำคัญ หรือไม่	(4) ให้เหตุผลการตัดสินใจใน คอลัมน์ที่ 3	(5) มีมาตรการป้องกัน อะไรที่ใช้ป้องกัน อันตรายที่มี ความสำคัญ	(6) ขั้นตอนนี้ เป็นจุด วิกฤตที่ ต้อง ควบคุม หรือไม่
ได้ะคัดแยก กุ้งมีตำหนิ	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค -การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่ ไม่ ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้น (ดูการคัดขนาดของกุ้ง) (ดูการคัดขนาดของกุ้ง) ควบคุมโดย SSOP		
การเก็บ รักษาใน สภาพแช่เย็น	อันตรายทางชีวภาพ (การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค) ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ใช่ ไม่ ไม่	ถ้าไม่ควบคุมอุณหภูมิ แบคทีเรียก่อโรคอาจ เพิ่มจำนวน ควบคุมโดย SSOP ควบคุมโดย SSOP	ขั้นตอนการให้ ความร้อนใน ขั้นถัดไปจะ ทำลายเชื้อ แบคทีเรีย	
การทำให้สุก	อันตรายทางชีวภาพ (แบคทีเรียก่อโรคมียังมีชีวิตรอด) ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ใช่ ไม่ ไม่	ถ้าไม่แปรรูปที่อุณหภูมิและ เวลาเหมาะสม แบคทีเรียก่อโรค เช่น <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. และ <i>Vibrio</i> spp. อาจรอด ควบคุมโดย SSOP ควบคุมโดย SSOP	ให้ความร้อนที่ เวลาและ อุณหภูมิที่ เหมาะสม	

ตารางที่ 10.3 Hazard-Analysis Worksheet ของการผลิตกุ้งแช่แข็ง (ต่อ)

(1) ขั้นตอนการ ผลิต	(2) อันตรายที่อาจเกิดขึ้นในขั้นนี้	(3) มีอันตราย ใดที่มีความ สำคัญ หรือไม่	(4) ให้เหตุผลการ ตัดสินใจในคอลัมน์ที่ 3	(5) มีมาตรการป้องกัน อะไรที่เข้าป้องกัน อันตรายที่มี ความสำคัญ	(6) ขั้นตอนนี้ เป็นจุด วิกฤตที่ ต้อง ควบคุม หรือไม่
Shuffler	อันตรายทางชีวภาพ -การปนเปื้อนอีกครั้งด้วยแบคทีเรียก่อโรค -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่ ไม่ ไม่	ควบคุมโดย SSOP ไม่น่าจะเกิดขึ้น เนื่องจากเป็น ระบบต่อเนื่อง ควบคุมโดย SSOP		
คัดแยกกุ้งมี ดำหนิ	อันตรายทางชีวภาพ -การปนเปื้อนอีกครั้งด้วยแบคทีเรียก่อโรค -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่จำแนก)	ไม่ ไม่ ไม่	ควบคุมโดย SSOP ไม่น่าจะเกิดขึ้น เนื่องจากเป็น ระบบต่อเนื่อง ควบคุมโดย SSOP		
แช่แข็งโดย spiral freezer	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่จำแนก)	ไม่ ไม่ ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้น เนื่องจากแช่แข็ง ด้วยอัตราเร็ว ควบคุมโดย SSOP ควบคุมโดย SSOP		
ทำให้ใส (glaze station)	อันตรายทางชีวภาพ -การปนเปื้อนอีกครั้งด้วยแบคทีเรียก่อโรค -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (สารทำความสะอาดตก ค้าง) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่ ไม่ ไม่	ใช้น้ำและอุปกรณ์ที่ สะอาด ไม่น่าจะเกิดขึ้น เนื่องจากเป็น ระบบต่อเนื่อง ควบคุมโดย SSOP		

ตารางที่ 10.3 Hazard-Analysis Worksheet ของการผลิตกุ้งแช่แข็ง (ต่อ)

(1) ขั้นตอนการ ผลิต	(2) อันตรายที่อาจเกิดขึ้นในขั้นนี้	(3) มีอันตรายใด ที่มี ความสำคัญ หรือไม่	(4) ให้เหตุผลการตัดสินใจใน คอลัมน์ที่ 3	(5) มีมาตรการป้องกัน อะไรที่ใช้ป้องกัน อันตรายที่มี ความสำคัญ	(6) ขั้นตอนนี้ เป็นจุด วิกฤตที่ ต้อง ควบคุม หรือไม่
ล้าง/บรรจุ/ติด ฉลาก	อันตรายทางชีวภาพ -การปนเปื้อนอีกครั้งด้วยแบคทีเรีย ก่อโรค -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (สารซัลไฟต์) (สารทำความสะอาดตกค้าง) ทางกายภาพ (ไม่จำแนก)	ไม่ ไม่ ใช่ ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้นเนื่องจาก เป็นระบบต่อเนื่อง ไม่น่าจะเกิดขึ้นเนื่องจาก เป็นระบบต่อเนื่อง อาจเกิดปฏิกิริยาการแพ้ (ควรเขียนบอกที่ฉลาก) ควบคุมโดย SSOP	มีการเขียนบอกที่ ฉลากอย่าง ถูกต้อง	
ประทับตรา	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (ไม่มี) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้นเพราะอยู่ใน สภาพแช่แข็ง		
การเก็บ รักษาใน สภาพแช่แข็ง	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (ไม่มี) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้นเพราะอยู่ใน สภาพแช่แข็ง		
การขนส่ง	อันตรายทางชีวภาพ -การเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ทางเคมี (ไม่มี) ทางกายภาพ (ไม่มี)	ไม่	ไม่น่าจะเกิดขึ้นเพราะอยู่ใน สภาพแช่แข็ง		

ที่มา: Huang⁴

10.4.3.2 หลักการที่ 2 การกำหนดจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Identification of Critical Control Point)

สำหรับอันตรายทุกจุดที่ถูกระบุในระหว่างการวิเคราะห์อันตรายจะต้องมีจุดวิกฤต (Critical Control Point, CCP) 1 จุดหรือมากกว่า 1 จุดที่อันตรายจะต้องถูกควบคุม CCP เป็นจุดในกระบวนการผลิตที่จะต้องทำการควบคุม CCP หมายถึงจุดหรือขั้นตอนหรือวิธีการในกระบวนการผลิตที่ต้องมีการควบคุม เพื่อป้องกันหรือกำจัดหรือลดอันตรายที่อาจทำให้อาหารไม่ปลอดภัยให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ CCP ควรเป็นจุดที่เฉพาะในกระบวนการผลิตซึ่งต้องมีการใช้มาตรการป้องกันอันตราย CCP อาจเป็นขั้นตอนใดก็ได้ในกระบวนการผลิตซึ่งสามารถควบคุมอันตรายได้

ตัวอย่างเช่น ในผลิตภัณฑ์บางชนิดหรือบางกระบวนการสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้เป็นจริงคือ การเข้าของจุลินทรีย์ก่อโรคและสารเคมีตกค้างอาจป้องกันได้ที่จุดรับซื้อเช่น การแจ้งให้ทราบจากผู้จำหน่าย ส่วนอันตรายทางเคมีอาจป้องกันได้โดยควบคุมขั้นตอนการเติมส่วนผสม การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สุดท้ายป้องกันได้ที่จุดเติมส่วนผสมเช่น การปรับ pH หรือเติมวัตถุกันเสียและการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคควบคุมได้โดยการแช่เย็นต้องเป็นจุดที่สามารถจัดอันตรายในบางผลิตภัณฑ์หรือบางกระบวนการเช่น ทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคได้ระหว่างการให้ความร้อนและปรสิตถูกทำลายได้ระหว่างแช่แข็ง สำหรับอันตรายทางกายภาพเช่น เศษโลหะจะถูกตรวจพบได้โดยเครื่องตรวจโลหะ อย่างไรก็ตาม อาจเป็นไปได้ที่จะขจัดหรือป้องกันอันตรายอย่างสมบูรณ์

ในบางกระบวนการที่มีอันตราย การลดอันตรายลงเป็นเพียงจุดมุ่งหมายที่มีเหตุผลของแผน HACCP เช่น เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ที่จะบริโภคดิบ ๆ หรือให้ความร้อนเพียงบางส่วน อาจไม่มีกระบวนการใดที่สามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคหรือไม่มีเทคโนโลยีใด ๆ ที่สามารถตรวจสอบหรือป้องกันอันตรายทางเคมีหรือกายภาพได้ ในกรณีนี้อาจจำเป็นต้องเลือกจุด CCP ที่ทำให้อันตรายที่สำคัญถูกทำให้ลดลงหรืออยู่ในระดับที่ยอมรับ ถึงแม้ว่าการลดอันตรายจะยอมรับในบางโอกาส แต่สำคัญที่จุดอันตรายทั้งหมดควรถูกระบุและควรเข้าใจข้อจำกัดของแผน HACCP ที่จะต้องควบคุมอันตรายจุดนั้น

จุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (CCP) และจุดควบคุม (Control Points)

หลาย ๆ จุดในกระบวนการผลิตที่ต้องควบคุม อาจไม่ใช่จุดวิกฤตที่ต้องควบคุมอันตรายที่สำคัญเท่านั้น อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มที่จะพยายามกำหนดจุด CCP มากเกินไป จุดวิกฤตที่ต้องควบคุมกับจุดควบคุมต่างกันในแง่ที่ว่า จุดควบคุมหมายถึง ขั้นตอนใด ๆ ที่สามารถควบคุมปัจจัยทางชีวภาพ ทางเคมีและทางกายภาพ ดังนั้น การแยกระหว่าง CCP กับ CP ด้วยคำถาม: ถ้าไม่มีการควบคุมจะเกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคหรือไม่ถ้าตอบว่า “ใช่” จุดนั้นจะเป็น CCP แต่ถ้าตอบว่า “ไม่ใช่” จุดนั้นไม่เป็น CCP แต่เป็นเพียงจุด CP เท่านั้น

จุด CCP หลายจุดกับอันตราย

จุดวิกฤต อาจเป็นจุดที่ต้องควบคุมอันตรายมากกว่า 1 ชนิดเช่น การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (refrigerated storage) อาจเป็นจุด CCP ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและการสร้างฮิสตามีน (histamine)

โรงงานต่างกันแต่ผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันอาจจะมีจุด CCP ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากโรงงานแต่ละแห่งมีความแตกต่างกันในด้านของแผนผังโรงงาน (plant layout) สูตรของผลิตภัณฑ์ กระบวนการผลิต อุปกรณ์เครื่องมือเครื่องใช้ การเลือกส่วนผสม โปรแกรมการสุขาภิบาลและโปรแกรมอื่น ๆ ถึงแม้ว่ารูปแบบของแผน HACCP มีประโยชน์ในการพิจารณา CCP แต่ความต้องการของแผน HACCP ของแต่ละสูตรและแต่ละกระบวนการผลิตควรพิจารณาแยกกัน

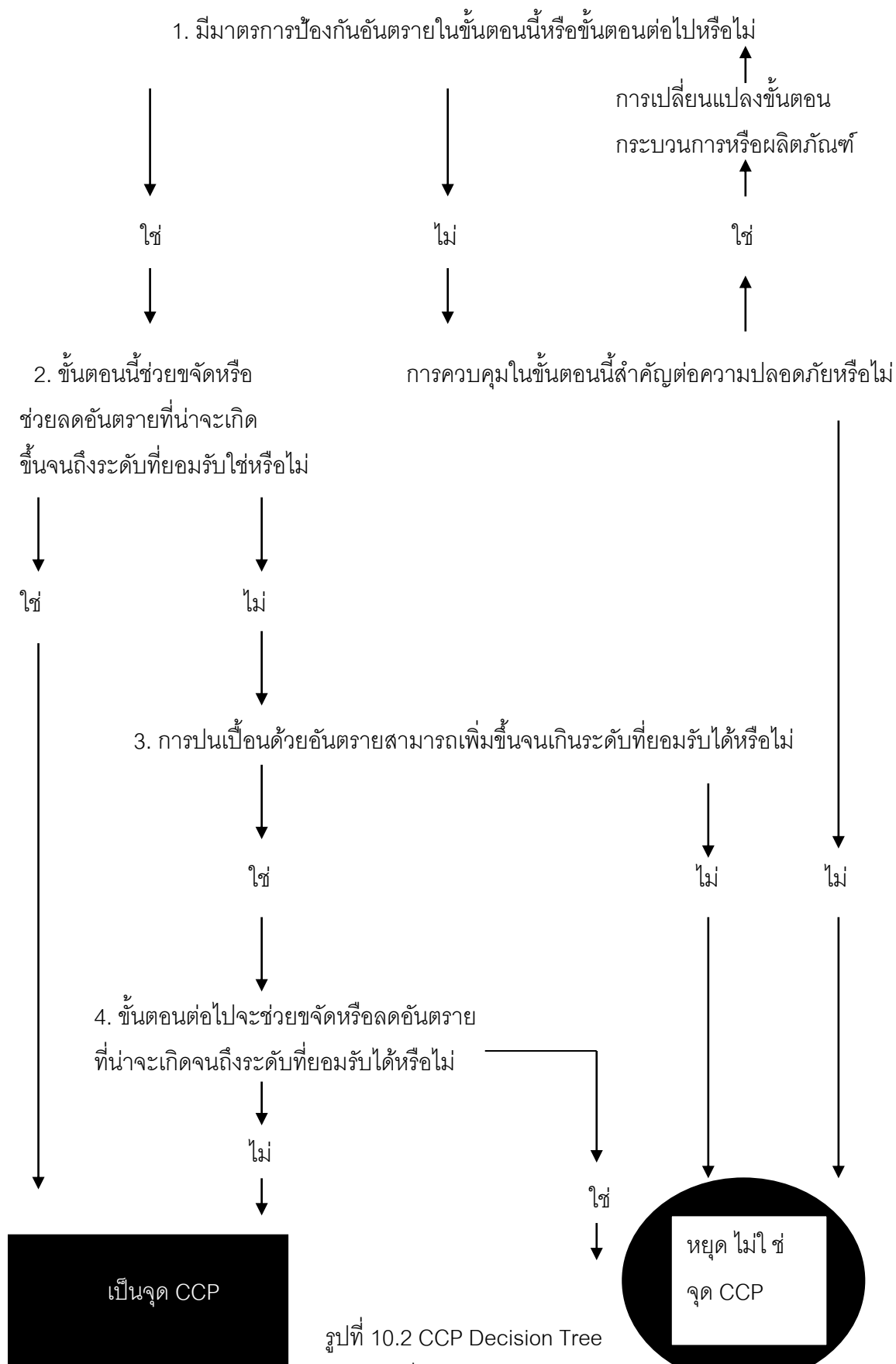
จากผลการวิเคราะห์อันตรายของแต่ละขั้นตอน สามารถจัดได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. ขั้นตอนและมาตรการควบคุมในขั้นตอนนั้นเป็น CCP
2. ขั้นตอนและมาตรการควบคุมในขั้นตอนนั้นวิกฤตต่อความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ แต่อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรแกรมพื้นฐานหรือ SSOP (ให้จัดไว้ใน SSOP ต้องมีการตรวจติดตาม (monitoring) การแก้ไข (corrective action) การทวนสอบ (verification) และการจัดเก็บบันทึก (record – keeping) ภายใต้โปรแกรม SSOP ซึ่งเป็นทางเลือกที่ดีกว่าจะจัดให้ขั้นตอนนั้นเป็น CCP
3. ขั้นตอนนั้นไม่เป็น CCP เพราะอันตรายจะถูกกำจัดในขั้นตอนต่อไปหรือไม่มีอันตรายที่มีผลต่อความปลอดภัยของอาหาร

CCP Decision tree

การพิจารณาตัดสินว่าขั้นตอนใดเป็น CCP นั้นทำได้หลายวิธี ตามข้อกำหนดของ codex (1997) ได้แนะนำให้ใช้หลักการของ CCP Decision tree ซึ่งประกอบด้วย 4 คำถาม จะใช้แต่ละคำถามเพื่อถามทุก ๆ ขั้นตอนที่จะระบุในหลักการที่ 1 ซึ่งเป็นอันตรายที่สำคัญ ถ้าใช้ decision tree อย่างเหมาะสมจะมีประโยชน์ในการตัดสินว่าจุดนั้นเป็น CCP หรือไม่ แต่ก็ไม่ใช่สิ่งที่ดีที่สุดแต่เป็นเพียงสิ่งที่จะช่วยในการตัดสินใจเท่านั้นแต่ก็ไม่ได้บังคับว่าจะต้องใช้ decision tree ในระบบ HACCP โดย CCP decision tree ไม่ได้ใช้เพื่อทดแทนความรู้ทางวิชาการ ถ้าเชื่อถือมากเกินไปอาจนำไปสู่การสรุปที่ผิดพลาดได้

ในการผลิตอาหารอาจมีขั้นตอนที่เป็น CCP เพียง 1-2 จุด หรือในกระบวนการที่ซับซ้อนอาจมีจุด CCP มากกว่า 10 จุดก็ได้ การกำหนดจุด CCP ต้องพิจารณาอย่างรอบคอบ ข้อผิดพลาดส่วนใหญ่เกิดจากการที่ทีมงานกำหนดขั้นที่เป็น CCP ให้เป็นเพียง CP ทำให้ไม่ช่วยป้องกันอันตราย เมื่อระบุจุด CCP แล้ว ควรนำมาระบุไว้ในแผนภูมิการผลิต (flow diagram) ขั้นตอนต่อไปคือการพิจารณาว่าจะควบคุมอันตรายที่แต่ละจุด CCP ได้อย่างไร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องกำหนดค่าวิกฤตเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ระหว่างผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยและไม่ปลอดภัย ตามหลักการที่ 3



รูปที่ 10.2 CCP Decision Tree

ที่มา: Huang⁴

ตารางที่ 10.4 สรุปผลของ CCP Decision Tree สำหรับกุ้งสุกแช่แข็ง

ขั้นตอนการผลิต/อันตราย	Q1	Q2	Q3	Q4	CCP
การรับกุ้งสด: แบคทีเรียก่อโรค	ใช่	ไม่ใช่	ใช่	ใช่	ไม่ใช่
การรับกุ้งสด: สารซัลไฟต์	ใช่	ไม่ใช่	ใช่	ใช่	ไม่ใช่
การรับกุ้งแช่แข็ง: แบคทีเรียก่อโรค	ใช่	ไม่ใช่	ใช่	ใช่	ไม่ใช่
การรับกุ้งแช่แข็ง: สารซัลไฟต์	ใช่	ไม่ใช่	ใช่	ใช่	ไม่ใช่
การละลาย: แบคทีเรียก่อโรค	ใช่	ไม่ใช่	ใช่	ใช่	ไม่ใช่
การเก็บรักษาโดยแช่เย็น: แบคทีเรียก่อโรค	ใช่	ไม่ใช่	ใช่	ใช่	ไม่ใช่
การให้ความร้อน: แบคทีเรียก่อโรคนั้นยังมีชีวิตรอด	ใช่	ใช่	-	-	ใช่
ซัง/บรรจุ/ติดฉลาก : สารซัลไฟต์	ใช่	ใช่	-	-	ใช่

ที่มา: Huang⁴

10.4.3.3 หลักการที่ 3 การกำหนดค่าวิกฤต (Establish Critical limit)

ค่าจำกัดวิกฤต (Critical limits, CL) เป็นเกณฑ์หรือค่าที่กำหนดขึ้น เพื่อให้แยกระหว่างความปลอดภัยและไม่ปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ซึ่งจำเป็นต้องกำหนดให้ถูกต้องในแต่ละวิธีการควบคุม โดยอ้างอิงจากข้อกำหนดตามกฎหมายอาหาร มาตรฐานหรือข้อกำหนดของบริษัทที่อ้างอิงตามหลักวิทยาศาสตร์หรือจากการทดลองเมื่อกระบวนการเบี่ยงเบนจากค่าวิกฤต จะต้องมีการแก้ไขเพื่อให้แน่ใจว่าอาหารปลอดภัย

การกำหนดค่าวิกฤต

ในหลายกรณี ค่าวิกฤตที่เหมาะสมอาจไม่ชัดเจนหรือหาไม่ได้ จึงต้องอาศัยการทดสอบหรือรวบรวมข้อมูลจากแหล่งต่างๆ เช่น ข้อมูลที่ตีพิมพ์ทางวิทยาศาสตร์ (scientific publications) ข้อกำหนดที่บังคับ (regulatory guidelines) ข้อควรปฏิบัติ (guidelines) ผู้เชี่ยวชาญ (expert) หรือข้อมูลจากการทดลอง (experiment studies)

ถ้าหาข้อมูลที่ต้องการใช้กำหนดค่าวิกฤตไม่ได้ อาจนำมาจากค่าที่ได้ปฏิบัติต่อ ๆ กันมา หลักการทั่วไปและข้อมูลอ้างอิงที่ใช้กำหนดค่าวิกฤตควรเป็นส่วนหนึ่งของเอกสารที่ใช้สนับสนุนแผน

HACCP

บ่อยครั้งที่มีหลายทางเลือกในการควบคุมอันตราย การควบคุมที่ดีที่สุดและค่ากำหนดที่ดีที่สุด มักได้มาจากการฝึกฝนและประสบการณ์ ตัวอย่างต่อไปนี้ชี้ให้เห็นถึงทางเลือกในการควบคุมและค่าวิกฤตซึ่งสามารถใช้ได้ในขั้นตอนการทอดในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในชิ้นปลาทอด

การตั้งค่าวิกฤตของจุลินทรีย์เป็นค่าจำกัดวิกฤตสำหรับจุด CCP นั้น ไม่นิยมใช้ในทางปฏิบัติ เนื่องจากค่ากำหนดทางจุลินทรีย์ (microbiological limits) นั้นยากที่จะตรวจติดตาม (monitor) และการทดสอบเพื่อหาความเบี่ยงเบนจากค่าวิกฤตนั้น อาจใช้เวลาหลายวัน ถ้าการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นั้นไม่สม่ำเสมอจะต้องสุ่มตัวอย่างจำนวนมากพอ สำหรับตัวอย่างปลาทอด ในทางปฏิบัติการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาจุลินทรีย์นั้นไม่นิยมใช้

การตั้งค่าจำกัดวิกฤตทางจุลินทรีย์นั้นไม่จำเป็นสำหรับตัวอย่างนี้ ตราบเท่าที่ค่าจำกัดวิกฤตที่เหมาะสมสามารถถูกตั้งขึ้นได้โดยขึ้นอยู่กับสภาพที่ต้องการในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง จุลินทรีย์ก่อโรคที่เกี่ยวข้องในชิ้นปลาทอดจะถูกทำลายโดยการให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิภายในชิ้นปลาเท่ากับ 150°F เป็นเวลา 1 นาที ดังนั้นอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์เมื่อทอดเสร็จจึงเป็นค่าจำกัดวิกฤต ดังนั้นในทางปฏิบัติ การวัดอุณหภูมิของชิ้นปลาทอดจึงนิยมใช้มากกว่าการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ในหลายกรณี การตรวจวัดอุณหภูมิภายในของอาหารมักไม่นิยมทำกันทางปฏิบัติ อีกทางหนึ่ง ค่าจำกัดวิกฤตอาจถูกกำหนดโดยการตั้งสภาวะที่จำเป็นเพื่อให้แน่ใจว่ากระบวนการให้ความร้อนได้ทำให้ชิ้นปลาทอดมีอุณหภูมิสูงขึ้นจนถึงระดับต่ำสุดตามที่ต้องการ สำหรับทางเลือกนี้ อุณหภูมิของน้ำมันที่ใช้ทอด ความหนาของชิ้นปลาและเวลาซึ่งชิ้นปลาอยู่ในน้ำมันร้อนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่ออุณหภูมิสุดท้ายของปลาทอด (final patty temperature) บ่อยครั้งที่จะต้องทดสอบเพียงเพื่อให้แน่ใจว่าปัจจัยเหล่านี้ได้ถูกควบคุมให้อยู่ภายในค่าจำกัดวิกฤต ซึ่งจะทำให้ได้ อุณหภูมิภายในของผลิตภัณฑ์ที่จะสามารถยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องได้ ทางเลือกนี้ง่ายกว่าการควบคุมอุณหภูมิภายในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้อุณหภูมิและเวลาการให้ความร้อนสามารถถูกตรวจติดตามได้อย่างต่อเนื่องซึ่งจะทำให้เกิดความเชื่อมั่นสูงที่ว่าชิ้นปลาทุก ๆ ชิ้นจะได้รับความร้อนอย่างเพียงพอ

ดังนั้นปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิต่ำสุดของน้ำมันที่ใช้ทอด ความหนาสูงสุดของชิ้นปลาและเวลาที่ให้ความร้อนต่ำสุดจึงกลายเป็นค่าจำกัดวิกฤตสำหรับจุด CCP แต่อย่าสับสนระหว่างค่าจำกัดวิกฤตกับค่า operating parameter ของอุปกรณ์

การกำหนดค่าจำกัดที่ใช้ในการปฏิบัติงาน (Establishing Operating Limits)

ค่าจำกัดที่ใช้ในการปฏิบัติงาน (operating limits) คือเกณฑ์ที่เข้มงวดกว่าค่าจำกัดวิกฤต และถูกใช้โดยผู้ปฏิบัติงานในการลดความเสี่ยงต่อการเบี่ยงเบนจากค่าจำกัดวิกฤต

ถ้าการตรวจติดตาม แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มที่จะขาดการควบคุมที่จุด CCP ผู้ปฏิบัติงานก็จะจัดการให้จุด CCP อยู่ภายใต้การควบคุมก่อนที่จะละเมิดค่าจำกัดวิกฤต จุดที่ผู้ปฏิบัติงานจะจัดการนั้นเรียกว่า ค่าจำกัดที่ใช้ในการปฏิบัติงาน ค่านี้จะถูกกำหนดที่ระดับซึ่งจะถึงก่อนที่ค่าจำกัดวิกฤตจะถูกละเมิด

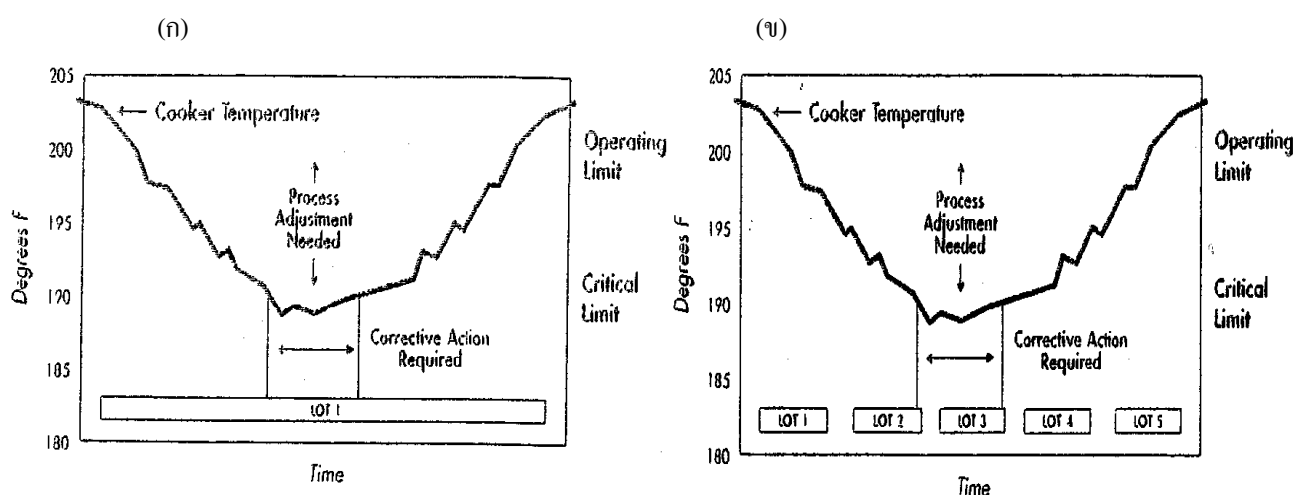
การปรับกระบวนการ

การปรับกระบวนการ (process adjustment) เป็นการกระทำที่จะนำกระบวนการกลับมาอยู่ภายใต้ค่าจำกัดที่ใช้ในการปฏิบัติงาน การปรับกระบวนการเพื่อให้อยู่ภายใต้ค่าจำกัดที่ใช้ในการปฏิบัติ งานเพื่อหลีกเลี่ยงการละเมิดค่าจำกัดวิกฤตนี้ ผู้ปฏิบัติงานอาจปรับกระบวนการเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสีย การควบคุม การหลีกเลี่ยงการสูญเสียการควบคุมจะช่วยประหยัดผลิตภัณฑ์ที่จะต้องทำใหม่เมื่อมีการละเมิดค่าจำกัดวิกฤตจำเป็นต้องทำการแก้ไข

การใช้ค่าจำกัดในการปฏิบัติงาน อาจเลือกใช้ด้วยหลาย ๆ เหตุผลด้วยกันได้แก่

1. เหตุผลด้านคุณภาพเช่น อุณหภูมิของการทำให้สุกที่ถูกต้องสำหรับการเกิดกลิ่นรสที่ดีหรือเพื่อควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย
2. เพื่อหลีกเลี่ยงการล่วงละเมิดค่าจำกัดวิกฤตเช่น การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าค่าจำกัดวิกฤตเพื่อเตือนผู้ปฏิบัติงานว่าอุณหภูมิที่กำลังเข้าใกล้ค่าจำกัดวิกฤตจะต้องทำการปรับกระบวนการ
3. การผันแปรปกติเช่น การทอดด้วยอุณหภูมิที่ผันแปรไป 5°F ควรตั้งอุณหภูมิสูงกว่าค่าจำกัดวิกฤตอย่างน้อย 5°F เพื่อหลีกเลี่ยงการละเมิด

รูปที่ 10.3 ก และ 10.3 ข แสดงถึงจุดสำคัญหลายจุดได้แก่ ค่าจำกัดในการปฏิบัติงานและการปรับกระบวนการ ค่าจำกัดวิกฤตและการแก้ไข รวมทั้งขนาดของชุดสินค้า (lot size) ตัวอย่างนี้ค่าจำกัดในการปฏิบัติงานถูกกำหนดที่ 200°F และกำหนดค่าจำกัดวิกฤตที่ 190°F การปรับจะทำก่อนอุณหภูมิลดลงต่ำกว่าค่าจำกัดวิกฤตที่ 190°F อย่างไรก็ตามถ้าการไม่มีการปรับอุณหภูมิหลังจากอุณหภูมิ ลดลงต่ำกว่าค่าจำกัดวิกฤต (รูปที่ 10.3 ก และ 10.3 ข) จำเป็นต้องทำการแก้ไข และจะต้องรายงานการแก้ไขลงในแฟ้มบันทึกข้อมูลของแผน HACCP



รูปที่ 10.3 บันทึกอุณหภูมิของอุปกรณ์ให้ความร้อน
ที่มา: Huang⁴

เมื่อต้องมีการแก้ไข ผู้ปฏิบัติงานต้องระบุและแยกชุดสินค้าที่ถูกกระทบ ถ้าขนาดของชุดสินค้า ใหญ่ ผลกระทบปริมาณมากอาจต้องถูกแยกออกเพื่อแก้ไขทั้ง ๆ ที่มีผลิตภัณฑ์เพียงปริมาณน้อยเท่านั้นที่ผลิตในขณะที่ค่าจำกัดวิกฤตถูกล่วงละเมิด การใส่รหัสผลิตภัณฑ์ให้เป็นชุดเล็กๆ จะทำให้มีผลิตภัณฑ์ ปริมาณน้อยกว่ามากที่เกี่ยวข้องเมื่อมีการละเมิดค่าจำกัดวิกฤต ดังนั้นผู้ปฏิบัติงานควรเปลี่ยนรหัสบ่อยๆ ในระหว่างการผลิตและมีการตรวจติดตามบ่อยๆ เมื่อเปลี่ยนรหัส

10.4.3.4 หลักการที่ 4 การตรวจติดตาม (Monitoring) สำหรับแต่ละจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม

กำหนดการตรวจติดตามแต่ละจุด CCP ซึ่งหมายถึงการกำหนดวิธีการสำหรับการตรวจติดตามเพื่อปรับกระบวนการและคงสภาพของการควบคุมไว้ การตรวจติดตาม หมายถึงการดำเนินการอย่างเป็นลำดับตามแผนเพื่อสังเกตหรือตรวจวัดค่าต่าง ๆ เพื่อที่จะประเมินว่าจุดวิกฤตนั้นอยู่ภายใต้สภาวะที่ควบคุมหรือไม่และเพื่อให้ได้บันทึกข้อมูลที่ถูกต้องของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตตามระบบ HACCP สำหรับการใช้นั้นขั้นตอนการทวนสอบ (verification)

จุดประสงค์ของการตรวจติดตาม

1. เพื่อคอยตรวจดูระบบการปฏิบัติงานของกระบวนการผลิตและทำให้บ่งชี้ถึงแนวโน้มที่จะนำไปสู่ค่าจำกัดวิกฤต (CL) ซึ่งอาจก่อให้เกิดการปรับกระบวนการ
2. เพื่อชี้หรือเตือนให้เห็นว่าขั้นตอนที่เป็น CCP นั้นกำลังจะสูญเสียการควบคุมหรือเกิดการเบี่ยงเบนจากจุดวิกฤต
3. เพื่อให้ได้บันทึกข้อมูลของระบบการควบคุม

การตรวจติดตามอย่างถูกต้องจะชี้ให้เห็นถึงการสูญเสียการควบคุมที่จุด CCP และจะมีการเบี่ยงเบนจากค่าวิกฤต ซึ่งจะต้องทำการแก้ไข (corrective action) เมื่อปัญหายืดเยื้อจำเป็นต้องทำการแก้ไขก็สามารถกลับมาดูบันทึกของการตรวจติดตาม และหาข้อมูลครั้งสุดท้ายที่ตรงตามค่าวิกฤตที่ได้บันทึกไว้

การออกแบบระบบการตรวจติดตาม

มาตรการป้องกันอันตรายและค่าจำกัดวิกฤต มีไว้เพื่อควบคุมอันตรายที่แต่ละจุดวิกฤต การตรวจติดตามใช้ในการบ่งบอกว่ากำลังใช้มาตรการป้องกันนั้นอยู่หรือไม่ และได้ติดตามค่าจำกัดวิกฤตหรือไม่และต้องทำการตรวจติดตามดังนี้ จะตรวจติดตามอะไร (What) จะตรวจติดตามค่าวิกฤตและหามาตรการป้องกันได้อย่างไร (How) จะทำการตรวจติดตามบ่อยแค่ไหน (Frequency) และใครจะเป็นผู้ตรวจติดตาม (Who) ขั้นตอนการตรวจติดตามเป็นการปฏิบัติที่ต้องมีการจัดการอย่างเหมาะสม มีการกำหนดการตรวจติดตามล่วงหน้าเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ต้องการ

อะไรที่จะทำการตรวจติดตาม ณ จุดวิกฤตนั้น (What will be monitored?)

อะไร: ส่วนใหญ่มักเป็นการวัด (measurement) หรือการสังเกตเพื่อจะประเมินว่าจุดวิกฤต

นั่นที่กำลังปฏิบัติงานนั้นอยู่ภายใต้คำจำกัดวิฤต คำตอบที่เหมาะสมก็คือทำการตรวจติดตามการควบคุม ณ ขั้นตอนของจุดวิฤตนั้นว่า การทำงานที่จุดนั้น ๆ ยังสอดคล้องและอยู่ภายใต้คำวิฤตที่กำหนดไว้หรือไม่ ซึ่งการตรวจติดตามการควบคุม ณ จุด CCP ในที่นี้มักได้แก่

การตรวจวัดด้วยเครื่องมือหรืออุปกรณ์สำเร็จรูปที่มีอยู่แล้ว หรือหามาเสริมเพื่อให้ตรวจสอบได้ง่ายในขณะทำการผลิตเช่น การวัดอุณหภูมิและเวลาในการฆ่าเชื้อ การวัดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ การวัดอุณหภูมิของห้องเย็นซึ่งวิฤตสำหรับส่วนผสมที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ การวัด pH ของส่วนผสมที่เป็นกรดซึ่งวิฤตสำหรับการผลิตอาหารที่เป็นกรด และการวัดความเร็วของสายการผลิตนั้นซึ่งวิฤตต่อการให้ความร้อนที่เพียงพอหรือการทำให้เย็นที่เพียงพอ

การตรวจติดตามอาจรวมถึงการสังเกตด้วยคำถามที่ว่า มีการใช้มาตรการป้องกันที่จุด CCP อยู่หรือไม่ หรือปฏิบัติอย่างรัดกุมหรือไม่เช่น การตรวจสอบว่าผลการวิเคราะห์ตามใบรับรองของผู้ขาย (vendor's certificate) ว่าตรงตามชุดของวัตถุดิบหรือไม่

การตรวจสอบบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยของหอยที่ระบุไว้บนป้ายที่ติดกับภาชนะของวัตถุดิบที่เป็นหอย (molluscan shellfish) เพื่อให้แน่ใจว่าวัตถุดิบมาจากน้ำที่ได้รับการรับรอง นอกจากนี้ควรกำหนดคำจำกัดในการปฏิบัติงาน ณ จุด CCP ให้เข้มงวดกว่าคำจำกัดวิฤต

จะตรวจติดตามตั้งคำวิฤตและหามาตรการควบคุมอย่างไร (How ?)

เมื่อกำหนดว่าจะตรวจติดตามอะไร ณ จุด CCP นั้นแล้วจำเป็นต้องพิจารณาว่าควรตรวจติดตามสิ่งที่กำหนดขึ้น ณ จุด CCP นั้นอย่างไร ซึ่งการตรวจติดตามเพื่อให้ทราบว่าการเบี่ยงเบนจากคำวิฤตที่กำหนดนั้น จำเป็นจะต้องรู้ผลอย่างรวดเร็ว (real - time results) เพื่อที่ผู้ตรวจติดตามและผู้ปฏิบัติงาน ณ จุดนั้นจะสามารถแก้ไขกระบวนการผลิตได้ทัน เพราะฉะนั้นจึงไม่นิยมใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ เนื่องจากใช้เวลานานและใช้ตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อให้ได้ค่าที่น่าเชื่อถือ จึงนิยมตรวจวัดค่าทางกายภาพและทางเคมีที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตผลิตภัณฑ์ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา และค่า a_w หรือปริมาณเกลือที่เหลือในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว

ตัวอย่างของการติดตาม การวัดค่าทางกายภาพและเคมีที่จุด CCP ดังนี้

1) อุณหภูมิและเวลา

การวัดค่าทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน มักใช้ในการตรวจติดตามประสิทธิภาพของการทำลายหรือควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค การให้ความร้อนอาหารที่เวลาและอุณหภูมิที่กำหนดสามารถทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น เนื้อปูพาสเจอร์ไรส์ในกระป๋องขนาด a 401 X 301 ควรให้ความร้อนจนแกนกลางของกระป๋องมีอุณหภูมิเท่ากับ 185°F (85°C) เป็นเวลา 1 นาที โดยเพื่อให้มั่นใจว่าได้อุณหภูมิตามที่ ซึ่งจะต้อคอยตรวจอุณหภูมิของหม้อน้ำร้อนและควบคุมเวลาที่ผลิตภัณฑ์อยู่ในนั้น นอกจากนี้ จุลินทรีย์ก่อโรคสามารถถูกควบคุมได้โดยการป้องกันไม่ให้อาหารมีอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับ

อุณหภูมิที่จุลินทรีย์ก่อโรคจะเจริญได้ (ระหว่าง 40-140°F หรือ 4.4-60°C) ดังนั้นจึงต้องให้ความร้อนอย่างรวดเร็วและ/หรือทำให้ผลิตภัณฑ์เย็นลงอย่างรวดเร็ว และรักษาอุณหภูมิให้ต่ำกว่า 40°F หรือมากกว่า 140°F ระหว่างเก็บรักษา

2) ค่า a_w

การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถถูกควบคุมโดยการจำกัดค่า a_w หรือปริมาณของน้ำอิสระ ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เช่น การทำแห้งผลิตภัณฑ์จนถึง a_w ต่ำกว่า 0.85 สามารถยับยั้ง การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ในกรณีนี้ตัวอย่างอาจถูกรวบรวมระหว่างกระบวนการทำแห้งและวัดค่า a_w กระบวนการจะเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อ a_w ลดลงต่ำกว่า 0.85 ผู้ปฏิบัติงานอาจตรวจวัดอุณหภูมิ เวลาและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ ถ้าอัตราการทำแห้งภายใต้สภาพนี้จะได้ a_w เท่ากับ 0.85 เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการ

3) ความเป็นกรดต่ำ (pH)

การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคสามารถถูกควบคุมได้โดยการจำกัดค่า pH ของผลิตภัณฑ์ จนถึงระดับที่ไม่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้ ตัวอย่างเช่น การเจริญของ *Clostridium botulinum* ในผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดซึ่งทำให้เกิดโรคโบทูลิซึม ถูกควบคุมได้โดยการเติมกรดจนกระทั่งค่า pH ลดลงถึง 4.6 หรือต่ำกว่า 4.6 ในกรณีนี้จะตรวจติดตาม pH ของอาหารก่อนที่จะเติมกรด การบันทึกค่า pH ของผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่ใช่การตรวจที่ดีเพราะก่อนที่ pH ของผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะถึงจุดสมดุลจะต้องใช้เวลานานถึง 2-3 วัน

4) การตรวจสอบทางประสาทสัมผัส (sensory examination)

การตรวจสอบทางประสาทสัมผัส เป็นทางหนึ่งในการทดสอบการเน่าเสียซึ่งอาจส่งผลให้เกิดอันตรายเช่น การเกิดฮิสตามีน (histamine) ชนิดและความเข้มข้นของกลิ่นรสจะชี้ให้ผู้ตรวจสอบทราบถึงการใช้อุณหภูมิและเวลาที่ผิดพลาดซึ่งมีผลต่อการเกิดฮิสตามีน

การเลือกเครื่องมือที่ใช้ตรวจ เป็นสิ่งสำคัญต่อการพิจารณาระหว่างการพัฒนาแผน HACCP เครื่องมือที่ใช้สำหรับการตรวจติดตาม ณ จุด CCP มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับตรวจสอบได้แก่ เทอร์มิเตอร์ นาฬิกา เครื่องชั่ง เครื่องวัด pH เครื่องวัด a_w และเครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมี เครื่องมือเหล่านี้ควรมีความถูกต้อง เพื่อให้แน่ใจถึงการควบคุมอันตรายควรคำนึงถึงความผันแปรของเครื่องมือตั้งค่าวิกฤต เช่น ถ้าอุณหภูมิต่ำสุดที่ใช้คือ 145°F (62.8°C) และถ้าเทอร์มิเตอร์มีความถูกต้อง $\pm 2^\circ\text{F}$ ดังนั้น ค่าวิกฤตควรตั้งไม่ต่ำกว่า 147°F (63.8°C) การสอบเทียบมาตรฐาน (calibrate) ของเครื่องมือเป็นครั้งคราวมีความจำเป็นต่อความมั่นใจว่าถูกต้อง

จะตรวจติดตามด้วยความถี่เท่าไร (Monitoring frequency ?)

ความถี่ในการตรวจติดตามแบ่งเป็น 2 แบบคือ การตรวจติดตามแบบต่อเนื่อง (continuous) และแบบช่วงเวลา (batch) การตรวจแบบต่อเนื่องจะให้ผลดีกว่าแบบช่วงเวลาเพราะสามารถพบเห็น

สิ่งผิดปกติและแก้ไขได้ทันทีและเป็นไปได้สำหรับปัจจัยด้านกายภาพและเคมีหลายชนิด ตัวอย่างของการตรวจติดตามแบบต่อเนื่อง (continuous monitoring) เช่น การตรวจและบันทึกเวลาและอุณหภูมิของกระบวนการพาสเจอร์ไรส์เนื้อปูอย่างต่อเนื่อง และตรวจหาโลหะอย่างต่อเนื่องในผักโขมสับแช่แข็ง เครื่องมือตรวจอย่างต่อเนื่องจะให้ข้อมูลของค่าที่วัดได้อย่างต่อเนื่อง แต่จะไม่ได้ช่วยควบคุมอันตราย ดังนั้นจำเป็นต้องสังเกตค่าที่วัดเป็นระยะ ๆ และแก้ไขเมื่อต้องการ

การตรวจแบบช่วงเวลา จะต้องคำนึงถึงความถี่ในการปฏิบัติให้เหมาะสมเพียงพอที่จะสร้างความมั่นใจว่าสามารถควบคุมจุด CCP นั้นได้ มีปัจจัยหลายประการในการกำหนดความถี่ได้แก่

1. จำนวนตัวอย่างที่จะสุ่ม ต้องมีแผนการสุ่มตัวอย่างที่กำหนดขึ้นโดยพิจารณาว่าจะยอมรับความเสี่ยงที่ระดับเท่าไร
2. กำลังการผลิตในขณะนั้น ถ้ามีการผลิตในอัตราสูงควรมีความถี่การตรวจติดตามมากขึ้น
3. ความแปรปรวนของอุปกรณ์การผลิต ณ จุด CCP ถ้าหากอุปกรณ์มีความแปรปรวนมากควรตรวจติดตามด้วยความถี่ที่เหมาะสม
4. ความเร็วในการอ่านผลของอุปกรณ์ตรวจวัด ถ้าอ่านผลช้า ต้องเพิ่มความถี่ในการอ่านผลให้มากขึ้น
5. ค่าปกติที่วัด ถ้าใกล้กับค่าวิกฤต เวลาระหว่างการตรวจควรสั้น (เพิ่มความถี่)

ตัวอย่างของการตรวจแบบไม่ต่อเนื่องได้แก่ 1) การตรวจอุณหภูมิของของผสมบนสายการผลิตขนมปังในช่วงเวลาเฉพาะ 2) การตรวจอุณหภูมิของแกนกลางของผลิตภัณฑ์พาสเจอร์ไรส์ในช่วงเวลาเฉพาะ (specified time intervals) และ 3) การตรวจทางประสาทสัมผัสเป็นระยะ ๆ สำหรับการสลายการเกิดฮีสตามีนในอาหารทะเล

ใครเป็นผู้ตรวจติดตาม (Who ?)

การที่จะให้ใครรับผิดชอบในการตรวจติดตามนั้นเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อพัฒนาแผน HACCP ผู้ที่ได้รับมอบหมายในการตรวจติดตามอาจเป็นพนักงานในสายการผลิต พนักงานคุมเครื่อง ช่าง และพนักงานควบคุมคุณภาพ โดยผู้ตรวจติดตามควรเป็นผู้ที่อยู่ในบริเวณหรือตำแหน่งที่สะดวกและรวดเร็วต่อการตรวจติดตามควบคุมจุด CCP ผู้ตรวจติดตามจะต้องเป็นผู้ที่ได้รับการอบรมถึงเทคนิคการตรวจที่จุด CCP นั้น เข้าใจความสำคัญของการตรวจติดตามจุด CCP นั้นและมีความชำนาญในวิธีการติดตาม โดยเฉพาะวิธีการที่ต้องใช้ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสเพื่อการรายงานผลอย่างถูกต้องและเชื่อถือได้ นอกจากนี้ควรรายงานผลผิดปกติและการเบี่ยงเบนจากค่าจำกัดวิกฤตทันทีเพื่อให้แน่ใจว่าจะทำการปรับกระบวนการและแก้ไขได้ทัน การบันทึกเอกสารทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการตรวจติดตามจุด CCP ต้องมีลายเซ็นของผู้ที่ทำการตรวจติดตามนั้น วิธีการตรวจติดตามแต่ละค่าวิกฤตในหลักการที่ 3 ของ IQF cooked - shrimp แสดงดังตารางที่ 10.5

10.4.3.5 หลักการที่ 5 การแก้ไข (Corrective Actions)

การแก้ไขหมายถึง การดำเนินการใด ๆ ที่ต้องปฏิบัติเมื่อมีการเบี่ยงเบนจากค่าวิกฤตหรือเกิดการสูญเสียการควบคุม ณ จุดวิกฤต

หลักการของการกำหนดวิธีการแก้ไข

เมื่อค่าจำกัดวิกฤตถูกละเมิดที่จุด CCP ควรทำการแก้ไข เพื่อฟื้นฟูระบบการควบคุมและการกำหนดการแก้ไขควรพิจารณาตั้งแต่วันที่กระบวนการผลิตเริ่มสูญเสียการควบคุมคือ ตั้งแต่เริ่มมีการเบี่ยงเบนจากค่าที่ใช้ในการปฏิบัติงาน (Operating limits) โดยผู้ที่ได้รับมอบหมาย ณ จุด CCP นั้นเป็นผู้ปรับกระบวนการผลิตให้อยู่ในขอบเขตของค่าการปฏิบัติงานที่กำหนด ก่อนที่จะเกิดการเบี่ยงเบนไปมากจนเกินค่าจำกัดวิกฤต

กลุ่มคณะทำงานควรจะพิจารณากำหนดมาตรการแก้ไข โดยคำนึงถึงว่า “ถ้าจุด CCP มีปัญหาเนื่องจากเกิดการเบี่ยงเบนไปจากค่าวิกฤตแล้ว จะทำการแก้ไขอย่างไรกับสายการผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นเพราะ การเบี่ยงเบนจะส่งผลให้เกิดปัญหาด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ผลิตขึ้นและเกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ การแก้ไขอาจทำได้โดย 1) แยกหรือกักสินค้าที่มีปัญหา 2) เปลี่ยน ผลิตภัณฑ์ไปใช้ในสายการผลิตอื่นซึ่งการเบี่ยงเบนไม่ได้ถูกพิจารณาว่าวิกฤต 3) ผลิตใหม่ 4) ปฏิเสธไม่รับวัตถุดิบและ 5) ทำลายผลิตภัณฑ์ ในการแก้ไขทำได้โดย

1. แก้ไขให้ถูกต้อง และกำจัดสาเหตุของการเบี่ยงเบนจากค่าจำกัดวิกฤตและฟื้นฟูระบบควบคุม การแก้ไขจะต้องนำจุด CCP กลับมาอยู่ภายใต้การควบคุม ควรแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในระยะสั้นและให้ได้ผลในระยะยาวจุดประสงค์เพื่อให้แผนที่ทำนั้นเสร็จสิ้น โดยไม่มีการเบี่ยงเบนกระบวนการอีก อาจจำเป็นต้องหาสาเหตุของการเบี่ยงเบนเพื่อป้องกันปัญหาในอนาคต ถ้าหากการเบี่ยงเบนจากค่าจำกัดวิกฤตเกิดขึ้นโดยไม่ได้คาดคิดหรือเกิดอีกครั้ง ควรมีการปรับกระบวนการ HACCP อีกครั้ง และเมื่อประเมินแล้วว่าจะเปลี่ยนแปลงแผน HACCP ควรหาทางแก้ไข จัดหรือลดสาเหตุเริ่มต้นหรือสาเหตุของการเบี่ยงเบนกระบวนการ ควรมีคำชี้แจงสำหรับการแก้ไขให้พนักงาน

2. การบ่งชี้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตระหว่างการเบี่ยงเบน เมื่อมีการเบี่ยงเบนเกิดขึ้นควรบันทึกการรายงาน การแก้ไขดังนี้ 1) การระบุชนิดและลักษณะของผลิตภัณฑ์ เช่น คำอธิบายรายละเอียดของผลิตภัณฑ์ (product description) และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่กักไว้ 2) คำอธิบายการเบี่ยงเบน 3) การแก้ไขที่ได้ปฏิบัติ 4) ชื่อคนที่รับผิดชอบและ 5) ผลการประเมิน

10.4.3.6 หลักการที่ 6 การบันทึก (Record - Keeping Procedures)

การบันทึกข้อมูลเป็นส่วนสำคัญของโปรแกรม HACCP ซึ่งใช้เป็นหลักฐานหรือแสดงว่า กระบวนการผลิตถูกควบคุมและมีการแก้ไขที่เหมาะสมเมื่อเกิดการเบี่ยงเบน การบันทึกข้อมูลจะแสดงประวัติของกระบวนการผลิต การตรวจติดตาม การเบี่ยงเบน การแก้ไข การทำลายผลิตภัณฑ์

ที่อาจก่อให้เกิดอันตราย ข้อมูลที่เก็บในระบบ HACCP มี 4 ประเภทได้แก่ เอกสารสนับสนุนการจัดทำแผน HACCP ข้อมูลการตรวจติดตามที่จุด CCP ข้อมูลการแก้ไขและข้อมูลการทวนสอบ

1. เอกสารการจัดทำแผน HACCP

ข้อมูลและรายละเอียดที่ใช้ในการจัดทำแผน HACCP ซึ่งรวมถึง Hazard – analysis worksheet และรายละเอียดที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์อันตรายและกำหนดค่าวิกฤต เอกสารอาจได้แก่ ข้อมูลที่ใช้จัดทำมาตรการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ข้อมูลที่ใช้กำหนดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ ภัยที่กรณีอายุของผลิตภัณฑ์มีผลต่อความปลอดภัย ข้อมูลที่ใช้กำหนดความเพียงพอของการให้ความร้อนในการทำลายแบคทีเรียก่อโรคและการติดต่อกับที่ปรึกษาหรือผู้เชี่ยวชาญ นอกจากนี้ยังรวมถึงรายชื่อและความรับผิดชอบของแต่ละบุคคลในคณะทำงาน HACCP สรุปขั้นตอนเบื้องต้นที่ใช้ในการจัดเตรียมแผน HACCP และโปรแกรมบังคับก่อน (Prerequisite programs)

2. ข้อมูลการตรวจติดตาม (Monitoring Records)

บันทึกการตรวจติดตาม จะช่วยให้ผู้ผลิตทราบถึงสถานะของการผลิตที่กำลังเข้าใกล้ค่าวิกฤตหรือไม่ โดยการสังเกตแนวโน้มจากบันทึก ทำให้สามารถแก้ไขได้ทันเวลา

ถ้าปรับระบบก่อนจะเกิดค่าจำกัดวิกฤตผู้ปฏิบัติงานไม่ต้องสิ้นเปลืองแรงงาน และค่าใช้จ่ายในการแก้ไข การบันทึกการตรวจติดตามควรบันทึกลงในแบบฟอร์มที่มีรายละเอียดดังนี้

ตัวอย่างการบันทึกการตรวจติดตามที่จุดควบคุมเช่น

บันทึกอุณหภูมิที่เก็บรักษา เมื่อการควบคุมอุณหภูมิมีความสำคัญต่อความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เช่น ส่วนผสมจะเสียได้ง่ายในระหว่างกระบวนการผลิต

3. การบันทึกการแก้ไข (Corrective Action Records)

ควรมีรายละเอียดดังนี้ หมายเลขแสดงรุ่นของผลิตภัณฑ์ที่ถูกต้อง ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ถูกกักการเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้น ข้อมูลรายละเอียดของผลิตภัณฑ์และการแก้ไขกระบวนการผลิต

ตัวอย่างการบันทึกการเบี่ยงเบนและแก้ไขมีดังนี้

ก) การบันทึกการกักเก็บผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นระหว่างการสูญเสียการควบคุมกระบวนการผลิต
ข) การบันทึกการทำลายผลิตภัณฑ์ และ ค) การบันทึกการทวนสอบ (Verification record) ได้แก่

- การปรับแผน HACCP เช่น การเปลี่ยนส่วนผสม สูตร กระบวนการผลิต การบรรจุ และการจำหน่ายแจกจ่าย

- การทวนสอบเกี่ยวกับใบรับรองจากผู้ส่งวัตถุดิบว่าตรงตามข้อกำหนด
- ความถูกต้องและการสอบเทียบเครื่องมือทุกชนิดที่ใช้ตรวจติดตาม
- ผลเกี่ยวกับการทดสอบทางจุลินทรีย์และการทดสอบทางสิ่งแวดล้อมเกี่ยวกับจุลินทรีย์

และการตรวจผลิตภัณฑ์สุดท้ายในสายการผลิตเป็นระยะ ๆ ด้านจุลินทรีย์ เคมีและกายภาพ

- ผลการตรวจที่จุดตรวจสอบและผลการทดสอบการประเมินอุปกรณ์

ตารางที่ 10.5 แบบฟอร์มของแผน HACCP (ต่อ)

(1) จุดวิกฤต ที่ต้อง ควบคุม	(2) อันตราย ที่สำคัญ	(3) ค่าจำกัด วิกฤต	(4) (5) (6) (7) การเฝ้าติดตาม				(8) การแก้ไข	(9) บันทึก	(10) การ ทวน สอบ
			อะไร	อย่างไร	บ่อยแค่ไหน	ใคร			
ซัง/บรรจุ/ ติดฉลาก	ปฏิกิริยา การแพ้ ถ้าไม่ เขียน บอกว่ามี สารซัล ไฟต์	ผลิตภัณฑ์ ทั้งหมดที่มี สารซัลไฟต์ หลงเหลือ อยู่ต้อง บอกให้รู้	- ที่จุด ซัง/ บรรจุ/ ติด ฉลาก ตรวจ ว่ามี การแจ้ง ว่ามี สารซัล ไฟต์ หรือไม่	-ตรวจสอบ ฉลาก ทั้งหมดที่ จุดบรรจุว่า ตรงกับ สินค้า หรือไม่	-ตรวจดู การเขียน ที่ฉลาก ทุกครั้ง ที่เปลี่ยน ม้วนของ ฉลาก	- เจ้า หน้าที่ ฝ่าย บรรจุ	หากติด ฉลาก ผิดพลาด ควรติด ฉลากใหม่ ให้ถูกต้อง	- แผ่น บันทึก งานการ ตรวจ สอบของ ห้อง บรรจุ	
			- ที่จุด รับซื้อ กุ้งสด ตรวจ ว่ามี สาร ซัลไฟต์ หรือไม่	- ทดสอบ ด้วยมาลา โคทท์กรีน	- กุ้งสด สุ่มตรวจ 3 ตย.ต่อ ถัง	-นาย เรือ		- แผ่น บันทึก งานการ ประเมิน วัตถุดิบ	
			- ที่จุดรับ ซื้อกุ้ง แช่แข็ง ตรวจ การ บอกว่า ไม่มี สารซัล ไฟต์ใน กุ้ง หรือไม่	-สังเกต จากการ เขียน บอกของ ผู้ขาย	- กุ้งแช่ แข็ง ตรวจสอบ ทุกชุด	-นาย เรือ		-มีการ รับประกัน จากผู้ขาย	

10.4.3.7 หลักการที่ 7 การทวนสอบ (Verification Procedure)

กำหนดวิธีเพื่อทวนสอบระบบ HACCP ว่าทำงานถูกต้องหรือไม่ การทวนสอบ (verification) คือ การใช้วิธีการ กระบวนการทดสอบหรือการประเมินใด ๆ นอกเหนือไปจากการตรวจติดตามเพื่อตรวจสอบการปฏิบัติงานว่าดำเนินไปตามแผน HACCP และเพื่อยืนยันว่าระบบนี้ยังคงมีประสิทธิภาพหรือต้องมีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการควบคุมที่จุด CCP อย่างเดียวไม่อาจประกันได้ว่าแผน HACCP ที่จัดทำขึ้นจะได้ผลอย่างสมบูรณ์ถูกต้อง

การทวนสอบจะช่วยให้ผู้ผลิตสามารถทบทวนมาตรการควบคุม และทบทวนว่ามีการควบคุมอย่างเหมาะสมและเพียงพอ จุดประสงค์ก็เพื่อให้ได้ความเชื่อมั่นระดับหนึ่งซึ่งแผน HACCP ตรงตามหลักวิทยาศาสตร์และเพียงพอที่จะควบคุมอันตรายที่มากับผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิต

เหตุผลหนึ่งของทวนสอบคือ การยากที่จะเข้าใจเพราะมีหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับหลักการซึ่งรวมทั้ง validation และ audits ความสับสนเกิดขึ้นเพราะแผน HACCP จะต้องรวมวิธีการทวนสอบสำหรับแต่ละจุด CCP และทั้งแผน HACCP เพื่อให้เข้าใจมากขึ้น สิ่งต่าง ๆ จะต้องถูกอธิบาย การทวนสอบควรประกอบด้วย

1. Validation คือการประเมินสภาพความใช้ได้ เช่น กิจกรรม ccp verification activities การสอบเทียบเครื่องมือ การสุ่มตัวอย่างทดสอบเป้าหมายและ CCP record review

2. HACCP system verification ได้แก่ 1) audits หมายถึง การตรวจประเมินระบบ HACCP และ 2) การทดสอบทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์

3. Regulatory agencies

Validation หมายถึง การได้มาซึ่งหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่าแผน HACCP มีประสิทธิภาพ (ความใช้ได้) Validation เป็นองค์ประกอบสำคัญของการทวนสอบ ซึ่งมีจุดประสงค์หรือแสดงให้เห็นว่าแผน HACCP ที่ใช้อยู่มีการระบุและควบคุมอันตรายของผลิตภัณฑ์อย่างพอเพียงและสามารถลดอันตรายที่จะเกิดขึ้นให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

ใครเป็นผู้ประเมินความใช้ได้ (Validate ?)

ผู้ทำการประเมินอาจเป็นทีมงาน HACCP คนที่ได้รับการอบรมหรือมีประสบการณ์ โดยมีขอบเขตและเวลาของการประเมินเหมือนกับช่วงเริ่มต้นของการพัฒนาแผน HACCP

การประเมินความใช้ได้นี้เป็นกระบวนการเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าแผน HACCP มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ และมีข้อมูลที่ทันสมัยเหมาะสมกับผลิตภัณฑ์และกระบวนการผลิตที่ดำเนินการซึ่งเป็นการทบทวนเพื่อสรุปว่าอันตรายที่ถูกกำหนดไว้จะถูกควบคุมอย่างไร โดยรวมถึงการทบทวนการวิเคราะห์อันตรายและค่าวิกฤตที่กำหนดโดยใช้คำแนะนำและข้อมูลทางวิทยาศาสตร์

การประเมินความใช้ได้ควรทำตั้งแต่ตอนเริ่มต้นและทำต่อเนื่องเป็นระยะๆ ตามช่วงเวลาที่กำหนดไว้ แต่อาจมีหลายปัจจัยซึ่งเมื่อเกิดขึ้นแล้วควรทบทวนแผน HACCP เพื่อดูว่าจำเป็นต้องมี

การเปลี่ยนรายละเอียดในแผน HACCP หรือไม่ โดยต้องทำทันทีแม้ว่ายังไม่ครบตามเวลาที่กำหนดไว้ ตัวอย่างปัจจัยที่มีผลได้แก่ การเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบ การเปลี่ยนผลิตภัณฑ์หรือกระบวนการ การตรวจพบสิ่งผิดปกติ การเบี่ยงเบนที่เกิดขึ้นซ้ำๆ ข้อมูลใหม่เกี่ยวกับอันตรายและมาตรการควบคุม การสังเกตในสายการผลิตและการแจกจ่ายผลิตภัณฑ์ใหม่หรือวิธีการปฏิบัติของผู้บริโภค

ตัวอย่างของกิจกรรม validation

การควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งจัดเป็นอันตรายในแฮมเบอร์เกอร์ทำโดยให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิภายในสูงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในแผน HACCP ความหนาสูงสุดของชิ้นเนื้อ ความเร็วสูงสุดของสายพานของเครื่องให้ความร้อนและอุณหภูมิต่ำสุดของเครื่องให้ความร้อนค่าเหล่านี้ถูกกำหนดเป็นค่าจำกัดวิกฤต เพื่อให้แน่ใจว่าอุณหภูมิภายในชิ้นเนื้อจะเพิ่มขึ้นตามต้องการ การตั้งค่าตัวแปรเหล่านี้ จะทำภายหลังที่ได้เก็บข้อมูลจากสายการผลิตมากพอที่จะแน่ใจว่าการควบคุมที่จุดนี้อยู่ในสภาวะที่กำหนด สามารถทำให้อุณหภูมิต่ำสุดภายในชิ้นเนื้อทุกชิ้นสูงถึงระดับที่ต้องการในระหว่างการทำให้สุก

ในกึ่งสดจะกำหนดอุณหภูมิภายในที่ 145°F จำเป็นที่อุณหภูมิต้องสูงพอที่จะทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค การให้ความร้อนที่ 212°F เป็นเวลา 4 นาที จะทำให้อุณหภูมิภายในเพิ่มขึ้นเป็น 145°F ความสามารถของกระบวนการที่จะทำให้ได้อุณหภูมิและเวลาตามที่กำหนดจะถูกพิสูจน์โดยการวัดอุณหภูมิที่กึ่งกลางของกึ่งจำนวนหนึ่งที่ใช้เป็นตัวแทน และจะประเมินเครื่องมือให้ ความร้อนโดยการทดสอบการแผ่กระจายของความร้อนทุกจุดภายในเครื่องมือนั้นว่า มีอุณหภูมิสม่ำเสมอตลอดช่วงของการทำงานหรือไม่

กิจกรรมการทวนสอบที่จุด CCP (CCP verification activities)

กิจกรรมการทวนสอบที่พัฒนาขึ้นสำหรับจุด CCP นั้น ๆ จำเป็นเพื่อให้แน่ใจว่าวิธีการควบคุมที่ใช้ในการทำงานอย่างเหมาะสมและกำลังทำงานภายในช่วงที่เหมาะสม สำหรับควบคุมความปลอดภัย ของอาหาร ตัวอย่างการทวนสอบที่จุด CCP ได้แก่ การสอบเทียบเครื่องมือที่ใช้เพื่อทวนสอบว่าการตรวจติดตามนั้นให้ผลถูกต้อง การบันทึกการตรวจติดตามและแก้ไขเพื่อยืนยันว่ามีประสิทธิภาพตามแผน HACCP และการสุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์เพื่อตรวจสอบ

ก) การสอบเทียบเครื่องมือ (Calibration)

การสอบเทียบเครื่องมือมักทำกับเครื่องมือที่ใช้ตรวจติดตามหรือทวนสอบ ทำบ่อยครั้งเพื่อให้แน่ใจถึงความถูกต้องของการวัดทำโดยตรวจสอบความถูกต้องกับสภาพมาตรฐานที่ใช้เครื่องมือ นั้น ตัวอย่างของกิจกรรมการสอบเทียบเครื่องมือได้แก่

1. MIG thermometer ที่ใช้ตรวจวัดอุณหภูมิที่จุด CCP ซึ่งให้ความร้อนกับอาหารโดยอาจถูกตรวจสอบความถูกต้อง โดยการเปรียบเทียบกับเทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการรับรองในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ

2. เครื่องวัดอุณหภูมิอย่างต่อเนื่องในเครื่องพาสเจอร์ไรส์ อาจเปรียบเทียบกับอุณหภูมิในแต่ละชุดผลิตภัณฑ์กับเทอร์โมมิเตอร์ที่ถูกตั้งซึ่งได้รับการรับรอง

3. เครื่องวัด pH (pH meter) จะถูกสอบเทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH มาตรฐาน เป็น 7.0 และ 4.0 เมื่อใช้ทดสอบผลิตภัณฑ์ที่มี pH สุดท้ายเป็น 3.8-4.2

ข) การตรวจดูบันทึกการสอบเทียบเครื่องมือ (Calibration record review)

ตรวจดูว่าเครื่องมือนั้นผ่านการสอบเทียบหรือไม่โดยตรวจดูการบันทึกการสอบเทียบเครื่องมือ ได้แก่ การตรวจสอบวันที่ วิธีสอบเทียบและวิธีวิเคราะห์ผล ตัวอย่างของการตรวจบันทึกการสอบเทียบเช่น การตรวจดูการบันทึกอุณหภูมิจาก MIG thermometer ซึ่งให้เห็นว่าเทอร์โมมิเตอร์นี้ถูกตรวจสอบความถูกต้องกับเทอร์โมมิเตอร์ที่ได้รับการรับรอง บันทึกนี้ยังชี้ให้เห็นว่าเทอร์โมมิเตอร์ทำงานภายในสภาพที่กำหนดและไม่ต้องปรับเปลี่ยนในการสอบเทียบซึ่งแสดงถึงการไม่มีปัญหา

การสุ่มตัวอย่างเป้าหมายและการตรวจสอบ (Targeted Sampling and Testing)

การทวนสอบอาจรวมถึง การสุ่มตัวอย่างการทดสอบและกิจกรรมอื่นที่ทำเป็นระยะ ๆ อาจสุ่มตัวอย่างมาตรวจ เมื่อรับซื้อวัตถุดิบกรณีที่จุดรับวัตถุดิบเป็นจุด CCP และข้อกำหนดในการซื้อต้องตรงตามคำจำกัดความโดยทั่วไปเมื่อการตรวจติดตามไม่เข้มงวด ควรมีการทวนสอบที่เข้มงวด ตัวอย่างของการสุ่มตัวอย่างและตรวจสอบได้แก่

1. บริษัทที่ซื้อกุ้งแช่แข็งภายใต้การรับประกันของผู้จัดส่งว่าปราศจากสารซัลไฟต์ ควรทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งแช่แข็งมาตรวจว่าไม่มีสารซัลไฟต์จริงหรือไม่

2. การทวนสอบสารซัลไฟต์ตกค้างที่จุดรับกุ้งสด ควรสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเพื่อให้แน่ใจว่าผลที่ได้จากการตรวจติดตามเบื้องต้นนั้นถูกต้อง และควรบันทึกให้เห็นการเบี่ยงเบน

เมื่อตั้งคำจำกัดความสำหรับการปฏิบัติงานของเครื่องมือ ควรสุ่มตัวอย่างเพื่อให้แน่ใจว่าการตั้งเครื่องมือั้นเหมาะสมกับความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์

ตัวอย่างของการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจสอบได้แก่

1. บริษัทอาจเก็บตัวอย่างกุ้งในสายการผลิตของผลิตภัณฑ์ที่คัดเลือกหลังการทำให้สุกเพื่อนำมาวัดอุณหภูมิภายใน

2. เมื่อความหนาของแฮมเบอเกอร์นั้นวิกฤตต่อการทำให้สุกอย่างเหมาะสม ควรจะเก็บตัวอย่างและวัดความหนาของแฮมเบอเกอร์ว่ามีความหนาเหมาะสมตามต้องการหรือไม่

การตรวจดูบันทึกที่จุด CCP (CCP record review)

ที่แต่ละจุด CCP ควรมีการบันทึกอย่างน้อย 2 ชนิด คือบันทึกการตรวจติดตามและการแก้ไข บันทึกเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นเนื่องเป็นการชี้ให้เห็นว่าจุด CCP นั้นกำลังทำงานภายใต้ตัวแปรที่ให้ความปลอดภัยและการเบี่ยงเบนถูกจัดการอย่างเหมาะสม อย่างไรก็ตามการบันทึกอย่างเดียวไม่มีความหมาย ถ้าไม่ใครคอยไปตรวจดูเป็นระยะ ๆ เพื่อพิสูจน์ให้เห็นว่าตรงตามแผน HACCP

การทวนสอบระบบ HACCP (HACCP System Verification)

นอกจากจะทวนสอบจุด CCP ต่าง ๆ แล้วยังต้องทำการทวนสอบระบบ HACCP ทั้งระบบ ควรทำอย่างน้อยปีละครั้งหรือควรทำเมื่อมีความผิดปกติเกิดขึ้น หรือมีการเปลี่ยนแปลงผลิตภัณฑ์ หรือกระบวนการผลิต คณะทำงานต้องรับผิดชอบเพื่อให้แน่ใจว่ามีการทวนสอบทั้งระบบ บ่อยครั้งที่ทีมงานได้ร่วมมือกับบุคคลอื่นในการทวนสอบทั้งระบบเช่น เจ้าหน้าที่ขององค์การที่เกี่ยวข้องกับกฎข้อบังคับ (regulatory agency) อาจเข้ามาทวนสอบระบบ HACCP ว่ามีประสิทธิภาพหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

1. Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology, 3rd ed. CRC Press., Boca Raton, Florida.
2. Bauman, H.E. 1992. Introduction to HACCP, pp. 1-5. In: Pierson, M.D., Corlett, D.A. HACCP: Principles and Applications, Van Nostrand Reinhold, New York.
3. Jay, J. M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern Food Microbiology, 7th ed. Springer Science+Business Media, Inc., New York.
4. Huang, Y.-W. 1997. HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point Training Curriculum. Seafood HACCP Alliance for Training and Education, Department of Food Science and Technology, University of Georgia, Athens, GA.
5. Mortimore, S., Wallace, C. 2013. HACCP: A Practical Approach, 3rd ed. Springer Science+Business Media, New York.
6. Corlett, Jr., D.A. 1998. HACCP User's Manual. Aspen Publishers, Inc. Maryland, USA.
7. Rhodehamel, E. J. 1992. Overview of Biological, Chemical, and Physical Hazards, pp. 8-38. In: Pierson, M.D., Corlett, D. A. HACCP: Principles and Applications, Van Nostrand Reinhold, New York.
8. คณะผู้จัดการประชุมเชิงปฏิบัติการปฐมนิเทศครั้งที่ 6. 2551. หนังสือประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการปฐมนิเทศครั้งที่ 6. ภาควิชาปฐมนิเทศฯ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
9. Bell, C., Neaves, P., Williams, A.P. 2005. Food Microbiology Laboratory Practice. Blackwell Science Ltd., UK.

บทที่ 11

โพรไบโอติก พรีไบโอติกและโพสไบโอติก

11.1 โพรไบโอติก

มีการยอมรับโดยทั่วกันถึงบทบาทที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะอาหารและลำไส้ต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ จากหลักการที่จุลินทรีย์บางชนิดจะให้ประโยชน์โดยตรงแก่ร่างกายของสัตว์ที่จุลินทรีย์นี้อาศัยอยู่เมื่อมีอยู่ในปริมาณที่เพียงพอ เป็นคำจำกัดความของคำว่า “โพรไบโอติก (probiotic)” ผู้เชี่ยวชาญของสหประชาชาติ (United Nations) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้ว่า “เป็นจุลินทรีย์ที่เมื่อรับประทานเข้าไปในปริมาณที่เพียงพอแล้วจะให้ประโยชน์ต่อสุขภาพของร่างกายสัตว์ที่จุลินทรีย์นี้อาศัยอยู่” [1]

ตาม guideline ขององค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) และองค์การอนามัยโลกได้กล่าวว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ใช้ในอาหารจะต้องสามารถผ่านเข้าไปและอยู่รอดได้ในลำไส้ดังเช่น ต้องมีความสามารถทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร สามารถทนต่อเกลือน้ำดีและสามารถเจริญหรือเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้โพรไบโอติกที่ใช้ยังต้องมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพและยังคงมีประสิทธิภาพและศักยภาพตลอดช่วงอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วย [1]

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก (ตารางที่ 11.1) ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ในกลุ่มที่หลากหลายเช่น *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Bifidobacteria* นักวิจัยหลายท่านได้เสนอให้ใช้คุณสมบัติในการเกาะติดของจุลินทรีย์ในการคัดเลือกโพรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ ซึ่งกลไกที่ใช้ในการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้แก่ 1) การแข่งขันสำหรับสารอาหารและจุดที่เข้ามา 2) การสร้างสารเมแทบอลิซึมในการต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค 3) การเปลี่ยนแปลงในสภาพแวดล้อม และ 4) การตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน จุลินทรีย์ส่วนน้อยที่ถูกใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus* และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* สำหรับเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ได้ถูกใช้เป็นโพรไบโอติกที่ช่วยส่งเสริมการย่อยน้ำตาลแลคโตสในคนที่แพ้แลคโตส [1]

11.1.1 ประโยชน์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อสุขภาพ

ผลของโพรไบโอติกต่อสุขภาพมีหลายประการ ดังนี้

11.1.1.1 อันตรกิริยาของโพรไบโอติกต่อระบบภูมิคุ้มกัน

จุลินทรีย์ในลำไส้ซึ่งจะอาศัยอยู่บริเวณที่เรียกว่า epithelial cell ของผนังลำไส้ (gut lumen) เชื่อกันว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีส่วนร่วมในตอนเริ่มต้นและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรค โดยอันตรกิริยากับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของบริเวณ Peyer's patches เนื้อเยื่อน้ำเหลืองใน lamina propria ของลำไส้และเม็ดเลือดขาว เริ่มแรกโพรไบโอติกสามารถที่จะเข้าไปจับกับ recognition receptor ที่แสดงออกบนผิวของเซลล์ epithelial ของผนังลำไส้เล็ก ซึ่งจะก่อให้เกิดกลไกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน [1]

ตารางที่ 11.1 จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Lactic acid bacteria	ชนิดอื่นๆ
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. curvatus</i>			
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophiles</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

ที่มา: Saad และคณะ [1]

โพรไบโอติกสามารถส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) รวมถึงกิจกรรม phagocytic ของ neutrophils และกิจกรรม cytotoxic ของ NK cell การกระตุ้นกิจกรรมของเซลล์มีเกี่ยวข้องกับความสามารถในการติดเชื้อและการต้านมะเร็งของโพรไบโอติก การใช้โพรไบโอติกอาจไปช่วยในการส่งเสริมหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันได้ จริงๆ แล้วได้มีรายงานที่บ่งชี้ให้เห็นว่าการเติมเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* HN001 ลงไปในอาหารสามารถช่วยเพิ่มจำนวนของ NK cell ในร่างกายคนได้ และได้มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* Shirota ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักนมสามารถช่วยส่งเสริมกิจกรรม cytotoxic ของ NK cell ได้ ยิ่งไปกว่านั้นยัง

ได้มีรายงานอีกว่าองค์ประกอบของผนังเซลล์ของโพรไบโอติกเช่น กรดไลโปเทอโคอิก (lipoteichoic acid) สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมโครฟาจ (macrophage) หลั่ง TNF- α และ IL-10 ได้ โดยผ่านตัวรับที่สำคัญคือ phagocytosis receptors เช่น Toll-like receptor [1]

11.1.1.2 การแพ้แลคโตส

ประชากรหลายล้านคนทั่วโลกประสบกับสภาวะการดูดซึมแลคโตสได้ไม่ดี ซึ่งเกิดมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น สาเหตุที่ทำให้เกิดสภาวะนี้ เนื่องมาจากการลดลงของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเตส ภายใน brush border ของลำไส้เล็ก การลดลงของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์นี้ มีผลทำให้เกิดการดูดซึมแลคโตสได้ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงทำให้เกิดอาการท้องอืด ท้องเดิน เป็นตะคริวที่ท้อง ตลอดจนเกิดอาการท้องร่วงในระดับปานกลางจนถึงระดับรุนแรงได้ การเกิดปัญหานี้เป็นผลให้บุคคลมีข้อจำกัดในการรับประทานผลิตภัณฑ์นมหรือไม่สามารถรับประทานได้ ซึ่งปัญหาเหล่านี้พบมากในผู้สูงอายุ จากการทดลองหลายการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเตสในโยเกิร์ตมีผลต่อกระบวนการหมักนมเพื่อให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์และเมื่อมีการบริโภคโยเกิร์ตซึ่งมีเอนไซม์แลคเตสจะช่วยทำให้เกิดการกระตุ้นภายในลำไส้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ถูกใช้สำหรับการผลิตโยเกิร์ตนี้ก็คือเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* และได้มีการทดลองพบว่าการรับประทานโยเกิร์ต มีส่วนช่วยผู้ที่มีอาการแพ้แลคโตส เนื่องจากมีความสำคัญต่อการลดระดับของไฮโดรเจนลงในลมหายใจ เมื่อเปรียบเทียบกับรับประทานนมอย่างเดียวในสภาวะที่เหมือนกัน ระดับของไฮโดรเจนในลมหายใจมีผลต่อเมแทบอลิซึมของเอนไซม์แลคเตสของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ที่จะไม่เกิดการดูดซึมภายในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ที่เป็นบริเวณที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมากและหนาแน่น และยังมีงานวิจัยอีกที่พบว่า บุคคลผู้ที่รับประทานเอนไซม์แลคเตสที่มีอยู่ในโยเกิร์ตปริมาณ 18 กรัม นั้น จะช่วยลดระดับของไฮโดรเจนภายในลมหายใจได้ถึงร้อยละ 67 เมื่อเปรียบเทียบกับรับประทานนมตามปกติ [2]

11.1.1.3 โรคลำไส้อักเสบ

โรคลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) เป็นปัญหาหลักทางการแพทย์ คำนี้ใช้สำหรับเรียกโรคที่มีอาการอักเสบของลำไส้ และโรคที่มีความจำเพาะและมีความผิดปกติ โรคที่จัดอยู่ในกลุ่มของโรคที่ก่อให้เกิดการอักเสบนั้น รวมถึงโรคโครห์น (Crohn's disease) โรคแผลอักเสบในลำไส้ (ulcerative colitis) และโรคที่มีความระคายเคืองในลำไส้ (irritable bowel syndrome) การประยุกต์ใช้ที่สำคัญทางการแพทย์อย่างหนึ่งก็คือ การนำโพรไบโอติกมาใช้ในการรักษาและป้องกันไม่ให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ หรือทำให้โรคลำไส้อักเสบทุเลาลง [2]

11.1.1.4 การรักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร

จากรายงานทางการแพทย์ได้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในการรักษาโรคอย่างกว้างขวางโดยส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับโรคท้องร่วง (diarrheal disease หรือ gastroenteritis) สามารถแบ่งกลุ่มการรักษาและการป้องกันตามสาเหตุหรือชนิดของโรค ได้ดังนี้

- โรคอุจจาระร่วงที่เกี่ยวข้องกับการได้รับยาปฏิชีวนะ

ได้มีการทดลองมากมายที่ทดสอบหาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกในการป้องกันหรือช่วยลดความถี่และความรุนแรงของโรคอุจจาระร่วงที่เกี่ยวข้องกับการใช้ยาปฏิชีวนะในทางคลินิก จากการทดลองศึกษาในเด็กจำนวน 119 คนที่ได้รับยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ พร้อมกับการให้รับประทาน *Lactobacillus rhamnosus* GG โดยเปรียบเทียบกับเด็กที่ไม่ได้รับประทานเชื้อ *L. rhamnosus* GG ในช่วงที่มีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ พบว่าเด็กจำนวนหนึ่งที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG จะมีอาการท้องร่วงลดลงถึงร้อยละ 70 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับประทานเชื้อนี้ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติก มีคุณสมบัติมากมายในการบำบัดและรักษาโรคอุจจาระร่วง [2]

- โรคท้องร่วงเฉียบพลัน

การศึกษาหลากหลายแหล่งได้รายงานเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกในการป้องกันหรือรักษาโรคท้องร่วงเฉียบพลัน (Acute diarrhea) การศึกษาส่วนใหญ่ได้ทำการทดลองในเด็กทารกและเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคคือ ไรต้าไวรัส (rotavirus) หรือบางกรณีไม่ทราบสาเหตุของโรค โดยพบว่าโพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคท้องร่วงเฉียบพลัน ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกดังกล่าว ได้แก่เชื้อ *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* และ *S. boulardii* [2]

11.1.1.5 การลดระดับคอเลสเตอรอล

มีหลักฐานจากการทดลองในมนุษย์ พบว่าโพรไบโอติกอาจมีส่วนทำให้ระดับของคอเลสเตอรอลในซีรัมลดลงและมีปริมาณของแอลดีแอล-คอเลสเตอรอลลดลงเช่นกัน ผลลัพธ์ดังกล่าวยังไม่เป็นที่แน่ชัดและมักจะมีข้อโต้แย้ง การลดระดับของแอลดีแอล-คอเลสเตอรอลมีความสำคัญต่อการลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) และโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน (fatal myocardial infarction) จากการศึกษาในมนุษย์ได้แสดงให้เห็นถึงผลของผลิตภัณฑ์นมหมักต่อระดับพลาสมาคอเลสเตอรอล ซึ่งพบว่าการลดลงของระดับคอเลสเตอรอลในช่วงร้อยละ 5.4 ถึงร้อยละ 23.2 และมีการลดลงของปริมาณแอลดีแอล-คอเลสเตอรอลอยู่ในช่วงร้อยละ 9 ถึงร้อยละ 9.8 [2]

11.1.1.6 การรักษาอาการภูมิแพ้

ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางที่เกี่ยวข้องกับการใช้โพรไบโอติกในการปรับสภาพของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสารก่อภูมิแพ้จากอาหาร ซึ่งได้ทำการทดลองศึกษากับเชื้อแบคทีเรีย *L. rhamnosus* GG เพื่อใช้ในการป้องกันและบำบัดโรคภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic eczema) โดยได้มีผู้ทำการทดลองในหญิงมีครรภ์จำนวน 159 คนที่ครอบครัวมีประวัติของการเป็นโรคภูมิแพ้ โดยการให้เชื้อ *L. rhamnosus* GG เปรียบเทียบกับการไม่ให้เชื้อนี้เป็นเวลา 2 ถึง 4 สัปดาห์ก่อนถึงกำหนดเวลาคลอด และได้ทำการทดลองในหญิงที่เลี้ยงลูกด้วยนมแม่ที่รับประทานเชื้อ *L. rhamnosus* GG เปรียบเทียบกับการไม่รับประทานเชื้อนี้เป็นเวลา 6 เดือนโดยได้เปรียบเทียบกับหญิงที่เลี้ยงลูกด้วยนมขวด ซึ่งได้รับและไม่ได้รับเชื้อ *L. rhamnosus* GG พบว่าเด็กที่ได้รับ *L. rhamnosus* GG จะมีอัตราการเกิดโรคภูมิแพ้ลดลงถึงร้อยละ 50 ในระยะเวลา 2 ปีแรกหลังเกิด เมื่อเปรียบเทียบกับเด็กที่ไม่ได้รับเชื้อ *L. rhamnosus* GG [2]

11.1.1.7 การป้องกันฟันผุ

ได้มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *L. rhamnosus* GG มีกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Streptococcus* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดฟันผุ จากการศึกษาทดลองของนักวิจัยกลุ่มหนึ่งในปี ค.ศ. 2001 ซึ่งได้ทดลองในเด็กในศูนย์เลี้ยงเด็ก โดยให้รับประทานเชื้อแบคทีเรีย *L. rhamnosus* GG ที่ผสมในนมเปรียบเทียบกับการที่ไม่ได้ใส่เชื้อในนมและทำการตรวจวิเคราะห์ทั้งก่อนและหลังจากการให้รับประทานเชื้อนี้เป็นเวลา 7 เดือน พบว่าเด็กที่ได้รับโพรไบโอติกจะมีอัตราของการเกิดฟันผุลดลง โดยเฉพาะในกลุ่มเด็กที่มีอายุ 3 ถึง 4 ปี [2]

11.1.1.8 การรักษาและการป้องกันมะเร็งโดยโพรไบโอติก

จากคุณสมบัติของกิจกรรมเมแทบอลิซึม โพรไบโอติกมีอิทธิพลต่อการเกิดมะเร็งลำไส้และการเกิดเนื้องอกได้ในที่บริเวณอื่นๆ มีรายงานว่าโพรไบโอติกช่วยลดเอนไซม์ของแบคทีเรียภายในลำไส้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นสารก่อมะเร็ง (procarcinogens) โพรไบโอติกยังสามารถสร้างกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acids) ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวป้องกันในลำไส้ใหญ่ และจากการทดลองในหนู พบว่าโพรไบโอติกยังสามารถยับยั้ง aberrant crypt foci ได้ [2]

11.2 โพรไบโอติก

โพรไบโอติก (prebiotic) ถูกให้คำจำกัดความขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1995 โดย Gibson และ Roberfroid ว่าหมายถึงส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยซึ่งมีผลในทางที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายของผู้ที่ได้รับสารดังกล่าว โดยจะไปกระตุ้นการเจริญหรือกิจกรรมของแบคทีเรียจำนวนหนึ่งที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ดังนั้นจึงช่วยปรับปรุงสุขภาพของผู้ที่รับประทานสารนี้ คำจำกัดความดังกล่าวได้ถูก

ปรับปรุงใหม่โดยผู้เขียนหลายๆท่านและในปัจจุบัน สารพรีไบโอติกหมายถึง ส่วนประกอบที่ถูกคัดเลือกให้เกิดกระบวนการหมักส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างจำเพาะทั้งต่อองค์ประกอบและหรือกิจกรรมของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะอาหารและลำไส้ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ ปัจจุบันสารพรีไบโอติกทั้งหมดหมายถึงคาร์โบไฮเดรตสายสั้น (short-chain carbohydrates) ที่มีระดับของการเกิดโพลิเมอร์ (degree of polymerization) ระหว่าง 2 ถึงประมาณ 60 มอนอเมอร์ และเชื่อกันว่าสารดังกล่าวนี้ไม่สามารถถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ [1] ซึ่งสารที่จะจัดเป็นสารพรีไบโอติกได้นั้นจะต้องมีคุณลักษณะสำคัญอย่างน้อย 3 ประการคือ 1) สารนั้นจะต้องไม่ถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) หรือดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก 2) สารนั้นจะต้องมีความจำเพาะกับแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ เช่น bifidobacteria 3) การหมักของสารนี้ควรชักนำให้เกิดผลในทางที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย [3] ซับสเตรต (substrate) จำนวนหนึ่งที่ได้มาจากอาหารหรือถูกผลิตขึ้นโดยร่างกายที่จะถูกใช้ในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ ได้แก่ สาร resistant starch ซึ่งเป็นสารที่ได้มาจากอาหารเป็นซับสเตรตที่มีปริมาณมากและมีความสำคัญมากที่สุด สารโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่สตาร์ช (non-starch polysaccharides) นั้นเป็นสารกลุ่มที่มีปริมาณมากและมีความสำคัญรองลงมา ประกอบด้วยซับสเตรตที่ได้จากพืช เช่น เพคติน (pectin) เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) กว (guar) และไซแลน (xylan) น้ำตาลและโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) เช่น แลคโตส (lactose) แลคทูโลส (lactulose) ราฟฟิโนส (raffinose) สตาชิโอส (stachyose) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) สารทั้งหมดนี้เป็นสารที่ไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก ดังนั้นจึงพบมากในลำไส้ใหญ่ ซึ่งจะถูกเมแทบอลิซึมโดยเชื้อแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ มิวซินไกลโคโปรตีน (mucin glycoprotein) ถูกสร้างขึ้นโดยก๊อบเล็ตเซลล์ (goblet cell) ในเยื่อบุลำไส้ใหญ่ (colonic epithelium) เป็นสารที่มีมากซึ่งจะถูกหมักในลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้สารมิวโคโพลีแซคคาไรด์ (related mucopolysaccharides) ชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องเช่น คอนดรอยติน ซัลเฟต (chondroitin sulphate) และเฮปาริน (heparin) และสารที่หลังจากตับอ่อนและแบคทีเรียนั้น เป็นสารที่หาได้หรือมีใช้โดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ สุดท้ายแล้วโปรตีนและเปปไทด์ที่ได้มาจากอาหารซึ่งอยู่ในสารที่หลังจากตับอ่อนหรือถูกผลิตขึ้นโดยเชื้อแบคทีเรียก็ยังคงเป็นสารที่มีอยู่แม้ว่าจะมีในปริมาณที่น้อยกว่าสารประเภทคาร์โบไฮเดรต [3]

ดังนั้นสารพรีไบโอติก จึงเป็นสารที่สามารถกระตุ้นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นบางชนิดที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ได้มากกว่าที่จะนำแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่อาศัยอยู่ภายนอกในร่างกายเข้ามา ฉะนั้นหลักการที่สำคัญของสารพรีไบโอติกก็คือ การที่สารคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อย (non-digestible carbohydrates) ถูกคัดเลือกไปใช้ในการหมักโดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ และเมื่อองค์ประกอบของอาหารใดๆ นี้เคลื่อนมาถึงลำไส้ใหญ่จึงเป็นสารพรีไบโอติกที่มีศักยภาพ อย่างไรก็ตาม

ตามความสนใจส่วนใหญ่ในการพัฒนาสารพรีไบโอติกนั้น ได้มุ่งเน้นไปที่สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible oligosaccharides) [3]

เนื่องจากแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ดังนั้น สารพรีไบโอติกมักจะเคลื่อนตัวไปยังแบคทีเรียที่อยู่บริเวณลำไส้ส่วนล่างโดยตรง ปัจจุบันพรีไบโอติกส่วนใหญ่ถูกจัดเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้บริเวณลำไส้ส่วนบนและมีระดับของการถูกเลือกให้เกิดกระบวนการหมักตามความต้องการ ตัวอย่างเช่นมีความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม bifidobacteria [3]

11.2.1 แหล่งที่มาและชนิดของสารพรีไบโอติก

มีความเป็นไปได้ที่จะได้รับสารพรีไบโอติกจากธรรมชาติ เช่น จากอาหาร ผักและผลไม้หลายชนิดประกอบด้วยสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่จัดเป็นสารพรีไบโอติก เช่น สารฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ผักและผลไม้ที่มีสารโอลิโกแซคคาไรด์ได้แก่ หัวหอม กระเทียม กลัวย หน่อไม้ฝรั่ง กระเทียมต้น หัวชิโครี และแก่นตะวัน เป็นต้น (Gibson, 2004)

เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการพัฒนาสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นสารพรีไบโอติกและแบคทีเรียโพรไบโอติกในทางการค้าซึ่งได้นำไปสู่แนวคิดใหม่นั้นคือ ซิมไบโอติก (symbiotic) ซึ่งเป็นการรวมโพรไบโอติกเข้ากับสารพรีไบโอติก สารพรีไบโอติกนั้นอาจได้มาจากการสกัดโดยตรงจากแหล่งธรรมชาติหรือโดยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยการไฮโดรไลซ์พอลิแซคคาไรด์หรือโดยการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์และปฏิกิริยาทางเคมีจากน้ำตาลโมเลกุลคู่ สารพรีไบโอติกส่วนใหญ่ถูกสังเคราะห์ขึ้นหรือแยกโดยกระบวนการดีพอลิเมอร์ไรเซชัน (depolymerization) ของพอลิแซคคาไรด์จากพืช และสำหรับ เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharides) กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galacto-oligosaccharides) ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides) และไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (xylo-oligosaccharides) [1]

11.2.1.1 สารพรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ

(1) กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galacto-oligosaccharides)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วย กาแลคโตสในโครงสร้างต่อไปนี้คือ $\text{Glu } \alpha 1-4 [\beta \text{ Gal } 1-6]_n$ โดยที่ n เท่ากับ 2-5 ซึ่งพบได้ในน้ำนมของมนุษย์ วัว โยเกิร์ต และอาจสังเคราะห์ได้จากแลคโตสด้วยเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) [4] กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ในลำไส้และสามารถเคลื่อนตัวผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้โดยปราศจากการถูกย่อย แต่อย่างไรก็ตามกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดการสร้างกรดไขมันสายสั้นๆ (short-chain fatty acid) เช่น กรดแอสติก (acetic acid) กรดโพ

รพโรนิก (propionic acid) และกรดบิวทิริก (butyric acid) รวมทั้งแก๊ส เช่น แก๊สไฮโดรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้อาจมีสารประกอบอื่นที่ได้จากการย่อยสลายกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์เช่น แลคเตท (lactate) ที่สามารถส่งเสริมการเจริญของ Bifidobacteria และ Lactobacilli ได้ จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถช่วยสังเคราะห์สารจำพวกวิตามินออกมากระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและป้องกัน ภาวะอาหารส่วนบน (stomach upset) จากรายงานการศึกษาผลของกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ของอาสาสมัครจำนวน 12 คนที่มีจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้้น้อยกว่าปกติ โดยให้อาสาสมัครทั้ง 12 คนได้รับกาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ปริมาณ 10 กรัมต่อวัน พบว่ามีจำนวน จุลินทรีย์เพิ่มขึ้นและมีการดูดซึมแร่ธาตุในลำไส้ของพวกเขาเพิ่มขึ้นเช่นกัน แล้วยังมีรายงานว่ากาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาณร้อยละ 5 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ในอาหารหนูเป็นเวลา 30 วัน มีผลทำให้หนูนั้นมีการดูดซึมแคลเซียมเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีผู้ทดลองให้หนูกินอาหารที่มีกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาณร้อยละ 5 (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นเวลา 14 วันพบว่าหนูมีการดูดซึมแคลเซียม และแมกนีเซียมดีขึ้น นอกจากนี้กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ยังช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยการลดระดับค่าพีเอชในลำไส้ใหญ่ซึ่งจะช่วยยับยั้งกระบวนการสร้าง secondary bile acids ที่เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง กาแลคโตโอลิโก-แซคคาไรด์จะช่วยควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์ของ แบคทีเรียที่หลากหลายชนิด ตัวอย่างเช่น เบต้ากลูโคโรนิเดส (β -glucuronidase) และไนโตรรีดักเทส (nitroreductase) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษและสารก่อมะเร็ง กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ยังถูก พบว่าสามารถลดสารประกอบที่อันตราย เช่น แอมโมเนีย (ammonia) อินโดล (indole) และ *p*-cresol ซึ่งเป็นสารเคมีที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการขยายตัวของมะเร็งได้ [4]

(2) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และอินนูลิน

อินนูลิน คือสารโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นอาหารสะสมของพืช เป็นโมเลกุลของฟรุคโตโอ-ลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดเล็กประกอบด้วยฟรุคโตส 3 ถึง 60 โมเลกุลมีโครงสร้างคือ $\text{Glu } \alpha\text{-1-2 } [\beta\text{-Fru } 2\text{-1}]_n$ ซึ่ง n เท่ากับ 10^{14} โดยทั่วไปแล้วอินนูลินนั้นพบได้ในพืช แบคทีเรียและฟังไจบางชนิดและเป็นที่รู้กันดีว่ามีอินนูลิน มีอยู่ในผักและผลไม้มากกว่า 3,600 ชนิด โดยเฉพาะในวงศ์ชิโคเรียม (Cichorium family) เช่น ชิโครี กัลวีย หอมหัวใหญ่ และกระเทียม (ตารางที่ 2.1) อินนูลินไม่ถูกย่อยในลำไส้เล็กแต่บางส่วน อาจถูกย่อยในลำไส้ใหญ่โดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น อินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถละลายได้ง่ายในน้ำร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส แต่ละลายได้น้อยมากในน้ำเย็นและแอลกอฮอล์ อินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์เกือบทั้งหมดมีความเสถียร ไม่มีสมบัติทางประสาทสัมผัสที่ไม่พึงประสงค์ยกเว้นบางชนิดมีความหวานบ้าง ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อปรับปรุงรสสัมผัสและคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น ช่วยรักษาความสดใหม่และความชื้นในเค้ก และรักษาความคงตัวทางกายภาพในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม อินนูลินและฟรุคโตโอลิ

โก-แซคคาไรด์สามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้โดยปราศจากการถูกย่อย ดังนั้นทั้งอินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จึงมีคุณสมบัติของการเป็นสารพรีไบโอติก [4]

(3) โอลิโกแซคคาไรด์ในถั่วเหลือง (Soybean oligosaccharides)

Soybean oligosaccharides เป็นสารโอลิโกแซคคาไรด์ในถั่วเหลืองที่ประกอบด้วยราฟฟิโนส (raffinose) และสตาชิโอส (stachyose) สามารถทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้โดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ซึ่งสามารถเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม bifidobacteria ในลำไส้ใหญ่ได้ [4]

ตารางที่ 11.2 อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบในพืช

ชนิดของพืช	อินนูลิน (ร้อยละของน้ำหนักเปียก)	ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ร้อยละของน้ำหนักเปียก)
หอมหัวใหญ่	2-6	2-6
แก่นตะวัน	16-20	10-15
ชิโครี	15-20	5-10
กระเทียมต้น	3-10	2-5
อาร์ติโชค	3-10	น้อยกว่า 1
กล้วย	0.3-0.7	0.3-0.7
ข้าวไรน์	0.5-1.0	0.5-1.0
บาร์เลย์	0.5-1.5	0.5-1.5
ข้าวสาลี	1-4	1-4
หน่อไม้ฝรั่ง	1-30	5-10
กระเทียม	9-16	3-6

ที่มา: ดัดแปลงจาก Thammarutwasik และคณะ [4]

11.2.1.2 สารพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์

(1) แลคโตซูโครส (Lactosucrose)

แลคโตซูโครสถูกผลิตขึ้นจากการรวมกันของแลคโตสและซูโครสโดยใช้เอนไซม์เบต้า-ฟรุกโตฟูรานซิเดส (β -fructofuranosidase) จากการทดลองให้แลคโตซูโครสกับอาสาสมัครจำนวน 3 คนใน

ปริมาณ 3 กรัมต่อวัน พบว่าปริมาณของ bifidobacteria มีการเพิ่มขึ้น 0.7 เท่าและจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายลดลง 0.6 เท่า นอกจากนี้กรดไขมันสายสั้นๆ เช่น กรดแอซีติกและกรดบิวทิริกก็มีการเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน [4]

(2) แลคทูโลส (lactulose)

แลคทูโลส ถูกผลิตขึ้นจากแลคโตสที่มีโครงสร้างอยู่ในรูป Gal β 1-4 Fru แลคทูโลส ละลายได้ในน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในเมทานอลและไม่ละลายในอีเทอร์ ไม่ถูกไฮโดรไลซ์และไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก แต่สามารถถูกหมักโดยเชื้อแบคทีเรียภายในลำไส้ใหญ่ซึ่งจะช่วยเพิ่มจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ประจำถิ่น การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นนี้พบว่าสามารถช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ ช่วยลดปริมาณเชื้อก่อโรคและช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกัน แลคทูโลสปริมาณเล็กน้อยถูกพบในอาหารจากธรรมชาติ ดังนั้นจึงมีการเติมแลคทูโลสในอาหารที่หลากหลายชนิด เช่น โยเกิร์ต คุกกี้ เค้ก และชีสโกแลต เพื่อใช้เป็น Functional ingredient ที่ช่วยปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการ [4]

(3) ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharide)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ถูกผลิตขึ้นจากสตาร์ชโดยใช้เอนไซม์ไอโซมอลโตส (isomaltose) ซึ่งเป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่สามารถถูกย่อยได้ในลำไส้เล็ก มีรายงานว่า การให้สารไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ปริมาณ 20 กรัมต่อวันนั้นส่งผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ bifidobacteria ในลำไส้ใหญ่และกระบวนกรหมักไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่การสร้างบิวทิเรท [4]

(4) กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Gluco-oligosaccharide)

กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ ถูกสังเคราะห์ขึ้นด้วยเอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyl transferase) ที่ผลิตขึ้นโดย *Leuconostoc mesenteries* หรืออาจจะสกัดจากเบต้า-กลูแคน (β -glucan) ของต้นไผ่ โดยได้มีการยอมรับว่าเป็นอาหารฟังก์ชันนอล (functional food) กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถถูกหมักโดย Bifidobacteria ได้ ยกเว้น *Bifidobacterium bifidum* และยังสามารถถูกไฮโดรไลซ์โดยเชื้อกลุ่ม Bacteriodes และ Clostridia แต่ไม่สามารถถูกไฮโดรไลซ์โดย Lactobacilli นักวิจัยกลุ่มหนึ่งได้ศึกษาผลของกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ในหนูต่อกิจกรรมของเชื้อ *B. breve* และพบว่ากลูโค-โอลิโกแซคคาไรด์ สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ได้ [4]

(5) ไคโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharide)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส (xylose) ที่ต่อกันอยู่ด้วยพันธะ β 1-4 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์สามารถถูกไฮโดรไลซ์โดย Bifidobacteria และ Lactobacilli และพบว่า มีประสิทธิภาพมากกว่าฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ในการเพิ่มจำนวนประชากรของโพรไบโอติกและการลดจำนวนลงของแบคทีเรียที่เป็นอันตราย [4]

11.2.1.3 คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อย (Non-digestible carbohydrate)

คาร์โบไฮเดรตต่างๆ มักถูกจัดกลุ่มตามขนาดของโมเลกุลหรือ degree of polymerization ได้เป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ซึ่งกลุ่มย่อยเหล่านี้ถูกบ่งชี้โดยธรรมชาติของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบสำคัญ อย่างไรก็ตามมีความจำเป็นที่จะต้องทำการแบ่งตามคุณสมบัติทางสรีรวิทยาด้วย [5]

การจัดกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญที่สุด คือการจัดกลุ่มตามความสามารถในการย่อยในลำไส้เล็ก มีคาร์โบไฮเดรต 3 ชนิดหลักที่ไม่สามารถย่อยได้ในลำไส้เล็กของมนุษย์ ได้แก่ สารโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่สตาร์ช รีซิสแตนท์สตาร์ช และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่ถูกย่อย สารคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยในบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนบน จัดเป็นสับสเตรทที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายในลำไส้ใหญ่ รีซิสแตนท์สตาร์ชประมาณ 10 ถึง 60 กรัมต่อวันจะเคลื่อนตัวไปสู่ลำไส้ใหญ่ และรีซิสแตนท์สตาร์ชประมาณ 8 ถึง 40 กรัมต่อวันที่จะเป็นส่วนของสับสเตรทที่ใช้ในการหมักตามด้วยพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่สตาร์ช 8 ถึง 18 กรัมต่อวันซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลที่ไม่สามารถดูดซึมได้ 2 ถึง 10 กรัม และโอลิโกแซคคาไรด์ 2 ถึง 8 กรัม ซึ่งจะเป็นสับสเตรทที่ใช้ในการหมัก แต่อย่างไรก็ตามจากการสำรวจปริมาณรีซิสแตนท์สตาร์ชในอาหารหลักที่ชาวยุโรปรับประทานพบว่ามีปริมาณรีซิสแตนท์สตาร์ชเพียง 4 กรัมต่อวัน [5]

11.2.2 ประโยชน์ของสารโพรไบโอติก

จุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้สามารถหมักสารประกอบได้หลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารที่ได้มาจากอาหารซึ่งไม่ถูกย่อยในลำไส้เล็ก จึงทำให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการหมักโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ สารต่างๆ เหล่านี้รวมถึงรีซิสแตนท์สตาร์ช โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่สตาร์ช (dietary fiber) โอลิโกแซคคาไรด์ โปรตีน กรดอะมิโนและสารอื่นๆ อีกมากมาย โดยในผู้ใหญ่ทั่วๆ ไป อาหาร 100 กรัมของที่รับประทานเข้าไปในแต่ละวันนั้น จะเคลื่อนตัวเข้าสู่ลำไส้ใหญ่และจะเกิดกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ กระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนในลำไส้แบ่งได้เป็น 2 ชนิดหลัก คือ การย่อยสลายแบ่งให้เป็นน้ำตาล (saccharolytic) และการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic) ส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต คือกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) ซึ่งกรดไขมันสายสั้นที่สำคัญๆ นั้นได้แก่ แอซีเตท (acetate) โพรพิโอเนต

(propionate) และบิวทิเรท (butyrate) สารเหล่านี้อาจถูกเมแทบอลิซึมต่อไปเพื่อสร้างพลังงานให้แก่ร่างกาย สำหรับผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมักโปรตีนได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก เอมีน และแอมโมเนียซึ่งสารทั้งหมดนี้มีความเป็นพิษ (Gibson, 2004) ผลของสารพรีไบโอติกส่วนใหญ่ ที่มักถูกอ้างถึงเกี่ยวกับการปรับหน้าที่การทำงานของลำไส้ใหญ่และเมแทบอลิซึม เช่น การเพิ่มขึ้นของการแสดงออก หรือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดไขมันสายสั้น การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักรูขุมขน การลดลงของค่าพีเอชในลำไส้ใหญ่ การลดลงของผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีไนโตรเจน และการรีดักทีฟเอนไซม์ (reductive enzyme) การเพิ่มการแสดงออกของ binding proteins หรือ biomarker บางชนิดในเมแทบอลิซึมของไขมันและแร่ธาตุและการปรับระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งประโยชน์ของสารพรีไบโอติกชนิดต่างๆมีดังนี้ [1]

11.2.2.1 ผลต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้

สารพรีไบโอติกเช่น สารพรุโกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ทรานส์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (trans-galactooligosaccharides) และอินนูลินร่วมกับแบคทีเรียโพรไบโอติก เช่น *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* หรือ *B. bifidum* นั้นช่วยเพิ่มปริมาณของ bifidobacteria และ lactobacilli หรือช่วยยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด เช่น *Clostridium* sp., *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Enterobacterium* sp., *Salmonella* Enteritidis หรือ *S. Typhimurium* ในหนู หมู หรือคน นอกจากนี้การใช้สารพรีไบโอติกหลายๆ ชนิดร่วมกัน เช่น สารโพลีเดกซ์โทส (polydextrose) และแลคติทอล (lactitol) พบว่ามีผลต่อระบบนิเวศของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของหนูและมีผลช่วยส่งเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่ม การหลั่งของอิมมูโนโกลบูลินเอ (immunoglobulin A) และยิ่งไปกว่านั้นในการบำบัดรักษาภาวะลำไส้ใหญ่อักเสบ (colitis disorders) นั้นมีผลการทดลองจำนวนหนึ่งที่ได้แสดงให้เห็นประโยชน์ของอินนูลินในการบรรเทาภาวะลำไส้ใหญ่อักเสบในหนู [1]

11.2.2.2 ผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรค

หลักฐานความสำเร็จของพรีไบโอติก ได้แก่ ความสามารถในการปรับปรุงความต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรคโดยการเพิ่มจำนวนของ bifidobacteria และ lactobacilli ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าจุลินทรีย์ 2 สกุลนี้สร้างกรดแลคติกซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ไวรัส โปรโตซัวและแบคทีเรียที่สามารถก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารที่รุนแรง ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์เหล่านี้อาจช่วยลดค่าพีเอชในลำไส้ให้ต่ำกว่าระดับพีเอชที่จุลินทรีย์ก่อโรคจะเจริญแข่งขันได้ นอกจากนี้ lactobacilli และ bifidobacteria ยังปล่อยสารยับยั้งการเจริญที่ออกฤทธิ์กว้างต่อเชื้อจุลินทรีย์อีกด้วย [3]

11.2.2.3 การป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่

สารพรีไบโอติกสามารถป้องกันการพัฒนาของมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยผ่านกลไกอย่างน้อย 2 กลไก ได้แก่ 1) การสร้างสารเมแทบอลิท์ป้องกัน เช่น บิวทิเรท คือสารผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมักและสามารถที่จะกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และเป็นแหล่งพลังงานสำหรับเซลล์ลำไส้ใหญ่ที่มีสุขภาพดี ด้วยเหตุนี้จึงมีความต้องการที่จะเพิ่มระดับของการสร้างบิวทิเรทในลำไส้ใหญ่ โดยพบว่าสารพรีไบโอติกนั้นมีความสามารถในการกระตุ้นการสร้างบิวทิเรทได้ 2) การกำจัด เมแทบอลิซึมของโปรตีนและไขมันในลำไส้ใหญ่ โดยเป็นไปได้ที่พรีไบโอติกจะชักนำกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ซึ่งจะนำไปสู่การสร้างผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ไม่เป็นพิษโดยจะเปลี่ยนเมแทบอลิซึมของ clostridia และ bacteroides จากการย่อยสลายโปรตีนไปเป็นการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาล [3]

11.2.2.4 การปรับปรุงการดูดซึมแคลเซียม

มีความสนใจเพิ่มขึ้นในหลายๆ ปีที่ผ่านมาถึงความเป็นไปได้ในการเพิ่มขึ้นของการดูดซึมแร่ธาตุโดยเฉพาะแคลเซียมจากการบริโภคสารพรีไบโอติก มีหลายกลไกที่ถูกเสนอขึ้นเพื่ออธิบายการเพิ่มขึ้นของการดูดซึมแคลเซียมโดยการชักนำของสารพรีไบโอติก ได้แก่ 1) การหมักสารพรีไบโอติก เช่น อินนูลิน ส่งผลให้เกิดการสร้างกรดไขมันสายสั้นอย่างมีนัยสำคัญนำไปสู่การลดลงของค่าพีเอชในลำไส้ใหญ่ การลดลงของค่าพีเอชนี้เป็นไปได้ที่จะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของแคลเซียม 2) ไฟเตท (phytate) หรือ myoinositol hexaphosphate ซึ่งเป็นองค์ประกอบในพืชที่สามารถเคลื่อนตัวไปยังลำไส้ใหญ่ได้ มีความเสถียร เป็นสารเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำกับ divalent cations เช่น แคลเซียม จึงทำให้ไม่เหมาะสำหรับการขนส่งสาร ซึ่งผลของการหมักไฟเตทจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียนั้นจะมีการปลดปล่อยแคลเซียมออกมา 3) ได้มีการเสนอว่ากลไกการแลกเปลี่ยนแคลเซียมเกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ ซึ่งในระบบนี้เมื่อกรดไขมันสายสั้นเคลื่อนตัวเข้าสู่ลำไส้ใหญ่ในรูปของ protonated แยกตัวภายในเซลล์ โปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาก็จะถูกหลังเข้าไปใน lumen ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนแคลเซียมไอออน หลายการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารพรีไบโอติกช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมจากลำไส้ใหญ่และลดการสูญเสียแคลเซียมจากเนื้อเยื่อกระดูก [3]

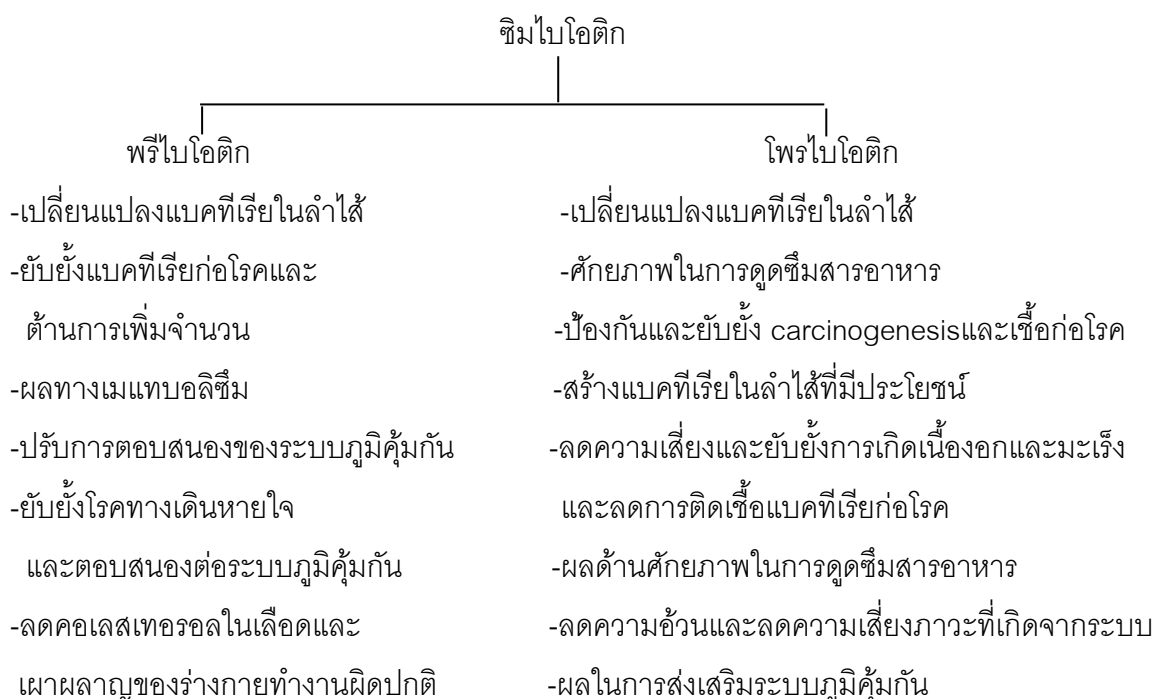
11.2.2.5 ผลต่อไขมันในเลือด

ได้มีการรายงานไว้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกอาจช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลทั้งหมดและแอลดีแอล-คอเลสเตอรอลได้ กลไกดังกล่าวเกิดขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกและเกิดขึ้นทางอ้อมโดยสารพรีไบโอติกที่มีอิทธิพลต่อไขมันในเลือด ซึ่งยังไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนักในปัจจุบัน และอาจมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้คอเลสเตอรอลได้โดยตรง [3]

11.2.2.6 ผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถที่จะกระตุ้นกลไกการป้องกันทางภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้านแบบไม่จำเพาะและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะผ่านเซลล์ ผลของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันก็คือการเพิ่มกิจกรรม phagocytic และหรือการเพิ่ม immunological molecules เช่น สารอิมมูโนโกลบูลิน เอ ที่ส่งผลต่อเชื้อโรคเช่น *Salmonella* และ rotavirus ส่วนใหญ่การศึกษานี้มุ่งไปที่การบริโภคโพรไบโอติก (แบคทีเรียกรดแลคติก) และการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของผนังเซลล์และเซลล์ภูมิคุ้มกัน โพรไบโอติกส่งผลเช่นเดียวกับแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น การปรับปรุงองค์ประกอบของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ ซึ่งผลดังกล่าวจะเกิดขึ้นต่อเมื่อได้รับสารโพรไบโอติก ปัจจุบันการศึกษาในสัตว์แสดงให้เห็นว่าสารโพรไบโอติกมีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน [3]

ซิมไบโอติก (symbiotics) คือการผสมกันของโพรไบโอติกและพรีไบโอติกซึ่งทำให้เกิดประโยชน์ต่อเจ้าของร่างกาย (host) ซึ่งก่อให้เกิดผลดีในด้านการส่งเสริมการรอดชีวิตและการอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของเจ้าของร่างกาย ซิมไบโอติกสามารถเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์สารเมตาบอไลต์ (metabolite) ของจุลินทรีย์และองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ กลไกการรวมกันของโพรไบโอติกและพรีไบโอติกแสดงดังรูปที่ 11.1



รูปที่ 11.1 กลไกการทำงานของซิมไบโอติก

ที่มา: Rafique และคณะ [6]

11.3 โฟสไบโอติก (postbiotic)

โฟสไบโอติกเป็นอีกกลยุทธิ์หนึ่งที่จะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (gut microbiota) คำว่าโฟสไบโอติกมาจากภาษากรีก “post” หมายถึงภายหลัง “bios” หมายถึงชีวิต ดังนั้นคำว่า “biotic” จึงหมายถึง วิธีการที่รวมถึงการใช้โภชนาการให้เป็นประโยชน์ต่อประชากรของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ในปี ค.ศ. 2021 สมาคมวิทยาศาสตร์นานาชาติสำหรับโพรไบโอติกและพรีไบโอติก (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics หรือ ISAPP) ได้ให้คำจำกัดความของคำ “postbiotic” ว่าหมายถึง “การเตรียมจุลินทรีย์ที่ไม่มีชีวิต และ/หรือ องค์ประกอบของจุลินทรีย์นั้นที่อาจส่งผลดีหรือมีประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าของร่างกาย (host) เช่นสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial compounds) ซึ่งได้แก่สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไดแอซิติล (diacetyl) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) และสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเช่น แบคเทอริโอซิน สารเหล่านี้เป็นที่ทราบกันดีคือสารโฟสไบโอติก (postbiotics) นอกจากนี้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีสารพันธุกรรมประมาณ 10 ล้านยีน (gene) ที่เชื่อมโยงกับจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ละยีนส่งผลกระทบต่อสุขภาพเช่น การรักษาสมดุล (homeostasis) ของระบบภูมิคุ้มกัน การแปลงอาหารให้เป็นสารอาหารที่มีประโยชน์และช่วยต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ที่จริงแล้วคำจำกัดความที่แม่นยำของคำว่า “โฟสไบโอติก” นั้นไม่ชัดเจน ซึ่งคำจำกัดความหนึ่งได้ระบุว่า โฟสไบโอติกคือการปรับเปลี่ยนทางจุลินทรีย์ที่ถูกสร้างหรือถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการทำกิจกรรมของจุลินทรีย์และมีผลเชิงบวกทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อลำไส้ของเจ้าของร่างกาย ยิ่งกว่านั้น โฟสไบโอติกยังหมายถึงสารที่ละลายได้ ซึ่งถูกหลั่งหรือปลดปล่อยออกมา (เช่น เอนไซม์ เปปไทด์ กรดเทโคอิก (teichoic acid) สารมิวโรเปปไทด์ (muropeptide) ที่มาจากเปปติโดไกลแคน โพลีเปปไทด์ โปรตีนที่ผิวเซลล์และกรดอินทรีย์) โดยจุลินทรีย์ระหว่างการแตกของเซลล์ โฟสไบโอติกเป็นโปรแกรมการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย (immunity booster) ซึ่งช่วยลดการอักเสบที่ถูกชักนำโดยจุลินทรีย์ก่อโรคและช่วยสนับสนุนความคงทนของ epithelial cells ของลำไส้ นักวิจัยจำนวนมากสนใจ “โฟสไบโอติก” ในแง่ของอายุการเก็บ ชีตจำกัดด้านความปลอดภัย สมบัติด้านโครงสร้างทางเคมี และผลิตภัณฑ์สุดท้ายของโมเลกุล สัญญาณที่ควบคุมวัตถุประสงค์ต่างๆเช่น สารปรับภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immunomodulator) กิจกรรมการลดความดันโลหิต (antihypertensive) การต้านการอักเสบ (anti inflammatory) การต้านอนุมูลอิสระและอื่นๆ สารโฟสไบโอติกเช่น กรดเทโคอิก (teichoic acid) อินโดล ไลโพพอลิแซ็กคาไรด์ muramyl peptide และ lactospin ถูกสร้างจากจุลินทรีย์โพรไบโอติก [6]

เอกสารอ้างอิง

1. Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M. and Bressollier, P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 50: 1-16.
2. Goldin, B. R. 2011. Probiotics and health: from history to future. In: Kneifel, W. and Salminen, S. (Eds.), *Probiotics and health claims*, pp. 1-13. Blackwell Publishing Ltd., Chichester.
3. Gibson, G. R. 2004. Prebiotic. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18 (2): 287-298.
4. Thammarutwasik, P., Hongpattakere, T., Chantachum, S., Kijroongrojana, K., Itharat, A., Reanmongkol, W., Tewtrakul, S. and Ooraikul, B. 2009. Prebiotics-a review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 31 (4): 401-408.
5. Voragen, A. G. J. 1998. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends in Food Science & Technology*, 9: 328–335.
6. Rafique, N., Jan, S.Y., Dar, A.H., Dash, K.K., Sarkar, A., Shams, R., Pandey, V.K., Khan, S.A., Amin, Q.K., Hussain, S.Z. 2023. Promising bioactivities of postbiotics: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14: 100708.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล

ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์ระดับ 9

หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถ. ชลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

วุฒิการศึกษา

- Ph.D. (Food Science), The University of Georgia, Athens, GA, USA

- วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- วท.บ. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จุลชีววิทยาทางอาหารและการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

พิมพ์ครั้งที่ 4 (แก้ไขและเพิ่มเติม): มิถุนายน 2568

354 หน้า

ISBN 978-616-7367-11-8

สงวนลิขสิทธิ์

โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพฯ 10520 โทร. 0-2329-8000 ต่อ 3592