ผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่เย็นและการทำให้ละลายต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อสุกร

EFFECT OF ORGANIC ACID SALTS IN COMBINATION WITH FREEZING AND THAWING ON GROWTH INHIBITION OF PATHOGENIC BACTERIA IN PORK

กัญญารัตน์ ชูบ่รางค์

KANYARAT CHOOPRANG

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

พ.ศ. 2550

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อสุกร

EFFECT OF ORGANIC ACID SALTS IN COMBINATION WITH FREEZING AND THAWING ON GROWTH INHIBITION OF PATHOGENIC BACTERIA IN PORK

กัญญารัตน์ จูปรางค์

KANYARAT CHOOPRANG

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....74837
วัน,เดือน,ปี.....11 ต.ค. 2550

.b.....11830116.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

EFFECT OF ORGANIC ACID SALTS IN COMBINATION WITH FREEZING AND THAWING ON GROWTH INHIBITION OF PATHOGENIC BACTERIA IN PORK

KANYARAT CHOOPRANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILMENT

OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2007

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อสุกร

Effect of Organic Acid Salts in Combination with Freezing and Thawing on Growth Inhibition of Pathogenic Bacteria in Pork

ชื่อนักศึกษา นางสาวกัญญารัตน์ จูปรางค์

รหัสประจำตัว 46063411

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	
ผศ.ดร.สุรีย์	นานาสมบัติ	
รศ.อรไท	สุขเจริญ	
ผศ.ดร.มาริสา	จาตุพรพิพัฒน์	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 8 พฤษภาคม 2550 เวลา 10.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....๑๑.....**เดือน**.....พฤษภาคม.....**พ.ศ.**๒๕๕๐.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อสุกร
นักศึกษา	นางสาวกัญญารัตน์ จูปรางค์
รหัสประจำตัว	46063411
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

ในการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนม ชนิดละ 30 ตัวอย่าง พบว่าในเนื้อสุกรมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.6×10^{6}-2.3×10^{9} โคโลนีต่อกรัม และพบ *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ปนเปื้อนในตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 86.67, 43.33 และ 96.67 ของจำนวนตัวอย่างเนื้อสุกรทั้งหมดที่วิเคราะห์ ตามลำดับ ส่วนในแหนมพบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.0×10^{8}-2.8×10^{8} โคโลนีต่อกรัม ยีสต์และเชื้อรามีจำนวนอยู่ในช่วง 1.0×10^{2}-6.9×10^{5} โคโลนีต่อกรัม พบ *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Clostridium perfringens* ร้อยละ 36.67, 26.67, 53.33 และ 6.67 ของจำนวนตัวอย่างแหนมทั้งหมดที่วิเคราะห์ ตามลำดับ

การศึกษาผลของเกลือโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 8 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Rissen, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) ในสภาพที่มีพีเอชต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ พีเอช 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งของเกลือทั้งสามชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าในสภาพที่มีพีเอชต่ำ (พีเอช 4.5-5.5) โซเดียมแลคเตตมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบ เชื้อ *Listeria monocytogenes* ไวต่อโซเดียมแลคเตตมากที่สุดที่พีเอช 4.5 (ค่า MIC เท่ากับ 23.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *V. parahaemolyticus* สามารถต้านทานต่อโซเดียมแลคเตตได้ดีที่สุด (ค่า MIC มากกว่า 191.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในสภาพที่มีพีเอชสูง (พีเอช 6.0-6.5) พบว่า *E. coli* ถูกยับยั้งโดยโพแทสเซียมซอร์เบตได้ดีกว่าโซเดียมแลคเตตและโซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต

ยังสามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่พีเอช 4.5-5.5 ส่วนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยโซเดียมอะซิเตตพบว่าค่าพีเอชมีผลน้อยมากโดยเฉพาะในช่วง 5.0-6.5 และ *Y. enterocolitica* ไวต่อโซเดียมอะซิเตตมากที่สุดในช่วงพีเอช 4.5-7.0 (ค่า MIC เท่ากับ 13.12-52.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่ *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* และ *E. coli* ต้านทานต่อโซเดียมอะซิเตตได้ดีที่สุด (ค่า MIC มากกว่า 210 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

การศึกษาผลของโซเดียมแลคเตต (1.91 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสุกร) โซเดียมอะซิเตต (8.4 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสุกร) และโพแทสเซียมซอร์เบต (2.56 มิลลิกรัมต่อกรัมเนื้อสุกร) ร่วมกับการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -23 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และการทำให้ละลายด้วยอัตราช้าต่อการยับยั้งการเจริญของ *S.* Rissen และ *S. aureus* ในเนื้อสุกร พบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Rissen และ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรทั้งหมดลดลงเมื่อระยะเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น และหลังจากผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมเกลือโพแทสเซียมซอร์เบตน้อยกว่าในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมอะซิเตต แต่จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตหรือโซเดียมอะซิเตตน้อยกว่าในเนื้อสุกรที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบต นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนเซลล์ที่ตายของแบคทีเรียทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเมื่อทำการแช่แข็งครบ 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตมีจำนวนมากที่สุด ขณะที่จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมเกลือทุกชนิดเพิ่มขึ้น และเช่นเดียวกัน *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตมีจำนวนเซลล์ที่ตายมากที่สุด แต่จำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บลดลงหลังจากการแช่แข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Thesis title	Effect of organic acid salts in combination with freezing and thawing on growth inhibition of pathogenic bacteria in pork
Student	Kanyarat Chooprang
Student ID	46063411
Degree	Master of science
Program	Biotechnology
Year	2007
Thesis Advisor	Asst.Prof.Dr.Suree Nanasombat

ABSTRACT

In this study, the microbiological quality of pork and Nham (30 samples each) was analyzed. Total viable counts in pork samples were in the range of 4.6×10^{6}-2.3×10^{9} CFU/g, and *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria were contaminated in 86.67%, 43.33% and 96.67% of pork samples, respectively. The total viable counts (1.0×10^{8}-2.8×10^{8} CFU/g) were found in nham samples. Yeasts and molds in nham were in the range of 1.0×10^{2}-6.9×10^{5}CFU/g, and *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, and *Clostridium perfringens* were present in 36.67%, 26.67%, 53.33%, and 6.67% of nham samples tested, respectively.

The effect of sodium lactate, sodium acetate and potassium sorbate on growth inhibition of eight bacterial species including *Salmonella* Rissen, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* and *Vibrio parahaemolyticus* was investigated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) values at six different pH levels (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0). The effective of three organic acid salts was found to depend on types of bacteria and pH of medium. At low pH (pH 4.5-5.5), sodium lactate showed great inhibitory effect to most of tested bacteria. *L. monocytogenes* was the most sensitive to sodium lactate at pH 4.5 (MIC 23.9 mg/ml), while *V. parahaemolyticus* was the most resistant (MIC >191.25 mg/ml) to sodium lactate. At high pH (pH 6.0-6.5), *E. coli* was inhibited by potassium sorbate better than sodium lactate and sodium acetate. Potassium sorbate had good inhibitory activity against *E. coli* at pH 4.5-5.5. The pH value had less effect to antibacterial action of sodium acetate particularly at pH 5.0-6.5. *Y. enterocolitica* was the most sensitive strain to sodium acetate at pH 4.5-7.0 (MIC 13.12-52.5 mg/ml), whereas *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* and *E. coli* were the most resistant strains to sodium acetate (> 210 mg/ml).

Combined effect of sodium lactate (1.91 mg/g), sodium acetate (8.4 mg/g) and potassium sorbate (2.56 mg/g) with freezing (-23±2°C for 72 h) and slow thawing on growth inhibition of *S.* Rissen and *S. aureus* in pork. Survival cells of *S.* Rissen and *S. aureus* decreased as the freezing time increased. After freezing for 72 h, the number of *S.* Rissen viable cells in pork treated with potassium sorbate were significantly lower than those in pork with the other two salts. However, the survival cells of *S. aureus* in pork added with sodium lactate or sodium acetate were significantly lower than those in samples with potassium sorbate. In addition, the number of dead cells of both bacterial species increased after 24 h of freezing. At 72 h of freezing, the number of *S.* Rissen dead cells were the highest in pork with potassium sorbate, whereas injured cells of *S.* Rissen in pork added with all types of organic acid salts increased. Similarly, the highest number of *S. aureus* dead cells were found in pork with sodium lactate, but the number of *S. aureus* injured cells decreased at 72 h of freezing.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะ ช่วยแก้ไขปัญหา ให้ความรู้และข้อคิดเห็นในด้านต่างๆที่เป็นประโยชน์ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ผศ.ดร.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ และ รศ.อรไท สุขเจริญ ซึ่งเป็นคณะกรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษาและให้คำชี้แนะในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกและติดต่อประสานงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกคน ในความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจตลอดมา

และที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อกิตติ จูปรางค์ และคุณแม่จำเนียร จูปรางค์ และทุกคนในครอบครัวที่ได้เสียสละทุนทรัพย์ ให้ความรัก และให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับคุณพ่อคุณแม่และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัย ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

กัญญารัตน์ จูปรางค์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ III

กิตติกรรมประกาศ V

สารบัญ VI

สารบัญตาราง IX

สารบัญรูป X

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 องค์ประกอบของเนื้อสัตว์ 5

2.2 การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์ 7

2.2.1 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ 7

2.2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ 9

2.3 การเจริญของจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์ 11

2.3.1 ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนและการแพร่กระจาย
ของเชื้อในเนื้อ 11

2.3.2 คุณสมบัติทางกายภาพของเนื้อ 11

2.3.3 คุณสมบัติทางเคมีของเนื้อ 11

2.3.4 ปริมาณออกซิเจน 12

2.3.5 อุณหภูมิ 12

2.4 การลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของเนื้อสัตว์ 12

2.5 การควบคุมจุลินทรีย์โดยใช้กรดอินทรีย์ 13

2.5.1 ผลของกรดอินทรีย์ต่อการรอดชีวิตและการตายของจุลินทรีย์ 14

2.5.2 กลไกการทำงานของกรดอินทรีย์ 14

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของกรดอินทรีย์ 15

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.4 การประยุกต์ใช้ ... 18

2.5.5 ผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสและคุณภาพการสัมผัสอื่นๆของเนื้อ ... 20

2.5.6 การใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับวิธีการถนอมอาหารอื่นๆ ... 21

2.6 การใช้กรดและเกลือของกรดอินทรีย์ในการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหาร ... 21

2.6.1 กรดอะซีติกและเกลืออะซีเตต ... 22

2.6.2 กรดแลคติกและเกลือแลคเตต ... 24

2.6.3 กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบต ... 31

2.7 การควบคุมจุลินทรีย์โดยการแช่แข็งและการทำให้ละลาย ... 40

2.7.1 การแช่แข็ง ... 40

2.7.2 การทำให้ละลาย ... 44

บทที่ 3 การวิจัยและการดำเนินงาน ... 45

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี ... 45

3.1.1 ตัวอย่างเนื้อสุกรและแหนม ... 45

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ ... 45

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเจือจาง และสารเคมี ... 45

3.1.4 เครื่องมือ ... 46

3.2 วิธีการทดลอง ... 46

3.2.1 การศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร ... 46

3.2.2 การศึกษาผลการยับยั้งของสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ ... 47

3.2.3 การศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย ต่อการยับยั้งเจริญของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร ... 48

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล ... 51

4.1 ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร ... 51

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ 56

4.3 ผลของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย ต่อการยับยั้งเจริญของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร 62

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 71

บรรณานุกรม 73

ภาคผนวก ก 80

ภาคผนวก ข 83

ภาคผนวก ค 86

ภาคผนวก ง 98

ภาคผนวก จ 99

ภาคผนวก ฉ 107

ประวัติผู้เขียน 115

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารอาหารต่างๆที่มีในกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่โตเต็มวัย ในระยะหลังการเกร็งตัวก่อนจะเข้าสู่ระยะ post mortem 6

2.2 จำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการบรรจุเนื้อวัวในโรงฆ่าสัตว์ 9

2.3 ประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของวิธีต่างๆ 13

2.4 ผลของพีเอชต่อปริมาณไอออนที่ได้จากการแตกตัวของกรดอินทรีย์ 16

2.5 ช่วงพีเอชโดยประมาณของอาหารต่างๆ 17

2.6 ช่วงพีเอชในการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหาร 19

2.7 ผลของการใช้กรดแลคติกและกรดอะซีติกต่อคุณภาพของเนื้อ 20

2.8 การใช้แลคเตตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ 27

2.9 ผลของโซเดียมแลคเตตต่อค่า a_w และการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ 28

2.10 ผลของโซเดียมคลอไรด์หรือโซเดียมแลคเตตต่อค่า a_w ของเนื้อวัวบดสุกซึ่งมีความชื้นร้อยละ 55 28

2.11 ค่า a_w ต่ำสุดในการเจริญและการรอดชีวิตของ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลวที่เติมสาร humectant 30

2.12 ผลของพีเอชต่อการแตกตัวของกรดซอร์บิก 34

4.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร 51

4.2 ค่าพีเอชและ a_w เฉลี่ยของเนื้อสุกรและแหนม 55

4.3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่พีเอชต่างๆ 57

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์ 15

4.1 ผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต เซลล์ที่บาดเจ็บ และเซลล์ที่ตายของ *Salmonella* Rissen ในเนื้อสุกร 65

4.2 ผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต เซลล์ที่บาดเจ็บ และเซลล์ที่ตายของ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร 66

ก.1 ผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลอง 82

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

โดยทั่วไปเนื้อสุกรและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกรเป็นแหล่งที่มีคุณค่าสารอาหารสูง ปริมาณความชื้น และค่าพีเอชที่เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้มักพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia* spp., *Listeria monocytogenes* และ *Campylobacter* spp. (Chang และคณะ. 2003) จากการศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อน *Salmonella* spp. ในภาคเหนือของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ระหว่างปี พ.ศ. 2543-2546 ทั้งหมด 2141 ตัวอย่าง ทั้งในไก่ สุกร โคนม คนงานในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ และเด็กที่ป่วยเป็นโรคท้องร่วง พบว่าไก่ในฟาร์ม ไก่ในโรงฆ่าสัตว์ และเนื้อไก่ที่จำหน่ายในตลาดมีการปนเปื้อน *Salmonella* ร้อยละ 4, 9 และ 57 ตามลำดับ ส่วนสุกรในฟาร์ม สุกรในโรงฆ่าสัตว์ และเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาด มีการปนเปื้อน *Salmonella* ร้อยละ 6, 28, และ 29 ตามลำดับ และพบว่ามีการปนเปื้อน *Salmonella* ในโคนมที่อยู่ในฟาร์ม คนงานในฟาร์มที่สัมผัสกับสัตว์และคนงานในฟาร์มที่ไม่สัมผัสกับสัตว์ และเด็กที่ป่วยเป็นโรคท้องร่วงร้อยละ 3, 36, 33 และ 7 ตามลำดับ โดย *Salmonella* ซีโรไทป์ที่แยกได้บ่อยที่สุดจากไก่และมนุษย์คือ *S.* Weltevreden และซีโรไทป์ที่แยกได้บ่อยจากสุกรคือ *S.* Rissen (Padungtod และ Kaneene. 2006) ซึ่งจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้อาจมาจากเชื้อประจำถิ่นที่อยู่ภายในตัวสัตว์หรือเป็นผลมาจากการติดเชื้อของสัตว์ขณะที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่ หรืออาจเป็นผลมาจากจากการปนเปื้อนข้ามในระหว่างการฆ่าสัตว์และการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น แหนม ซึ่งปัญหาที่สำคัญคือ การปนเปื้อนด้วย *Salmonella* เนื่องจากกรรมวิธีการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ซึ่งแบคทีเรียนี้จะถูกทำลายหลังจากการทำให้สุกด้วยความร้อนก่อนนำไปบริโภค (Mountney และ Gould. 1988) จากรายงานวิจัยของ Tuitemwong และคณะ (2004) พบว่ามี *Salmonella* ปนเปื้อนในแหนมเฉลี่ย 105-195 โคโลนีต่อแหนม 25 กรัม ดังนั้นถ้าหากบริโภคแหนมโดยไม่ผ่านความร้อน *Salmonella* ที่ปนเปื้อนในแหนมจะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมเพื่อให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรและแหนม และจำเป็นต้องหาวิธีที่สามารถทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อสุกรเพื่อทำให้เนื้อสุกรมีความปลอดภัยมากขึ้นหากมีการนำไปปรุงอาหารหรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ

สำหรับวิธีที่ใช้ในการควบคุมจุลินทรีย์โดยทั่วไป ได้แก่ การใช้ความร้อน การใช้อุณหภูมิต่ำ การฉายรังสี การใช้สารเคมี การใช้กรดอินทรีย์ และน้ำมันหอมระเหย (Ray. 1996) วิธีหนึ่งที่

กำลังได้รับความสนใจคือ การใช้กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแอซิติก กรดแลคติก กรดซอร์บิก และเกลือของกรดอินทรีย์เหล่านี้ ในอุตสาหกรรมเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อมีการนำกรดอินทรีย์มาใช้ในการทำความสะอาดเนื้อที่ใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ โดยการฉีดพ่นหรือจุ่มลงในสารละลายกรดอินทรีย์ เช่น การล้างเนื้อวัวด้วยสารละลายกรดแอซิติกและกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำให้จำนวนเซลล์ของ *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* O157:H7 ลดลง ซึ่งกรดอินทรีย์จะทำให้เนื้อมีสภาพเป็นกรดมากขึ้นและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยไปมีผลต่อส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และการสังเคราะห์โปรตีนหรือสารพันธุกรรม (Barsosa-Cánovas และคณะ. 1998) นอกจากนี้ยังมีการใช้กรดอินทรีย์ในรูปของเกลือโซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียม ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกัน แต่สามารถละลายในน้ำได้ดีกว่ากรดอินทรีย์และเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายกว่า นอกจากนี้เกลือของกรดอินทรีย์ยังทำหน้าที่เป็นสารลดแรงตึงผิวและช่วยเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น โซเดียมแลคเตต (Shelef. 1994) การใช้เกลือของกรดอินทรีย์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์นั้นส่วนใหญ่จะใช้วิธีจุ่มหรือฉีดพ่นมากกว่าการเติมเกลือของกรดอินทรีย์ลงไปในเนื้อสัตว์โดยตรง และมีรายงานวิจัยไม่มากนักที่ศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย อย่างไรก็ตาม การใช้เกลือของกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียวอาจมีประสิทธิภาพไม่มากเพียงพอในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถปรับตัวหรือต้านทานต่อกรดได้ ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์อาจนำวิธีการควบคุมจุลินทรีย์อื่นๆมาใช้ร่วมด้วย เช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ

โดยทั่วไปในการถนอมรักษาเนื้อสัตว์มักจะใช้วิธีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำมากกว่าการใช้วิธีอื่นๆ ซึ่งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำแบ่งเป็น 2 วิธีคือ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเยือกแข็งเล็กน้อย (การแช่เย็น) และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (การแช่แข็ง) การเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเยือกแข็งพบว่ามีการเจริญของแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) เช่น *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Lactobacillus* และ *Proteus* และพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์และเชื้อราสามารถเจริญได้ในเนื้อสัตว์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำได้ ดังนั้นการเก็บรักษาเนื้อสัตว์โดยการแช่แข็งจะมีประสิทธิภาพมากกว่าและอาจทำลายแบคทีเรียได้ถึงประมาณร้อยละ 50 (Frazier และ Westhoff. 1988) การแช่แข็งจะทำให้จุลินทรีย์สูญเสียน้ำออกจากเซลล์ เนื่องจากความแตกต่างของความดันออสโมติกและเกิดการสร้างผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญและการทำงานของเอนไซม์ต่างๆภายในเซลล์ ทำให้มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงและสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น จากการทดลองของ Zhao และคณะ (2003) พบว่าการเก็บรักษาปีกไก่ที่อุณหภูมิ -20 และ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำให้จำนวนของ *Campyrobacter jejuni* บนปีกไก่ลดลงประมาณ 1.3 และ 1.8 $\log_{10}$ CFU

ต่อกรัม ตามลำดับ และพบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ -86 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 สัปดาห์ ทำให้เชื้อ *C. jejuni* ลดลงประมาณ 4 และ 0.5 $\log_{10}$ CFUต่อกรัม ตามลำดับ ถึงแม้ว่าการแช่แข็งจะลดจำนวนจุลินทรีย์และช่วยยับยั้งการเจริญ แต่พบว่าจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์สามารถกลับมาเจริญได้อีกเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในระหว่างการทำให้ละลาย และในช่วงระหว่างการรอเป็นระยะเวลานานก่อนการทำให้สุก อาจทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมีการเจริญเพิ่มจำนวนและสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้ จึงเป็นไปได้ที่จะใช้วิธีการแช่แข็งร่วมกับการใช้เกลือของกรดอินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสุกร ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสีย ในอาหารเหลวที่มีค่าพีเอชต่างกัน โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเกลือของกรดอินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบ แล้วนำค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเกลือของกรดอินทรีย์ที่ได้มาใช้ในการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

1.2.2 เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆในอาหาร Mueller Hinton Broth ที่มีค่าพีเอชต่างกัน

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร ชนิดละ 30 ตัวอย่าง และหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 8 ชนิด ในอาหาร Mueller Hinton Broth (MHB) ที่ปรับให้มีค่าพีเอช 6 ระดับ ได้แก่ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยใช้วิธี micro broth dilution แล้วนำค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตมาศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อ

สุกรร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย โดยหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต เซลล์ที่ตาย และเซลล์ที่บาดเจ็บ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ทราบคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

1.4.2 ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในอาหาร MHB ที่มีค่าพีเอชต่างกัน

1.4.3 ทำให้ทราบผลของการใช้โซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Rissen และเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 องค์ประกอบของเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ส่วน ได้แก่ เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมัน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ และมีองค์ประกอบต่างจากเนื้อเยื่อไขมัน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อสัตว์โดยทั่วไปมักหมายถึงกล้ามเนื้อจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น เนื้อจากวัว สุกร ควาย แพะ แกะ และไก่ เป็นต้น ภายหลังจากสัตว์ตายแล้วคำว่ากล้ามเนื้อและเนื้อสัตว์สามารถใช้แทนกันได้ โดยกรณีที่กล่าวถึงกล้ามเนื้อสัตว์จะเป็นช่วงที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่ และมีบทบาทในการทำงานอยู่ในตัวสัตว์ แต่ถ้ากล่าวถึงเนื้อสัตว์จะหมายถึงกล้ามเนื้อที่ได้จากสัตว์ภายหลังจากสัตว์ตายแล้ว (บุษกร อุตรภิชาติ. 2545 ; Robinson. 1985)

องค์ประกอบของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อแปรผันได้หลากหลาย แม้ว่าเป็นกล้ามเนื้อที่มาจากสัตว์ชนิดเดียวกัน แต่อัตราส่วนความสัมพันธ์ขององค์ประกอบส่วนมากจะอยู่ในช่วงที่มีน้ำมากกว่าร้อยละ 70-79 ของน้ำหนักเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ โปรตีนประมาณร้อยละ 18 และไขมันประมาณร้อยละ 3 (Lawrie. 1974) ส่วนที่เหลือประมาณร้อยละ 3-5 นั้นประกอบด้วยสารอนินทรีย์ สารประกอบอินทรีย์ที่ละลายได้ วิตามินและแร่ธาตุ (ตารางที่ 2.1) ซึ่งปริมาณขององค์ประกอบที่มีอยู่เพียงเล็กน้อยก็เป็นสารที่ช่วยให้จุลินทรีย์เจริญบนเนื้อสัตว์ได้ ในระหว่างที่สัตว์ยังมีชีวิตและหลังจากเกิดระยะเกร็งตัวแล้ว ปริมาณของสารอนินทรีย์และไนโตรเจนที่ละลายได้ไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนัก แต่พบการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่สำคัญในองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์และความเข้มข้นของกรดอะมิโน ซึ่งมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น ไกลโคเจนที่เก็บสะสมไว้ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกโดยปฏิกิริยาไกลโคไลซิส ซึ่งจะปล่อยสารตัวกลางต่างๆออกมาทำให้ความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น การปล่อยสารคาเทพซิน (cathepsin) ซึ่งเป็นสารตัวกลางตัวหนึ่งออกมาและการสะสมกรดแลคติกปริมาณมากทำให้กล้ามเนื้อเข้าสู่ระยะเกร็งตัว และทำให้ค่าพีเอชของกล้ามเนื้อลดลงจากตอนมีชีวิตที่เป็นกลางมาอยู่ในช่วงระหว่าง 5.5-5.8 (Bendall. 1973) อย่างไรก็ตามถ้าสัตว์มีการดิ้นรนหรือเกิดความเครียดก่อนถูกฆ่ามากเกินไปจะทำให้ร่างกายใช้ไกลโคเจนที่สะสมไว้ในกล้ามเนื้อจนหมดทำให้เกิดปฏิกิริยาไกลโคไลซิสน้อยลง ปริมาณของกรดแลคติกที่ถูกผลิตก็มีน้อยลง และไม่มีอนุพันธุ์อื่นๆของไกลโคเจนเกิดขึ้น เช่น กลูโคส เนื้อที่อยู่ในสภาวะนี้จะมีพีเอชสุดท้ายมากเกิน 6.0 และทำให้เนื้อวัวมีสีดำและแห้ง (dark firm dry : DFD) หรือทำให้เนื้อมีสีซีดจาง นิ่ม มีน้ำเยิ้มออกมา (pale soft exudate : PSE) ส่วนใหญ่พบในเนื้อสุกร แต่อาจพบในเนื้อวัวได้บ้าง (Fischer และ Hamm. 1978)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารอาหารต่างๆที่มีในกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่โตเต็มวัย ในระยะหลังการเกร็งตัวก่อนจะเข้าสู่ระยะ post mortem

สารอาหาร	ร้อยละของน้ำหนัก
น้ำ	75.5
โปรตีน	18.0
ไมโอฟิบริลลาร์	
ไมโอซิน, โทรโพไมโอซิน, โปรตีน X	7.5
แอคติน	2.5
ซาร์โคพลาสมิค	
ไมโอเจน, กลอบูริน	5.6
ไมโอโกลบิน	0.36
ฮีโมโกลบิน	0.04
ไมโตคอนเดรีย---ไซโตโครม C	0.002
Sarcoplasmic reticulum, collagen, elastic, "retuculin" , insoluble connective tissue	2.0
ไขมัน (fat)	3.0
สารที่ไม่ใช่โปรตีน (soluble nonprotein substances)	3.5
ไนโตรจีนัส	
ครีเอทีน	0.55
อินโนซีนโมโนฟอสเฟต	0.30
2- และ 3-ฟอสโฟไพริดีน นิวคลีโอไทด์	0.07
กรดอะมิโน	0.35
คาร์โนซีน แอนเซอรีน	0.30
คาร์โบไฮเดรต	
กรดแลคติก	0.09
กลูโคส-6-ฟอสเฟต	0.17
ไกลโคเจน	0.10
กลูโคส	0.10
สารอนินทรีย์	
ฟอสฟอรัสที่ละลายได้ทั้งหมด	0.20
โพแทสเซียม	0.35
โซเดียม	0.05
แมกนีเซียม	0.02
แคลเซียม	0.007
สังกะสี	0.005
สารตัวกลางที่ได้จากไกลโคไลซิส, แร่ธาตุ, วิตามิน และอื่นๆ	0.10

ที่มา : Lawrie. 1974

เนื้อเยื่อไขมันประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์จำนวนมาก แต่มีวิตามินและแร่ธาตุอยู่เล็กน้อย และพบสารประกอบที่ละลายน้ำได้อยู่ที่ผิวหน้าของเนื้อเยื่อไขมัน และที่ผิวหน้าของเนื้อเยื่อไขมันยังมีความเข้มข้นของกรดแลคติกต่ำซึ่งแตกต่างจากผิวหน้าของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ ดังนั้นพีเอชของ

ผิวหน้าเนื้อเยื่อไขมันจึงมีค่าใกล้เคียงกับค่าพีเอชเป็นกลาง และถึงแม้ว่าจะมีกลูโคสและกรดอะมิโนอยู่ด้วยแต่ก็ไม่พบสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาไกลโคไลซิส เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีสารประกอบที่ละลายได้อยู่ที่ผิวหน้าเนื้อเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมัน และเป็นส่วนที่ช่วยให้จุลินทรีย์เจริญ (Robinson. 1985)

เนื่องจากเนื้อสัตว์ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และวิตามินต่างๆ รวมทั้งความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จึงมักพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่บริเวณผิวหน้าและภายในเนื้อสัตว์

2.2 การปนเปื้อนจุลินทรีย์ของเนื้อสัตว์

การปนเปื้อนจุลินทรีย์ของเนื้อสัตว์อาจมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน 4 แหล่ง ได้แก่ วัตถุดิบ (สัตว์) เครื่องมือ (เครื่องมือที่ใช้) กระบวนการต่างๆในโรงฆ่าสัตว์ (การแปรรูป การเก็บที่อุณหภูมิต่ำ และการตัด) และมนุษย์ (คนงานในโรงฆ่าสัตว์)

2.2.1 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์

2.2.1.1 การปนเปื้อนในขณะที่สัตว์ยังมีชีวิต

โดยธรรมชาติเนื้อที่ได้จากสัตว์ที่มีสุขภาพดีจะปราศจากเชื้อโรค ซึ่งไม่รวมถึงในต่อมน้ำเหลือง อย่างไรก็ตามบนผิวหนังของสัตว์ที่ใช้กินเนื้อทุกชนิดจะเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ต่างๆจำนวนมาก นำไปสู่การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ผิวหนัง กีบเท้า เยื่อบุทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ ตัวอย่างเช่นที่ผิวหนังมีจำนวนจุลินทรีย์สูงถึง 10^6 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร แบคทีเรียก่อโรคจะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับมูลสัตว์และปนเปื้อนอยู่ในคอก ซึ่งอาจจะถูกสัตว์นำเข้าไปทางปากและเกิดการติดเชื้ออีกครั้งหนึ่งได้ เป็นเหตุให้มีเชื้อประจำถิ่นอาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ตั้งแต่ยังอายุน้อย (Zeothen และ Bøgh - Sørensen. 2003)

เชื้อประจำถิ่นเริ่มแรกที่มีจำนวนมากและมีความสำคัญคือแบคทีเรียแกรมบวก พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง ที่สำคัญได้แก่ *Micrococcus*, *Staphylococcus* และ *Bacillus* spp., โดยปนเปื้อนมากับมูลสัตว์และผิวหนังของสัตว์ แต่มีบางส่วนที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ที่สำคัญได้แก่ pseudomonads ซึ่งปนเปื้อนมากับดิน น้ำ และพืช เนื้อแดงที่มีการตัดแต่งภายใต้สภาวะที่ถูกสุขลักษณะมีเชื้อประจำถิ่นเริ่มต้นประมาณ 10^3-10^4 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งน้อยกว่าร้อยละ 10 และมักพบพวกที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำได้เพียงร้อยละ 1 เท่านั้น จำนวนของพวกที่เจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิต่ำจะยังคงแปรผันกับฤดูกาลและภูมิศาสตร์ด้วย เพราะว่าจำนวนของแบคทีเรียพวกที่เจริญได้ดีในดินที่อุณหภูมิต่ำจะลดลงเมื่ออุณหภูมิของดินเพิ่มขึ้น ยีสต์และราเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้น้อยมาก สปีชีส์ที่มักพบเป็นประจำ ได้แก่ พวกที่

อาศัยอยู่ในดินและพืช และมีโอกาสน้อยมากที่จะพบบนเนื้อในจำนวนเกิน 10^2 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Robinson. 1985)

การใช้อาหารเลี้ยงสัตว์ที่มีการปนเปื้อนก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ การขนส่งสัตว์โดยใช้พาหนะที่ปราศจากเชื้อไม่เพียงพอและการที่สัตว์ต้องนอนอยู่ในโรงฆ่าสัตว์เป็นระยะเวลานานทำให้มีการปล่อยแบคทีเรียก่อโรคออกมา ความเครียดของสัตว์อาจจะทำให้จุลินทรีย์ถูกปล่อยออกมาในต่อมน้ำเหลืองหรือเยื่อบุตับซึ่งทั้งสองบริเวณเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อข้าม (cross-infections) ไปยังตัวสัตว์ได้ (Smulders. 1995)

2.2.1.2 การปนเปื้อนจากเครื่องมือที่ใช้

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากเครื่องมือที่ใช้ เช่น มีด จะปนเปื้อนเข้าไปในตัวสัตว์ผ่านทางเส้นเลือด และแพร่เข้าสู่กระแสเลือดไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย แต่สารต้านจุลินทรีย์ที่อยู่ในเลือดจะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้น อย่างไรก็ตามมีด เหล็ก และผ้ากันเปื้อนของคนงาน และตัวผู้ตรวจสอบคุณภาพเนื้ออาจเป็นแหล่งของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ การสวมถุงมือจะช่วยป้องกันการปนเปื้อนเชื้อที่มาจากบาดแผลบนมือของคนงานแต่ละคนได้ และในพื้นที่ที่มีการตัดแต่งเนื้อถ้าไม่สะอาดอาจเป็นทางที่นำไปสู่การปนเปื้อนข้าม (cross - contamination) ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่บริเวณนั้นไปยังเนื้อสัตว์ที่ตัดแต่งแล้ว (Zeothen และ Bøgh - Sørensen. 2003)

2.2.1.3 การปนเปื้อนจากการแปรรูป

การกำจัดเขาสัตว์ การกำจัดขน และการถลกหนังวัวควายในโรงฆ่าสัตว์ด้วยมนุษย์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์บนผิวหน้าเนื้อมากกว่าการกำจัดด้วยเครื่อง สำหรับหมูที่ผ่านการลวกในภาชนะขนาดใหญ่ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แต่ก็ยังพบว่ามีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ที่ผิวหนัง ปอด และบาดแผล (Zeothen และ Bøgh - Sørensen. 2003) หลังจากการกำจัดขนที่ลำตัวออกจะทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือน้อยกว่า 10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร โดยจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตส่วนใหญ่เป็นพวกทนอุณหภูมิสูงได้ (Robinson. 1985) แต่กระบวนการในขั้นตอนต่อมาอาจจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้อีก ได้แก่ การตัดอวัยวะภายในออกทั้งในสุกรและวัวควายโดยเฉพาะอย่างยิ่งการกำจัดทวารหนักและการเปิดช่องท้อง รวมทั้งการตัดต่อมน้ำเหลืองและอวัยวะอื่นๆที่เป็นแหล่งของแบคทีเรีย การนำเนื้อสัตว์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 2 องศาเซลเซียสจะช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเจริญและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสีย การเก็บเนื้อสัตว์ไว้ในห้องเย็นโดยการใส่เข้าไปแบบไม่หนาแน่นจนเกินไป และมีการกำจัดน้ำออกโดยใช้ความดันต่ำซึ่งจะทำให้น้ำระเหยออกไปทำให้บริเวณผิวหน้าเนื้อแห้งและมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อปนเปื้อน (Zeothen และ Bøgh - Sørensen. 2003)

ตารางที่ 2.2 จำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการบรรจุเนื้อวัวในโรงฆ่าสัตว์

ตัวอย่าง	แบคทีเรีย	ยีสต์	รา
เนื้อวัว, ชำแหละ, บนพื้น	6,400-830,000 ต่อตร.ซม.	-	-
ดินที่ติดมาจากสัตว์(แห้ง)	110,000,0009 ต่อกรัม	50,000 ต่อกรัม	120,000 ต่อกรัม
มูลสัตว์(สด)	90,000,000 ต่อกรัม	200,000 ต่อกรัม	60,000 ต่อกรัม
กระเพาะสัตว์	2,000,000,000 ต่อกรัม	180,000 ต่อกรัม	1,600 ต่อกรัม
อากาศในห้อง	140 ต่อตร.ซม.ของจานเพาะเชื้อ	-	2 ต่อตร.ซม.
น้ำล้างเนื้อวัว	20-10,000 ต่อมิลลิลิตร	-	-
น้ำล้างพื้น	1,000-16,000 ต่อมิลลิลิตร	-	-

ที่มา : Empey และ Scott. 1939

2.2.1.4 การปนเปื้อนจากคนงาน

สัตว์ที่ถูกฆ่าในโรงฆ่าสัตว์หรือคนงานในโรงฆ่าสัตว์ มีโอกาสปนเปื้อนแบคทีเรียได้เท่าๆ กัน เนื่องจาก การพบแบคทีเรียในจมูก ปาก และผิวหนังของสัตว์ ส่วนมือของคนงานก็อาจปนเปื้อนแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร (*Enterobacteriaceae*) เช่น *Salmonella* หรือแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (coliform bacteria) ซึ่งเป็นผลมาจากการสัมผัสเนื้อเยื่อสัตว์ โดยทั่วไปเชื้อประจำถิ่นที่อยู่ในตัวสัตว์จะมีการปนเปื้อนเพียงชั่วคราวและสามารถกำจัดออกได้ง่ายด้วยการทำความสะอาดที่เหมาะสม แต่สำหรับ enterococci และ coliforms ยังจะปนเปื้อนอยู่ในเนื้อต่อไป ดังนั้นการทำงานโดยมนุษย์ทำให้เนื้อมีการปนเปื้อนมากขึ้น (Zeothen และ Bøgh- Sørensen. 2003)

การปนเปื้อนจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ อาจหลีกเลี่ยงได้ยากเนื่องจากเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบบ่อยๆ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจะเจริญในเนื้อสัตว์และอาจทำให้เกิดการเน่าเสียได้

2.2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่หลายชนิด แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทคือ

2.2.2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้อยู่ตามผิวหน้าของเนื้อ ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถใช้น้ำตาลได้โดยการออกซิไดซ์ทำให้ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้ามีปริมาณออกซิเจนจำกัดหรือถ้าการออกซิไดซ์ของน้ำตาลไม่สมบูรณ์จะทำให้เกิดกรดอินทรีย์เกิดขึ้น แบคทีเรียพวกนี้มีบทบาทสำคัญต่อผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ซึ่งแบ่งเป็น 4 ชนิดคือ

1. Homofermentative lactic acid bacteria ได้แก่ *Streptococci* และ *Lactobacilli* บางชนิด แบคทีเรียพวกนี้ในการหมักจะให้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว

2. Heterofermentative lactic acid bacteria ได้แก่ *Leuconostoc* และ *Lactobacilli* บางชนิด แบคทีเรียพวกนี้ในระหว่างการหมักจะสร้างกรดแลคติก เอทิลแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3. *Bacillus* species แบคทีเรียพวกนี้จะพบเฉพาะในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่เติมสารไนเตรตเท่านั้น จะทำให้เกิดกรดแลคติก กรดแอซีติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

4. *Clostridium* species แบคทีเรียพวกนี้ในระหว่างการหมักจะมีการสร้างกรดแลคติก กรดแอซีติก กรดบิวทิริก อะซีโตน บิวทิลแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน

2.2.2.2 แบคทีเรียที่สร้างสารพิษขึ้นในอาหารพวกเนื้อสัตว์

แบคทีเรียพวกนี้ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อ มาจากฝุ่น ดิน และคนงาน สามารถทนความร้อนสูง และเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นพร้อมกับผลิตสารพิษ แบคทีเรียเหล่านี้มีอยู่ 3 ชนิดคือ

1. *Clostridium botulinum* เป็นแบคทีเรียผลิตสารพิษที่มีชื่อว่า Botulism สารพิษนี้ถูกสร้างขึ้นและขับออกจากเซลล์แบคทีเรียมาอยู่ในอาหาร เป็นพวกเอ็กโซทอกซิน (exotoxin) ที่ถูกทำลายเมื่อนำไปต้มในน้ำเดือด (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) 15-20 นาที ความเป็นพิษของ Botulism พบว่าภายหลังจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษนี้อยู่ 24-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการกล้ามเนื้ออ่อนเพลียไม่มีแรง สูญเสียความสามารถในการสั่งการของสมองส่วนกลางและถ้ารับเข้าไปในปริมาณมากอาจถึงตายได้ *C. botulinum* มี 3 แบบคือ A B และ E เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (rod) เจริญได้ดีในที่มีอากาศและทนความร้อนได้สูง พบอยู่ทั่วไปในดิน มักพบในอาหารประเภทโปรตีน อาหารกระป๋องที่มีพีเอชต่ำ เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อและผักบรรจุกระป๋อง แต่ไม่พบบ่อยนักในผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมสารไนเตรต เพราะสารเหล่านี้ยับยั้งการเจริญของ *C. botulinum* ได้

2. *Staphylococcus aureus* สามารถผลิตสารพิษพวกเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ซึ่งสร้างขึ้นภายในเซลล์ และเมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีเซลล์ของแบคทีเรียอยู่จำนวนมากพอ พบว่าภายใน 2-6 ชั่วโมง ภายหลังจากได้รับสารพิษ ผู้ป่วยจะเกิดการบวมพองของผนังลำไส้และกระเพาะ สารพิษนี้สามารถทนความร้อนที่น้ำเดือดได้นานถึง 60 นาที แต่ถ้าใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จะถูกทำลายได้ *S. aureus* มักพบในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ปิ้ง ย่าง รมควัน และเนื้อสด ซึ่งผ่านการให้ความร้อนในช่วงแรกไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ แต่ความร้อนที่ใช้จะเป็นตัวกระตุ้นให้แบคทีเรียที่เหลือรอดอยู่เจริญได้ และแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วในช่วงที่ทำให้เย็นลงช้าๆ และตั้งรอเวลาไว้ 8-12 ชั่วโมง ก่อนนำมารับประทาน

3. *Clostridium perfringens* พบในเนื้อสัตว์หลายชนิด ได้แก่ เนื้อโค สุกร แกะ และไก่ ทั้งในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์ แต่ส่วนใหญ่จะพบในเนื้อที่ผ่านการทำให้สุก และทิ้งไว้ให้เย็นอย่างช้าๆ ผู้บริโภคจะมีอาการปวดท้อง และท้องเสียภายหลังจากรับประทานอาหารที่มี *C. perfringens* ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณมากเป็นเวลา 8-22 ชั่วโมง การหุงต้มโดยปกติจะสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียพวกนี้ได้ และถ้าต้องการทำลายสปอร์ต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้น

2.2.2.3 แบคทีเรียจากเนื้อสัตว์ที่ทำให้เกิดโรค

แบคทีเรียจากเนื้อสัตว์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Salmonella* spp. ที่ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อสัตว์จำนวนมาก ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ในร่างกายของผู้บริโภค แล้วมีการสร้างสารพิษเอนโดทอกซิน (endotoxin) ขึ้นภายในเซลล์ ทำให้ผู้ติดเชื้อมีอาการวิงเวียนศีรษะ อาเจียน และท้องเดิน ระยะเวลาของการฟักตัว หรือช่วงเวลาหลังรับเชื้อเข้าไปจนถึงปรากฏอาการออกมาจะใช้ระยะเวลามากกว่า 6 ชั่วโมง (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2534)

2.3 การเจริญของจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์

การเจริญของจุลินทรีย์ทั้งบนผิวหน้าเนื้อและภายในเนื้ออาจทำให้เนื้อเน่าเสียได้ ซึ่งการเน่าเสียก็จะมีลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์และนำไปสู่การทำให้เนื้อเน่าเสียได้มีดังต่อไปนี้

2.3.1 ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนและการแพร่กระจายของเชื้อในเนื้อ

เมื่อเก็บเนื้อไว้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ เนื้อที่มีการปนเปื้อนเชื้อประจำถิ่นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำเป็นจำนวนมากจะทำให้เนื้อเน่าเสียได้รวดเร็วกว่าเนื้อที่มีจุลินทรีย์พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำปนเปื้อนอยู่น้อย (Zeothen และ Bøgh- Sørensen. 2003)

2.3.2 คุณสมบัติทางกายภาพของเนื้อ

พื้นที่ผิวของผิวหน้าเนื้อมีผลต่ออัตราการทำให้เน่าเสีย เพราะว่าบริเวณผิวหน้าเป็นแหล่งที่พบจุลินทรีย์มากที่สุด เนื่องจากมีออกซิเจนปริมาณมากช่วยให้จุลินทรีย์พวกที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเจริญได้ ดังนั้นเนื้อบดซึ่งมีพื้นที่ผิวหน้ามากจะช่วยให้จุลินทรีย์เจริญได้มากกว่า ไขมันที่ผิวหน้าอาจจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ได้ แต่ก็อาจทำให้เนื้อเน่าเสียได้เนื่องจากการย่อยสลายตัวเองของไขมัน (Zeothen และ Bøgh- Sørensen. 2003)

2.3.3 คุณสมบัติทางเคมีของเนื้อ

เนื้อสัตว์ประกอบด้วยสารอาหารต่างๆมากมาย และมีปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นเนื้อจึงเป็นแหล่งที่พบจุลินทรีย์ได้มากโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ผิวหน้า ซึ่งถ้าผิวหน้าเนื้อไม่มีความชื้นก็อาจจะทำให้ไม่มีจุลินทรีย์เจริญ ถ้ามีปริมาณความชื้นเล็กน้อยทำให้ราและยีสต์เจริญได้ แต่ถ้าปริมาณความชื้นมากๆจะช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ ดังนั้นความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศในการเก็บรักษาจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื้อที่มีปริมาณโปรตีนสูงและมีคาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์ใช้หมักได้ในปริมาณต่ำหรือไม่มีเลยมีแนวโน้มจะพบการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่หมักมากกว่า ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนและผลิตภัณฑ์ของโปรตีนไปเป็นไนโตรเจน คาร์บอน และพลังงานได้ ค่าพีเอชของเนื้อสัตว์ดิบอาจจะแปรผันตั้งแต่ประมาณ 5.7 ถึงมากกว่า 7.2 ขึ้นอยู่กับปริมาณของ

ไกลโคเจนที่มีในขณะที่สัตว์ถูกฆ่าและการเปลี่ยนแปลงในเนื้อที่เกิดขึ้นภายหลัง โดยจุลินทรีย์จะชอบเจริญในเนื้อที่มีค่าพีเอชสูงมากกว่าเนื้อที่มีค่าพีเอชต่ำกว่า เนื่องจากทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง (Zeothen และ Bøgh- Sørensen. 2003)

2.3.4 ปริมาณออกซิเจน

บนผิวหน้าของเนื้อมีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมกับการเจริญของรา ยีสต์ และแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ ส่วนภายในชิ้นเนื้อนั้นจะมีปริมาณออกซิเจนในระดับต่ำกว่า ถึงแม้ว่าจะมีออกซิเจนแพร่เข้าไปในเนื้อและเพิ่ม O-R potential อย่างช้าๆ ในการบรรจุเนื้อจึงต้องใช้วัสดุแบบที่ไม่ให้ออกซิเจนผ่านได้ แต่การเน่าเสียที่แท้จริงแล้วเกิดจากจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Zeothen และ Bøgh- Sørensen. 2003)

2.3.5 อุณหภูมิ

เนื้อควรจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิไม่สูงกว่าอุณหภูมิแช่แข็งมากนัก ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในอุณหภูมิต่ำเท่านั้น เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียที่ชอบเจริญภายใต้อุณหภูมิต่ำเจริญได้อย่างช้าๆและทำให้เนื้อเกิดลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป การเน่าเสียที่แท้จริงจะไม่เกิดที่อุณหภูมิต่ำแต่เกิดขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้อง จุลินทรีย์กลุ่มที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำจะมีการสลายโปรตีนและใช้เปปไทด์และกรดอะมิโนในการเจริญที่อุณหภูมิในสภาวะบรรยากาศปกติ พวกที่ชอบเจริญในอุณหภูมิปานกลางจะเจริญได้ เช่น แบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Bacillus* sp. และ *Clostridium* sp. ซึ่งมีการผลิตกรดปริมาณปานกลางจากคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่อย่างจำกัด (Zeothen และ Bøgh - Sørensen. 2003)

2.4 การลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

วิธีที่เป็นไปได้ในการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของเนื้อสด ได้แก่ (1) การประยุกต์ใช้สารเคมีรวมทั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรีย (2) การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การล้างน้ำ การพ่นละอองอากาศหรือการฉายรังสีบนผิวหน้าเนื้อด้วยรังสีอุลตร้าไวโอเลต รังสีอินฟาเรด การใช้ความดันไอน้ำและความดันสูง เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีจะมีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนได้แตกต่างกันดังตารางที่ 2.3 ในปัจจุบันนี้มีเฉพาะวิธีในกลุ่มแรกเท่านั้นที่ยังคงนำมาใช้กันอยู่ ส่วนวิธีที่ใช้ลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อนั้นทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับกฎหมายที่รองรับ วิธีที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ การกำจัดน้ำออกโดยการทำแห้ง การให้ความร้อนโดยการฆ่าเชื้อหรือการทำให้ปลอดเชื้อ การเติมไนไตรต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และโพลีฟอสเฟต (Polyphosphate) ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก การใช้กรดแลคติกและแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกร่วมกับการลดค่า a_w และการใช้ออกซิเจน เป็นต้น (Zeothen และ Bøgh- Sørensen. 2003)

สารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ กรดอินทรีย์ น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ และสารที่สร้างโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคเทอริโอซิน ไนซิน เพดิโอซิน เป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอาหารเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป็นเวลานานแล้ว ซึ่งผลการทำลายหรือการยับยั้งจุลินทรีย์โดยมากขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ถ้าใช้ในปริมาณสูงจุลินทรีย์จะถูกทำลายได้มาก แต่การใช้กับอาหารมักถูกจำกัดให้ใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545) ปัจจุบันนี้สารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติเหล่านี้กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้แทนวัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมี เช่น ไนไตรต์ ไนเตรต

ตารางที่ 2.3 ประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์โดยวิธีต่างๆ

ชนิด	วิธีการ	จำนวนที่ลดลง (log_{10})
ทางเคมี	การใช้กรดอินทรีย์	1.2-3.5
	การใช้คลอรีน	< 2
	การใช้โอโซน	0.3-3
ทางกายภาพ	การล้างด้วยน้ำ	< 0.5-1.4
	การล้างด้วยน้ำอุณหภูมิ 50-80 °C	< 0.5- มากกว่า 3
	การใช้ไอน้ำ	3-6
	การใช้รังสีอุลตร้าไวโอเลต	2-3
	การใช้รังสีอินฟาเรด	ประมาณ 1.7
	การใช้คลื่นไมโครเวฟ	ประมาณ 2
	การฉายรังสี	ประมาณ 6 (ขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้)

ที่มา : Zeothen และ Bøgh – Sørensen. 2003

2.5 การควบคุมจุลินทรีย์โดยใช้กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์หลายตัวถูกใช้เป็นสารลดพีเอชและช่วยเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร นอกจากนี้กรดอินทรีย์ยังเป็นตัวควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย เนื่องจากเมื่อค่าพีเอชของอาหารลดลงต่ำกว่า 5.0 จะทำให้แบคทีเรียบางตัวตายได้ (Ray. 1996) แต่ไม่ใช่ว่ากรดอินทรีย์ทุกตัวจะมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ กรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนต่อกันเป็นสายยาว 10 -12 ตัว เหมาะสมที่สุดที่จะเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (Barsosa-Cánovas และคณะ. 1998) กรดอินทรีย์ที่มีกิจกรรมมากที่สุด ได้แก่ กรดแอซีติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก กรดซอร์บิก และกรดเบนโซอิก กรดซิตริก กรดมาร์ลิก กรดฟูมาริก เป็นต้น (Davidson. 2001)

2.5.1 ผลของกรดอินทรีย์ต่อการรอดชีวิตและการตายของจุลินทรีย์

แม้ว่าในสภาวะที่เป็นกรดจุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ แต่สามารถรอดชีวิตได้เป็นระยะเวลาหนึ่ง ถ้าในกรณีที่เป็นเชื้อก่อโรคก็จะมีผลต่อความปลอดภัยของอาหาร ตัวอย่างเช่น การรอดชีวิตของ *Salmonella* spp. ในน้ำแอปเปิ้ลและในน้ำส้มคั้นที่ไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์ และ *E. coli* O157 ในน้ำแอปเปิ้ลที่ไม่ผ่านการพาสเจอไรซ์

การตอบสนองต่อความเครียดจากกรดทำให้เกิดเหตุการณ์หลายชนิด ได้แก่ การเหนี่ยวนำให้ทนต่อกรด (acid tolerance response ; ATR) ซึ่งเกิดในช่วงที่เซลล์เจริญอยู่ในระยะ log phase การต้านทานต่อกรด (acid resistance ; AR) และความเคยชินต่อกรด (acid habituation ; AH) ซึ่งเหตุการณ์เหล่านี้จะช่วยให้จุลินทรีย์รอดชีวิตในสภาวะที่มีกรดอินทรีย์ได้

การต้านทานต่อพีเอชของกรดที่เพิ่มขึ้นทำให้จุลินทรีย์สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีกรดอินทรีย์ได้เพิ่มขึ้น เช่น *E. coli* ที่มีความเคยชินต่อกรดที่พีเอช 5.0 จะเพิ่มการรอดชีวิตที่พีเอช 3.5 ในสภาวะที่มีกรดแลคติก (31 มิลลิโมลาร์) และกรดแอซีติก กรดโพรพิโอนิก กรดซอร์บิก และกรดเบนโซอิก (12.5 มิลลิโมลาร์)

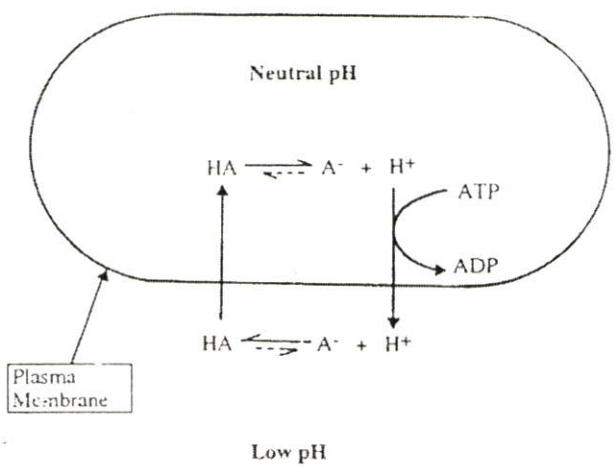
การรอดชีวิตของ *L. monocytogenes* ระยะ stationary phase ในสภาวะที่พีเอชลดต่ำลง เนื่องจากมีกรดแอซีติกหรือกรดแลคติก ความเข้มข้นของกรดแอซีติกทั้งหมด 5,000 - 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 3.5 จะเท่ากับความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ไม่แตกตัว 79-158 มิลลิโมลาร์ ทำให้อัตราการตายที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของกรดแอซีติกทั้งหมด 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ *L. monocytogenes* ที่มีชีวิตลดลงประมาณ 10^4 เซลล์ในเวลา 4 วัน กรดแอซีติกถูกใช้เป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียในทางเดินอาหาร โดยเฉพาะ *Salmonella* spp. ในซอส มีจำนวนลดลง 30 เท่าของ *E. coli* ที่เจริญที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Lund และคณะ. 2000)

2.5.2 กลไกการยับยั้งของกรดอินทรีย์

การทำหน้าที่เป็นสารต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์เกี่ยวข้องกับค่าพีเอช และกรดที่อยู่ในรูปไม่แตกตัว ดังนั้นในการคัดเลือกกรดอินทรีย์หนึ่งตัวเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ทั้งค่าพีเอชของอาหารและค่า pKa ของกรดจึงเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง การใช้กรดอินทรีย์ในอาหารต่างๆโดยทั่วไปแล้วจะใช้ในช่วงที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 5.5 เพราะว่ากรดอินทรีย์ส่วนใหญ่มีค่า pKa อยู่ที่พีเอช 3.0-5.0 (Davidson. 2001)

กลไกการยับยั้งของกรดอินทรีย์มีผลต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ในโปรคาริโอต หรือไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและการเกิดเมตาบอลิซึมต่างๆอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติมกรดอินทรีย์ลงในอาหาร (รูปที่ 2.1) ส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดสามารถแทรกผ่านชั้นไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ง่ายมาก เนื่องจากกรดอินทรีย์เป็นกรดไขมันชนิดหนึ่งจึงสามารถละลายใน

ไขมันได้ดี เมื่อเข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดอินทรีย์จะแตกตัวออกเพราะว่าค่าพีเอชภายในเซลล์สูงกว่าภายนอกเซลล์ แบคทีเรียจึงต้องพยายามรักษาค่าพีเอชภายในเซลล์ให้ใกล้เคียงกับสภาวะเป็นกลางเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครงสร้างเซลล์ที่เป็นโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลิอิก และฟอสโฟลิปิด และโปรตอนที่เกิดจากการแตกตัวของกรดอินทรีย์ภายในเซลล์มีผลทำให้ไซโตพลาสซึมมีความเป็นกรดมากขึ้นด้วย ดังนั้นต้องมีการขับโปรตอนออกไปภายนอกเซลล์ แต่เยื่อหุ้มเซลล์ไม่ยอมให้โปรตอนผ่านออก ทำให้ต้องใช้แรงดันไฟฟ้าเคมี (electrochemical potential) ในการนำโปรตอนออกนอกเซลล์ ซึ่งแรงดันที่ใช้ในการขับโปรตอนข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์นี้เรียกว่า แรงขับโปรตอน (proton motive force ; PMF) (Davidson. 2001) การขับโปรตอนออกจากเซลล์อาจจะเกิดขึ้นโดยการทำงานของเซลล์เองผ่านกระบวนการ active transport ทำให้พลังงาน ATP ของเซลล์ถูกใช้หมดไป และไม่สามารถสร้างขึ้นมาใหม่ได้เนื่องจากการขัดขวางการสร้างพลังงานของกรดอินทรีย์ (Barsosa-Cánovas และคณะ. 1998)



รูปที่ 2.1 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์
ที่มา : Adams และ Moss. 1995

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของกรดอินทรีย์

2.5.3.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกรด

กรดอินทรีย์ที่ใช้ในอาหารมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์แตกต่างกัน เนื่องจากค่า pKa ที่ต่างกัน กรดที่มีค่า pKa สูงกว่าจะมีปริมาณโมเลกุลที่ไม่แตกตัวสูงกว่าและสามารถต้านจุลินทรีย์ได้มากกว่า โดยทั่วไปภายใต้สภาวะเดียวกันประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของกรด 4 ชนิด เป็นดังนี้ กรดแอซีติก > กรดโพรพิโอนิก > กรดแลคติก > กรดซิตริก ในทำนองเดียวกันเมื่อความเข้มข้นของกรดสูงขึ้นหรือพีเอชต่ำลง ทำให้กรดมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ได้มากขึ้น

นอกจากนี้ความสามารถในการละลายน้ำของกรดอินทรีย์ก็มีผลสำคัญต่อการต้านจุลินทรีย์ เกลือของกรดอินทรีย์ เช่น อะซีเตต โพรพิโอเนต แลคเตต และซิเตตสามารถละลายในน้ำได้ดี ในขณะที่เบนโซเอต ซอร์เบต และพาราเบนละลายในน้ำได้น้อย ดังนั้นในสารละลายที่มีความเข้มข้นเดียวกันกรดอินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีประสิทธิภาพต่างกัน การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของกรดเหล่านี้ส่วนมากได้มีการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นในหน่วยร้อยละ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์จะแปรผันตามมวลโมเลกุล ดังนั้นที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีจำนวนโมเลกุลต่างกันและทำให้มีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเท่ากับไอออนที่แตกตัว เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์จะให้ผลที่ดีกว่า คุณสมบัติการเป็นโมเลกุลไม่มีขั้วของกรดอินทรีย์ทำให้มีประสิทธิภาพต่างกันด้วย กรดแอซีติกและกรดโพรพิโอนิกมีโมเลกุลไม่มีขั้วมากกว่ากรดแลคติกและมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์มากกว่ากรดแลคติก ซิเตรตถูกขนส่งผ่านเยื่อหุ้มโดยกลไกการขนส่งแบบจำเพาะ (citrate permease) และมีประสิทธิภาพต่ำกว่ากรดที่ไม่มีขั้ว จุลินทรีย์จำนวนมากสามารถใช้ไอออนของกรดอ่อน เช่น อะซีเตต แลคเตต และซิเตตได้ การใช้เกลือของกรดอินทรีย์เหล่านี้อาจมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลดลงในที่พีเอชสูงขึ้น และเมื่อมีการใช้กรดร่วมกันในการยับยั้งพบว่ากรดบางชนิดแสดงผลเสริมฤทธิ์กันอย่างเหมาะสม (เช่น กรดแอซีติกและแลคติก กรดโพรพิโอนิกและซอร์บิก) หรือการใช้กรดร่วมกับการถนอมอาหารอื่นๆ (เช่น กรดเบนโซอิกกับไนซิน กรดโพรพิโอนิก กรดแอซีติก หรือกรดแลคติกกับไนซิน หรือเบนโซเอตกับคาร์บอนไดออกไซด์) (Ray. 1996)

ตารางที่ 2.4 ผลของพีเอชต่อปริมาณไอออนที่ได้จากการแตกตัวของกรดอินทรีย์

ชนิดของกรด	ค่า pKa	การแตกตัวที่พีเอชต่างๆ (ร้อยละ)		
		4	5	6
กรดแอซีติก	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 : Ray. 1996

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5.3.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

โดยทั่วไปอาหารต่างๆมีค่าพีเอชหลากหลายตั้งแต่ช่วงที่เป็นกรด (พีเอช 3.0 เช่น น้ำมะนาว) ไปจนถึงช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 9.0 เช่น ไข่ขาว) พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีผลในการต้านจุลินทรีย์ ซึ่งในอาหารที่มีพีเอชต่ำกรดจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าในอาหารที่มีพีเอชสูงกว่าและที่พีเอชต่ำทำให้การรักษาค่าพีเอชของอาหารให้คงที่มีประสิทธิภาพลดลงด้วย แต่สารอาหารที่มีจะช่วยให้จุลินทรีย์ที่บาดเจ็บจากความเครียดของกรดซ่อมแซมตัวเองได้ง่ายขึ้น (Ray. 1996)

ตารางที่ 2.5 ช่วงพีเอชโดยประมาณของอาหารต่างๆ

ผลิตภัณฑ์	พีเอช
เนื้อสัตว์	
เนื้อวัว (ดิบ)	5.1-6.2
แฮม	5.9-6.1
เนื้อลูกวัว	6.0
เนื้อไก่	6.2-6.4
เนื้อหมู (ดิบ)	5.5-5.8, 6.8-7.0
ปลาและสัตว์น้ำ	
เนื้อปลา(ส่วนใหญ่)	6.6-6.8
เนื้อปลาแซลมอน	6.1-6.3
เนื้อปู	7.0
ทูน่า	5.2-6.1
ผัก	
ผักสีเขียวส่วนใหญ่	4.5-7.1
หน่อไม้ฝรั่ง	5.0-6.1
แครอท	4.9-6.3
มันฝรั่ง	5.6-6.2
มะเขือเทศสุก	3.4-4.9
ผลไม้	
แอปเปิ้ล	2.9-3.3, 3.3-4.1
แคนตาลูป	6.2-6.5
ผลิตภัณฑ์นม	
น้ำนม	6.3-6.5
ครีม	6.5
เนยเหลว	6.1-6.4

ที่มา : Lund และ Eklund. 2000

74837

2.5.3.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหารสามารถเจริญในอาหารที่มีพีเอชต่ำได้อย่างจำกัด เนื่องจากค่าพีเอชต่ำสุดที่เจริญได้ของจุลินทรีย์ต่างๆแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.6) โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบจะไวต่อกรดมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์และเชื้อราไวต่อกรดน้อยที่สุด แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญจะต้านทานต่อพีเอชต่ำๆได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน น่าจะเป็นเพราะว่าแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนนั้นสามารถต้านทานต่อค่าพีเอชภายนอกเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดีเช่นเดียวกับการต้านทานต่อพีเอชภายในเซลล์ที่ต่ำลงเล็กน้อย และเนื่องจากเหตุนี้ทำให้เชื้อราและยีสต์สามารถต้านทานต่อสภาพกรดได้

คุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ในอาหารเพิ่มขึ้นได้ โดยการใช้ความร้อน การลดค่า a_w การเติมสารกันเสียตัวอื่นๆลงในอาหาร และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ประสิทธิภาพในการยับยั้งของกรดอินทรีย์จะลดลงเมื่อมีจุลินทรีย์จำนวนมาก และมีจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดซึ่งมีผลต่อการทำงานของกรด เช่น ถ้ามีสปีชีส์หนึ่งต้านทานต่อแลคเตตจะทำให้ความเข้มข้นของกรดมีผลในการยับยั้งลดลงและทำให้สปีชีส์อื่นๆที่ไวต่อแลคเตตกลายเป็นต้านทานได้ จุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหารบางตัว เช่น *Salmonella* บางสายพันธุ์อาจจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ช่วยให้เจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นกรดสูง (หรือสภาวะที่มีพีเอชต่ำ) ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆในสปีชีส์เดียวกัน การทนต่อกรดนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (stress protein) จำนวนมากออกมา จุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีความไวต่อกรดอินทรีย์ต่างกัน ยีสต์และราบางส่วนไวต่อกรดโพรพิโอนิกและกรดซอร์บิก ขณะที่แบคทีเรียไวต่อกรดแอซีติกมาก ในสภาวะที่มีพีเอชต่ำจะทำให้สปอร์ของแบคทีเรียไวต่อความร้อนที่ใช้ และไม่มีการงอกและการเจริญของสปอร์ที่ค่า a_w ต่ำสุดของการเจริญ (minimal a_w) (Ray. 1996)

2.5.3.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีที่ใช้

ปัจจัยนี้ประกอบด้วยวิธีที่ใช้ ชนิดของกรด ความเข้มข้น อุณหภูมิของกรด และเวลาที่ผิวหน้าเนื้อสัมผัสกับกรด ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่นำมาใช้ในการล้างหรือใช้เป็นสารละลายสำหรับจุ่ม การฉีดพ่นเนื้อวัวด้วยกรดที่อุณหภูมิต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลของการใช้กรดที่อุณหภูมิสูงกว่าพบว่ากรดที่อุณหภูมิสูงมีแนวโน้มในการลดจำนวนจุลินทรีย์ได้ดีกว่า ซึ่งอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่มีประสิทธิภาพมาก (Ray. 1996)

2.5.4 การประยุกต์ใช้

การนำกรดอินทรีย์มาใช้กับอาหารเพื่อลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์นั้น อาจจะใช้วิธีการฉีดพ่นบนผิวหน้าหรือการจุ่มลงในสารละลายซึ่งส่วนใหญ่การฉีดพ่นจะทำด้วยมือหรืออาจใช้เครื่องที่มีหัวฉีดอยู่กับที่หรือเคลื่อนที่ไปตามเนื้อ การจุ่มเป็นเทคนิคที่ใช้กับชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็ก เช่น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในโรงฆ่าสัตว์ และขั้นตอนการตัดในตอนแรก โดยทั่วไปกรดอินทรีย์จะอยู่

บริเวณผิวหน้าและสามารถเข้าไปภายในส่วนของเนื้อเยื่อได้โดยเข้าทางเส้นเลือดหรือท่อน้ำดีในตับ สารอินทรีย์ที่อยู่บนผิวหน้าเนื้อจะถูกปล่อยลงในถังน้ำที่ใช้จุ่มและจับกับไอออนลบของกรด ทำให้ความเข้มข้นของกรดลดลง ด้วยเหตุนี้ทำให้เทคนิคการจุ่มเหมาะสมสำหรับการทดลองมากกว่าการใช้ในทางการค้า (Zeothen และ Bøgh - Sørensen. 2003)

ตารางที่ 2.6 ช่วงพีเอชในการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหาร

จุลินทรีย์	พีเอชต่ำสุดที่เจริญได้	พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญ	พีเอชสูงสุดที่เจริญได้
แบคทีเรีย (ส่วนใหญ่)	4.5	6.5-7.5	9.0
แบคทีเรียไม่ก่อโรค			
Acetobacter spp.	3.0	5.0-6.0	-
Escherichia coli (ไม่ก่อโรค)	4.0	-	-
Lactobacillus plantarum	< 3.0	-	-
Enterobacter agglomerans	3.6	-	-
Pseudomonas fluorescens และ *P. putida*	4.4	-	-
แบคทีเรียก่อโรค			
Bacillus cereus	5.0	6.0-7.0	8.8
Campylobacter jejuni/coli	4.9	6.5-7.5	~9
Clostridium botulinum	4.6	-	-
Clostridium perfringens	5.0	-	9.0
Escherichia coli (ก่อโรคในลำไส้)	4.4	6.0-7.0	9.0
Listeria monocytogenes	4.3-4.5	7.0	9.4
Salmonella spp.	3.8	7.0-7.5	9.5
Salmonella Typhimurium	< 4.0	-	-
Staphylococcus aureus	4.0	6.0-7.0	10.0
Vibrio cholerae	5.0	7.6	9.6
Vibrio parahaemolyticus	4.8	7.8-8.6	11.0
Yersinia enterocolitica	4.2	~7.2	9.6-10.0
ยีสต์ (ทั่วไป)	1.5-3.5	4.5-6.8	8.0-8.9
Saccharomyces cerevisiae	1.6	-	-
Candida krusei	1.3	-	-
รา (ทั่วไป)	1.5-3.5	4.5-6.8	8.0-11.0
Aspergillus flavus, A. parasiticus, A. niger	2.0	5.0-8.0	> 11.0
Penicillium verrucosum	< 2.1	6.0-7.0	> 10.0
Fusarium equiseti	< 3.3	5.0-8.0	>10.4

ที่มา : Lund และ Eklund. 2000

ตารางที่ 2.7 ผลของการใช้กรดแลคติกและกรดแอซีติกต่อคุณภาพของเนื้อ

ชนิดของกรด	วิธีการใช้	ความเข้มข้น (ร้อยละ)	ตัวอย่างเนื้อ	การเปลี่ยนแปลง
กรดแอซีติก	ฉีดพ่น	2	เนื้อวัว	สีเปลี่ยน
กรดแลคติก	ฉีดพ่น	1	เนื้อวัว	สีเปลี่ยน
กรดแลคติก	ฉีดพ่น	1.25	เนื้อลูกวัว	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแลคติก	ฉีดพ่น	1	เนื้อหมู	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแลคติก	ฉีดพ่น	2.4	เนื้อหมู	สีเปลี่ยน
กรดแอซีติก	ฉีดพ่น	2	เนื้อสัน	สีเปลี่ยน
กรดแอซีติก กรดแลคติก กรดแลคติก+กรดแอซีติก	ฉีดพ่น	1	สเต็กเนื้อวัว	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแอซีติก กรดแลคติก กรดแลคติก+กรดแอซีติก	ฉีดพ่น	1	เนื้อวัวแผ่น	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแลคติก+กรดแอซีติก	ฉีดพ่น	2	เนื้อวัวแผ่น	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแอซีติก	จุ่ม	1.2	เนื้อวัวก้อน	รสชาดและสีเปลี่ยน
กรดแอซีติก กรดแลคติก กรดแลคติก+กรดแอซีติก	จุ่ม	1	หมูสับ	มีน้ำไหลซึมออกมาและสีเปลี่ยน
กรดแลคติก+กรดแอซีติก	จุ่ม	2	สเต็กเนื้อวัว	สีเปลี่ยน
กรดแลคติก	จุ่ม	3	เนื้อหมู	สีเปลี่ยน

ที่มา : Zeothen และ Bøgh – Sørensen. 2003

2.5.5 ผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสและคุณภาพการสัมผัสอื่นๆของเนื้อ

คุณภาพการสัมผัสของเนื้อที่เป็นผลมาจากกรดแลคติกและกรดแอซีติก สามารถแบ่งอย่างง่ายได้เป็น 3 กลุ่มคือ สี กลิ่น หรือรสชาติ การสูญเสียน้ำเกิดจากการใช้กรดแลคติกและกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1-3 ในเนื้อสัตว์แต่ไม่มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของเนื้อที่ถูกตัด การเปลี่ยนสีของซากสัตว์สามารถสังเกตได้ซึ่งจะคืนสู่สภาพเดิมมากที่สุดภายใน 24 ชั่วโมง การรักษาเนื้อโดยจุ่มลงในสารละลายกรดอินทรีย์โดยตรงและไม่มีการฉีดพ่นมักจะทำให้สีและกลิ่นของเนื้อเปลี่ยนไป

การที่ค่าพีเอชภายในเซลล์ต่ำกว่าภายนอกเซลล์อาจเป็นผลให้มีไมโอฟิบริลาร์น้อยลง ทำให้มีการสูญเสียของเหลวภายในเซลล์ซึ่งหมายถึงมีการสูญเสียน้ำเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อที่ตัดออกมาจากเนื้อที่สัมผัสกับกรด แสดงให้เห็นว่าไม่มีการละลายเพิ่มขึ้นและไม่มีการ

สูญเสียในขณะปรุงอาหาร (cook loss) หลังจากการเก็บแช่แข็งภายใต้สุญญากาศ การเสียสภาพของโปรตีนไมโอฟิบริลาร์อาจจะเกิดขึ้นได้ แต่ไม่เพิ่มความแรงของแรงเฉือนที่พบ

2.5.6 การใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับวิธีการถนอมอาหารอื่นๆ

การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารขึ้นอยู่กับปัจจัยสองทาง ได้แก่ ปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน ปัจจัยภายนอก ได้แก่ ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ บรรยากาศ และปัจจัยภายใน ได้แก่ คุณสมบัติของอาหารที่ใช้ เช่น ค่าพีเอช ค่า a_w ของอาหาร และปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวกับการแปรรูป (เช่น ไนไตรต์ ความร้อน) หรือปัจจัยที่เกี่ยวกับคุณสมบัติของเชื้อประจำถิ่น สำหรับการยับยั้งหรือการลดการเจริญของจุลินทรีย์อย่างน้อยที่สุดต้องทำให้ปัจจัยบางอย่างเหล่านี้ไม่เหมาะสม หรือทำให้แบคทีเรียตายได้ สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไป การใช้เพียงวิธีเดียวในการยับยั้งหรือลดการเจริญของจุลินทรีย์นั้นไม่เพียงพอ เนื่องจากผลในด้านของคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารและการจำกัดการใช้ในอนาคต การถนอมอาหารโดยการลดปริมาณน้ำเพียงอย่างเดียว (โดยการทำแห้งหรือใส่เกลือ) มีผลให้จำนวนจุลินทรีย์ในอาหารคงที่ แต่ในกรณีของอาหารพร้อมรับประทานมีเพียง 2-3 อย่างเท่านั้นที่สามารถยับยั้งได้ ดังนั้นการใช้หลายๆวิธีร่วมกันมีความเหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่า ซึ่งอาจจะมีการใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ หรือการใช้กรดอินทรีย์ฉีดพ่นที่อุณหภูมิสูง หรือการใช้กรดอินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกัน เป็นต้น (Zeothen และ Bøgh - Sørensen. 2003)

2.6 การใช้กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร

การใช้วัตถุกันเสียเป็นวัตถุเจือปนอาหารเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ เนื่องจากการเน่าเสียของอาหารส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีความชื้นและพีเอชพอเหมาะ ดังนั้นการใช้วัตถุกันเสียในอาหารจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารเหล่านั้นเพื่อช่วยให้สามารถเก็บอาหารได้นานขึ้น โดยสารที่เป็นวัตถุกันเสียจะไปมีผลต่อการสร้างสารพันธุกรรม การสังเคราะห์โปรตีน การทำงานของเอนไซม์ เยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ และการขนส่งสารอาหาร (Lück และ Jager. 1995)

สำหรับวัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ กรดเบนโซอิก (benzoic acid) เกลือเบนโซเอต (benzoates) กรดซอร์บิก (sorbic acid) เกลือซอร์เบต (sorbates) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) เกลือโพรพิโอเนต (propionates) กรดอะซิติก (acetic acid) เกลืออะซิเตต (acetates) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfer dioxide) เกลือซัลไฟต์ (sulfites) เกลือไนเตรตและไนไตรต์ (nitrate และ nitrite) เอสเทอร์ออฟพารา-ไฮดรอกซิเบนโซอิกแอซิด (esters of *p*-hydroxy benzoic acid) สารปฏิชีวนะ (antibiotics) และวัตถุกันเสียจากสารธรรมชาติ เป็นต้น (ศิวาพร ศิวเวชช. 2546)

กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้ในอาหาร ได้แก่ กรดแอซีติกและอะซีเตต กรดแลคติกและแลคเตต กรดซอร์บิกและซอร์เบต เป็นต้น

2.6.1 กรดแอซีติกและเกลืออะซีเตต

กรดแอซีติก (CH_3COOH, pKa = 4.75 น้ำหนักโมเลกุล 60.05) เป็นองค์ประกอบแรกของน้ำส้มสายชู และเกลือต่างๆของกรดแอซีติก เช่น โซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียม โซเดียมไดอะซีเตตและแคลเซียมไดอะซีเตต เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารที่เก่าแก่ที่สุดตัวหนึ่งและมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง กรดแอซีติกมีประสิทธิภาพในการต้านยีสต์และแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา (Ingram และคณะ. 1956) มีแบคทีเรียบางส่วนที่สามารถทนต่อกรดแอซีติกได้ ได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซีติก แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก และแบคทีเรียที่ผลิตกรดบิวทิริก (Baid-Parker. 1980 ; Doores. 1983) แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งโดยกรดแอซีติก ประกอบด้วย *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* และ *Pseudomonas* spp. ราและยีสต์สามารถต้านทานต่อกรดแอซีติกได้มากกว่าแบคทีเรีย แต่ก็มีราและยีสต์บางส่วนที่ไวต่อกรดแอซีติก เช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* spp. และ *Saccharomyces* บางสายพันธุ์ (Davidson. 2001)

กิจกรรมของกรดแอซีติกขึ้นอยู่กับอาหาร สภาพแวดล้อม และชนิดของจุลินทรีย์ Woolford (1975) ได้ศึกษาบทบาทในการต้านจุลินทรีย์ของกรดแอซีติกที่พีเอช 4, 5 และ 6 ในสภาพที่มีพีเอช 6 พบว่า *Bacillus*, *Clostridium* และแบคทีเรียแกรมลบ ถูกยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เมื่อพีเอชลดลงถึงพีเอช 5.0 แบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้งได้ดีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ยีสต์ และเชื้อรา และที่พีเอช 4.0 พบว่าความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ต้องใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง และมีนักวิจัยบางท่านได้ใช้ความเข้มข้นของกรดแอซีติกที่ยับยั้งแบคทีเรียได้มาศึกษาการต้านจุลินทรีย์ต่างๆ 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 สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้มากกว่าร้อยละ 99.9 ภายใน 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่ากรดแอซีติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดชนิดหนึ่งที่สามารถต้านการเจริญของ *Yersinia enterocolitica*

Kirby และคณะ (1937) พบว่าที่พีเอช 3.5 กรดแอซีติกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราขนมปัง *A. niger* และ *Rhizopus nigricans* และยังมีผู้รายงานว่ากรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 0.8-1 ที่พีเอช 3.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* var. ellipsoideus และ *Penicillium glaucum* ขณะที่กรดแอซีติกความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 4 ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองที่

พีเอช 7.0 นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่าเมื่อเติมกรดแอซีติกลงในน้ำเย็น ซึ่งมีพีเอช 2.5 สามารถยืดอายุการเก็บรักษา cut-up chicken parts ได้ การเติมกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงในถังน้ำร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปสัตว์ปีก พบว่าค่า D_{52} ของ *Salmonella* Newport, *Salmonella* Typhimurium และ *Campylobacter jejuni* ลดลง 5-10 เท่า และพบว่ากรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำให้แบคทีเรียทั้ง 3 สกุลนี้ตายลงอย่างฉับพลัน ในทางตรงกันข้ามมีนักวิจัยบางท่านพบว่าการเติมกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ลงในถังน้ำร้อนไม่มีผลในการยับยั้ง *Salmonella* แบคทีเรียทั้งหมด หรือ *Enterobacteriaceae* ใน unpicked poultry carcasses อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อจุ่มเนื้อวัวลงในสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1.2 เป็นเวลา 10 วินาที พบว่าจำนวนเชื้อประจำถิ่น ได้แก่ *S.* Typhimurium, *Shigella sonnei*, *Y. enterocolitica*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Streptococcus faecalis* ลดจำนวนลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 65 Anderson และคณะ (1988) ได้นำเนื้อแกะที่เพิ่งชำแหละเสร็จจุ่มลงในสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 1.5 หรือ 3.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสหรือ 55 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบรรจุภายใต้สุญญากาศและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการจุ่มในสารละลายกรดแอซีติกต่ำกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ และพบประสิทธิภาพการยับยั้งมากที่สุดเมื่อจุ่มลงในสารละลายกรดแอซีติกความเข้มข้นร้อยละ 3 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นักวิจัยท่านหนึ่งได้ศึกษาผลของกรดแอติกในซุปมะเขือเทศและซุปกุ้ง ซึ่งถูกทำให้เป็นกรดด้วยกรดแอซีติกมีพีเอชเท่ากับ 4.2 และ 4.6 พบว่าไม่มีการเจริญหรือการสร้างสารพิษอย่างมีนัยสำคัญของ *Clostridium botulinum* ที่พบในผลิตภัณฑ์หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ใน frankfurter emulsion slurry กรดแอซีติก (ความเข้มข้นร้อยละ 0.3-1.16) ทำให้อัตราการยับยั้งการเจริญของ *Bacillus coagulans* และ *B. stearothermophilus* ที่พีเอช 4.2 อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 4.6 อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้น ตามลำดับ (Davidson และ Juneja. 1990)

เกลือแคลเซียมและโซเดียมอะซิเตตคาดว่ามีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับกรดแอซีติกที่พีเอชเดียวกัน และมีการนำมาใช้ในอาหารต่างๆ ได้แก่ ธัญพืชอบกรอบ เนยแข็ง ไขมันและน้ำมัน เจลาติน ลูกอม แยมและเยลลี่ เนื้อสัตว์ อาหารขบเคี้ยว ซุปผสม และซอสหวาน (Davidson. 2001) โซเดียมไดอะซิเตต (pKa เท่ากับ 4.75) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-2.0 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในเนยแข็ง นอกจากนี้พบว่าโซเดียมไดอะซิเตตยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง rope-forming bacteria *(Bacillus subtilis)*ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ และยังพบว่าโซเดียมไดอะซิเตตความเข้มข้นร้อยละ 0.1-0.5 สามารถยับยั้ง *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Penicillium expansum* และ *Mucor pusillus* ที่พีเอช 3.5-4.5 ได้ และที่ความเข้มข้น 32 มิลลิโมลาร์ (ร้อยละ 0.45) ในอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) (พีเอช 5.4) สามารถยับยั้ง *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 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้สารละลายโซเดียมไดอะซีเตตความเข้มข้น 21-28 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อประจำถิ่นในเนื้อวัวดิบ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 8 วัน (Davidson และ Juneja. 1990)

โซเดียมอะซีเตตความเข้มข้นร้อยละ 1 ยืดอายุการเก็บเนื้อปลาดุกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ถึง 6 วัน เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โซเดียมอะซีเตตยังสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis* ในขนมปัง และรา *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Penicillium expansum* และ *Mucor pusillus* ที่พีเอช 3.5-4.5 และเป็นสารที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมขนมปัง เนื่องจากมีผลเล็กน้อยต่อยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง Al-Dagal และ Bazaraa (1999) พบว่าเมื่อจุ่มทั้งตัวกุ้งและเปลือกกุ้งลงในสารละลายโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 2 นาที จะช่วยยืดอายุการเก็บและเพิ่มลักษณะทางประสาทสัมผัส เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Davidson. 2001)

ในประเทศสหรัฐอเมริกากรดแอซีติกเป็นสาร GRAS (Generally Recognized as safe) (21 CFR 184.1005) ที่ใช้ในการหมักดองใน (ปริมาณสูงสุดแสดงในวงเล็บ) ผลิตภัณฑ์ขนมอบ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.25) เนยแข็ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.8) ซอสและซอสพริก (ความเข้มข้นร้อยละ 9.0) ผลิตภัณฑ์นม (ความเข้มข้นร้อยละ 0.8) ไขมันและน้ำมัน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5) น้ำเกรวี่ และซอส (ความเข้มข้นร้อยละ 3.0) และในเนื้อ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.6) อาหารอื่นๆอาจจะมีกรดมากกว่าร้อยละ 0.15 โซเดียมอะซิเตต (21 CFR 184.1721) สามารถนำมาใช้ในธัญพืชอาหารเช้า (ความเข้มข้นร้อยละ 0.007) ไขมันและน้ำมัน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) ลูกอมชนิดแข็ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.15) แยมและเยลลี่ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.12) เนื้อสัตว์ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.12) ลูกอมชนิดอ่อน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.2) และอาหารทานเล่น ซุปผสม และซอสหวาน (ทั้งหมดใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05) แคลเซียมอะซิเตต (21 CFR 184.1185) ถูกปรับปรุงเพื่อใช้ในเนยแข็ง (ความเข้มข้นร้อยละ 0.02) เจลาติน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.02) อาหารทานเล่น (ความเข้มข้นร้อยละ 0.06) และซอสหวาน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.15) โซเดียมไดอะซิเตตยังเป็นสาร GRAS ด้วย (21 CFR 184.1754) สำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.4) ; เนยแข็ง น้ำเกรวี่และซอส (ความเข้มข้นร้อยละ 0.25) ; เนื้อสัตว์ (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) ; ลูกอม (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) ; และซุปผสม (ความเข้มข้นร้อยละ 0.05) กรดแอซีติกอาจถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อ (9 CFR 318.7) (Davidson และ Juneja. 1990)

2.6.2 กรดแลคติกและเกลือแลคเตต

กรดแลคติก ($CH_3CHOHCOOH$, pKa = 3.79 น้ำหนักโมเลกุล 90.08) ที่ได้จากธรรมชาติถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักอาหาร มีการใช้กรดแลคติกและ

เกลือของกรดแลคติกเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารมานานแล้ว โดยใช้เพื่อควบคุมพีเอช และกลิ่นรส กรดแลคติกสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica* และแบคทีเรียสร้างสปอร์ มีรายงานวิจัยมากมายที่เกี่ยวกับการใช้กรดแลคติกในการทำความสะอาดเนื้อสัตว์และสัตว์ปีก เพื่อลดหรือกำจัดเชื้อก่อโรค กรณีส่วนมากจะใช้กรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 0.2-2.5 ในการฉีดพ่นหรือจุ่ม เพื่อลดการปนเปื้อนบนผิวหน้าเนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อสัตว์ปีก และยังช่วยยืดอายุการเก็บได้ด้วย

2.6.2.1 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์

การศึกษาการทำงานแบบจำเพาะของแลคเตตต่อเซลล์จุลินทรีย์ถูกจำกัด มีเพียง 2 กลไกเท่านั้นที่เป็นไปได้และได้เคยมีผู้เสนอไว้คือ 1) ความสามารถในการละลายในไขมันของกรดอ่อน (ได้แก่ กรดแลคติก) ในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปที่ไม่แตกตัวแล้วไปแตกตัวภายในเซลล์และทำให้ภายในเซลล์มีสภาพเป็นกรด และ 2) ความสามารถจำเพาะของโซเดียมแลคเตตในการลดค่า a_w (Shelef. 1994)

1. การลดลงของพีเอชภายในเซลล์

ในการผ่านเข้าเซลล์ของกรด โมเลกุลของกรดที่ละลายได้ไขมันสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างอิสระในรูปโปรตอน ตัวพาที่มีพลังงาน (energy-linked carriers) และศักยภาพของเยื่อหุ้มเซลล์อาจจะเกี่ยวข้องในการรับโมเลกุลของกรดเข้าสู่เซลล์ ถ้าพีเอชภายนอกเซลล์ต่ำกว่าพีเอชภายในเซลล์ กรดจะแตกตัวและปล่อยโปรตอนออกมาทำให้ไซโตพลาสซึมมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปเซลล์พยายามที่จะรักษาค่าพีเอชภายในเซลล์ให้คงที่โดยการกำจัดโปรตอนออกไป และเมื่อพลังงานปริมาณมากของเซลล์ถูกใช้ไปเพื่อรักษาพีเอชภายในเซลล์ให้คงที่ จึงทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ลดลง การที่โปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเข้าสู่เซลล์ทำให้เกิดความแตกต่างของโปรตอน (proton gradient) ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของเซลล์ เช่น การขนส่งกรดอะมิโน กลไกนี้ได้รับการสนับสนุนจากผลการทดลองที่พบว่าเมื่อพีเอชลดลงหรือในสภาพที่มีกรดอินทรีย์ ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นมากกว่ากิจกรรมต้านจุลินทรีย์ที่ค่าพีเอชใกล้เป็นกลาง โดยในสภาพที่มีกรดอินทรีย์จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์มากกว่ากรดอนินทรีย์ (Shelef. 1994)

กรดแลคติกไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์จุลินทรีย์ได้โดยใช้กลไกเดียวกับกรดชนิดอื่นที่ได้จากการหมัก เช่น กรดแอซีติก และโพรพิโอนิก และไม่กระทำตามที่ได้คาดหมายจากพื้นฐานของค่าคงที่คงการแตกตัว (dissociation constant) *L. monocytogenes* ไวต่อกรดแลคติกและเกลือของกรดแลคติก จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ในสภาพที่มีกรดแลคติกและกรดอินทรีย์อื่นๆได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์รักษาความแตกต่างของพีเอชที่ประมาณ 1.0 ถึง 1.5 หน่วยของพีเอช ถึงระดับพีเอช 3.5-6.5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อในการตอบสนองต่อกรดแลคติกภายนอกเซลล์ เซลล์จะยังคงรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ให้อยู่ใกล้ 5.0 แม้ว่าระดับพีเอชภายนอกเซลล์ลดลงถึง 3.5 ข้อเท็จจริงนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าการยับยั้ง *L. monocytogenes* ไม่

เกี่ยวข้องกับพีเอชภายในเซลล์ที่ลดลง เกลือของกรดอินทรีย์ เช่น โซเดียมแลคเตตและโพแทสเซียมแลคเตตแตกตัวได้หมดในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายและที่พีเอชของผลิตภัณฑ์เนื้อที่ไม่ผ่านการหมักซึ่งปกติเท่ากับ 6.0-6.5 ความเข้มข้นของแลคเตตในรูปที่ไม่แตกตัวที่เติมลงไปต่ำ (Shelef. 1994)

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยเกลือแลคเตตเกี่ยวข้องกับโปรตอนและแอนไอออน (Eklund. 1983) มีรายงานว่าเกลือแลคเตตไอออนสามารถยับยั้งเชื้อ *C. botulinum* และ *Listeria* ได้ และแคลเซียมแลคเตตช่วยเพิ่มกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของแอนไอออน มีผู้เสนอว่าการสะสมไอออนลบเป็นสาเหตุที่ทำให้กรดที่เกิดขึ้นจากการหมักเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ในสภาพที่มีค่าพีเอชต่ำ แต่ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของพีเอชด้านนอกและด้านในเยื่อหุ้มเซลล์ การสะสมแอนไอออนและความเป็นพิษของกรดได้รับความสนใจน้อยและยังไม่มีการศึกษาถึงผลของแลคเตตแอนไอออนที่พีเอชใกล้สภาพเป็นกลาง (Shelef. 1994)

2. ผลของโซเดียมแลคเตตต่อค่า a_w

มีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งแบคทีเรียโดยเกลือของกรดแลคติกอาจเกี่ยวข้องกับผลของค่า a_w ซึ่งจากการรายงานได้แนะนำว่าควรใช้โซเดียมแลคเตตที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 5 จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ในอาหารเหลวได้ โดยทั่วไปการใช้ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารจะมีประสิทธิภาพน้อยกว่าการใช้สารนี้ในระดับความเข้มข้นเดียวกับในอาหารเหลว อย่างไรก็ตามมีผู้รายงานว่าความเข้มข้นของแลคเตตที่ต้องใช้เพื่อยับยั้ง *Listeria* ในเนื้อสัตว์ปีกและเนื้อสุกนั้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่ต้องใช้ในอาหารเหลว เมื่อปริมาณความชื้น ค่า a_w และอุณหภูมิของอาหารลดลง ความเข้มข้นของแลคเตตที่ต้องใช้ก็ลดลงไปด้วย การศึกษาอื่นๆ โดยใช้อาหารเหลวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงมีการยืนยันว่ามีการยับยั้งอย่างจำกัดหรือไม่มีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยแลคเตต ขณะที่การเติมแลคเตตลงในผลิตภัณฑ์เนื้อได้มีการศึกษาผลการต้านจุลินทรีย์ต่างๆดังข้อมูลในตาราง 2.8 และได้มีการศึกษาผลของแลคเตตต่อ a_w ในสารละลายที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและในผลิตภัณฑ์เนื้อ มีผู้ศึกษาผลของโซเดียมแลคเตตในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายและพบว่าแลคเตตไม่มีคุณสมบัติในการลดค่า a_w และยังพบว่าแลคเตตที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จะมีประสิทธิภาพด้อยกว่าโซเดียมคลอไรด์ในการลดค่า a_w ซึ่งตรงกันข้ามกับการรายงานก่อนหน้านี้ นอกจากนี้นักวิจัยอีกท่านหนึ่งยังได้เปรียบเทียบการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียชนิดต่างๆ และจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเหลวที่มีโซเดียมแลคเตตหรือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับ a_w เท่ากันคือ 0.958 พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ระดับเดียวกัน จุลินทรีย์เกือบทุกชนิดที่นำมาทดสอบยกเว้นสายพันธุ์หนึ่งของ *Escherichia coli* มีความไวต่อแลคเตต แต่ไม่ไวต่อคลอไรด์ ผู้เขียนสรุปว่าผลการต้านแบคทีเรียของโซเดียมแลคเตตไม่สามารถอธิบายได้ว่าเป็นผลมาจากการลดค่า a_w (Shelef. 1994)

ตารางที่ 2.8 การใช้แลคเตตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ผลิตภัณฑ์	การเก็บรักษา (วัน/องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตต (ร้อยละ)	ผลต่อจุลินทรีย์
ไส้กรอกหมู	45/5	3	ลดจำนวนพวก aerobes
ไส้กรอกหมู	28/4	2-3	ทำให้การเจริญของ aerobes ช้าลง
ตับหมู	42/6	2	ยับยั้งการเจริญของ aerobes และ anaerobes
frankfurters	56/4	2-4	ยับยั้ง *L. monocytogenes* และ aerobes
ไก่งวงบดสุก	10/27	3-3.5	*C. botulinum* สร้างสารพิษช้าลง
เนื้อวัวสุก	80/0	1-4	ลดจำนวน aerobes (ร้อยละ 3-4)

ที่มา : Shelef. 1994

จากการศึกษาถึงผลของแลคเตตในผลิตภัณฑ์เนื้อ Hammer และ Wirth (1985) ได้รายงานค่า a_w ของไส้กรอกตับที่ผสมแล้ว หลังจากการเติมเกลือโซเดียมชนิดต่างๆความเข้มข้นร้อยละ 1 ชนิดของเกลือโซเดียมที่เติมลงไป ได้แก่ อะซิเตต แอสคอร์เบต คลอไรด์ ซิเตรต ไดฟอสเฟต กลูตาเมท และแลคเตต โซเดียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการลดค่า a_w รองลงมาคือแลคเตต ซึ่งค่า a_w ลดลงร้อยละ 66 ของค่า a_w ที่ลดลงเมื่อใช้เกลือคลอไรด์ นักวิจัยหลายท่านได้เคยตรวจสอบเปลี่ยนแปลงการเจริญของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงค่า a_w ในผลิตภัณฑ์เนื้อที่เติมเกลือโซเดียมแลคเตต ข้อสรุปของข้อมูลเหล่านี้แสดงในตารางที่ 2.9 ซึ่งได้นำโซเดียมแลคเตตชนิดเดียวหรือโซเดียมแลคเตตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์มาใช้ในการศึกษานี้ ค่า a_w ของผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้เติมเกลือแลคเตตอยู่ในช่วง 0.959 ถึง 0.986 (ค่า a_w เฉลี่ยเท่ากับ 0.970) ซึ่งได้มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน และใช้ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตตและโซเดียมคลอไรด์ระดับเดียวกันเติมลงในผลิตภัณฑ์ต่างชนิดกันและทำการวัดค่า a_w ของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด พบว่าความเข้มข้นของแลคเตตซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในเนื้อมีผลในการลดค่า a_w แม้ว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ช่วง a_w วิกฤตคือ 0.945-0.965 (ค่า a_w เฉลี่ยเท่ากับ 0.970) และความแตกต่างจากค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.016 (ตารางที่ 2.9) ในการศึกษาผลของแลคเตตต่อการเจริญของ *L. monocytogenes* ในอาหารเนื้อจำลอง (meat model system) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อวัวบดที่ไม่ได้เติมวัตถุเจือปนอาหาร พบว่าการเติมโซเดียมแลคเตตความเข้มข้นร้อยละ 4 ลงในเนื้อที่มีความชื้นร้อยละ 55 สามารถยับยั้งการเจริญของสายพันธุ์ Scott A ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (Chen และ Shelef. 1992) และจากการวัดค่า a_w ได้แสดงให้เห็นว่าโซเดียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการลดค่า a_w ของเนื้อมากกว่าโซเดียมแลคเตต (ตารางที่ 2.10) การต้านทานต่อโซเดียมคลอไรด์ของ *L. monocytogenes* ได้มีการรายงานกันอย่างแพร่หลายถึงแม้ว่าโซเดียมคลอไรด์จะมีผลในการลดค่า a_w

จากตาราง 2.9 และ 2.10 อาจจะสรุปได้ว่าถึงแม้ว่าโซเดียมแลคเตตจะลดค่า a_w ในเนื้อให้ต่ำลง แต่มีผลเล็กน้อยและไม่เพียงพอที่จะใช้อธิบายผลในการต้านจุลินทรีย์อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 2.9 ผลของโซเดียมแลคเตตต่อค่าa_w และการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ผลิตภัณฑ์	การเก็บรักษา (วัน/องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นของโซเดียมแลคเตต/โซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)	ค่า a_w ของผลิตภัณฑ์ (ไม่เติมแลคเตต)	ค่า a_w วิกฤต	จุลินทรีย์
ตับหมู	42/6	2/2	0.959	0.940	จุลินทรีย์ทั้งหมด
แฮมสุก	60/5	1/2.2	0.970	0.965	จุลินทรีย์ที่ใช้อากาศทั้งหมด
เนื้อวัวบด เนื้อวัวสุก	7/20	4/0	0.986	0.964	*L. monocytogenes*
ไส้กรอกตับหมู	50/5	4/2	0.965	0.955	*L. monocytogenes*
		2/4		0.945	
		3/3		0.951	

ที่มา : Shelef. 1994

ตารางที่ 2.10 ผลของโซเดียมคลอไรด์หรือโซเดียมแลคเตตต่อค่า a_w ของเนื้อวัวบดสุก ซึ่งมีความชื้นร้อยละ 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 : Shelef. 1994

จากผลการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้ง *L. monocytogenes* โดยแลคเตต และค่า a_w ของอาหาร สามารถเปรียบเทียบกับผลจากการศึกษาอื่นๆที่ศึกษาผลของ a_w ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่มี a_w ต่ำ ได้แก่ อุณหภูมิ การใช้เกลือร่วมกันและค่าพีเอช ดังที่ได้สรุปไว้ในตารางที่ 2.11 ตัวอย่างเช่น Miller (1992) ได้ศึกษาการเจริญและการรอดชีวิตของ *L. monocytogenes* Scott A ในอาหารเหลว brain heart infusion (BHI) ที่มีค่า a_w ต่างกัน โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ กลีเซอรอล หรือโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) เป็นสาร

humectant พบว่าค่า a_w ต่ำสุดในการเจริญของเชื้อนี้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.92, 0.90 และ 0.97 ในสภาพที่มีสาร humectant ทั้งสามชนิดดังกล่าว ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้มีการใช้โซเดียมคลอไรด์ ซูโครส หรือกลีเซอรอลในอาหาร tryptic soy broth-yeast extract (TSB-YE) เพื่อหาค่า a_w ต่ำสุดในการเจริญระหว่างที่มีการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 21 วัน ค่า a_w ต่ำสุดเท่ากับ 0.92, 0.92 และ 0.90 ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ซูโครส หรือกลีเซอรอล ตามลำดับ และการเติมยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ลงใน TSB จะเพิ่มการทนต่อสาร humectant ทั้งสามชนิดได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ TSB ที่ไม่ได้เติมยีสต์สกัด ถึงแม้ว่ามีการแปรผันในสภาวะที่ทดสอบและชนิดของสาร humectant ค่าa_w ต่ำสุดในการเจริญของ *Listeria* ซึ่งใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นสาร humectant อยู่ในช่วง 0.90-0.94 a_wเฉลี่ย 0.922 (ตารางที่ 2.11) ค่า a_w ที่ได้เหล่านี้ต่ำกว่าค่าที่ได้เคยมีการรายงานไว้ในผลิตภัณฑ์เนื้อที่เติมแลคเตต (a_w เฉลี่ยเท่ากับ 0.954) สมมติว่าค่า a_w วิกฤตเท่ากันทั้งในอาหารเหลวและในอาหาร ดังนั้นการยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ที่พบในเนื้อที่เติมแลคเตตซึ่งมี a_w สูงขึ้น อาจเป็นผลมาจากการทำงานของแลคเตตซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับค่า a_w ข้อสังเกตจากการควบคุม *Listeria* ในสภาวะที่มีค่า a_w สูงกว่าที่คาดไว้ช่วยสนับสนุนประสิทธิภาพของ barrier system ซึ่งการยับยั้งแบคทีเรียในอาหรที่มี a_w สูงขึ้นอาจเกิดขึ้นได้โดยการใช้วัตถุเจือปนอาหารหลายชนิดร่วมกัน (Shelef. 1994)

การวัดค่า a_w ได้รับการยอมรับกันทั่วโลกว่าสามารถใช้ในการทำนายความคงตัว (shelf-stability) ในการเก็บรักษาและความปลอดภัยด้านจุลินทรีย์ของอาหารแต่คำถามต่างๆและข้อโต้แย้งเกี่ยวกับค่า a_w ของอาหารได้มีมากขึ้นเมื่อไม่กี่ปีมานี้ Slade และ Levine (1991) เสนอว่าตัวถูกละลายที่เป็นโพลิเมอร์ เช่น น้ำตาล อาจจะสร้างสารที่มีความเสถียรมาก ซึ่งมีผลต่อความคงตัวของจุลินทรีย์มากกว่าตัวถูกละลายโมเลกุลเล็กที่ไม่ใช่โพลิเมอร์ (nonpolymeric small compounds) กรดแลคติกสามารถเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันได้เอง (self-esterification) และเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย การเปลี่ยนแปลงนี้อาจจะมีผลต่อปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ (Shelef. 1994)

3. ผลกระทบด้านอื่นๆ

สำหรับการอธิบายในแง่อื่นเกี่ยวกับเหตุผลการต้านจุลินทรีย์ของแลคเตตได้เคยมีผู้เสนอไว้ เช่น มีการแนะนำว่า *C. botulinum* ในสภาวะที่มีแลคเตตไอออนความเข้มข้นสูงอาจทำให้การรีดักชันของไพรูเวตไปแป็นแลคเตตเข้าใกล้จุดสมดุลเทอร์โมไดนามิคของแลคเตต ดังนั้นจึงยับยั้งวิถีเมแทบอลิซึมหลักในสภาวะไม่มีออกซิเจนที่สำคัญในการเจริญ การอธิบายอื่นๆที่เป็นไปได้ถูกเสนอโดยผู้เขียนเหล่านี้ กล่าวว่า *C. botulinum* ถูกยับยั้งโดยการที่แลคเตตไหลออกจากเซลล์ ซึ่งอาจจะเกิดควบคู่กับการสร้าง adenosine triphosphate (ATP) จากการขนส่งโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ สิ่งนี้อาจทำให้ *C. botulinum* ถูกยับยั้งเนื่องจากความเข้มข้นของแลคเตตภายนอกเซลล์สูงดังที่พบใน membrane vesicle ของ *Streptococcus faecalis* (Shelef. 1994)

ตารางที่ 2.11 ค่า a_w ต่ำสุดในการเจริญและการรอดชีวิตของ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลวที่เติมสาร humectant

สาร humectant	สภาวะที่ทดสอบ	a_w ต่ำสุด
โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 16	1 ปี	ประมาณ 0.90
โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10	-	ประมาณ 0.93
โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10.5	15 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส	<0.80
โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 20-30	5 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส	<0.80
โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 30.5	100 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส	<0.80
โซเดียมคลอไรด์	20 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส	0.93 และ 0.94[a]
ซูโครส	20 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส	0.92 และ 0.94[a]
กลีเซอรอล	20 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส	0.91
โซเดียมคลอไรด์	20 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส	0.90
ซูโครส	20 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส	0.91 และ 0.94[b]
กลีเซอรอล	20 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส	0.89
โซเดียมคลอไรด์	10-15 วัน ที่ 28 องศาเซลเซียส	0.92
กลีเซอรอล	10-15 วัน ที่ 28 องศาเซลเซียส	0.90
โพรไพลีนไกลคอล	10-15 วัน ที่ 28 องศาเซลเซียส	0.97
โซเดียมคลอไรด์	21 วัน ที่ 21 องศาเซลเซียส	0.92
ซูโครส	21 วัน ที่ 21 องศาเซลเซียส	0.92
กลีเซอรอล	21 วัน ที่ 21 องศาเซลเซียส	0.90

[a] จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^4 และ 10^2 CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

[b] สายพันธุ์ Scott A และ Brie 1 ตามลำดับ

ที่มา : Shelef. 1994

เป็นที่ทราบกันดีว่ากรดไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิก (กรดซิตริก กรดแลคติก กรดมาลิก และกรดทาร์ทาริก) มีคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาคีเลชัน แลคเตตเป็นตัวคีเลเตอร์ที่นำมาใช้ในอาหารมากที่สุดเช่นเดียวกับซิเตรต ไพโรฟอสเฟต และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ตัวอย่างเช่น ค่าคงที่ความเสถียรของ Fe (III) ในการทำปฏิกิริยากับกรดแลคติกคือ 6.4 ค่านี้ไม่สามารถทำนายประสิทธิภาพในการสร้างสารเชิงซ้อน iron-lactate ในอาหาร เช่น เนื้อ ซึ่งมีส่วนประกอบที่ขัดขวางจำนวนมาก และมีค่าต่ำกว่าการทำปฏิกิริยากับซิเตรต (11.85) การเกิดคีเลชันของเหล็กที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อสัตว์อาจทำให้แลคเตตยับยั้ง *Listeria* ได้ ข้อสันนิษฐานนี้ได้รับการสนับสนุนโดยการพบว่าแลคเตตทำให้ไขมันและน้ำมันคงตัว น่าจะมีสาเหตุมาจากการ

เกิดคีเลชันของเหล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ความร้อนช่วยส่งเสริมการยับยั้ง *Listeria* โดยแลคเตตที่เติมในเนื้อสัตว์ซึ่งทำให้ *Listeria* ถูกยับยั้งได้มากขึ้น การเปรียบเทียบผลการต้าน *Listeria* ของโซเดียมแลคเตตในไส้กรอกตับหมูพบว่าการยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ในไส้กรอกที่ฆ่าเชื้อโดยการสเตอริไลส์ (15 นาที 121 องศาเซลเซียส) หลังจากการเติมโซเดียมแลคเตตดีกว่าในผลิตภัณฑ์ที่ให้ความร้อนโดยการแช่ใน water bath เพื่อให้อุณหภูมิภายในเนื้อสัตว์เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส สภาวะในการแปรรูปก่อนหน้านี้อาจช่วยให้ polyvalent cations เกิดคีเลชันเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของ *Listeria* เป็นไปได้ว่าผลของแลคเตตต่อ *C. botulinum* ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดคีเลชันของ polyvalent cations ด้วย เช่น เหล็ก (Shelef. 1994)

จากข้อสังเกตเกี่ยวกับการยับยั้ง *Listeria* ในเนื้อสัตว์เปรียบเทียบกับในอาหารเหลว จะเห็นได้ว่าถ้าหากปริมาณความชื้นลดลงกิจกรรมการยับยั้งจะเพิ่มขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสามารถหาได้จากความเข้มข้นของแลคเตตในน้ำ เพราะว่าการเติมโซเดียมแลคเตตความเข้มข้นร้อยละ 4 ในเนื้อสัตว์ที่มีความชื้นร้อยละ 55 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ดังนั้นความเข้มข้นของแลคเตตในน้ำที่อยู่ในเนื้อสัตว์จึงมากกว่าร้อยละ 7 ของแลคเตตทั้งหมดหรือแลคเตตส่วนใหญ่ที่อยู่ในน้ำ การอธิบายนี้สนับสนุนว่าความเข้มข้นของเกลือแลคเตตที่ใช้ในการยับยั้งในอาหารเหลวและในเนื้อสัตว์ต่างกัน (Shelef. 1994)

โซเดียมแลคเตตความเข้มข้นร้อยละ 2.5-5.0 สามารถยับยั้ง *Clostridium botulinum*, *Clostridium sporogenes*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Y. enterocolitica* และแบคทีเรียที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆเน่าเสีย การใช้โซเดียมแลคเตตความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ร่วมกับโซเดียมอะซีเตตความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ช่วยยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในแฮมและผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเป็นเวลา 5 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Davidson. 2001)

2.6.3 กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบต

กรดซอร์บิก ($CH_3CH=CH-CH=CHCOOH$, pKa = 4.75) เป็นกรดที่ไม่แตกตัวและมักใช้ในรูปของเกลือโซเดียมโพแทสเซียม หรือแคลเซียม ซึ่งในรูปของเกลือโพแทสเซียมละลายในน้ำได้ดี (58.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้นของกรดซอร์บิกที่ใช้อยู่ระหว่าง 500-2000 ppm (ร้อยละ 0.05-0.2) ในอาหารต่างๆ ได้แก่ เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์บางชนิด ผักและผลไม้แปรรูป ขนมหวาน ลูกกวาด มายองเนส น้ำสลัด และมัสตาร์ด (Ray. 1996)

2.6.3.1 การต้านจุลินทรีย์

ได้มีรายงานว่าซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียจำนวนมากได้ ซอร์เบตสามารถต้านแบคทีเรียได้ดี อย่างไรก็ตามกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของซอร์เบตยังไม่เป็นที่เข้าใจดีเท่ากับการยับยั้งยีสต์และรา นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ากรดซอร์บิกความเข้มข้นร้อย

ละ 0.1 ยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ผิวหน้าในระหว่างการหมักแตงกวาดอง โดยไม่มีการรบกวนการหมักกรดที่ต้องการ Costilow และคณะ (1955) ได้รายงานผลการทดลองที่เหมือนกันของทั้งยีสต์ที่สร้างฟิล์มและยีสต์ที่ผิวหน้า อย่างไรก็ตามมีผู้พบว่ากรดซอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ไม่เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของ fermentative yeasts ในการหมักแตงกวาดองได้เท่านั้น แต่ยังยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ และยังทำให้สีของแตงกวาดองที่ได้และคุณภาพการเก็บไม่ดี นอกจากนี้มีผู้วิจัยได้รายงานว่าผลการยับยั้งของกรดซอร์บิกต่อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในการหมักแตงกวาดองขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำเกลือ ถ้าความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ยิ่งสูงมากขึ้นก็จะยับยั้งการหมักกรดแลคติกได้ดีมากขึ้น ผลการยับยั้งของกรดซอร์บิกต่อยีสต์ได้มีรายงานแล้วโดยนักวิจัยท่านอื่นจำนวนมาก

สำหรับประโยชน์ของกรดซอร์บิกที่ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราในเนยแข็งได้มีการทดลองแล้วโดยนักวิจัยหลายท่าน และผลการยับยั้งเชื้อราโดยกรดซอร์บิกได้เคยมีรายงานแล้วในอาหารอื่นๆ และอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ (Sofos และ Busta. 1981)

ถึงแม้ว่าการยับยั้งแบคทีเรียโดยซอร์เบตยังไม่เป็นที่เข้าใจดีเท่ากับการยับยั้งยีสต์และเชื้อรา แต่มีแบคทีเรียจำนวนมากที่ถูกยับยั้งโดยสารประกอบของซอร์เบต ดังรายงานวิจัยของ Emard และ Vaughn (1952) ได้รายงานว่าซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Doell (1962) พบว่าซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.075 มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Typhimurium และ *E. coli* และซอร์เบตยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในน้ำนม และเนยแข็ง และมีรายงานว่าซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด staphylococci, *Pseudomonas* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าซอร์เบตถูกใช้เป็นวัตถุกันเสียในผลิตภัณฑ์ต่างๆ (Sofos และ Busta. 1981)

จากการที่ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของซอร์เบตที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พีเอชของผลิตภัณฑ์ ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ วัตถุเจือปนอาหารอื่นๆที่มีในผลิตภัณฑ์ การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ การแปรรูป การบรรจุ อุณหภูมิในการเก็บรักษา ระยะเวลาในการเก็บรักษา และสุขลักษณะ (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.2 ข้อดีของซอร์เบต

งานวิจัยจำนวนมากได้ทำการทดลองเกี่ยวกับความเป็นพิษ เมแทบอลิซึม ความคงตัว วิธีการตรวจวัด และความมีประสิทธิภาพของซอร์เบตในการเป็นวัตถุกันเสีย ในช่วงแรกที่มีการนำซอร์เบตมาใช้ ซอร์เบตถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่ไม่เป็นพิษ มีรายงานว่าซอร์เบตสามารถถูกเมแทบอไลซ์โดยสิ่งมีชีวิตเหมือนกับการเมแทบอไลซ์กรดไขมันที่พบในธรรมชาติ ยังมีรายงานอีกว่าซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากกว่าเบนโซเอต และมีความเป็นพิษน้อยกว่าเบนโซเอต เบนโซเอตถูก

เมแทบอไลซ์ต่างจากซอร์เบต เบนโซเอตต้องถูกกำจัดพิษในตับก่อนที่จะถูกขับถ่ายออกมา บางคนถือว่าซอร์เบตเป็นอาหารที่ใช้ถนอมอาหารอื่นๆ ค่า LD_{50} ของกรดซอร์บิกคือประมาณ 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สำหรับค่า LD_{50} ของเกลือ (NaCl) คือ 5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในบรรดาวัตถุกันเสียในอาหาร องค์การอนามัยโลกได้ระบุว่าซอร์เบตเป็นสารที่รับเข้ามาในแต่ละวันสูงที่สุด ซึ่งเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Sofos และ Busta. 1981) ซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากกว่าเบนโซเอตอย่างน้อย 3 เท่าในการเป็นวัตถุกันเสียในเนยแข็ง ปลา และผลิตภัณฑ์พวกขนมอบ การกระจายของไขมันต่อน้ำของเกลือโพรพิโอเนตดีกว่าของซอร์เบต แต่ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าโพรพิโอเนต ซอร์เบตมีประสิทธิภาพดีกว่าเกลือโพรพิโอเนตประมาณ 4 เท่าในการถนอมรักษาเนยแข็ง ปลา และผลิตภัณฑ์ขนมอบ เชื้อ *S.* Typhimurium ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตที่เติมลงในเนยแข็งแช่เย็นได้เร็วกว่าโพรพิโอเนตมาก (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.3 ผลของพีเอช

ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของกรดไขมันที่มีอะตอมของคาร์บอน 1-14 อะตอม เกี่ยวข้องกับส่วนที่ไม่แตกตัวของกรด ไม่ใช่ส่วนที่เป็นไอออนลบของกรด ซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากที่ค่าพีเอชใกล้เคียงกับค่าคงที่ในการแตกตัวของกรด (pKa) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.75 ที่ค่าพีเอชนี้ร้อยละ 50 ของปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวซึ่งมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 2.12) ดังนั้นซอร์เบตจึงมีประสิทธิภาพมากในอาหารที่มีความเป็นกรดที่ระดับพีเอชสูงขึ้นประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบตมีมากกว่าเบนโซเอตและโพรพิโอเนต อาจจะอธิบายได้ว่าโดยพิจารณาจากค่า pKa ซอร์เบตมีพีเอชสูงสุดในการทำงานประมาณ 6.0-6.5 ขณะที่พีเอชสูงสุดในการทำงานของโพรพิโอเนตและเบนโซเอตคือ 5.0-5.5 และ 4.0-4.5 ตามลำดับ ซอร์เบตสามารถนำมาใช้แทนเบนโซเอตได้บางส่วนหรือทั้งหมดในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง เพื่อหลีกเลี่ยงกลิ่นรสที่ไม่ดี และเพิ่มความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.4 การเกิดปฏิกิริยา

องค์ประกอบของอาหารที่ละลายน้ำได้ เช่น น้ำตาล และเกลือ มีผลในการเพิ่มอัตราส่วนของไขมันต่อน้ำของซอร์เบต ซึ่งควรจะหมายความว่าซอร์เบตระดับต่ำยังคงอยู่ในส่วนของน้ำในอาหาร ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นสารต้านจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาได้พบว่าเกลือและน้ำตาลทำงานเสริมฤทธิ์กันกับซอร์เบตและช่วยเพิ่มผลในการต้านจุลินทรีย์ และจากการรายงานอื่นๆได้พบปฏิกิริยาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างซอร์เบต พีเอช เกลือ และน้ำตาลเช่นเดียวกัน เมื่อเร็วๆนี้มีผู้รายงานว่าซอร์เบตให้ผลในการเสริมฤทธิ์การทำงานกับเกลือ (NaCl) สาร BHA และ TBHQ ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* บางสายพันธุ์ ความเป็นกรดอาจทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของซอร์เบตลดลง แต่โดยทั่วไปกรดจะเพิ่มกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบต โดยการลดพีเอชของสารตั้งต้นให้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับค่าคงที่การแตกตัว กรดบางชนิด เช่น กรด

แอซีติก อาจจะถูกใช้ร่วมกับซอร์เบตในการทำแตงกวาแช่อิ่ม เพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซีติก ซึ่งจะเจริญได้ดีจากการที่ซอร์เบตยับยั้งการเจริญของยีสต์ ในน้ำแอปเปิ้ลนั้นจะถูกยับยั้งโดยกรดแอสคอร์บิกในผลิตภัณฑ์ ปฏิกิริยาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างซอร์เบตกับอุณหภูมิเคยมีรายงานแล้ว การใช้ความร้อนต่ำ (49 องศาเซลเซียส) และการเติมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.06-0.12 สามารถช่วยเพิ่มอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ผลไม้ได้นานขึ้นอย่างมาก (87) นอกจากนี้ซอร์เบตยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำองุ่นที่อุณหภูมิต่ำ (1.1 องศาเซลเซียส) และได้มีรายงานว่ากรดซอร์บิกยับยั้งกลไกการซ่อมแซมองค์ประกอบภายในของเซลล์ หลังจากการให้ความร้อนต่อ *E. coli* และ *Candida utilis* ดังนั้นซอร์เบตจึงช่วยเสริมผลของความร้อนในการทำลายเซลล์ (Sofos และ Busta. 1981)

ตารางที่ 2.12 ผลของพีเอชต่อการแตกตัวของกรดซอร์บิก

ค่าพีเอช	รูปที่ไม่แตกตัวของกรด (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 Busta. 1981

2.6.3.5 อนุพันธุ์ต่างๆของกรดซอร์บิก

อนุพันธุ์ต่างๆของกรดซอร์บิกมีเพียงเกลือของกรดซอร์บิกเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ในทางการค้าและใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามอนุพันธุ์อื่นๆบางตัวเคยถูกทดสอบและพบว่ามีประสิทธิภาพ ซอร์บาไมด์ (sorbamide) เป็นสารประกอบหนึ่งที่พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ alcohol dehydrogenase จากยีสต์ ได้มากถึง 1,000 เท่า ขณะที่ sorbohydroxamic acid มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราในพีเอชช่วง 3.6-9.2 (23,108) ค่า pKa ของกรด sorbohydroxamic เท่ากับ 8.8 และดังนั้นจึงอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวได้ในช่วงพีเอชกว้างกว่ากรดซอร์บิก ซอร์บิกอัลดีไฮด์มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน แต่สารนี้มีกลิ่นและรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งเป็นสิ่งที่จำกัดการใช้ประโยชน์ของสารนี้ เอสเทอร์ของกรดซอร์บิกที่ไม่สามารถแตกตัวยังคงรักษาประสิทธิภาพการ

ทำงานในช่วงพีเอชที่กว้าง แต่การที่สารนี้ไม่ละลายในน้ำจึงนำมาใช้ประโยชน์ได้ไม่มาก (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.6 เมแทบอลิซึมและการต้านทาน

เป็นที่ทราบกันดีว่าราบางสปีชีส์ต้านทานต่อกรดซอร์บิกได้ดี บางครั้งจึงพบว่าเชื้อราทำให้อาหารที่เก็บถนอมไว้ด้วยซอร์เบตเน่าเสีย นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อราเริ่มต้นที่มีปริมาณมากในเนยแข็งสามารถย่อยสลายกรดซอร์บิกได้ สิ่งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าซอร์เบตมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอที่จะใช้ถนอมรักษาเนยแข็งที่ผลิตภายใต้สภาวะที่ไม่ถูกสุขลักษณะให้เก็บไว้ได้นาน ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถใช้กรดซอร์บิกได้ อย่างไรก็ตามมีผู้รายงานว่า *Clostridium* หลายสปีชีส์ใช้ซอร์เบตเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และมีการรายงานว่าเชื้อราหลายสปีชีส์ย่อยสลายซอร์เบตในเนยแข็งได้ และซอร์เบตจะถูกย่อยสลายได้ดีขึ้นในสภาพที่มีสารอาหารคุณค่าสูง และถูกย่อยสลายได้ช้าลงในอาหารที่ด้อยคุณค่า การย่อยสลายซอร์เบตเกิดขึ้นพร้อมกับการสร้างสารประกอบที่ระเหยได้ซึ่งมีกลิ่นเหมือนสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งก็คือสาร 1,3 pentadiene มีผู้เสนอว่าเชื้อราย่อยสลายซอร์เบตโดยผ่านกระบวนการดึงคาร์บอนออก (decarboxylation) ดังนี้

potassium sorbate + กรดทาร์ทาริก ⟶ potassium tartrate + sorbic acid

sorbic acid decarboxylation ⟶ 1,3-pentadiene + CO_2

นอกจากการเกิดกลไกผ่านเมแทบอลิซึมของกรดไขมัน (fatty acid metabolism) กลไกข้างบนนี้ยังอาจจะเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของซอร์เบตโดยเชื้อรา มีผู้รายงานว่ากรดซอร์บิกถูกเมแทบอไลซ์โดยยีสต์ที่ความเข้มข้นของซอร์เบตภายในเซลล์ต่ำ อย่างไรก็ตามเกลือซอร์เบตที่ความเข้มข้นสูงยับยั้งการเกิดเมแทบอลิซึมและการเจริญของยีสต์ มีการรายงานว่า *Saccharomyces bailii* ต้านทานต่อกรดซอร์บิก กรดเบนโซอิก และวัตถุกันเสียที่เป็นกรดโมโนคาร์บอกซิลิกสายสั้น (short-chain monocarboxylic acid) และเสนอว่าการต้านทานต่อวัตถุกันเสียเหล่านี้เบื้องต้นมีผลมากจากระบบที่ต้องการพลังงาน (an inducible energy-requiring system) ซึ่งขนส่งวัตถุกันเสียออกนอกเซลล์ กลไกนี้ถูกชักนำขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตเจริญในสภาวะที่มีวัตถุกันเสียความเข้มข้นต่ำมาก่อนหน้านี้ (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.7 การยับยั้งแบบคัดเลือก

มีรายงานวิจัยส่วนหนึ่งได้เสนอว่ากรดซอร์บิกมีความจำเพาะในการต้านจุลินทรีย์ทุกชนิดที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ดังนั้นจึงอาจใช้เกลือซอร์เบตเป็นสารคัดเลือกสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสรวมทั้งเชื้อ clostridia ด้วย อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่พบว่าข้อสรุปเหล่านี้ไม่สมบูรณ์ จากผลการวิจัยเป็นที่ชัดเจนว่าพีเอชของอาหารมีผลต่อความสามารถของกรดซอร์บิกในการคัดเลือกจุลินทรีย์ โดยทั่วไปประสิทธิภาพของกรดซอร์บิกในการศึกษาเหล่านี้ขึ้นอยู่

กับปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของสารประกอบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ยังคงมีข้อมูลที่ขัดแย้งกับข้อสรุปข้างบน เช่น นักวิจัยบางท่านได้รายงานว่า *S. aureus* บางสายพันธุ์ ที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ เจริญได้ดีพอๆกับ lactobacilli ที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสในสภาพที่มีกรดซอร์บิก และยังมีรายงานถึงความแปรผันในการทนต่อความเข้มข้นของกรดซอร์บิก ระหว่างสปีชีส์และสายพันธุ์ของ clostridia ที่ทดสอบ มีรายงานว่ากรดซอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.10 มีผลทำให้การเจริญและการผลิตกรดโดย *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* (ทั้งสองชนิดเป็นพวกไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส) ลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Pediococcus cerevisiae* สองสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ซึ่งเป็นพวกที่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เล็กน้อย และพบว่าทนต่อกรดซอร์บิกได้เหมือนกับแบคทีเรียพวกที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และสุดท้ายมีผู้สรุปว่ากรดซอร์บิกไม่สามารถยับยั้งหรือกระตุ้นการเจริญของ clostridia ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 6.7 (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.8 การใช้ซอร์เบตในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ปัจจุบันได้มีการยอมรับให้ใช้ซอร์เบตในผลิตภัณฑ์เนื้อในประเทศสหรัฐอเมริกา เช่น ในการจุ่มไส้ที่ใช้สำหรับทำ stuffed dry sausages ด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราบนผิวหน้าผลิตภัณฑ์ในระหว่างเวลาที่ทำแห้ง จากการรายงานที่ผ่านมาที่พบว่าซอร์เบตไม่สามารถยับยั้ง clostridia ในอาหารเลี้ยงเชื้อและการที่พบว่าประสิทธิภาพของซอร์เบตในการต้านแบคทีเรียนั้นเป็นการยับยั้งแบบคัดเลือก จึงเป็นเหตุผลหลักที่จำกัดการใช้ซอร์เบตในผลิตภัณฑ์เนื้อ การศึกษาโดย Tompkin และคณะ (1974) ซึ่งศึกษาผลของโพแทสเซียมซอร์เบตต่อ *Clostridium botulinum*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* ในไส้กรอกสุก ซึ่งไม่ได้เติมสารยับยั้งชนิดอื่น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด *Salmonella* และ *S. aureus* ขณะที่จำนวน *C. perfringens* ลดลงจนถึงระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ในทั้งชุดควบคุมและตัวอย่างที่เติมซอร์เบต ซอร์เบตยังคงชะลอการเจริญของ *C. botulinum* และการผลิตสารพิษจากเชื้อนี้ อย่างไรก็ตามสิ่งที่ค้นพบนี้เป็นสิ่งที่ไม่ได้คาดคิดเนื่องจากรายงานที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ซึ่งได้พบว่ากรดซอร์บิกเป็นสารคัดเลือกเชื้อ clostridia ให้เจริญขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sofos และ Busta. 1981) การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกับไนไตรต์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในผลิตภัณฑ์เนื้อปรุงรส (cured meat products) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเบคอนทอดกรอบ (crisp-fried bacon) เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการรายงานว่าไนไตรต์เป็นสารก่อมะเร็งโดยตรงในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามได้มีการใช้ไนไตรต์มาหลายปีในการใส่ถนอมเนื้อที่ซึ่งไนไตรต์มีการทำหน้าที่ที่สำคัญมากบางอย่าง ไนไตรต์ทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน (myoglobin) ทำให้เกิดสีที่ดีของ cured meat ไนไตรต์มีผลกระทบต่อกลิ่นรสของเนื้อและยังทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) การป้องกัน

การเกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีและที่สำคัญไนไตรต์ช่วยชะลอการผลิตสารพิษโดยเชื้อถ้าเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิไม่เหมาะสม จากความจำเป็นในการที่จะหาวิธีในการที่จะลดการสร้างไนไตรซามีนในผลิตภัณฑ์เนื้อ ขณะที่ยังคงให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจากสารพิษ (botulinum toxin) ได้อย่างดีเยี่ยม ได้นำไปสู่งานวิจัยที่ได้มีการทดลองนำซอร์เบตมาใช้แทนไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์เนื้อทั้งหมดหรือใช้แทนบางส่วน ในการควบคุมเชื้อ *C. botulinum* ได้มีการศึกษาในหลายๆห้องทดลอง ซึ่งการทดลองพื้นฐานคือซอร์เบต (ร้อยละ 0.20) มีผลในการชะลอการสร้างสารพิษในหลายๆผลิตภัณฑ์ และที่สำคัญอย่างมากคือการใช้ซอร์เบต (ร้อยละ 0.20) ร่วมกับไนไตรต์ที่มีความเข้มข้นต่ำลง (40-80 ppm) ให้ผลเสริมฤทธิ์กันและช่วยยืดระยะเวลาในการสร้างสารพิษในผลิตภัณฑ์ที่เก็บภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม ในปี ค.ศ.1979 กฎหมายที่ออกโดย USDA (USDA regulation) ได้อนุญาตให้ใช้โพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.26 ร่วมกับโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 40 ppm ได้ในเบคอน จากการศึกษาของ USDA เมื่อเร็วๆนี้เกี่ยวกับเบคอน ถึงแม้ว่ามีการพิสูจน์ผลของกิจกรรมการต้านการสร้างสารพิษโบทูลินัมโดยการใช้ซอร์เบตร่วมกับไนไตรต์แล้วก็ตาม แต่ก็ยังมีรายงานว่าจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ซึ่งพบว่าการใช้ซอร์เบตร่วมกับไนไตรต์อาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ในบางคนได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ได้คาดหมายและยังไม่ได้ตรวจสอบและเป็นสาเหตุให้มีการล่าช้าเกี่ยวกับการนำซอร์เบตไปใช้ในเบคอน

2.6.3.9 กลไกการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบต

จากการที่ทราบว่าซอร์เบตเป็นวัตถุกันเสียที่สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ได้หรือทำให้การเจริญช้าลงโดยการยับยั้งหรือฆ่าสปอร์หรือเซลล์นั้นเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องเข้าใจกลไกที่ทำให้เกิดผลยับยั้งนี้ ความเข้าใจกลไกเหล่านี้ทำให้สามารถปรับปรุงและอาจขยายการใช้ประโยชน์ของซอร์เบตให้มากขึ้น และอาจมีประโยชน์ในการค้นหาวัตถุกันเสียชนิดใหม่ที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ (Sofos และ Busta. 1981)

บางรายงานได้กล่าวเป็นนัยว่าการยับยั้งระบบเอนไซม์ต่างๆและปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้นเป็นกลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยซอร์เบต รายงานเหล่านี้มีเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีใครเห็นด้วยเลยว่าเอนไซม์ต่างๆคือจุดที่เกิดการยับยั้งโดยซอร์เบต ตอนต้นของปี ค.ศ.1954 มีผู้กล่าวว่ากรดซอร์บิกยับยั้งเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ซึ่งเกี่ยวข้องในปฏิกิริยา β-oxidation ของกรดไขมัน ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว (a, β-unsaturated fatty acids) ที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาการออกซิเดชันของกรดไขมันโดยเชื้อรา การสะสมกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้ (เช่นที่เกิดโดยการเติมกรดซอร์บิก) ช่วยป้องกันการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสและดังนั้นจึงยับยั้งเมแทบอลิซึมและการเจริญของเชื้อรา อย่างไรก็ตามกลไกนี้เป็นสมมติฐานที่ได้จากการทดลองที่เกี่ยวกับการย่อยสลายกรดซอร์บิกโดยเชื้อรา (Sofos และ Busta. 1981)

เอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล (sulfhydryl) ได้ถูกกล่าวถึงอีกครั้งในความสัมพันธ์กับการยับยั้งของกรดซอร์บิก เอนไซม์ฟูมาเรสถูกรายงานว่าเป็นจุดที่มีการยับยั้งของ oxidative metabolism

ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ยีสต์และเชื้อราในสภาวะที่มีกรดซอร์บิก มีรายงานว่าเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริลอื่นๆที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบต ได้แก่ เอนไซม์แอสพาร์เตส (aspartase) ซัคซินิกดีไฮโดรจีเนส (succinic dehydrogenes) และ yeast alcohol dehydrogenase มีผู้กล่าวว่ากรดซอร์บิก uncouples oxidative phosphorylation โดยการยับยั้งเอนไซม์ภายในเซลล์ และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศอาจจะเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นที่สูงขึ้นของซอร์เบตที่พบในปฏิกิริยาอะมิเนชัน (amination) ของ α-ketoglutarate เนื่องจากกลไกหนึ่งของการยับยั้งเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล มีผู้แนะนำว่ากรดซอร์บิกเกิดปฏิกิริยาอย่างช้าๆกับซิสเตอีน (cysteine) โดยผ่านปฏิกิริยาการเติมหมู่ไทออล (thiol) ของซิสเตอีน และนี่คือกลไกการยับยั้งเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่ากิจกรรมของกรดซอร์บิกในการต้าน *Aspergillus niger* ได้เพิ่มขึ้นโดยซิสเตอีน รายงานวิจัยอื่นๆได้เสนอว่าการทำงานของซอร์เบตเหมือนกับการทำงานของกรดมาเลอิก (maleic acid) ซึ่งทำให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีความเสถียรกับเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล โดยผ่านอนุพันธุ์ของกรด thiohexenoic (CH_3-CH=CH-RSCH-CH_2-COOH) รายงานต่อมาได้กล่าวว่าซอร์เบตยับยั้งเอนไซม์โดยการสร้างพันธะโควาเลนท์ (covalent bond) ระหว่างซัลเฟอร์ของหมู่ซัลไฟดริลที่สำคัญ หรือ $ZnOH^-$ ของเอนไซม์ และเคลต้าและ/หรือเบต้าคาร์บอนของซอร์เบตไอออน จากรายงานอื่นไม่เห็นด้วยกับข้อความข้างบนและกล่าวว่าจุดที่มีการยับยั้งการหมักกลูโคสโดยยีสต์ขนมปังคือจุดที่อยู่ระหว่าง 2-phosphoglyceric acid และ phosphoenolpyruvate ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์อิโนเลส (enolase) รายงานอื่นกล่าวว่าเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตคือโปรติเนส (proteinase) ขณะที่มีผู้เสนอว่าซอร์เบตยับยั้งกระบวนการการหายใจโดยการแข่งขันกับอะซิเตตตรงบริเวณที่มีการสร้าง acetyl-CoA ซอร์เบตจะแข่งขันในการจับกับ coenzyme A และอะซิเตต ดังนั้นจึงยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ coenzyme A ด้วย ในปี ค.ศ.1965 ซอร์เบตถูกกล่าวว่าเป็นตัวยับยั้งแบบคัดเลือกในการต้านแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยให้เหตุผลว่าผลการยับยั้งของซอร์เบตในการต้านเชื้อราอาจเนื่องมาจากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส หรือการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์คะตะเลส จากผลการทดลองได้พบว่าซอร์เบตยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. niger* และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ดังนั้นสรุปได้ว่าการยับยั้งเอนไซม์คะตะเลสเป็นหนึ่งในกลไกที่ทำให้กรดซอร์บิกสามารถยับยั้งเชื้อราและยีสต์ (fungistatic) ได้ การยับยั้งเอนไซม์คะตะเลสเป็นผลให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งที่จะมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญและป้องกันการงอกของสปอร์ จากรายงานก่อนหน้านี้ที่ว่าเอนไซม์คะตะเลสไม่เพียงแต่จะทำให้เกิดการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่านั้น แต่ตัวเอนไซม์เองยังถูกทำลายโดยสารประกอบนี้ในกระบวนการ และคาดว่ากรดซอร์บิกไวต่อ autoxidative deterioration ผ่านขั้นตอนของเปอร์ออกไซด์ (sorbyl peroxides) มีรายงานว่ากรดซอร์บิกในสถานะของเปอร์ออกไซด์อาจจะไปยับยั้งเอนไซม์คะตะเลส หรือยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อื่นๆ หรือ co-enzymes ที่สำคัญต่อการพัฒนาเซลล์เชื้อรา และมีผู้กล่าวว่ากรดไขมันไม่

อิ่มตัวเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยกลไกอนุมูลอิสระ (free-radical mechanism) ซึ่งควบคุมการเจริญของสปอร์ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ากรดซอร์บิกต้านทานต่อการเกิดออกซิเดชันในอาหาร ทฤษฎีนี้ยังคงขัดแย้งกับผลการทดลองของการใช้ไนไตรต์ร่วมกับซอร์เบต เพราะทราบกันดีว่าไนไตรต์ทำหน้าที่เป็นสาร antioxidant และกำจัดอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้ระบบเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะควบคุมเป็นข้อจำกัดทำให้ผลการทดลองของการศึกษาข้างบนไม่อาจสรุปได้ ผลการทดลองอาจจะถูกต้องสมบูรณ์ภายใต้สภาวะเฉพาะที่ทดสอบเท่านั้น แต่กลไกต่างๆได้มาจากการเสนอขึ้นและเป็นเพียงสมมติฐานซึ่งไม่อาจนำไปใช้ประโยชน์ได้ภายใต้หลายๆสภาวะที่ทดสอบ (Sofos และ Busta. 1981)

ซอร์เบตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารที่ดีที่สุดเนื่องจากสามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรีย ยีสต์ในอาหารที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตประกอบด้วย *Brettanomyces* sp., *Candida*, *Byssochlamys*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces*, *Torulaspora* และ *Zygosaccharomyces* เชื้อราในอาหารที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตได้แก่ *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Helminthosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Pullularia*, *Sporotrichum* และ *Trichoderma* ซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนยแข็ง ผักและผลไม้ และเนื้อสัตว์ และยังสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษของเชื้อราที่สร้างโดย *Aspergillus flavus* , *A. parasiticus*, *Penicillium expansum* และ *P. patulum* ได้อีกด้วย แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตประกอบด้วย *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium* spp., *E. coli* O157:H7, *Lactobacillus* spp., *L. monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Vibrio* spp. และ *Y. enterocolitica* กรดซอร์บิกจะยับยั้งแบคทีเรียที่มีเอนไซม์คะตะเลส ส่วนแบคทีเรียที่ไม่มีเอนไซม์คะตะเลสส่วนใหญ่จะต้านทานต่อซอร์เบตได้ (Davidson. 2001)

ซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิดไม่ว่าจะอยู่บนผิวหน้าอาหารหรืออยู่ในอาหาร ได้แก่ *Aeromonas* spp. ที่พบบนปลาเค็มตากแห้งซึ่งมีความเข้มข้นของซอร์เบตร้อยละ 1.5 สามารถยับยั้ง *Salmonell* 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 ในเนยแข็ง (Davidson. 2001)

ซอร์เบตมีผลเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในเนื้อปรุงรส และเนื้ออื่นๆ และผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ซอร์เบตยังช่วยป้องกันการงอกของสปอร์ *Clostridium botulinum* และการสร้างสารพิษของมันในเนื้อวัว เนื้อหมู เนื้อเป็ดไก่ เบคอน และไส้กรอก โพแทสเซียมซอร์เบตเป็นตัวยับยั้งการงอกสปอร์ที่ดีทั้งสปอร์ของ *Bacillus* และ *Clostridium* ที่พีเอช 5.7 แต่ที่พีเอช 6.7 จะยับยั้งได้น้อยมาก

Lopez และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Bacillus stearothermophilus* พบว่าสปอร์มีการงอกลดลงประมาณร้อยละ 50 และป้องกันการเจริญของสปอร์เมื่อให้ความร้อนด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

ซอร์เบตถูกนำมาใช้ในอาหารต่างๆโดยการเติมลงไปโดยตรง การจุ่ม การฉีดพ่น หรือใช้ในขั้นตอนการบรรจุ เมื่อใช้โพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 ฉีดพ่นหลังจากการทำหรือเติมลงไปโดยตรงในขนมปัง สามารถยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ได้ ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆมีการใช้ซอร์เบตความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ เครื่องดื่มใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เค้กและน้ำตาลไอซิ่งใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 เนยแข็งและผลิตภัณฑ์เนยแข็งใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.2-0.3 น้ำผลไม้ที่มีแอลกอฮอล์ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 ผลไม้แห้งใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.02-0.05 น้ำผลไม้ ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.025-0.075 มาร์การีน ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ขนมพายใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 น้ำสลัดใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 และไวน์ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.02-0.04 (Davidson. 2001)

2.7 การควบคุมจุลินทรีย์โดยการแช่แข็งและการทำให้ละลาย

การใช้อุณหภูมิต่ำในการถนอมอาหารก็เพื่อป้องกันหรือลดการเจริญของจุลินทรีย์ และอุณหภูมิต่ำยังช่วยยับยั้งกิจกรรมการสลายของเอนไซม์ในจุลินทรีย์โดยเฉพาะเอนไซม์ไลเปส และโปรติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ทนความร้อน นอกจากนี้การงอกของสปอร์ก็ลดลงด้วย การเก็บรักษาในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งการแช่แข็ง (และการละลาย) ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายได้ (Ray. 1996) การถนอมรักษาเนื้อสัตว์โดยการแช่แข็งทำให้เก็บได้นานขึ้น แต่ก็ยังมีความเสี่ยงในการปนเปื้อนและการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งการแช่แข็งสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ประมาณครึ่งหนึ่งและมีจำนวนลดลงอย่างช้าๆในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง (Frazier และ Westhoff. 1988)

2.7.1 การแช่แข็ง

อุณหภูมิแช่แข็งต่ำสุดที่ใช้กันภายในที่อยู่อาศัยคือ -20 องศาเซลเซียส นั่นคืออุณหภูมิในช่องแช่แข็งของตู้เย็น ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่น้ำอิสระส่วนใหญ่ในอาหารอยู่ในรูปของน้ำแข็ง อย่างไรก็ตามน้ำแข็งแห้ง (อุณหภูมิ -78 องศาเซลเซียส) และไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) สามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งได้ โดยการแช่แข็งจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและไม่นิยมนำมาใช้กับอาหาร หลังจากนำอาหารมาแช่แข็งแล้วอาหารจะมีอุณหภูมิประมาณ -20 ถึง -30 องศาเซลเซียส และสามารถเก็บในตู้เย็นได้นานหลายเดือนหรือมากกว่า 1 ปี ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร อาหารที่เก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เช่น ผักและผลไม้สด เนื้อสัตว์ ปลา ผลิตภัณฑ์แปรรูป และผลิตภัณฑ์ที่ปรุงสุกแล้ว จะไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์และเซลล์อาจตายได้

ในระหว่างเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง อย่างไรก็ตามเซลล์ที่รอดชีวิตจากการแช่แข็งสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในอาหารหลังจากทำให้ละลายแล้วได้ (Ray. 1996)

Zhao และคณะ (2003) ได้ศึกษาหาอัตราการยับยั้งการเจริญของ *Campylobacter jejuni* ในเนื้อไก่ โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิต่างกันในสภาวะอุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิแช่แข็ง โดยใช้เชื้อ *C. jejuni* ที่แยกได้จากไก่ใส่ลงบนปีกไก่ประมาณ 10^7 โคโลนีต่อกรัม ผลการทดลองพบว่าจำนวนของ *C. jejuni* บนปีกไก่ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 และ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ลดลง 1.3 และ 1.8 $\log_{10}$ CFUต่อกรัม ตามลำดับ และพบว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ -86 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 สัปดาห์ *C. jejuni* ลดลงประมาณ 4 และ 0.5 $\log_{10}$ CFUต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิและเวลามีผลอย่างมากต่อการยับยั้ง *C. jejuni* ในเนื้อไก่

2.7.1.1 กลไกการทำลายจุลินทรีย์

การทำลายจุลินทรีย์โดยการแช่แข็งมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของความดันออสโมติกระหว่างอาหารที่เป็นน้ำแข็งกับไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่เย็นจัด ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของน้ำออกจากเซลล์ อัตราการสูญเสียน้ำของแต่ละเซลล์จะขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์ เซลล์ที่มีขนาดเล็กซึ่งมีพื้นที่ผิวมากจะสูญเสียน้ำได้เร็วกว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ถ้าการสูญเสียน้ำเกิดขึ้นช้าเพียงพอที่เซลล์จุลินทรีย์จะรักษาสมดุลออสโมติกระหว่างไซโตพลาสซึมและสิ่งแวดล้อมไว้ได้ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างเหมาะสมกับอุณหภูมิที่ลดลงเพิ่มขึ้น และน้ำภายในเซลล์จะไม่เป็นน้ำแข็ง ดังนั้นอัตราการทำให้เย็นลง 1 องศาเซลเซียสต่อนาทีหรือน้อยกว่าจะทำให้น้ำภายในเซลล์เป็นน้ำแข็งได้ช้ามาก แต่จะสร้างผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์จุลินทรีย์ ส่วนอัตราการทำให้เย็นลง 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีทำให้น้ำในเซลล์แบคทีเรียกลายเป็นน้ำแข็งอย่างสมบูรณ์ โดยทั่วไปแล้วการรอดชีวิตของจุลินทรีย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยการเพิ่มอัตราการลดอุณหภูมิลง การลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วจะทำให้มีผลึกน้ำแข็งเล็กๆ 2-3 ผลึกเท่านั้นภายในเซลล์ และทำให้เซลล์รอดชีวิตได้เพิ่มขึ้น การรอดชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วอาจจะลดลงโดยการทำให้ละลายอย่างช้า เพราะว่าผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นในระหว่างที่มีกระบวนการทำให้ละลาย (Juneja และ Sofos. 2002)

มีหลายทฤษฎีที่อธิบายเกี่ยวกับกลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียโดยการแช่แข็ง ได้แก่ ในช่วงแรกๆได้กล่าวว่าการทำลายเซลล์เกิดจากการทำลายกลไกการทำงานและโครงสร้างของเซลล์โดยผลึกน้ำแข็งที่แตกละเอียด ต่อมาก็ได้มีการกล่าวว่าการทำลายเซลล์เกิดจากการดึงน้ำออกจากเซลล์ในระหว่างการแช่แข็ง แต่ส่วนใหญ่อ้างว่าการตายของจุลินทรีย์เกิดจากการสร้างน้ำแข็งภายในเซลล์ โดยเมื่อระบบเข้าสู่การแช่แข็ง อุณหภูมิที่ลดลงในช่วงแรกจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจัดแต่น้ำภายในเซลล์ยังคงเป็นของเหลวอยู่ จนกระทั่งอุณหภูมิต่ำลงตั้งแต่ -10 องศาเซลเซียส ถึง -15

องศาเซลเซียสจะมีการสร้างผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ และเซลล์ตอบสนองต่อสมดุลออสโมติกทำให้น้ำภายในเซลล์เป็นน้ำแข็ง

การศึกษาการทำลายเซลล์โดยการแช่แข็งต่อเซลล์ที่มีเยื่อหุ้ม เช่น *E. coli* ซึ่งการสลายเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้ได้รับผลของการสร้างผลึกน้ำแข็งนั้นทำได้ยาก เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มสามชั้นและประกอบด้วยสารโมเลกุลใหญ่ ได้แก่ ฟอสโฟลิปิดและโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน เปปติโดไกลแคนในชั้นที่อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในและชั้นนอกและลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ฟอสโฟลิปิดและโปรตีนในเยื่อหุ้มชั้นนอก (Robinson. 1985)

2.7.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในขณะแช่แข็ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในขณะแช่แข็ง ได้แก่

1. ธรรมชาติของเชื้อประจำถิ่น

จุลินทรีย์พวก psychrophile และ psychrotrophic จำนวนมากสามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสได้ และพบว่าโดยทั่วไปสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส หรือ -7 องศาเซลเซียส และมีจำนวนน้อยมากที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส ความไวต่อการลดอุณหภูมิลงอย่างฉับพลัน (cold shock) ที่แตกต่างกันก็เป็นปัจจัยที่สำคัญ เนื่องจากมีการกล่าวว่าพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงและอุณหภูมิปานกลางมีความไวต่อการลดอุณหภูมิลงอย่างฉับพลันมากกว่าพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ ขณะที่มีการแช่แข็งและอุณหภูมิลดลงอย่างต่อเนื่องทำให้ค่า a_w ลดลงไปด้วย ดังนั้นจึงพบเฉพาะจุลินทรีย์ประจำถิ่นเท่านั้นที่เจริญได้โดยยีสต์และเชื้อราสามารถต้านทานต่อสภาวะที่มีค่า a_w ต่ำลงได้มากกว่าแบคทีเรีย (Robinson. 1985)

โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบมักไวต่อการบาดเจ็บจากการแช่แข็งมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อย่างไรก็ตามความไม่ไวต่อการแช่แข็งไม่ได้รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกทุกตัว เพราะว่าแบคทีเรียแลคติกบางตัวที่ใช้ในการหมักอาหาร และเซลล์ของคลอสติเดียมไวต่อการแช่แข็งอย่างมาก แต่สปอร์ของมันต้านทานต่อการแช่แข็งได้ดีพอๆกับแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ตัวอื่นๆ (Juneja และ Sofos. 2002)

2. สารอาหาร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในระหว่างการแช่แข็งมีผลอย่างมากต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปอาหารที่มีความซับซ้อนมากจะทำให้จุลินทรีย์ได้รับผลกระทบจากการแช่แข็งน้อย เช่น ในสารละลายเกลือ น้ำ นม หรือในของเหลว มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตมากกว่าในฟอสเฟตบัฟเฟอร์และรอดชีวิตในอาหารต่างๆได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องทดลอง อย่างไรก็ตามตัวถูกละลายในอาหารบางชนิด เช่น กรดแลคติกในเนื้อดิบ อาจจะทำให้เซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งรุนแรงมากขึ้น ถ้ามีความเข้มข้นของกรดมากในระหว่างการแช่แข็งอย่างช้า (Juneja และ Sofos. 2002) การมีไนโตรเจนและคาร์บอนในปริมาณที่ต่างกันทำให้ต้านทานต่อการแช่แข็งได้ต่างกัน โดยเมื่อทดลองกับ *E. coli* พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด มีการสะสมปริมาณคาร์โบไฮเดรต

สูงขึ้นและต้านทานต่อการแช่แข็งมากขึ้น ทำให้ทราบว่าโพลีกลูโคส (polyglucose) และสารที่คล้ายไกลโคเจน สามารถใช้เป็นสารป้องกันเซลล์จากความเย็นได้โดยช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแรงมากขึ้น (Robinson. 1985)

3. อายุและอัตราการเจริญ

เซลล์ในระยะ exponential phase มีความไวต่อความเครียดจากการแช่แข็งและการทำให้ละลายมากกว่าเซลล์ในระยะ stationary phase มาก อย่างไรก็ตาม มีผู้วิจัยพบว่าความไวต่อการแช่แข็งของ *Pseudomonas* ที่มีระยะการเจริญต่างกัน ขึ้นอยู่กับอัตราการแช่แข็ง โดยที่อัตราการลดอุณหภูมิลง 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีหรือต่ำกว่า เซลล์ในระยะ exponential phase จะไวมากกว่า แต่เมื่ออัตราการลดอุณหภูมิลงสูงกว่า 100 องศาเซลเซียสต่อนาทีหรือมากกว่า เซลล์ในระยะ stationary phase จะไวมากกว่า

4. อัตราการทำให้เย็นลง

เซลล์มีการรอดชีวิตเมื่ออัตราการทำให้เย็นลงเป็นไปอย่างช้าในช่วง 10 องศาเซลเซียสต่อนาที แต่ถ้าอัตราการทำให้เย็นลงสูงขึ้นหรือต่ำลงกว่านี้ทำให้การรอดชีวิตลดลงด้วย ที่อัตราการทำให้เย็นลงสูงมากๆจนเข้าใกล้ 10,000 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำให้รอดชีวิตได้เพิ่มขึ้น แต่อัตราการทำให้เย็นลงเช่นนี้ไม่ค่อยพบว่านำมาใช้ในทางการค้า ส่วนวิธีการแช่แข็งที่นำมาใช้กันมากคือการใช้อุณหภูมิแช่แข็งในตู้เย็นถึงการใช้ไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอัตราการทำให้เย็นลงตั้งแต่ 0.2 องศาเซลเซียสต่อนาทีถึง 200 องศาเซลเซียสต่อนาที

อัตราการทำให้เย็นลงอย่างช้ามากๆ ซึ่งต่ำกว่าอัตราที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการอยู่รอดทำให้เกิดการสร้างน้ำแข็งภายนอกเซลล์ขึ้น และมีผลให้เซลล์ถูกทำลาย เนื่องจากความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงขึ้น ถ้าอัตราการทำให้เย็นลงสูงขึ้น เวลาที่เซลล์ต้องเผชิญกับความเครียดจากตัวถูกละลายเหล่านั้นจะลดลง ซึ่งมีผลให้เซลล์รอดชีวิตเพิ่มขึ้น ที่อัตราการทำให้เย็นลงสูงขึ้น (มากกว่า 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) น้ำแข็งภายในเซลล์เริ่มที่จะก่อตัวและทำให้การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ต่ำลง (Robinson. 1985)

5. การเก็บรักษา

จุลินทรีย์จะสูญเสียความมีชีวิตเมื่ออยู่ในอุณหภูมิแช่แข็งหรือต่ำกว่า แต่เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็งต่ำลง อัตราการตายจะลดลงด้วย และที่อุณหภูมิต่ำกว่า -60 องศาเซลเซียส โดยปกติอัตราการตายต่ำมากหรือไม่มีเลย (Robinson. 1985) การเก็บรักษาอาหารแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -10 องศาเซลเซียส มีผลให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษา อุณหภูมิของการเก็บรักษายิ่งต่ำลงเท่าใด อัตราการตายของจุลินทรีย์ก็จะยิ่งช้าลงเท่านั้น อาหารที่ผ่านการแช่แข็งไม่จัดว่าปลอดภัย เพราะอาจมีจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายและสารพิษหลงเหลืออยู่ เช่น เนื้อไก่แช่แข็งหลังจากแช่แข็งแล้วยังมีความเสี่ยงจากเชื้อ *Salmonella* อยู่เช่นเดิม (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545)

2.7.2 การทำให้ละลาย

ในระหว่างการละลายอาหารแช่แข็ง เช่น ไก่ดิบ การทำให้ละลายอย่างรวดเร็วจะเป็นการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเจริญของเชื้อก่อโรค ถ้าอาหารถูกละลายอย่างช้าๆ อุณหภูมิบนผิวหน้าอาหารจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ แม้ว่าบริเวณภายในจะยังคงเป็นน้ำแข็งอยู่ การทำให้ละลายอย่างรวดเร็วหรืออย่างช้าสามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียหรือจุลินทรีย์ก่อโรคที่รอดชีวิตได้ โดยการทำให้ละลายอย่างเร็วเป็นอันตรายต่อแบคทีเรียที่ผ่านการแช่แข็งน้อยกว่าการทำให้ละลายอย่างช้าๆ ส่วนสปอร์สามารถงอกและเจริญได้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ และเวลาหลังจากการทำให้ละลาย (Ray. 1996) โดยทั่วไปอัตราการทำให้ละลายมีผลเล็กน้อยต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ (Juneja และ Sofos. 2002) และเมื่อเซลล์จุลินทรีย์ตายจะปล่อยเอนไซม์ออกมา ซึ่งจะลดคุณภาพของอาหารลง (Ray. 1996) การทำการแช่แข็งสลับกับการทำให้ละลายวนไปมาหลายๆครั้ง สามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ลงได้มากกว่าการเก็บรักษาที่สภาวะคงที่ เช่น ที่มีรายงานว่าลดจำนวน *Listeria monocytogenes* ลงได้ อย่างไรก็ตาม สำหรับ *Staphylococcus aureus* ในอาหารที่เป็นกรด พบว่าอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปมาไม่ได้มีผลมากกว่าการเก็บที่อุณหภูมิใดอุณหภูมิหนึ่ง (Juneja และ Sofos. 2002)

บทที่ 3
การวิจัยและการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างเนื้อสุกรและแหนม

เนื้อสุกรและแหนมซื้อจากตลาดหัวตะเข้ ตลาดหน้านิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง ตลาดพระโขนง ตลาดลานบุญ ตลาดมีนบุรี ร้านขายของชำ และซุปเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร ชนิดละ 30 ตัวอย่าง ระหว่างเดือน ส.ค. - ต.ค. พ.ศ. 2548

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* SAP 17971/05 และ *Salmonella* Rissen SAP 08946/02 ที่แยกได้จากแหนม *Salmonella* Typhimurium SAP 08957/02 แยกได้จากเนื้อสุกรสด *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Yersinia enterocolitica* DMST 9380, *Escherichia coli* DMST 4212, *Vibrio parahaemolyticus* DMST 21243 และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเจือจาง และสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Tryptic Soy Broth/ Tryptic Soy Agar (TSB/ TSA, พีเอช 7.3 ± 0.2, Difco), Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD, พีเอช 7.4 ± 0.2, Difco), Cooked meat medium (CM, Mast Diagnostic), Brain Heart Infusion (BHI, พีเอช 7.4 ± 0.2, Difco), Lauryl Tryptose Broth (LST, พีเอช 6.8 ± 0.2, Difco), Braid-Parker Agar base (BP, Scharlau), EC Medium (EC, พีเอช 6.9 ± 0.2, Difco), Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (RV, พีเอช 5.1 ± 0.2, Difco), Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV, Difco), Tetrathionate broth base (TT, พีเอช 6.4 ± 0.2, Scharlau), Triple Sugar Iron Agar (TSI, พีเอช 7.4 ± 0.2, Difco), MIL medium (LIM, Difco), fluid thioglycolate medium (Merck), Eosin-methylene blue agar (EMB agar, Scharlau), Plate Count Agar (PCA), acidified Potato Dextrose Agar (acidified PDA, พีเอช 4.5), MR-VP broth, Koser's citrate broth, Tryptone broth, Modified BHI-EY medium agar (modified BHI, พีเอช 7.6), Lactose Broth (LB, พีเอช 6.9 ± 0.2), Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB) Mueller Hinton broth (MHB, พีเอช 7.3 ± 0.1, Difco) และ Iron milk medium (modified)

สารละลายที่ใช้ทำเจือจางและสารเคมี ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต สารละลายโซเดียมอะซิเตต สารละลายโซเดียมแลคเตต เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 คริสตัลไวโอเลต แกรมไอโอดีน ซาฟรานินโอ กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ ได้แก่ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 สารละลายแอลฟาแนฟทอล ครีเอทีน (creatine) น้ำเลือดกระต่าย (rabbit plasma), Kovacs' reagent, Voges-Proskauer (VP) reagents และเมทิลเรด (Methyl red)

3.1.4 เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) บริษัท Tomy รุ่น SS-325 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Harmle รุ่น Z383K ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) บริษัท Astec Microflow รุ่น ABS 1200 เครื่องตีป่น (Stomacher) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Cyberscan รุ่น 2000 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท Memmert เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (iEMS Reader MF, Labsystems) เครื่องวัดค่า water activity (a_w) Novasina thermoconstanter รุ่น TH 200 และอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเนื้อสุกรและแหนม ชนิดละ 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 200 กรัม จากตลาด ร้านขายของชำ และซุปเปอร์มาเก็ต ในกรุงเทพมหานคร แล้วนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ภายใน 6 ชั่วโมง

3.2.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร

ทำการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ ที่กำหนดโดยมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช.6000-2547 เกี่ยวกับมาตรฐานเนื้อสุกร โดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้วิธีการตาม BAM (Bacteriological Analytical Manual) Online. 2002

3.2.1.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในแหนม

วิเคราะห์จุลินทรีย์ที่กำหนดตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช. 145/2546 เกี่ยวกับมาตรฐานของแหนม โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*

perfringens และ *Escherichia coli* โดยใช้วิธีการตาม BAM (Bacteriological Analytical Manual) Online. 2002

3.2.1.4 การวัดค่าพีเอชและค่า water activity (a_w) ของเนื้อสุกรและแหนม

วัดค่าพีเอชของเนื้อสุกรและแหนมด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ส่วนการวัดค่า water activity (a_w) ของเนื้อสุกรและแหนม ทำได้โดยตัดเนื้อสุกรและแหนมให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในตลับสำหรับวัดค่า a_w แล้วนำไปวัดค่า a_w ด้วยเครื่องวัด a_w

3.2.2 การศึกษาผลของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี microtitre plate broth dilution

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *Staphylococccus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Rissen, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Escherichia coli* ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงในหลอดอาหาร TSA หลอดใหม่แต่ละหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. fluorescens* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้ออีก 2 ครั้ง นำไปบ่มในสภาวะเดิม แล้วเขี่ยเชื้อมาลากบนจานอาหาร TSA ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่สภาวะเดิม จากนั้นเขี่ยเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหารจำนวน 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ยกเว้น *P. fluorescens* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และทำให้เซลล์อยู่ในรูปสารแขวนลอยโดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดไปปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 2 จะได้เชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2.2 การหาค่า MIC ของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตในสภาวะที่มีค่าพีเอชต่างๆ

การหาค่า MIC ของสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ในอาหาร MHB ที่มีค่าพีเอชต่างกัน 6 ระดับ คือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมด 8 ชนิด โดยใช้เทคนิคการเจือจางด้วยวิธี

ของ Nanasombat และ Lohasupthawee (2005) โดยปิเปตอาหาร MHB ที่แต่ละค่าพีเอชปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมของ microtiter plate (96 หลุม) จากนั้นปิเปตสารละลายเกลือโซเดียมแลคเตต ความเข้มข้น 459 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 ของแต่ละแถว (แถว A-F) ที่ใส่อาหาร MHB ไว้แล้ว ทำการเจือจาง 2 เท่า (two-fold serial dilution) โดยผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตสารละลายในหลุมขึ้นมา 100 ไมโครลิตร นำไปใส่ลงในหลุมที่อยู่ถัดมาตามแนวนอน (หลุมที่ 2) แล้วผสมให้เข้ากันก่อนจะปิเปตไปใส่ในหลุมต่อไป ทำเช่นเดียวกันนี้ไปจนถึงหลุมสุดท้าย (หลุมที่ 12) แล้วจึงปิเปตสารละลายในหลุมสุดท้ายทิ้งไป 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแลคเตตในแต่ละหลุมเจือจางลดลง 2 เท่า ไปเรื่อยๆจนถึงหลุมสุดท้าย จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยของแบคทีเรียแต่ละชนิด ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในทุกหลุมจะได้ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแลคเตตเป็น 191.25, 95.62, 47.83, 23.92, 11.96, 5.98, 3.00, 1.50, 0.75, 0.38, 0.19 และ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวัดความขุ่นก่อนบ่มด้วยเครื่อง microplate reader (iEMS Reader MF, Labsystems) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาวัดการเจริญของเชื้อโดยวัดจากค่าความขุ่นในแต่ละหลุม ซึ่งความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้ค่าความขุ่นไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อและนั่นคือค่า MIC ของสารนั้น ส่วนการทดลองหาค่า MIC ของสารละลายโซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ก็ทำด้วยวิธีการเดียวกันนี้แต่ใช้สารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้นเริ่มต้น 504 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะได้ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอะซิเตตเป็น 210, 105, 52.5, 26.25, 13.12, 5.57, 3.28, 1.64, 0.82, 0.41, 0.20, และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นเริ่มต้น 615.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะได้ระดับความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตเป็น 256.34, 128.17, 64.08, 32.04, 16.02, 8.01, 4.00, 2.00, 1.00, 0.50, 0.25 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.3 การศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย ต่อการรอดชีวิตของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร

3.2.3.1 การเตรียมเนื้อสุกร

นำเนื้อสุกร 1 กิโลกรัม มาล้างให้สะอาด ใช้มีดปลอดเชื้อหั่นเนื้อสุกรให้เป็นชิ้นเล็กลง แล้วนำไปลวกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที (Nissen และคณะ. 2001) นำมาผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 นาที

3.2.3.2 การเตรียมเชื้อ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus*

ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1

3.2.3.3 การยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้สารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย

นำเนื้อสุกรที่เตรียมไว้ส่วนหนึ่งนำมาเติมสารแขวนลอยของเชื้อ *S.* Rissen และอีกส่วนหนึ่งนำมาเติมสารแขวนลอยของเชื้อ *S. aureus* เพื่อให้เชื้อมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^7 เซลล์ต่อกรัม ตามวิธีการของ Jung และ Beuchat (1999) จากนั้นทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของเชื้อทั้งสองชนิดในเนื้อสุกรที่ผ่านการเติมเกลือของกรดอินทรีย์ต่างชนิดกันจำนวน 3 ชนิด รวมทั้งในเนื้อสุกรที่ไม่มีการเติมเกลือชนิดใดๆ (ชุดควบคุม) และผ่านการแช่แข็งและการทำให้ละลาย โดยในขั้นตอนการทดลองได้แบ่งเนื้อสุกรที่เติมเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดออกเป็น 4 ส่วนย่อย นำแต่ละส่วนมาเติมสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของเกลือชนิดนั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดที่เติมลงไป เมื่อพีเอชเท่ากับ 5.5 ที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 ดังนี้ ส่วนที่ 1) เติมสารละลายโซเดียมแลคเตต ส่วนที่ 2) เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต ส่วนที่ 3) เติมสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต และส่วนที่ 4) ชุดควบคุม ไม่มีการเติมสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เติม (*S.* Rissen หรือ *S. aureus*) ในเนื้อสุกรทั้ง 4 ส่วน ก่อนนำไปแช่แข็ง จากนั้นนำเนื้อสุกรไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -23 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำออกมาทำให้ละลายอย่างช้าที่อุณหภูมิ 5 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์แข็งแรงและเซลล์บาดเจ็บ) ของ *S.* Rissen และ *S. aureus* ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และจำนวนเซลล์แข็งแรงของ *S.* Rissen บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และเซลล์แข็งแรงของ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA หลังผ่านการแช่แข็งนาน 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด โดยปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 100 แทนจำนวนเซลล์ทั้งหมดในเนื้อสุกรก่อนการเติมเกลือของกรดอินทรีย์ การแช่แข็ง และทำให้ละลาย รวมทั้งคำนวณหาปริมาณเซลล์บาดเจ็บและเซลล์ตายของ *S.* Rissen และ *S. aureus* การคำนวณทำได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA หลังแช่แข็ง}}{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA ก่อนแช่แข็ง}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณเซลล์บาดเจ็บ (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA - จำนวนโคโลนีบน XLD หรือ BPA}}{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณเซลล์ที่ตาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA (ก่อนแช่แข็ง) - จำนวนโคโลนีบน TSA (หลังแช่แข็ง)}}{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA ก่อนแช่แข็ง}} \times 100$$

3.2.3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD และนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS และปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนีต่อกรัม) นำมาแปลงเป็นค่าร้อยละ ก่อนนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan Multiple Range Test

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

จากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนม ชนิดละ 30 ตัวอย่าง ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1 พบว่าในเนื้อสุกรมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.6×10^{6}-2.3×10^{9} โคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียโคลิฟอร์ม 240 ถึงมากกว่า 1100 MPN ต่อกรัม ส่วนใหญ่มีจำนวนโคลิฟอร์มมากกว่า 1100 MPN ต่อกรัม (ร้อยละ 96.67) พบ *Salmonella* ในเนื้อสุกร 26 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 86.67 และพบ *S. aureus* อยู่ในช่วง 3.0×10^{2}-5.2×10^{6} โคโลนีต่อกรัม

ตารางที่ 4.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

จุลินทรีย์ที่วิเคราะห์	ชนิดของตัวอย่างที่วิเคราะห์	
	เนื้อสุกร	แหนม
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัม)	4.6×10^{6}-2.3×10^{9}	1.0×10^{8}-2.8×10^{8}
เชื้อราและยีสต์ (โคโลนีต่อกรัม)	-[a]	1.0×10^{2}-6.9×10^{5}
แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (MPN ต่อกรัม)	240-มากกว่า 1100	-
Salmonella spp.	พบ ร้อยละ 86.67	พบ ร้อยละ 36.67
S. aureus (โคโลนีต่อกรัม)	3.0×10^{2}-5.2×10^{6} (ร้อยละ 43.33)	4.0×10^{2}-5.9×10^{3} (ร้อยละ 26.67)
E. coli (MPN ต่อกรัม)	-	น้อยกว่า 3.0 – มากกว่า 1100
C. perfringens (โคโลนีต่อกรัม)	-	1.0×10^{2} (ร้อยละ 6.67)
จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ (ตัวอย่าง)	30	30

[a] ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

จากมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช.6000-2547 เกี่ยวกับมาตรฐานของเนื้อสุกร โดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้กำหนดว่าเนื้อสุกรจะต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 5.0×10^{5} โคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียโคลิฟอร์มต้องมีจำนวนไม่เกิน 5.0×10^{3} MPN ต่อกรัม *S. aureus* ต้องมีจำนวนไม่เกิน 1.0×10^{2} MPN ต่อกรัม และต้องไม่พบ *Salmonella* spp.ในตัวอย่าง 25 กรัม ซึ่งจากตารางที่ 4.1 พบว่าทุกตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินกว่าที่มาตรฐานกำหนด คิดเป็นร้อยละ 100 และมีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 3.33 ที่มีจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มผ่านข้อกำหนดตามมาตรฐาน (240 MPN ต่อกรัม) ส่วนตัวอย่างที่พบ *S. aureus* มีทั้งหมด 13 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 43.33 ก็มีค่าเกินกว่าที่มาตรฐานกำหนด และยังพบ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างมากถึงร้อยละ 86.67 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสดทั่วไป ส่วนใหญ่มีคุณภาพทางจุลินทรีย์ต่ำไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนักวิจัยหลายท่าน เช่น ในปี พ.ศ. 2543 นงคราญ ได้ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกร จำนวน 36 ตัวอย่าง และตับสุกร จำนวน 41 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าเนื้อสุกรมีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*, *S. aureus*, *C. perfringens* และ *Salmonella* spp. ร้อยละ 75.0, 44.4, 68.8 และ 2.8 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจสอบ ตามลำดับ ส่วนในตับสุกรมีการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าวในอัตราร้อยละ 65.9, 58.5, 2.4 และ 9.8 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจสอบ ตามลำดับ และในปี พ.ศ. 2537 กระทรวงสาธารณสุข ได้ทำการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* spp. ในเนื้อสุกร เนื้อไก่ และเนื้อโค ในตลาดสด 50 แห่งในจังหวัดชลบุรี ปรากฏว่าพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างเนื้อดังกล่าว ร้อยละ 90, 72 และ 86 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจสอบ ตามลำดับ นอกจากนี้ในปี พ.ศ. 2544 วันทนา และคณะ ได้สำรวจการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อสุกรจำนวน 110 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* ร้อยละ 100, 37.3, 56.4 และ 51.8 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจสอบ ตามลำดับ

การที่พบเชื้อเหล่านี้ในเนื้อสุกรอาจเป็นไปได้ที่เชื้อจากลำไส้ของสุกรจะปนเปื้อนมายังเนื้อสุกรในขั้นตอนการฆ่า ซึ่งบ่งบอกถึงสุขลักษณะที่ไม่ดีในฟาร์มและในโรงฆ่าสัตว์ โดยเฉพาะพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคเช่นเดียวกับการรายงานของ Kuri และคณะ (1996) ซึ่งได้ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรที่จำหน่ายในร้านค้าปลีกในเมืองเม็กซิโก โดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนของ *Enterobacteriaceae* และวิเคราะห์หา *Salmonella* spp. พบว่าเนื้อสุกรที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาเก็ตและในร้านขายเนื้อมีคุณภาพทางจุลินทรีย์ต่ำเช่นเดียวกับเนื้อสุกรที่จำหน่ายในตลาดสด และพบว่ามีการปนเปื้อน *Salmonella* spp. สูงถึงร้อยละ 76 ของตัวอย่างทั้งหมดที่ทดสอบ และ *Salmonella* ที่ตรวจพบมีมากกว่า 1 ซีโรไทป์ และพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดและ *Enterobacteriaceae* มีปริมาณมากทั้งในเนื้อสุกรที่แช่เย็นและไม่แช่เย็น นอกจากนี้ สุรีย์ และคณะ (2545) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในเนื้อสุกร ระหว่างเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม

พ.ศ. 2545 ปรากฏว่าได้ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในเนื้อสุกร จำนวน 16 ตัวอย่าง และเชื้อ *Salmonella* ที่แยกได้มีจำนวน 13 ซีโรไทป์ ได้แก่ *S.* Amsterdam, *S.* Agona, *S.* Anatum, *S.* Albany, *S.* Hadar, *S.* London, *S.* Orion, *S.* Panama, *S.* Schwarzengrund, *S.* Senftenberg, *S.* Stanley, *S.* Typhimurium และ *S.* Weltevreden

นอกจาก *Salmonella* แล้วยังมีแบคทีเรียชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกร เช่น *S. aureus* โดย Atanassova และคณะ (2001) ได้ตรวจหา *S. aureus* ในเนื้อสุกร เนื้อสุกรตากแห้ง และแฮม ทั้งหมด จำนวน 135 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีการเพาะเชื้อและวิธี PCR ในการตรวจหา *S. aureus* ด้วยวิธีการเพาะเชื้อ พบว่าในจำนวนตัวอย่างร้อยละ 25.9 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดมีการปนเปื้อน *S. aureus* ขณะที่การตรวจโดยวิธี PCR พบเชื้อ *S. aureus* ในตัวอย่างร้อยละ 51.1 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด นอกจากนี้ Inoue และคณะ (2000) ได้สำรวจการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes* ในเนื้อสัตว์ที่จำหน่ายในประเทศญี่ปุ่น พบว่าสามารถแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากเนื้อวัวบด เนื้อสุกรบด เนื้อไก่บด และเนื้อสุกรบดผสมเนื้อวัวบด คิดเป็นร้อยละ 12.2, 20.6, 37.0 และ 25.0 ของจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์ทั้งหมด ได้แก่ เนื้อวัวบด 41 ตัวอย่าง เนื้อสุกรบด 34 ตัวอย่าง เนื้อไก่บด 46 ตัวอย่าง และเนื้อสุกรบดผสมเนื้อวัวบด 16 ตัวอย่าง ตามลำดับ

การที่พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อสุกรนี้ ชี้ให้เห็นถึงความเสี่ยงต่อการบริโภคเนื้อสุกร ดังรายงานวิจัยของ Berends และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลกระทบของการปนเปื้อน *Salmonella* ในเนื้อสุกร ต่อสุขภาพของประชากรในประเทศเนเธอร์แลนด์ พบว่าในแต่ละปีมีผู้ที่เสี่ยงต่อการเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ *Salmonella* (Salmonellosis) ประมาณ 450 คน ต่อประชากร 100,000 คน และพบว่าร้อยละ 15 ของการเป็นโรค salmonellosis เกี่ยวข้องกับการบริโภคเนื้อสุกร จุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Salmonella* สามารถเข้าสู่และแพร่กระจายในเนื้อสุกรได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการตั้งแต่ขั้นตอนแรก โดยปนเปื้อนจากอาหารสัตว์ ในระหว่างการขนส่ง และขณะอยู่ที่โรงฆ่าสัตว์ โดยอาจเกิดการปนเปื้อนข้ามจากสิ่งแวดล้อมหรือสัตว์ที่ติดเชื้อ (van der Gaag และคณะ. 2004) ดังนั้น ถ้าหากนำเนื้อสุกรที่ปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ก่อโรคนี้ไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ก็อาจทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อหมักนั้น ถ้าหากจุลินทรีย์ก่อโรคอยู่รอดได้ในระหว่างการหมัก

ในการทดลองครั้งนี้ได้ตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของแหนม จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.0×10^{8}-2.8×10^{8} โคโลนีต่อกรัม เชื้อราและยีสต์อยู่ในช่วง 1.0×10^{2}-6.9×10^{5} โคโลนีต่อกรัม ตรวจพบ *Salmonella* ใน 11 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 36.67 พบ *S. aureus* อยู่ในช่วง 4.0×10^{2}-5.9×10^{3} ใน 8 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 26.67 *E. coli* พบจำนวนตั้งแต่น้อยกว่า 3.0 ถึงมากกว่า 1100 MPN ต่อกรัม และพบเชื้อ *C. perfringens* 1.0×10^{2} โคโลนีต่อกรัม ในแหนม 2 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 6.67 จากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช. 145/2546 เกี่ยวกับมาตรฐานของแหนม โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้

กำหนดว่าต้องไม่พบ *Salmonella* ในตัวอย่างแหนม 25 กรัม ไม่พบ *C. perfringens* และ *S. aureus* ในแหนม 0.1 กรัม *E. coli* ต้องมีน้อยกว่า 3.0 MPN ต่อกรัม และมีเชื้อราและยีสต์น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งจากตารางที่ 4.1 พบว่าทุกตัวอย่างมีเชื้อราและยีสต์เกินมาตรฐาน คิดเป็นร้อยละ 100 และตัวอย่างที่มี *S. aureus* เกินมาตรฐาน คิดเป็นร้อยละ 26.67 ส่วนตัวอย่างที่พบ *E. coli* มีค่า MPN ต่อกรัมมากกว่าที่มาตรฐานกำหนดคือมีทั้งหมด 16 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 53.33 และพบว่าร้อยละ 6.67 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด มีจำนวน *C. perfringens* เกินมาตรฐาน และพบ *Salmonella* ในตัวอย่างแหนมที่ตรวจสอบ คิดเป็นร้อยละ 36.67 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการวิเคราะห์ของบุญมา และคณะ ในปี พ.ศ. 2540 ซึ่งได้ตรวจหา *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกร เช่น ไส้กรอก แหนม และกุนเชียง พบว่ามี *Salmonella* ปนเปื้อนร้อยละ 24 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจสอบ นอกจากนี้ สุรีย์ และคณะ (2545) ได้รายงานว่าพบเชื้อ *Salmonella* ในแหนม 9 ตัวอย่าง ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (standard conventional method) และพบ *Salmonella* ในแหนม 11 และ 14 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบขององค์การเภสัชกรรม (GPO ELISA Kit) และชุดทดสอบของ TECRA ตามลำดับ โดยตรวจพบ *Salmonella* ทั้งหมด 5 ซีโรไทป์ ได้แก่ *S.* Agona, *S.* Anatum, *S.* Panama, *S.* Rissen และ *S.* Senftenberg เมื่อเปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในเนื้อสุกรกับจำนวนจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในแหนม จะเห็นได้ว่าในแหนมมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ต่ำกว่า การที่ตรวจพบเชื้อปนเปื้อนในแหนมน้อยกว่าในเนื้อสุกรนั้น เนื่องจากในการทำแหนมมีการเติมส่วนผสมต่างๆลงไปด้วย เช่น เกลือ กระเทียม โพแทสเซียมไนไตรต์ (potassium nitrite) และอื่นๆ ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ หรืออาจมีการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดลงไปเพื่อชักนำให้เกิดการหมักได้เร็วขึ้น เช่น *Lactobacillus curvatus* (Visedsanguan และคณะ. 2006) เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกนี้จะสร้างกรดอินทรีย์ ทำให้แหนมมีสภาวะเป็นกรดมาก นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินและสารชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ (Daeschel. 1989) ทำให้เชื้อที่ไม่ต้องการมีจำนวนลดลง แต่ที่ยังตรวจพบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในแหนมได้นั้น อาจเนื่องมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อสุกรที่ใช้เป็นวัตถุดิบมีการต้านทาน หรือปรับตัวต่อส่วนผสมและสารที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง ทำให้สามารถอยู่รอดได้ในแหนม ดังที่ได้มีการรายงานเกี่ยวกับการอยู่รอดได้ดีขึ้นของ *Salmonella* ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดระหว่างการหมัก โดย สุรีย์ และกัญญารัตน์ (2547) พบว่า *S.* Rissen ที่ผ่านการปรับตัวต่อกรดที่พีเอช 5.5 อยู่รอดได้ดีขึ้นในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมักใน nham model broth (NMB) ที่มีการเติมแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 ดังนั้นการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในแหนมมีผลต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังเช่นรายงานของ Moore (2004) ได้รายงานการระบาดของโรคในระบบลำไส้ ซึ่งมีสาเหตุจากการบริโภคเนื้อหมัก ทำให้ต้อง

มีการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อสุกรที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ โดยการใช้เกลือของกรดอินทรีย์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

นอกจากนี้ Mrema และคณะ (2006) ยังได้รายงานว่าพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* ในไส้กรอกเนื้อ จำนวน 120 ตัวอย่าง จากร้านค้าปลีกในเมืองกาโบโรน ประเทศบอตสวานา พบว่าอัตราการปนเปื้อนเท่ากับร้อยละ 20 และ serogroup ของ *Salmonella* ที่พบบ่อยที่สุดคือ group B Little และคณะ (1998) พบว่าไส้กรอกแห้งร้อยละ 0.9 ของตัวอย่างไส้กรอกทั้งหมด มีการปนเปื้อน *S. aureus* การที่ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรค ทำให้ผู้บริโภคเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sauer และคณะ (1997) ซึ่งได้รายงานการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการบริโภคไส้กรอกหมัก

นอกจากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนมแล้ว ยังได้ตรวจวัดค่าพีเอชและค่า a_w ด้วย ซึ่งค่าพีเอชและค่า a_w เฉลี่ยของเนื้อสุกรและแหนมแสดงดังตารางที่ 4.2 พบว่าค่าพีเอชเฉลี่ยของเนื้อสุกรมีค่าสูงกว่าค่าพีเอช และ a_w เฉลี่ยของแหนม ดังนั้นสภาพพีเอชและ a_w ของเนื้อสุกร จึงเอื้ออำนวยให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีกว่าในแหนม และทำให้พบจุลินทรีย์ปนเปื้อนในเนื้อสุกรมากกว่า

ตารางที่ 4.2 ค่าพีเอชและ a_w เฉลี่ยของเนื้อสุกรและแหนม

ค่าที่วิเคราะห์	เนื้อสุกร	แหนม
พีเอช	5.65	4.60
a_w	0.98	0.95
จำนวนตัวอย่าง	30	30

จากการที่ตรวจพบว่า เนื้อสุกรมีการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในปริมาณที่มากมากกว่ามาตรฐานกำหนด ดังนั้นหากมีการนำเนื้อสุกรไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น แหนม ไส้กรอกอีสาน หมูส้ม เกี๊ยวหมู ที่ต้องมีการหมักหรือวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลานานก็จะทำให้เชื้อที่ปนเปื้อนเจริญเพิ่มจำนวนได้ และบางชนิดอาจสร้างสารพิษที่ทนต่อความร้อนได้ทำให้เนื้อสุกรนั้นมีความเสี่ยงต่อการทำให้ผู้บริโภคเกิดโรคอาหารเป็นพิษ และอาจเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ ดังนั้นหากสามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเนื้อสุกรก็จะทำให้ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งการเติมเกลือของกรดอินทรีย์ลงในอาหารเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ แต่ต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจากมีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของอาหาร

4.2 ผลการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ

จากการศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจำนวน 8 ชนิด ในอาหาร MHB ที่ปรับให้มีค่าพีเอช (pH) ต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ได้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (MIC) ดังตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งของเกลือทั้งสามชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทดสอบต้านทานต่อโซเดียมอะซิเตตได้ดีกว่าโพแทสเซียมซอร์เบตและโซเดียมแลคเตต ในสภาพพีเอชส่วนใหญ่ที่ทดสอบ เกลือโซเดียมแลคเตตมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทดสอบ ในสภาพพีเอชต่ำ (พีเอช 4.5-5.5) ซึ่งจะเห็นได้จากค่า MIC ของโซเดียมแลคเตตที่ต่ำกว่าค่า MIC ของโซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่พีเอช 4.5 พบว่าโซเดียมแลคเตตยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *E. coli* ได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่า MIC ต่ำสุด (23.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และในช่วงพีเอช 4.5-5.5 พบว่า *L. monocytogenes* ไวต่อโซเดียมแลคเตตมากที่สุด สำหรับเชื้อ *S. aureus*, *S.* Typhimurium, *S.* Rissen และ *Y. enterocolitica* ถูกยับยั้งด้วยโซเดียมแลคเตตที่ค่า MIC เท่ากันคือ 47.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่า *V. parahaemolyticus* สามารถต้านทานต่อโซเดียมแลคเตตได้ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า MIC ส่วนใหญ่สูงกว่า 191.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โพแทสเซียมซอร์เบตสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *P. fluorescens* และ *E. coli* ได้ดีในช่วงพีเอชต่ำกว่า 6.0 (ค่า MIC ตั้งแต่ 16.02-64.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และในสภาพที่พีเอช 6.0 พบว่า *S. aureus*, *S.* Rissen, *P. fluorescens* และ *E. coli* ถูกยับยั้งโดยโพแทสเซียมซอร์เบตได้ดีกว่าโซเดียมแลคเตตและโซเดียมอะซิเตต และที่พีเอช 6.5 พบว่า *L. monocytogenes* และ *E. coli* ไวต่อการถูกยับยั้งด้วยโพแทสเซียมซอร์เบตมากที่สุด (MIC เท่ากับ 32.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วนที่พีเอช 7.0 โพแทสเซียมซอร์เบตยับยั้ง *S.* Typhimurium ได้ดีที่สุด (MIC 32.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อย่างไรก็ตามที่พีเอช 4.5-5.5 โพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่นำมาทดสอบ เช่น *E. coli* ส่วนประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยโซเดียมอะซิเตต พบว่าค่าพีเอชมีผลน้อยมาก โดยเฉพาะในช่วงพีเอช 5.0-6.5 พบว่าค่า MIC ในการยับยั้งแบคทีเรียทุกชนิดที่นำมาทดสอบไม่เปลี่ยนแปลงไปตามค่าพีเอช และ *Y. enterocolitica* ไวต่อโซเดียมอะซิเตตมากที่สุด โดยมีค่า MIC ต่ำสุดในช่วงพีเอช 4.5-7.0 (MIC 13.12-52.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่า *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* และ *E. coli* สามารถต้านทานต่อโซเดียมอะซิเตตได้ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า MIC ส่วนใหญ่สูงกว่า 210 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่พีเอชต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรีย	ความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งได้ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)																	
	โซเดียมแลคเตต						โซเดียมอะซิเตต						โพแทสเซียมซอร์เบต					
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0	pH 6.5	pH 7.0
Staphylococcus aureus	47.8	47.8	47.8	95.62	95.62	95.62	>210	>210	>210	>210	>210	>210	64.08	64.08	64.08	64.08	128.17	128.17
Salmonella Typhimurium	47.8	47.8	47.8	47.8	95.62	95.62	210	210	210	210	210	105	>256.38	>256.38	64.08	64.08	64.08	32.04
Salmonella Rissen	47.8	47.8	47.8	47.8	47.8	191.25	210	210	210	210	210	210	>256.38	64.08	64.08	32.04	64.08	64.08
Listeria monocytogenes	23.9	23.9	23.9	23.9	47.8	47.8	52.5	210	210	210	210	210	64.08	>256.38	>256.38	>256.38	64.08	64.08
Yersinia enterocolitica	47.8	47.8	47.8	47.8	47.8	47.8	13.12	52.5	52.5	52.5	52.5	52.5	64.08	>256.38	64.08	64.08	32.04	>256.38
Pseudomonas fluorescens	47.8	23.9	47.8	47.8	47.8	47.8	105	105	105	105	105	210	32.04	32.04	64.08	32.04	64.08	64.08
Vibrio parahaemolyticus	>191.25	>191.25	47.8	>191.25	>191.25	>191.25	>210	>210	>210	>210	>210	>210	>256.38	>256.38	>256.38	64.08	>256.38	>256.38
Escherichia coli	23.9	47.8	191.25	95.62	95.62	95.62	105	>210	>210	>210	>210	>210	16.02	16.02	64.08	64.08	32.04	64.08

โดยทั่วไปแล้วความสามารถในการต้านแบคทีเรียของกรดและเกลือของกรดอินทรีย์ ส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปของกรดหรือเกลือในรูปที่ไม่แตกตัว ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ข้างในเซลล์ได้ (Davidson และ Juneja. 1990) เมื่อโมเลกุลในรูปที่ไม่แตกตัวผ่านเข้าสู่เซลล์ที่มีชีวิต ส่วนที่ไม่แตกตัวนั้นจะเกิดการแตกตัวเนื่องจากค่าพีเอชภายในเซลล์ที่ปกติจะมีสภาพใกล้เคียงกับสภาวะเป็นกลาง (พีเอช 6.5) ซึ่งสูงกว่าค่า pKa ของกรด ซึ่งโปรตอนที่เกิดขึ้นมีผลให้ไซโตพลาสซึมมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น ดังนั้นเซลล์จึงต้องพยายามรักษาพีเอชภายในเซลล์ให้ใกล้เคียงกับสภาวะเป็นกลาง จึงต้องขับโปรตอนออกนอกเซลล์ ซึ่งการขับโปรตอนออกนอกเซลล์นั้นต้องใช้กระบวนการแอคทีฟทรานสปอร์ต (active transport) เซลล์จึงสูญเสียพลังงาน (ATP) ที่ใช้ในการเจริญ (Barsosa-Cánovas และคณะ. 1998) ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ช้าลง การแตกตัวของกรดหรือเกลือของกรดอินทรีย์จึงมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยปัจจัยที่มีผลต่อการแตกตัวของกรด ได้แก่ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า pKa ของกรดหรือเกลือแต่ละชนิด (Ray. 1996) เมื่อค่าพีเอชเท่ากับค่า pKa ของกรด นั่นคือมีส่วนของกรดที่ไม่แตกตัวร้อยละ 50 ถ้าค่าพีเอชเพิ่มขึ้นทำให้การแตกตัวของกรดเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเมื่อพีเอชเท่ากับ pKa+1 ทำให้กรดในรูปที่ไม่แตกตัวมีน้อยกว่ากรดในรูปที่แตกตัวถึง 10 เท่า ในทำนองเดียวกันเมื่อค่าพีเอชลดลงต่ำกว่าค่า pKa ส่วนของกรดที่ไม่แตกตัวจะเพิ่มขึ้น (Adams และ Moss. 1995) ดังนั้นในสภาพที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชต่ำจึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าที่พีเอชสูง แต่ประสิทธิภาพการยับยั้งยังขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย และชนิดของกรดหรือเกลือด้วย ในสภาพที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชต่ำ (พีเอช 4.5-5.5) พบว่า โซเดียมแลคเตตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทดสอบได้ดีกว่าโซเดียมอะซิเตตและโพแทสเซียมซอร์เบต ซึ่งพีเอชช่วงนี้โซเดียมแลคเตตจะแตกตัวได้มากกว่าเนื่องจากมีค่า pKa 3.79 (Davidson. 2001) ซึ่งต่ำกว่าค่า pKa ของโซเดียมอะซิเตตและโพแทสเซียมซอร์เบต (ค่า pKa เท่ากับ 4.75) (Davidson. 2001) แต่การที่โซเดียมแลคเตตสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่า น่าจะเป็นเพราะการแตกตัวของโซเดียมแลคเตตทำให้มีส่วนของโซเดียมแลคเตตที่ไม่แตกตัว แลคเตตไอออนและโซเดียมไอออนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังสมการ

$$\underset{\text{โซเดียมแลคเตต}}{CH_3CHOHCOONa} \longleftrightarrow \underset{\text{แลคเตตไอออน}}{CH_3CHOHCOO^-} + \underset{\text{โซเดียมไอออน}}{Na^+}$$

ซึ่งนอกจากส่วนของโซเดียมแลคเตตที่ไม่แตกตัวจะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แล้ว ยังพบว่าส่วนของแลคเตตไอออน ก็มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้เช่นกัน (Shelef. 1994) เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาคีเลชัน (chelating) กับโลหะไอออนที่มีในอาหาร หรือโลหะไอออนที่อยู่ที่ผนังเซลล์ เช่น เหล็ก (III) ไอออน (Fe^{3+}) เป็นต้น เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียร ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถใช้โลหะไอออนเหล่านั้นได้ การเจริญจึงหยุดลง (Russell และ Gould. 2003)

ซึ่งต่างจากโซเดียมอะซิเตตและโพแทสเซียมซอร์เบตที่ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่เกิดจากเกลือในรูปที่ไม่แตกตัว (Shelef. 1994) อาจจะทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่ำกว่าโซเดียมแลคเตตที่มีทั้งส่วนที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวและแลคเตตไอออนที่ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ และจากทฤษฎีการแตกตัวของกรดอ่อนพบว่าปฏิกิริยาการแตกตัวเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ และเมื่อพีเอชต่ำโปรตอนที่มีความเข้มข้นสูงจะผลักดันให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับทำให้ส่วนของกรดมีเพิ่มขึ้น และแอนไอออนมีเพียงเล็กน้อย (Russell และ Gould. 2003) ในทำนองเดียวกันเมื่อโซเดียมแลคเตตแตกตัว ปริมาณของโซเดียมไอออนที่ได้จากการแตกตัวของโซเดียม-แลคเตต และส่วนที่ถูกขับออกมาจากเซลล์มีเป็นจำนวนมากมากพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาผันกลับและโซเดียมไอออนจะรวมตัวกับแลคเตตไอออนได้เป็นโซเดียมแลคเตตและผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ นอกจากนี้โซเดียมแลคเตตยังทำให้ค่า a_w ลดลงได้มากกว่ากรดอินทรีย์อื่นๆที่ความเข้มข้นเดียวกัน (Bogaert and Naidu. 2000) ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียได้

การที่พบว่า *L. monocytogenes* และ *E. coli* ไวต่อโซเดียมแลคเตตมากที่สุดที่พีเอช 4.5 สอดคล้องกับ Ita และ Hutkins (1991) ได้รายงานว่า *L. monocytogenes* ไวต่อการถูกยับยั้งด้วยกรดแลคติกและเกลือของกรดแลคติกเช่นเดียวกัน และยังได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของพีเอชภายในเซลล์ พบว่าเซลล์รักษาความแตกต่างของพีเอชภายในและพีเอชภายนอกเซลล์ให้อยู่ในช่วง 1.0-1.5 หน่วยของพีเอช ในสภาพพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 3.5-6.5

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยโซเดียมแลคเตตนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด สันนิษฐานว่าอาจมีผลให้พีเอชของไซโตพลาสซึมลดลงหรือลดค่าพีเอชของอาหาร (Stratford และ Eklund. 2003) อย่างไรก็ตาม ยังมีรายงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้โซเดียมแลคเตตในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น Houtsma และคณะ (1996) ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร เพื่อนำมาศึกษาความไวต่อโซเดียมแลคเตต โดยศึกษาผลของพีเอช (5.7-7.0) และอุณหภูมิ (4-37 องศาเซลเซียส) ต่อค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนและยีสต์สกัด (peptone-yeast extract medium) และใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นตัวอ้างอิงเพื่อแบ่งแยกระหว่างผลของค่า a_w และผลการยับยั้งจำเพาะของโซเดียมแลคเตต พบว่าค่า MIC ของโซเดียมแลคเตตในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่มีค่าลดลงในสภาพที่มีค่าพีเอชต่ำ ที่พีเอช 5.7 เมื่อมีโซเดียมแลคเตต (มากกว่าหรือเท่ากับ 268 มิลลิโมลาร์) มักไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามสำหรับ *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus cremoris*, *L. lactis* และแบคทีเรียกรดแลคติกบางตัวที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อเน่าเสีย พบว่าค่า MIC ของโซเดียมแลคเตตจะไม่เปลี่ยนแปลงไปตามพีเอช ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะถูกยับยั้งได้ดีที่พีเอชสูง (7.0) และพบว่ายีสต์ส่วนใหญ่ไวต่อโซเดียมแลคเตตน้อยกว่าแบคทีเรีย เนื่องจากมีค่า MIC มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษา (1,339 มิลลิโมลาร์) และไม่ขึ้นกับพีเอชของอาหารในการเจริญ ส่วนค่า MIC ของโซเดียมคลอไรด์ไม่ขึ้นอยู่กับพีเอชในช่วง 5.7-7.0 สำหรับจุลินทรีย์ทุกชนิดที่นำมาศึกษา

ในสภาพที่มีพีเอชสูง (พีเอช 6.0-6.5) พบว่าแบคทีเรียบางชนิดที่ทดสอบโดยเฉพาะ *E. coli* ถูกยับยั้งโดยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตได้ดีกว่าโซเดียมแลคเตตและโซเดียมอะซิเตต และในพีเอชช่วงนี้พบว่า *S.* Typhimurium ถูกยับยั้งโดยโพแทสเซียมซอร์เบตด้วยค่า MIC 64.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่า MIC ในการยับยั้ง *E. coli* เท่ากับ 64.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 32.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของ Doell (1962) พบว่าซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.075 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium และ *E. coli* การที่ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่พีเอชสูงนี้ อาจเนื่องมาจากซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ที่พีเอชสูงสุดประมาณ 6.0-6.5 (Sofos และ Busta. 1981) อย่างไรก็ตามที่พีเอช 4.5-5.5 โพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่นำมาทดสอบ เช่น *E. coli* เนื่องจากพีเอชในช่วงนี้มีค่าใกล้เคียงกับค่า pKa ของโพแทสเซียมซอร์-เบต (4.75) ซึ่งที่พีเอชนี้มีโพแทสเซียมซอร์เบตในรูปที่ไม่แตกตัวร้อยละ 50 (Sofos และ Busta. 1981) มีรายงานว่าการใช้โพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ร่วมกับอบเชยความเข้มข้นร้อยละ 0.3 สามารถกำจัดเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่มีเซลล์เริ่มต้นในน้ำแอปเปิ้ล จำนวน 5.2 $\log_{10}$CFU ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (Ceylan และคณะ. 2004) และนอกจากนี้การที่พบว่าโพแทสเซียมซอร์เบตสามารถยับยั้ง *Salmonella* ได้ดีนั้น ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ LaRocco และ Martin (1981) ซึ่งได้ศึกษาผลของโพแทสเซียมซอร์เบตอย่างเดียว และผลของโพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 2 หรือ 3 ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium ATCC 7136 ในอาหาร TSB ซึ่งปรับพีเอชเท่ากับ 6.3 ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ซอร์เบตร่วมกับโซเดียมคลอไรด์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Typhimurium ได้มากกว่าการใช้โพแทสเซียมซอร์เบตอย่างเดียวภายใต้สภาวะที่ศึกษา การใช้โพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการยับยั้ง *S.* Typhimurium การที่เกลือซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ได้นั้นเนื่อง มาจากเกลือซอร์เบตเมื่อผ่านเข้าสู่เซลล์และแตกตัวภายในเซลล์ ทำให้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่น อิโนเลส (enolase) และแลคเตตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) และเอนไซม์ในวัฏจักรเครปส์ เช่น มาเลต ดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) ไอโซซิเตรต ดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase) แอลฟา-คีโตกลูตาเรตดีไฮโดรจีเนส (α-ketoglutarate dehydrogenase) ซัคซิเนตดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) ฟูมาเรส (fumarase) และแอสพาร์เทส (aspartase) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล (sulphydryl) เช่น เอนไซม์ฟูมาเรสในแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คะตะเลสบวกได้ (catalase positive) รวมทั้งเอนไซม์ที่สร้างโดยยีสต์และรา ได้แก่ เอนไซม์แอสพาร์เทส (aspartase) ซัคซินิกดีไฮโดรจีเนส (succinic dehydrogenase) และ yeast alcohol dehydrogenase ซึ่งหมู่ซัลไฟดริลนี้จะทำปฏิกิริยากับซอร์เบต นอกจากนี้ซอร์เบตยังมี

ผลต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์โดยยอมให้มีการยืดยาวของเซลล์ (elongation) แต่ไม่มีการงอกของสปอร์ *Bacillus* และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน อาร์เอนเอ และดีเอนเอ ใน *Pseudomonas fluorescens* (Kabara และ Eklund. 1991) จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยโพแทสเซียมซอร์เบตแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการเลือกความเข้มข้นของโพแทสเซียมซอร์เบตที่เหมาะสมสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารต้องคำนึงถึงชนิดของแบคทีเรียที่สำคัญที่ปนเปื้อนในอาหารชนิดนั้น และต้องคำนึงถึงพีเอชของอาหารนั้นด้วย เพื่อให้โพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้ง ดังเช่น Sofos และ Busta (1981) ได้กล่าวว่าประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบตนั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ วัตถุกันเสียอื่นๆที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ การแปรรูป การบรรจุ และการเก็บรักษา

ส่วนประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของโซเดียมอะซิเตตพบว่าไม่ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยกว่าโซเดียมแลคเตตและโพแทสเซียมซอร์เบต อาจจะเนื่องมาจากกรดอะซิติกเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ ดังนั้นอาจมีการระเหยของเกลืออะซิเตตออกไปในระหว่างการบ่มเป็นระยะเวลานาน (Lund และ Eklund. 2000) ทำให้ความเข้มข้นของเกลือลดลง หรือจากคุณสมบัติของอะซิเตตไอออนที่จุลินทรีย์จำนวนมากสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ รวมทั้งแลคเตตแอนไอออนและซิเตรตแอนไอออนด้วย การใช้เกลือเหล่านี้เป็นสารต้านจุลินทรีย์อาจจะมีประสิทธิภาพต่ำเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น (Ray. 1996) ดังนั้นเมื่อโซเดียมอะซิเตตแตกตัว จะได้ส่วนของอะซิเตตไอออนที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งเป็นการช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ดี และทำให้ต้องใช้อะซิเตตความเข้มข้นสูงขึ้นจึงจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้ Lee และคณะ (2002) ได้ศึกษากิจกรรมการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่พบได้บ่อย โดยศึกษาการยับยั้งแบคทีเรีย 10^4-10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยการหาค่า MIC ของเกลือโพแทสเซียมอะซิเตตในอาหาร TSB ซึ่งปรับให้มีพีเอช 7.0 พบว่าอะซิเตตสามารถต้านแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด โดยค่า MIC ของโพแทสเซียมอะซิเตตในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, และ *Yersinia enterocolitica* เป็นดังนี้ 125, 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองนี้ได้ค่า MIC ของเกลือของกรดอินทรีย์ค่อนข้างสูงกว่าผลที่ได้จากงานวิจัยของนักวิจัยท่านอื่น เนื่องจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นสูง 10^7-10^8 โคโลนีต่อกรัม ทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของเกลือของกรดอินทรีย์สูงขึ้นในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เมื่อทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเกลือของกรดอินทรีย์ทั้งสามชนิด ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆในอาหารเหลวได้แล้ว ก็สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารได้ โดยเลือกค่า MIC ที่พีเอชที่เหมาะสมกับอาหารนั้นๆ และชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน แต่ในการนำไปใช้จริงในอาหารอาจจะได้ผลไม่ดีเท่ากับใน

อาหารเหลว ดังนั้นจึงอาจใช้วิธีการควบคุมจุลินทรีย์วิธีอื่นร่วมด้วย เช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ เพื่อให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากขึ้น

4.3 ผลของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร

จากผลการทดลองในข้อ 4.2 ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชต่างกันได้ ดังนั้นจึงได้ทดลองเติมเกลือของกรดอินทรีย์ดังกล่าวลงในเนื้อสุกรที่ระดับความเข้มข้น 47.8, 210 และ 64.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้เป็นค่า MIC ที่พีเอช 5.5 การที่เลือกค่า MIC ที่ระดับพีเอชนี้เนื่องจากเป็นระดับพีเอชตามปกติของเนื้อสุกร (พีเอช 5.5- 5.8)

จากการทดลองเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *Salmonella* Rissen ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ต่างชนิดกันและไม่มีการเติมเกลือ แล้วนำเนื้อสุกรทั้งหมดไปแช่แข็งที่เวลาต่างๆและทำให้ละลายอย่างช้า (รูปที่ 4.1) จากนั้นนำมาหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (รูปที่ 4.1 ก) พบว่าหลังจากการแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่ 1 ที่เติมโซเดียมแลคเตต 1.91 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อสุกร ชุดที่ 2 ที่เติมโซเดียมอะซิเตต 8.4 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อสุกร และชุดที่ 4 ชุดควบคุม ที่ไม่มีการเติมเกลือ มีจำนวนเซลล์ลดลงเล็กน้อย แต่ในเนื้อสุกรชุดที่ 3 ที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบต 2.56 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อสุกร มีจำนวนเซลล์ลดลงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรทุกชุดลดลงมากขึ้น โดยมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่ 1, 2, 3 และ 4 คิดเป็นร้อยละ 85.27, 87.69, 84.77 และ 88.28 ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เมื่อทำการแช่แข็งครบ 48 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมแลคเตต และชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนจำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตและชุดควบคุมลดลงมากขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรทั้ง 4 ชุด จากนั้นเมื่อทำการแช่แข็งต่อไปจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบต (ร้อยละ 80.58) ลดลงมากกว่าในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตต (ร้อยละ 86.83) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้นการแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของ *S.* Rissen ในเนื้อสุกรที่เติม

โพแทสเซียมซอร์เบต และการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ร่วมกับการเติมโซเดียมแลคเตตหรือโซเดียมอะซิเตตลงในเนื้อสุกรเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Rissen เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงมากที่สุด

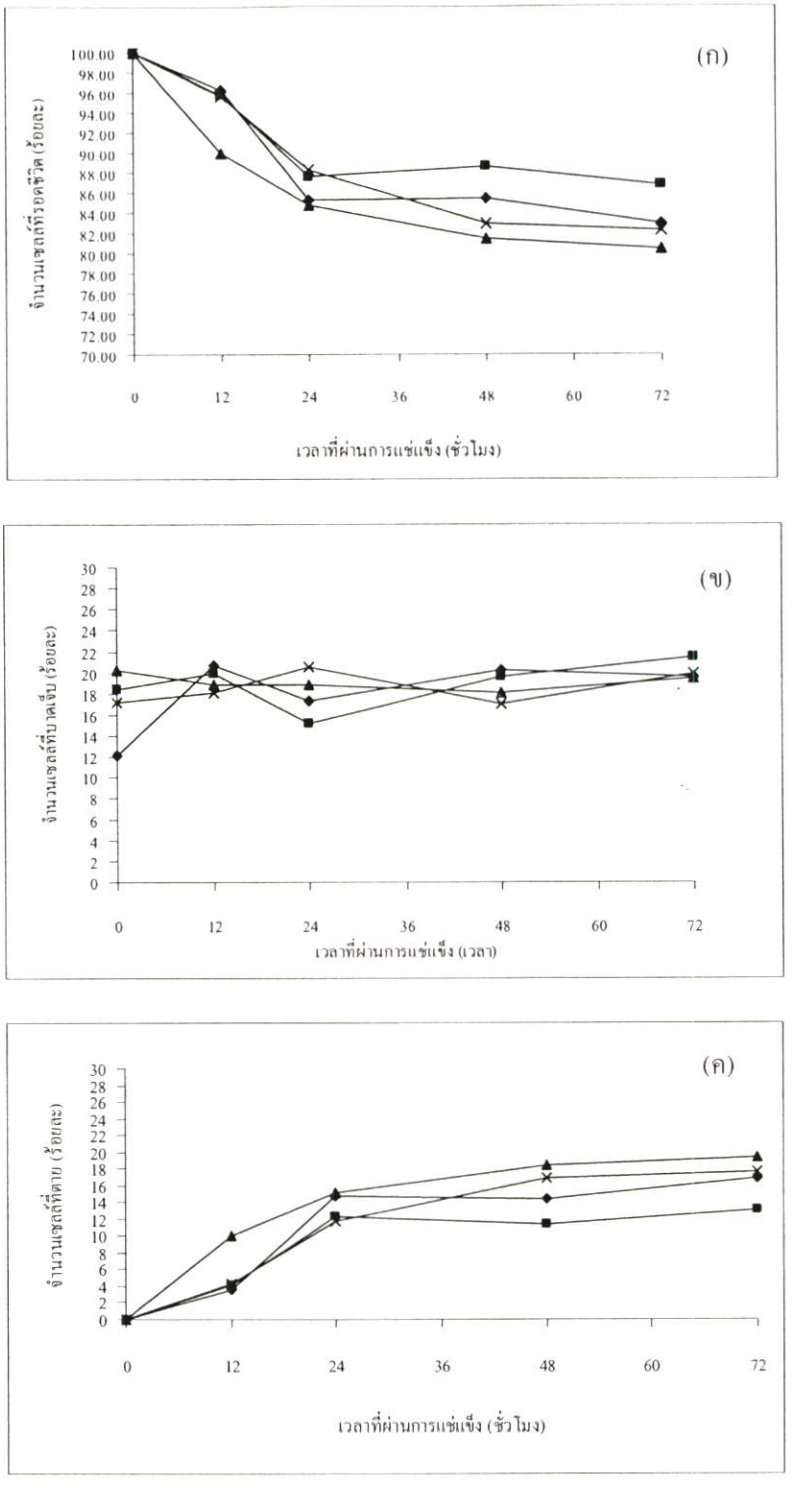
สำหรับจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บของ *S.* Rissen ในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต พบว่าจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บของ *S.* Rissen (รูปที่ 4.1 ข) มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น โดยที่เวลาเริ่มต้นของการแช่แข็งพบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรชุดที่ 1 ที่เติมโซเดียมแลคเตตมีจำนวนเซลล์ลดลงมากกว่าในเนื้อสุกรชุดที่ 3 ที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งเซลล์ในเนื้อสุกรที่ไม่ผ่านการแช่แข็งนี้เกิดการบาดเจ็บจากเกลือของกรดอินทรีย์ที่เติมลงไปเท่านั้น แสดงว่าโพแทสเซียมซอร์เบตทำให้เซลล์บาดเจ็บได้มากที่สุด และหลังจากผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมแลคเตต ชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตต และชุดควบคุมมีจำนวนเพิ่มขึ้น ส่วนในชุดที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตมีจำนวนลดลง แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บในแต่ละชุด หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรทุกชุดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อทำการแช่แข็งครบ 72 ชั่วโมงพบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรทุกชุดมีจำนวนมากกว่าที่เวลาเริ่มต้นของการแช่แข็ง ส่วนจำนวนเซลล์ที่ตายของ *S.* Rissen ในเนื้อสุกรทุกชุด พบว่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.1 ค) โดยจำนวนเซลล์ที่ตายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเวลาเริ่มต้นของการแช่แข็งจนถึง 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ที่ตายเปลี่ยนแปลงไม่มากนักจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 72 และพบว่าจำนวนเซลล์ที่ตายในเนื้อสุกรทุกชุดเพิ่มขึ้นสูงสุด โดยชุดที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตมีจำนวนเซลล์ที่ตายมากที่สุด ซึ่งจำนวนเซลล์ที่ตายสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ของ *S.* Rissen ที่รอดชีวิต (รูปที่ 4.1 ก)

ส่วนการเปรียบเทียบการอยู่รอดของ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกรชุดที่ 1 ที่เติมโซเดียมแลคเตต ชุดที่ 2 ที่เติมโซเดียมอะซิเตต ชุดที่ 3 ที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบต และชุดที่ 4 ชุดควบคุม ที่ไม่มีการเติมเกลือ หลังจากผ่านการแช่แข็งเป็นระยะเวลาต่างๆ และทำให้ละลายอย่างช้า (รูปที่ 4.2) พบว่าเมื่อผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิต (รูปที่ 4.2 ก) ในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมแลคเตต ลดลงมากกว่าจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อทำการแช่แข็งครบ 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมแลคเตตลดลงมากที่สุด แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรทุกชุด เมื่อทำการแช่แข็งครบ 48 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมแลคเตตลดลงมากกว่าในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตต ชุดที่

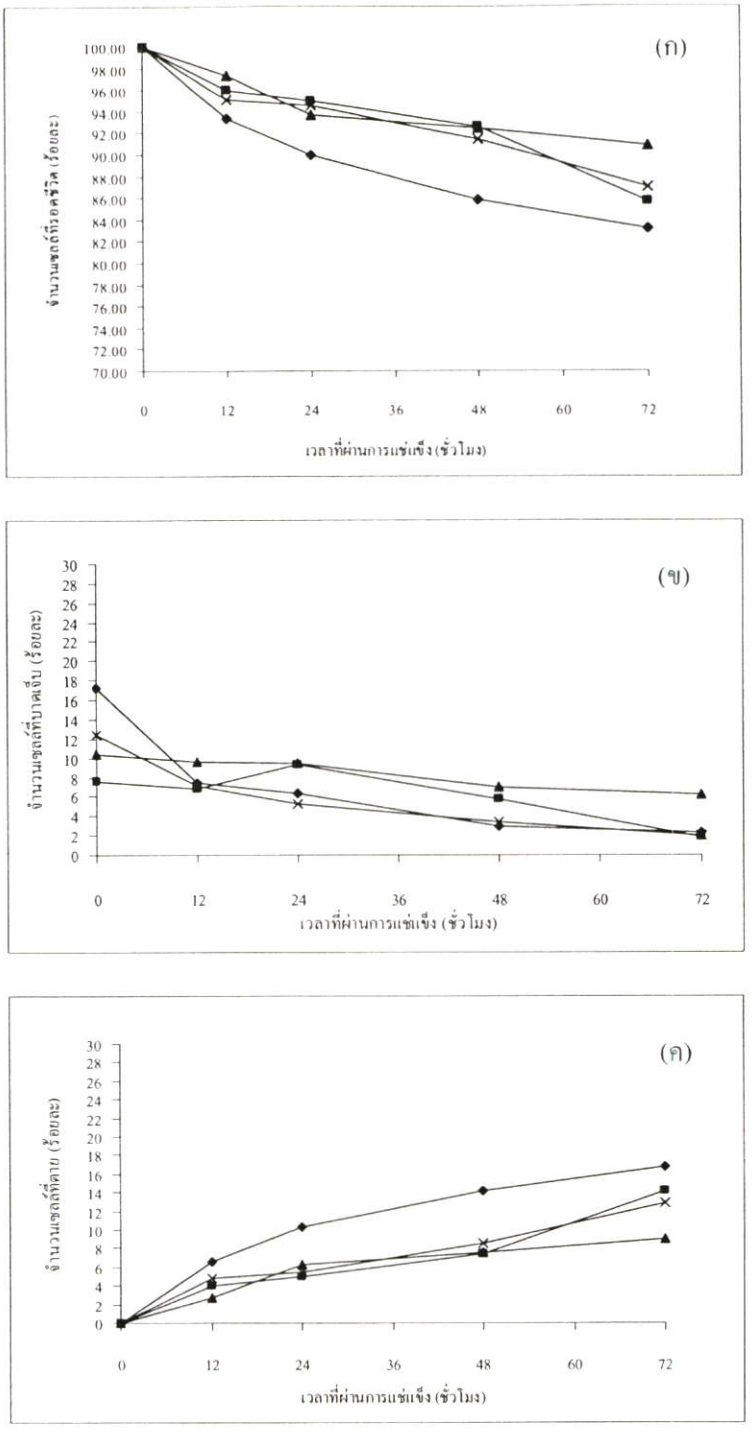
เติมโพแทสเซียมซอร์เบต และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากนั้นเมื่อทำการแช่แข็งต่อไปจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตต และในเนื้อสุกรชุดควบคุมมีจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมาก ส่วนจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมแลคเตต และชุดที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบต ลดลงเล็กน้อย ซึ่งมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตร้อยละ 83.18, 85.79 90.90 และ 87.13 ในเนื้อสุกรชุดที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ และพบว่าจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมแลคเตต และชุดที่เติมโซเดียมอะซิเตตน้อยกว่าจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดควบคุม จะเห็นได้ว่าจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดที่เติมโซเดียมแลคเตตน้อยกว่าในเนื้อสุกรชุดที่ 2, 3 และ 4 ในทุกระยะเวลาที่มีการแช่แข็ง แต่มีจำนวนลดลงน้อยกว่าจำนวนเซลล์ของ *S.* Rissen

จำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บและเซลล์ที่ตายของ *S. aureus* ในเนื้อสุกร (รูปที่ 4.2 ข และ 4.2 ค) พบว่าหลังจากผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตและชุดควบคุมลดลงอย่างมาก ส่วนจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมอะซิเตตและโพแทสเซียมซอร์เบตลดลงเล็กน้อย จากนั้นพบว่าจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย จนถึงชั่วโมงที่ผ่านการแช่แข็งครบ 72 ชั่วโมงพบว่าในเนื้อสุกรชุดที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตมีจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บมากกว่าเนื้อสุกรชุดอื่นๆ ขณะที่จำนวนเซลล์ที่ตายของ *S. aureus* ในเนื้อสุกรทั้ง 4 ชุดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น และ *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตมีจำนวนเซลล์ที่ตายมากที่สุด เมื่อทำการแช่แข็งครบ 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตมีจำนวนมากกว่าในเนื้อสุกรที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างจำนวนเซลล์ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และชุดควบคุมซึ่งสอดคล้องกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่มีน้อยที่สุดในเนื้อสุกรที่เติมเกลือโซเดียม-แลคเตต

จากการที่พบว่าจำนวนเซลล์ของ *S.* Rissen และ *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์มีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาของการแช่แข็งเพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากผลการต้านจุลินทรีย์ของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็ง โดยเฉพาะการเติมโพแทสเซียมซอร์เบตลงในเนื้อสุกร พบว่าทำให้ *S.* Rissen มีจำนวนลดลงมากกว่าในเนื้อสุกรที่เติมเกลือชนิดอื่นแต่ลดลงไม่มากนัก ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Tompkin และคณะ (1974) พบว่าโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด รวมทั้ง *Salmonella* และ *S. aureus* ในไส้กรอกสุกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Rice และ Pierson (1982) ได้



รูปที่ 4.1 ผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (ก) จำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (ข) และจำนวนเซลล์ที่ตาย (ค) ของ *S.* Rissen ในเนื้อสุกร ชุดที่ 1 (♦) เติมโซเดียมแลคเตต, ชุดที่ 2 (■) เติมโซเดียมอะซิเตต, ชุดที่ 3 (▲) เติมโพแทสเซียมซอร์เบต และชุดที่ 4 (×) ไม่มีการเติมเกลือ



รูปที่ 4.2 ผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (ก) จำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (ข) และจำนวนเซลล์ที่ตาย (ค) ของ *S. aureus* ใน เนื้อสุกรชุดที่ 1 (♦) เติมโซเดียมแลคเตต ชุดที่ (■) เติมโซเดียมอะซิเตต ชุดที่ 3 (▲) เติมโพแทสเซียมซอร์เบต และชุดที่ 4 (×) ไม่มีการเติมเกลือ

รายงานว่าการใช้โพแทสเซียมซอร์เบตอย่างเดียว หรือการใช้โพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับไนไตรต์ความเข้มข้น 50 ppm มีประสิทธิภาพเท่ากันในการยับยั้ง *Salmonella* ในไส้กรอก frankfurters ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส หรือ 27 องศาเซลเซียส และประสิทธิภาพการยับยั้งนี้เท่ากับประสิทธิภาพการยับยั้งของไนไตรต์ความเข้มข้น 156 ppm ในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ต่อมา McMeekin และคณะ (1984) ได้พบว่าการใช้โพแทสเซียมซอร์-เบตสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในชิ้นเนื้อสัตว์ปีกที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ ดังนั้นจึงช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นี้ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ การที่เกลือซอร์เบตสามารถลดจำนวนของ *S.* Rissen ได้ดีน่าจะเป็นเพราะค่าพีเอชของเนื้อสุกร (พีเอช 5.65) ใกล้เคียงกับค่า pKa ของซอร์เบต และมีนักวิจัยบางคนรายงานว่าซอร์เบตมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง (Nomoto และคณะ. 1955; Sofos และคณะ. 1980)

สำหรับจำนวนเชื้อ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตพบว่ามีจำนวนน้อยกว่าในเนื้อสุกรที่เติมเกลือชนิดอื่น ได้มีรายงานถึงการลดลงของ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์เนื้อที่เติมโซเดียมแลคเตต โดย Scannell และคณะ (1997) ได้ทำการทดลองใช้โซเดียมแลคเตตร่วมกับไนซินในการยับยั้ง *S. aureus* และ *Salmonellla* Kentucky ในไส้กรอกเนื้อสุกร พบว่าโซเดียมแลคเตตให้ผลเสริมฤทธิ์กับไนซินในการลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในไส้กรอกเนื้อสุกร แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเซลล์ของ *S.* Rissen และ *S. aureus* จะลดจำนวนลงแต่ก็ยังคงมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตสูง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะเกลืออะซิเตตและแลคเตตมีผลต่อการชะลอการเจริญเติบโตของแบคทีเรียมากกว่าทำให้เซลล์ตาย (Jay และคณะ. 2005) ซึ่งการที่จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในเนื้อสุกรลดลงไม่มากนัก ทั้งๆที่เชื้อเผชิญต่อสภาวะเครียดในสภาพที่มีเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับสภาวะของการแช่แข็งและการทำให้ละลายอย่างช้า อาจเป็นผลมาจากการใช้ความเข้มข้นของสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ในระดับเดียวกับค่า MIC ที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้งสองในอาหารเหลว ซึ่งอาจเป็นระดับความเข้มข้นที่ไม่เพียงพอที่จะใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารแข็ง เช่น เนื้อสุกร ซึ่งโดยทั่วไปการเติมสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารแข็งที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับสารต้านจุลินทรีย์ที่เติมในอาหารเหลว ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารแข็งจะน้อยกว่าในอาหารเหลว (Shelef. 1994) ดังเช่นการรายงานของ Drosinos และคณะ (2005) ซึ่งพบว่าการเติมสารละลายผสมระหว่างกรดแลคติก โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต และสารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมแลคเตตและโพแทสเซียมอะซิเตต สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกใน modified MRS แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ นอกจากนี้การที่จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของ *S.* Rissen และ *S. aureus* ลดลงไม่มากนักอาจจะเนื่องมาจากองค์ประกอบของเนื้อสุกรที่ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ (Lawrie. 1974) ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยปกป้องเซลล์ของจุลินทรีย์ให้อยู่รอดได้ดีในเนื้อสุกร และสารประกอบบางชนิดในอาหารยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารป้องกันความเย็น

(cryoprotectant) ช่วยป้องกันเซลล์ของจุลินทรีย์ในอาหารจากการบาดเจ็บอันเนื่องมาจากความเย็น (EL-Kest และ Marth. 1992) สารป้องกันความเย็นดังกล่าว ได้แก่ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต กลูโคส และแคลเซียม จึงทำให้แบคทีเรียไม่ได้รับผลกระทบจากการแช่แข็งมากนัก

การที่จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดได้ในขณะที่มีการแช่แข็งนั้นมีอยู่ด้วยกันหลายปัจจัย ได้แก่ ธรรมชาติของเชื้อ อายุและอัตราการเจริญของเชื้อ อัตราการลดอุณหภูมิ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในระหว่างแช่แข็ง เป็นต้น (Robinson. 1985) ในการทดลองนี้ได้ศึกษากับเชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางและเป็นเชื้อที่มักพบว่ามีการปรับตัวต่อสภาวะต่างๆได้ดี และเป็นเชื้อที่อยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งมีการต้านทานต่อสภาวะเครียดต่างๆได้ดี และอัตราการลดอุณหภูมิที่เป็นไปอย่างช้าทำให้ในระหว่างที่อุณหภูมิกำลังลดลงแบคทีเรียอาจมีการเจริญเพิ่มจำนวนได้ และเนื่องจากเนื้อสุกรเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์สำหรับแบคทีเรีย ดังนั้นปัจจัยเหล่านี้ล้วนทำให้แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้อยู่รอดได้ดีในขณะแช่แข็งจึงทำให้การแช่แข็งมีผลไม่มากนักต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ *S.* Rissen และ *S. aureus* หรือการที่แบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถอยู่รอดได้ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์นั้น อาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีการปรับตัวต่อสภาวะกรดหรืออุณหภูมิต่ำได้ ซึ่งการปรับตัวต่อกรดอาจจะทำให้แบคทีเรียสามารถต้านทานต่ออุณหภูมิต่ำได้ด้วย หรือเซลล์อาจเกิดการบาดเจ็บแล้วมีการซ่อมแซมตัวเองได้ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มความสามารถในการอยู่รอดมากขึ้น

การที่จำนวนเซลล์ของ *S.* Rissen และ *S. aureus* ในเนื้อสุกรลดจำนวนลง นอกจากจะมีสาเหตุมาจากฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเกลือของกรดอินทรีย์แล้ว ยังอาจเป็นผลร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย ซึ่งการแช่แข็งและการททำให้ละลายมีผลทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดจำนวนลงได้ ในการทดลองนี้ได้ทำการแช่แข็งเนื้อสุกรด้วยอัตราอย่างช้า ในการแช่แข็งอาหารด้วยอัตราช้าเมื่ออุณหภูมิลดลงถึง -2 องศาเซลเซียส โมเลกุลของน้ำในอาหารจะเริ่มแข็งตัวเป็นน้ำแข็ง และเมื่ออุณหภูมิลดลงอย่างต่อเนื่องจะเกิดผลึกน้ำแข็งมากขึ้น ตัวถูกละลายในน้ำที่เหลืออยู่ในอาหารจะเข้มข้นขึ้นซึ่งจะทำให้จุดเยือกแข็งของน้ำในสารละลายนั้นลดต่ำลง ค่า a_w ก็จะลดลงด้วย และเมื่ออุณหภูมิลดลงถึง -20 องศาเซลเซียส น้ำเกือบทั้งหมดจะแข็งตัวเป็นน้ำแข็ง ในสภาพเช่นนี้การเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ และความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกเซลล์ที่ยังไม่แข็งตัวมีผลต่อการมีชีวิตของจุลินทรีย์ในอาหารนั้นได้ ในสภาพที่น้ำในอาหารแข็งตัวเป็นผลึกน้ำแข็งและตัวถูกละลายในอาหารเข้มข้นขึ้นนั้นจะทำให้เกิดความแตกต่างของความดันออสโมติกระหว่างอาหารนั้น (freezing medium) และไซโตพลาสซึมในเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาพเย็นอย่างยิ่งยวด (supercooled cytoplasm) ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของน้ำออกจากเซลล์ และความเข้มข้นของตัวถูกละลายและไอออนต่างๆภายในเซลล์เข้มข้นขึ้น (Ray. 1996 ; Mazur. 1970) ในกรณีของการแช่แข็งเนื้อสัตว์ด้วยอัตราช้า จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์อาจได้รับอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งหรือเผชิญต่อสภาพที่ตัวถูกละลายเข้มข้นขึ้น ตัวถูกละลาย

ส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในเนื้ออาจช่วยป้องกันเซลล์จากการบาดเจ็บจากการแช่แข็ง โดยทั่วไปปริมาณสารประกอบอนินทรีย์ที่ละลายได้ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบไม่ผันแปรมากนักระหว่างกล้ามเนื้อของสัตว์ที่ยังมีชีวิตอยู่และกล้ามเนื้อของสัตว์ที่ตายแล้วในช่วง post rigor ถึงแม้ว่าองค์ประกอบของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนจะมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่สำคัญเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารเกิดการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นจากการเปลี่ยนสารไกลโคเจนผ่านวิถีกระบวนการไกลโคไลซิสโดยการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อในระยะหลังที่สัตว์ตาย (post mortem) นำไปสู่ระยะที่กล้ามเนื้อของสัตว์มีการเกร็งตัว (rigor development) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงของไกลโคเจนที่เก็บไว้ในกล้ามเนื้อสัตว์ทำให้ได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ความเข้มข้นของสารที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการไกลโคไลซิสจะผันแปรในระหว่างที่กล้ามเนื้อเกร็งตัว และลดลงในระดับต่ำ ปกติจะมีปริมาณกรดแลคติกสะสมในกล้ามเนื้อของสัตว์เพียงพอที่จะทำให้พีเอชของกล้ามเนื้อสัตว์ที่มีชีวิตลดลงจากช่วงพีเอชเป็นกลางจนถึงพีเอช 5.5-5.8 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่แลคเตตที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของไกลโคเจนในกล้ามเนื้อสัตว์ และเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดอื่นที่เติมลงไปจะเป็นสาเหตุของการบาดเจ็บจากการแช่แข็ง เนื่องจากรูปที่ไม่แตกตัวของกรดเหล่านี้สามารถมีผลในการยับยั้งเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ (Lowry และ Gill. 1985) ซึ่งในการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ที่จะมีจุลินทรีย์ 3 ประเภทในเนื้อสุกร ได้แก่ จุลินทรีย์ที่รอดชีวิต จุลินทรีย์ที่ตาย และจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บ ซึ่งจะเห็นได้จากผลการทดลองว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลง เมื่อระยะเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น ขณะที่จำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บเพิ่มขึ้น และขณะเดียวกันจำนวนเซลล์ที่ตายก็เพิ่มขึ้นด้วยเมื่อระยะเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น Merryman (1966) ได้แนะนำว่าในสภาพของการลดอุณหภูมิอย่างช้า (น้อยกว่า 1 องศาเซลเซียสต่อนาที) ในสภาพนี้จุลินทรีย์ที่ทนต่อการสูญเสียน้ำจากการที่ตัวถูกละลายเข้มข้นขึ้นนั้นจะต้านทานต่อการบาดเจ็บจากการแช่แข็ง ในขณะที่จุลินทรีย์บางเซลล์อาจถูกยับยั้งจากการที่ความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงขึ้น ซึ่งเซลล์จุลินทรีย์เหล่านี้อาจถูกทำลายได้ง่ายจากการแช่แข็ง

เซลล์ที่บาดเจ็บจากการแช่แข็งจะเกิดการสูญเสียการมีชีวิตโดยจะมีการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ มีความไวต่อสารยับยั้งเพิ่มขึ้น มีความต้องการสารอาหารที่มีคุณค่าสูงเพิ่มขึ้น มีระยะเวลาของ lag phase ยาวนานขึ้น และมีความไวต่อรังสีมากขึ้น นอกจากนี้ MacLeod และ Calcott (1976) ได้เสนอว่าการแช่แข็งและการทำให้ละลายมีผลทำให้ *E. coli* ไวต่อเกลือมากขึ้น ในการทดลองนี้การที่เลือกการทำให้ละลายอย่างช้ามาใช้ในการทดลองก็เนื่องจากการทำให้ละลายอย่างช้ามีผลทำให้จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ลดลงได้มากกว่าการทำให้ละลายอย่างรวดเร็วดังที่ได้ทดลอง (ภาคผนวก ก) พบว่าจำนวนเซลล์ของ *S.* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลอง (pork model broth) ที่ผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และมีการทำให้ละลายอย่างรวดเร็วหรือการทำให้ละลายอย่างช้ามีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเหลืออยู่ร้อยละ 51.78 และ 48.51 ตามลำดับ เนื่องจากการที่การทำให้ละลายอย่างช้ามีผลต่อการทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ดีนั้น มีผู้อธิบายว่าในระหว่างการทำให้

ละลายอย่างช้ามีผลต่อการทำลายเซลล์มาก เนื่องจากผลึกน้ำแข็งมีการโตขึ้นในระหว่างการทำให้ละลายอย่างช้า ผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการลดจำนวนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อได้มีผู้รายงานไว้แล้ว ดังเช่นการศึกษาของ Zhao และคณะ (2003) ที่ศึกษาผลของการแช่แข็งต่อการยับยั้งการเจริญของ *Campylobacter jejuni* ในเนื้อไก่ โดยใช้อุณหภูมิในการแช่แข็งต่างกัน พบว่าเมื่อนำเนื้อไก่ที่เติมเชื้อ *C. jejuni* ความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อกรัม ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ของ *C. jejuni* ลดลง 1.3 และ 1.8 $\log_{10}$CFUต่อกรัม ตามลำดับ และพบว่าการเก็บรักษาที่อุณภูมิ -20 และ -86 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 สัปดาห์ *C. jejuni* ลดลงประมาณ 4 และ 0.5 $\log_{10}$CFU ต่อกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ Digirolamo และคณะ (1970) ได้ศึกษาผลของการแช่แข็งต่อการรอดชีวิตของ *Salmonella* ในหอยนางรม พบว่า *Salmonella* Derby และ *S.* Typhimurium ไวต่อการแช่แข็งมากและมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเหลืออยู่ไม่เกินร้อยละ 1 หลังจากการแช่แข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ดังนั้นการแช่แข็งและการทำให้ละลายอย่างช้าจึงเป็นวิธีควบคุมจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับการใช้เกลือของกรดอินทรีย์ได้ ซึ่งจะทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลงมากขึ้นและมีผลให้อาหารมีความปลอดภัยมากขึ้นและสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Yoon และคณะ (2004) พบว่าการเติมสารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมแลคเตตและโซเดียมไดอะซิเตต ที่ทุกระดับความเข้มข้นที่นำมาศึกษาสามารถลดจำนวนเซลล์ *L. monocytogenes* ที่รอดชีวิตบนเนื้อปลาแซลมอนรมควันที่มีการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 10 เดือน ขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส เก็บรักษาได้นาน 32 วัน และ 11 วัน ตามลำดับ ดังนั้นการใช้วิธีการควบคุมจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งวิธีจะช่วยให้ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารได้มากขึ้น และทำให้อาหารมีความปลอดภัยมากขึ้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแหนม ชนิดละ 30 ตัวอย่าง พบว่าเนื้อสุกรมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.6×10^{6}-2.3×10^{9} โคโลนีต่อกรัม แบคทีเรียโคลิฟอร์ม 240 ถึงมากกว่า 1100 MPN ต่อกรัม ส่วนใหญ่มีจำนวนโคลิฟอร์มมากกว่า 1100 MPN ต่อกรัม (ร้อยละ 96.67) พบ *Salmonella* ร้อยละ 86.67 และพบ *S. aureus* ร้อยละ 43.33 ส่วนการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของแหนมพบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 1.0×10^{8}-2.8×10^{8} โคโลนีต่อกรัม เชื้อราและยีสต์อยู่ในช่วง 1.0×10^{2}-6.9×10^{5} โคโลนีต่อกรัม ตรวจพบ *Salmonella* ร้อยละ 36.67, *S. aureus* ร้อยละ 26.67 และ *E. coli* ตั้งแต่น้อยกว่า 3.0 ถึงมากกว่า 1100 MPN ต่อกรัม และ *C. perfringens* ร้อยละ 6.67 นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อสุกรมีค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 5.65 และค่า a_w เฉลี่ยเท่ากับ 0.98 และในแหนมมีค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 4.60 และค่า a_w เฉลี่ยเท่ากับ 0.95

การศึกษาผลของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 8 ชนิด ได้แก่ *Salmonella* Rissen, *Salmonella* Typhimurium, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยใช้วิธีการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งได้ (Minimum Inhibitory Concentration ; MIC) ในอาหาร Mueller-Hinton broth ที่ปรับให้มีค่าพีเอชต่างกัน (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0) พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเกลือทั้งสามชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าในสภาพที่มีพีเอชต่ำ (พีเอช 4.5-5.5) โซเดียมแลคเตตมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทดสอบ และ *L. monocytogenes* ไวต่อโซเดียมแลคเตตมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่พีเอช 4.5 (ค่า MIC 23.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ *V. parahaemolyticus* สามารถต้านทานต่อโซเดียมแลคเตตได้ดีที่สุด (ค่า MIC มากกว่า 191.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และในสภาพที่มีพีเอชสูง (พีเอช 6.0-7.0) พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทดสอบโดยเฉพาะ *E. coli* ถูกยับยั้งการเจริญโดยโพแทสเซียมซอร์เบตได้ดีกว่าโซเดียมแลคเตตและโซเดียมอะซิเตต ส่วนประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยโซเดียมอะซิเตต พบว่าค่าพีเอชมีผลเล็กน้อยโดยเฉพาะในช่วง 5.0-6.5 ค่า MIC ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน และในช่วงพีเอช 4.5-7.0 โซเดียมอะซิเตตยับยั้งการเจริญของ *Y. enterocolitica* ได้ดีที่สุด (ค่า MIC 13.12-52.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่า *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* และ *E. coli* ต้านทานต่อโซเดียมอะซิเตตได้ดีที่สุด (ค่า MIC มากกว่า 210 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

การศึกษาการรอดชีวิตของ *S.* Rissen และ *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต หรือโพแทสเซียมซอร์เบต ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 1.91, 8.4 และ 2.56 มิลลิกรัมต่อกรัมของเนื้อสุกร ตามลำดับ แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำให้ละลายอย่างช้า พบว่าหลังจากผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต โพแทสเซียมซอร์เบตหรือเนื้อสุกรที่ไม่มีการเติมเกลือ ลดลงมากที่สุด โดยมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ 85.27, 87.69, 84.77 และ 88.28 ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากนั้นเมื่อทำการแช่แข็งต่อไปจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมโพแทสเซียมซอร์เบตลดลงมากกว่าในเนื้อสุกรที่เติมเกลือโซเดียมอะซิเตตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนการรอดชีวิตของ *S. aureus* พบว่าในทุกระยะเวลาที่ทำการแช่แข็งจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตตลดลงมากกว่าจำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรชุดอื่นๆ และพบว่าระยะเวลาในการแช่แข็งที่ทำให้จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตต มีจำนวนลดลงมากที่สุดคือ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ได้ศึกษาจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บและเซลล์ที่ตายของ *S.* Rissen และ *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต หรือโพแทสเซียมซอร์เบต และเนื้อสุกรที่ไม่มีการเติมเกลือ พบว่าการเติมเกลือเพียงอย่างเดียวทำให้ *S.* Rissen และ *S. aureus* ในเนื้อสุกรทุกชุด มีจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บมากกว่าการใช้ร่วมกับการแช่แข็ง และจำนวนเซลล์ *S.* Rissen และ *S. aureus* ที่ตายในเนื้อสุกรทุกชุด เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะใช้เกลือโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตตและโพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย ในการยับยั้งการเจริญของ *S.* Rissen และ *S. aureus* ในเนื้อสุกร แต่ควรใช้ความเข้มข้นของเกลือของกรดอินทรีย์ให้มากขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ นอกจากนี้ควรศึกษาผลของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับวัตถุกันเสียชนิดอื่นที่ใช้ในทางการค้า เช่น ไนเตรต ไนไตรต์ เบนโซเอต โพรพิโอเนต หรืออาจศึกษาผลของโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับวิธีการควบคุมจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น การใช้ความร้อน การใช้แรงดันสูงต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งสองชนิด อาจทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเพิ่มมากขึ้น

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2537. "ความเสี่ยงทางชีวภาพที่พบในเนื้อสัตว์." ใน สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. **ปัญหาสภาพความเสี่ยงในห่วงโซ่อาหารด้านผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โครงการวิเคราะห์ปัญหาสภาพความเสี่ยงในห่วงโซ่อาหารที่มีต่อผู้บริโภค.** 2547. กรุงเทพมหานคร : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

นงคราญ เรืองประพันธ์. 2543. "ความเสี่ยงทางชีวภาพที่พบในเนื้อสัตว์." ใน สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. **ปัญหาสภาพความเสี่ยงในห่วงโซ่อาหารด้านผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โครงการวิเคราะห์ปัญหาสภาพความเสี่ยงในห่วงโซ่อาหารที่มีต่อผู้บริโภค.** 2547. กรุงเทพมหานคร : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2547. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สงขลา : ภารกิจเอกสารและตำรา กลุ่มงานบริการการศึกษา มหาวิทยาลัยทักษิณ.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2534. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.** กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วันทนา อ่อนภิรมย์, เพิ่มพล สัตยพันธ์, นิพนธ์ อินทร์วัฒนา และกรชนก ขยันคิด. 2544. "การสำรวจการปนเปื้อนของ Enteric bacteria และ *Staphylococcus aureus* ในสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ของจังหวัดราชบุรี." **วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.** 3 : 206-210.

สุมาลี บุญมา, นพรัตน์ หมานริน, ศรีรัตน์ พรเรืองวงศ์ และอรุณ บ่างตระกูลนนท์. 2540. "การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลลาในผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่และเนื้อหมู." **วารสารเกษตรศาสตร์.** 31(4) : 413-418.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** นนทบุรี : เอส.บี.บิซิเนส.

สุรีย์ นานาสมบัติ, วาริพินทุ ประเสริฐศิลป์, กฤษณา ไกรสินธุ์, คุษณี ธนะบริพัฒน์ และ Hla Shain. 2545. "ประสิทธิภาพของ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ชนิดใหม่ สำหรับตรวจหา *Salmonella* อย่างรวดเร็วในอาหาร. " รายงานการวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม.

สุรีย์ นานาสมบัติ และกัญญารัตน์ จูปรางค์. 2547. ผลการปรับตัวต่อกรดของ *Salmonella* spp. ต่อการอยู่รอดในระหว่างการหมักแหนม. **วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง.** 13 (2) : 65-77.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2546. **วัตถุเจือปนอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร.** นครปฐม : ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adams, M. R. and Moss, M. O. 1995. **Food Microbiology.** Cambridge : Thomcis Graham House.

Al-Dagal, M. M., and Bazaraa, W. A. 1999. "Extension of shelf life of whole and peeled shrimp with organic acid salts and bifidobacteria." **Journal of Food Protection.** 62 : 51-56.

Anderson, M. E., Huff, H.E., Naumann, H. D., Marshall, R.T. 1988. "Counts of six types of bacteria on lamb carcasses dipped or sprayed with acetic acid at 25°C or 55°C and stored vacuum packed at 0°C." **Journal of Food Protection**. 51. 874.

Atanassova, V., Meindl, A. and Ring, C. 2001. "Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham— a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR." **International Journal of Food Microbiology.** 68 : 105-113.

Bacteriological Analytical Manual Online. U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, http : //www. cfsan. fda. gov/~ebam/bam-12.html.

Bendall, J. R. 1973. Post mortem changes in muscle. In Bourne, G. H. (ed.) **The structure and Function of muscle.** 2nd. New York : Academic Press.

Barsosa-Cánovas, G. V. Pothakamury, U. R. Palou, E. and Swanson, B. G. 1998. **Nonthermal Preservation of foods.** New York : Marcel Dekker.

Berends, B.R., Knapen, F. V., Mossel, D. A. A. Burt, S. A. and Snijders, J. M. A. 1998. "Impaction human health of *Salmonella* spp. on pork in The Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed control strategies." **International Journal of Food microbiology**. 44 : 219-229.

Bogaert, J-C. and Naidu, A. S. 2000. Lactic acid. In Naidu, A. S. (ed.) **Natural Food Antimicrobial Systems.** USA : CRC Press.

Ceylan, E., Fung, D. Y. C. and Sabah, J. R. 2004. "Antimicrobial activity and synergistic effect of cinnamon with sodium benzoate or potassium sorbate in controlling *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice." **Journal of Food Science.** 69 (4) : 102-106.

Chang, V. P., Mills, E. W. and Cutter, C. N. 2003. "Reduction of bacteria on pork carcasses associated with chilling method." **Journal of Food Protection**. 66 : 1019-1024.

Chen, N. and 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.

Costilow, R. N., Ferguson, W. E. and Ray, S. 1995. "Effect of sorbic acid on microorganisms associated with cucumber fermentations." **Applied Microbiology.** 3 : 341-345.

Daeschel, M. A. 1989. "Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives." **Food Technology.** 43 : 164-167.

Davidson, P. M. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In Davidson, P. M., Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. (eds.). **Food Microbiology.** 2nd Washington DC. : ASM Press.

Davidson, P. M. and Juneja, V. K. 1990. Antimicrobial agents In Branen, A. L., Davidson, P. M. and Salminen, S. (eds.). **Food additives.** New York : Maccel Dekker.

Digirolamo, R., Liston, J. and Matches, J. 1970. "The effects of freezing on the survival of *Salmonella* and *E. coli* in Pacific Oysters." **Journal of Food Science.** 35(1) : 13-16.

Doell, W. 1962. "The antimicrobial action of potassium sorbate." **Arch. Lebensmittelhyg.** 13 : 4-10.

Eklund, T. 1983. "The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels." **Journal of Applied Bacteriology.** 54 : 383-389.

El-Kest, S. E. and Marth, E. H. 1992. "Freezing of *Listeria monocytogenes* and other microorganisms: A review." **Journal of Food Protection**. 55 (8) : 639-648.

Emard, L. O. and Vaughn, R. H. 1952. "Selectivity of sorbic acid media for the catalase negative lactic acid bacteria and clostridia." **Journal of Bacteriology.** 63 : 487-497.

Empey, W. A. and Scott, W. J. 1939. "Investigation on chilled beef. I." **Microbial contamination acquired in the meatworks.** CSIRO Bull.

Fischer, C. and Hamm, R. 1978. Proceedings of the 24th Conference of European Meat Research Workers. Kulmbach, West Germany.

Frazier, W. C. and Westhoff, D. C. 1988. Preservation of use by low temperature In **Food Microbiology**. 4th. Singapore : McGraw-Hill.

Houtsma, P. C., DE Wit, J. C. and Rombouts, F. M. 1996. "Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate and sodium chloride for spoilage organisms and pathogens at different pH values and temperatures." **Journal of Food Protection**. 59 (12) : 1300-1304.

Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Maruyama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamamoto, S. and Kumagai, S. 2000. "Prevalence and contamination levels of *Listeroia monocytogenes* in retail foods in Japan." **International Journal of Food Microbiology.** 59 : 73-77.

Ita, P. and Hutkins, R. W. 1991. "Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acid." **Journal Food Protection.** 54 : 15-19.

Jay, J. M., Loessner, M. J. and Golden, D. A. 2005. Food protection with chemicals In **Modern Food Microbiology.** 7th. New York : Springer Science & Business Media.

Juneja, V. K. and Sofos, J. N. 2002. **Control of foodborne microorganisms**. New York. Marcel Dekker.

Juneja, V.K. and Thippareddi, H. 2004. "Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast." **International Journal of Food Microbiology**. 93 : 155-163.

Jung, Y. S. and Beuchat, L. R. 1999. "Survival of multidrung-resistant *Salmonella* Typhimurium DT 104 in egg powders as affected by water activity and temperature." **Journal Food Microbiology.** 49 : 1-8.

Kabara, J. J. and Eklund, T. 1991. Organic acids and esters. In Russell, N. J. and Gould, G.W. (eds.). **Food preservatives**. New York : Blackie and Son.

Kirby, G. W., Atkin, L., Frey, C. N. 1937. "Further studies on the growth of bread mold as influenced by acidity." **Cereal Chemistry.** 14 : 865.

Kuri, V., Madden, R. H. and Collin, M. A. 1996. "Hygienic quality of raw pork and chorizo (raw pork sausage) on retail sale in Mexico City." **Journal of Food Protection.** 59 (2) : 141-145.

LaRocco, K. A. and Martin, S. E. 1981. "Effects of potassium sorbate alone and in combination with sodium chloride on the growth of *Salmonella* Typhimurium 7136." **Journal of Food Science.** 46 (2) : 568-570.

Lawrie, R. A. 1974. **Meat science.** 2nd. Braunschweig. Pergamon Press.

Lee, Y., Cesario, T., Owens,J., Shanbrom, E. and Thrupp, L. D. 2002. "Antibacterial activity of citrate and acetate." **Nutrition.** 18 : 665-666.

Little, C. L., Monsey, H. A., Nichols, G. L. and Louvois J. D. 1998. "The microbiological quality of ready-to-eat dried and fermented meat and meat products." **International Journal of Environmental Health Reserch**. 8 (4) : 277-284.

Lopez, M., Martinez, S., Gonzalez, J., Martin, R. and Bernardo, A. 1998. "Sensitization of

thermally injured spores of *Bacillus stearothermophilus* to sodium benzoate and potassium sorbate." **Lett. Applied Microbiology.** 27 : 331-335.

Lowry, P. D. and Gill, C. O. 1985. Microbiology of frozen meat and meat products In Robinson, R. K. (ed). **Microbiology of frozen foods.** England : Elsevier Applied Science Publishers.

Lück, E. and Jager, M. 1995. Antimicrobial action of preservatives. In **Antimicrobial Food Additives.** 2nd. London.

Lund,B. M. and Eklund, T. 2000. Control of pH and use of organic acids. In Lund, B. M., Baird-Parker, C. and Gould, G. W. (eds.) **Microbiological Safety and Quality of food** Vol.I Maryland : Aspen Publishers.

MacLeod, R. A. and Calcott, P. H. 1976. Cold shock and freezing damage to microbes. In Gray, T. R. G. and Postgate, J. R. (eds.). **The survival of vegetative microbes.** 26th Symposium, Soc. Gen. Microbiology. New York : Cambridge University Press.

Mazur, P. 1970. "Cryobiology : the freezing of biological systems." **Science.** (168).

McMeekin, T. A., Pennington, P. I. and Thomas, C. J. 1984. "Effect of potassium sorbate on the microbiology of vacuum-packed poultry." **Journal of Food Safety.** 6 (4) : 261-270.

Merryman, H. T. 1966. **Cryobiology.** London : Academic Press.

Miller, A. J. 1992. "Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A." **Journal of Food Protection**. 55 : 414-418.

Moore, J. E. 2004. "Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats." **Meat Science**. 67 : 565-568.

Mountney, G. I. and Gould, W. A. 1988. "Red meat and poultry. In **Practical Food Microbiology and Technology.** 3rd. New York : Van Nostrand Reinhold.

Mrema, N., Mpuchane, S. and Gashe, B. A. 2006. "Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana." **Food Control.** 17 : 207-212.

Nanasombat, S. and Lohasuptawee, P. 2005. "Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against Salmonellae and other enterobacteria." **KMITL Science Technology Journal** 5 (3) : 527-538.

Nissen, H., Maugesten, T. and Lea, P. 2001. "Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* Enteritidis on decontaminated and untreated

meat." **Meat Science**. 57 : 291-298.

Nomoto, M., Narahashi, Y. and Niikawa, Y. 1955. "The effect of the medium pH on the antimicrobial action of sorbic acid." **Journal of Agricultural Chemistry Socity Japan.** 29 : 805-809.

Padungtod, P. and Kaneene, J. B. 2006. " *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand." **International Journal of Food Microbiology**. 108 : 346-354.

Ray, B. 1996. **Fundamental food microbiology**. New York : CRC Press.

Rice, K. M. and Pierson, M. D. 1982. "Inhibition of *Salmonella* by sodium nitrite and potassium sorbate in frankfurters." **Journal of Food Science.** 47 (5) : 1615-1617.

Robinson, R. K. 1985. **Microbiology of frozen foods**. London : Elsevier applied science publishers.

Sallam, Kh. I. and Samejima, K. 2004. "Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage." **Food Science and Technology/ Lebensmittel-Wissenschaft und Technology**. 37 : 865-871.

Samelis, J., Sofos, J. N., Kain, M. L., Scanga, J. A., Belk, K. E. and Smith, G. C. 2001. "Organic acids and their salts as dipping solution to control inoculated following processing of sliced pork bologna stored at 4 C in vacuum packages." **Journal of Food Protection**. 64 (11) : 1722-1729.

Sauer, C. J., Majkowski, J., Green, S. and Eckel, R. 1997. "Foodborne illness outbreak associated with a semi-dry fermented sausage product." **Journal of Food Protection.** 60 (12) : 1612-1617.

Scannell, A. G. M., Hill, C., Buckley, D. J. and Arendt, E. K. 1997. "Determination of organic acids and nisin on shelf-life and microbiological safety aspects of fresh pork sausage." **Journal of Applied Microbiology.** 83 (4) : 407-412.

Shelef, L. A. 1994. "Antimicrobial effects of lactates: A review." **Journal of Food Protection**. 57 : 445-450.

Smulders, F. J. M. 1995. Preservation by microbial decontamination ; the surface treatment of meats by organic acids In Gould, G. W. (ed). **New methods of food preservation.** London : Blackie Academic & Professional.

Sofos, J. N. 1989. **"Sorbate food preservatives**." Florida : CRC Press.

Sofos, J. N., Busta, F. F. and Allen, C. E. 1980. "Influence of pH on *Clostridium botulinum*

control by sodium nitrite and sorbic acid in chicken emulsions." **Journal of Food Science.** 45 : 7-12.

Stratford, M. and Eklund, T. 2003. Organic acids and esters In Russell, N. J. and Gould, G. W. (eds). **Food Presertives.** 2nd. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Tompkin, R. B., Christiansen, L. N., Shaparis, A. B. and Bolin, H. 1974. "Effect of potassium sorbate on Salmonellae, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, and *Clostridium botulinum* in cooked, uncured sausage." **Applied Microbiology**. 28 (2) : 262-264.

Tuitemwong P., Osiriphun S., Pongpoolponsak A. and Tuitemwong K. 2004. "Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. in fermented pork sausage (Nham)." plantpro.doae.go.th/ world fermentedfood/poster.htm

van der Gaag, M. A., Saatkamp, H. W., Backus, G B. C., van Beek, P. and Huirne, R B. M., 2004. "Cost-effectiveness of controlling in the pork chain." **Food control**. 15 : 173-180.

Visedsanguan, W., Benjakul, S., Smitinont, T., Kittikun, C. Thepkasikul, P. and Panya, A. 2006. "Changes in microbiological, biochemical and physico-chemical properties of Nham inoculated with different inoculum levels of *Lactobacillus curvatus*." **Science and Technology/ Lebensmittel-Wissenschaft und Technology.** 39 : 814-826.

Woolford, M. K. 1975. "Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C_1-C_{12}) as potential silage additives." **Journal of Science Food Agricultural.** 26 : 219.

Yoon, K. S., Burnette,ed C.N., Abou-Zeid, K. A. and Whiting, R.C. 2004. "Control of growth and survival of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon by combined potassium lactate and sodium diacetate and freezing stress during refringeration and frozen storage." **Journal of Food Protection**. 67 (11) : 2465-2471.

Zeothen, P. and Bøgh – Sørensen, L. 2003. The control of pH In **Food preservation techniques**. England : TJ International.

Zhao, T., Ezeike, G.O.I., Doyle, M.P., Hung, Yen-con and Howell, R.S. 2003. "Reduction of *Campylobacter jejuni* on poultry by low-temperature treatment." **Journal of Food Protection**. 66 (4) : 652-655.

ภาคผนวก ก

การศึกษาผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลอง (Pork Model Broth)

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลอง (Pork Model Broth)

2. เพื่อศึกษาผลของชนิดของการทำให้ละลายต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลอง (Pork Model Broth)

วัสดุอุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ ได้แก่ *Salmonella* Rissen SAP 08946/02

2. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Tryptic Soy Broth/Tryptic Soy Agar; TSB/TSA (TSB/ TSA, พีเอช 7.3 ± 0.2, Difco), Pork model broth และ Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD, พีเอช 7.4 ± 0.2, Difco)

3. เครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ ตู้บ่มเชื้อ ตู้เย็น ตู้เขี่ยเชื้อ เครื่องปั่นเหวี่ยง

วิธีการทดลอง

1.การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อ S. Rissen จาก stock culture ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงในอาหารวุ้นเอียง TSA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขี่ยลงในอาหารวุ้นเอียง TSA อีกครั้ง นำไปบ่มที่สภาวะเดิม และขีดแยกโคโลนีเดี่ยวบน TSA plate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อประมาณ 5 โคโลนี ลงในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์สองครั้งด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับ MaFarland เบอร์ 4 จะได้เชื้อความเข้มข้นเริ่มต้น 10^7 cfu ต่อมิลลิลิตร

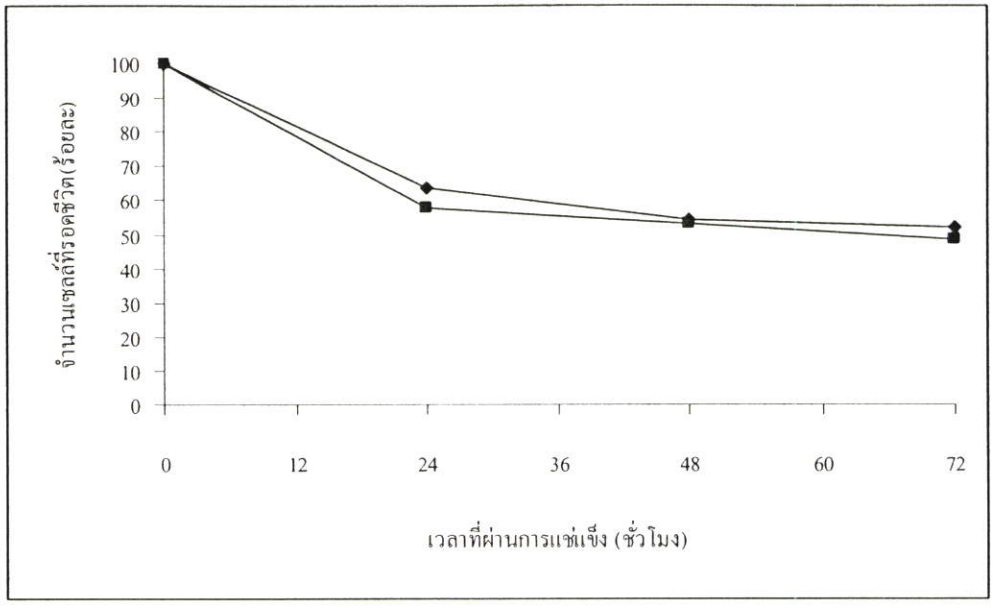
2.การศึกษาผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลอง (Pork Model Broth)

เมื่อปรับความขุ่นของเชื้อได้แล้ว ปิเปตสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน อาหารเหลว TSB ซึ่งมีปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -18 องศา เซลเซียส หาจำนวนเซลล์รอดชีวิตในชั่วโมงที่ 0 ด้วยเทคนิคการ spread plate ลงบน TSA และ XLD เพื่อนำไปหาจำนวนเซลล์บาดเจ็บ เมื่อแช่แข็งเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำออกมาทำให้ ละลายอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) และอย่างช้า (4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง) นำไปหาจำนวนเซลล์รอดชีวิตและเซลล์บาดเจ็บบน TSA และ XLD แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์บน TSA plate และ XLD

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการอยู่รอดของ *Salmonella* Rissen ใน อาหารเหลวหมูจำลอง ที่นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -22.7 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ และทำให้ ละลายอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือทำให้ละลายอย่างช้าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ ก 1 ซึ่งพบว่าเมื่อเวลาในการแช่แข็งเพิ่มขึ้น ปริมาณ เซลล์ที่รอดชีวิตของ *S.* Rissen ลดลงทั้งที่มีการทำให้ละลายอย่างรวดเร็วและการทำให้ละลายอย่าง ช้า และเมื่อเปรียบเทียบผลของการทำให้ละลายพบว่าการทำให้ละลายอย่างรวดเร็วทำให้จำนวน เซลล์ที่รอดชีวิตของ *S.* Rissen เหลืออยู่มากกว่าการทำให้ละลายอย่างช้า โดยหลังจากผ่านการแช่ แข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของ *S.* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลองที่ถูก ทำให้ละลายอย่างรวดเร็วและการทำให้ละลายอย่างช้าเหลืออยู่ร้อยละ 51.78 และ 48.51 ตามลำดับ ส่วนจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บและเซลล์ที่ตายของ *S.* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลองที่ถูกทำให้ ละลายอย่างรวดเร็วก็มีจำนวนน้อยกว่าที่ถูกทำให้ละลายอย่างช้า

การที่เซลล์ถูกยับยั้งโดยการแช่แข็งนั้นเนื่องมาจากเมื่อมีการแช่แข็ง น้ำอิสระที่อยู่ในอาหาร จะเปลี่ยนสถานะกลายเป็นน้ำแข็ง และทำให้น้ำที่อยู่ภายในเซลล์เคลื่อนที่ออกมายังนอกเซลล์ เพื่อ รักษาสมดุลออสโมติก ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และปริมาตรของ เซลล์ลดลง ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ และพบว่า ระยะเวลาในการทำให้ละลายมีผลต่อจำนวนเซลล์รอดชีวิต เนื่องจากการทำให้ละลายอย่างรวดเร็ว อุณหภูมิจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว และถ้าจุลินทรีย์ปรับตัวได้ก็จะสามารถเจริญต่อไปได้ ส่วนการทำให้ ละลายอย่างช้าทำให้แบคทีเรียต้องเผชิญกับสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำเป็นเวลานาน ซึ่งอุณหภูมิต่ำเป็น อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ ทำให้มีจำนวนลดลง



รูปที่ ก 1 ผลของการแช่แข็งและการทำให้ละลายต่อการอยู่รอดของ *S.* Rissen ในอาหารเหลวหมูจำลอง โดย (◆)ผ่านการทำให้ละลายอย่างรวดเร็ว และ (■)ผ่านการทำให้ละลายอย่างช้า

ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลาย

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สูตรอาหาร modified BHI-EY medium

Brain Heart Infusion (BHI)	37.0	กรัม
น้ำตาลแลคโตส	10.0	กรัม
ฟีนอลเรด	10.0	มิลลิลิตร
(ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95)		
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอช 7.6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วเติมไข่แดง (egg yolk) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงไป

1.2 สูตรอาหาร acidified Potato Dextrose Agar (acidified PDA)

potato dextrose broth	24.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 48 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายกรดทาร์ทาริก (tartaric acid) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 18.5 มิลลิลิตร ลงไป

1.3 สูตรอาหาร Koser's citrate broth

$NaNH_4HPO_4.4H_2O$	1.5	กรัม
KH_2PO_4 (monobasic)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSo_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมซิเตรต (sodium citrate.$2H_2O$)	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอชเป็น 6.7 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สูตรอาหาร Braid-Parker egg yolk agar (BPA)

Braid Parker agar	63.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายผสมระหว่างสารละลายไข่แดงและสารละลายเทลลูไรต์ (tellurite) โดยวิธีเตรียมสารละลายไข่แดงเป็นดังนี้ ปิเปตไข่แดง ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 35 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเทลลูไรต์ (tellurite) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตสารละลายผสม 30 มิลลิลิตร เติมลงใน Braid Parker agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.5 สูตรอาหาร Iron milk medium (modified)

นมสด	1,000	มิลลิลิตร
Ferrous sulfate.$7H_2O$	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร

ละลายเฟอร์รัสซัลเฟตในน้ำกลั่น เติมนมสดลงไปอย่างช้าๆจนครบ 1,000 มิลลิลิตร และผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 16 ×150 มิลลิลิตร หลอดละ 11 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที

1.6 สูตรอาหาร Lactose broth (LB)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
น้ำตาลแลคโตส	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าพีเอชเป็น 6.9 ± 0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา15 นาที

2. สารละลายเกลือของกรดอินทรีย์

2.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมแลคเตต ความเข้มข้น 459 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปิเปตสารละลายโซเดียมแลคเตต ความเข้มข้นร้อยละ 60 ปริมาตร 76.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 504 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) 50.4 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต ความเข้มข้น 604 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายโพแทสเซียมซอร์เบต 61.53 กรัม ด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์จุลินทรีย์และมาตรฐานผลิตภัณฑ์

1. วิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในเนื้อสุกรและแหนม (Bacteriological Analytical Manual online ; BAM online)

1. *Salmonella*

ชั่งเนื้อสุกรและแหนมตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นเติม lactose broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงไป นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 2 นาที แล้วเทลงในขวดฝาเกลียวปลอดเชื้อ ปิดฝาขวดแล้ววางตั้งทิ้งไว้ 60 นาที คลายเกลียวออก 1/4 รอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิดฝาขวดให้สนิทแล้วเขย่าตัวอย่าง จากนั้นปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดอาหาร RV และปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด TT นำทั้งสองหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมแบบหมุนวน แล้วปิเปตตัวอย่างจากหลอด RV และ TT หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหาร MSRV 5 จุด และขีดแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร XLD นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่ทำให้เกิดวงขุ่นบนอาหาร MSRV แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อด้านนอกสุดของโคโลนีลงในหลอด TSI และ LIM ส่วนบนอาหาร XLD เลือกโคโลนีที่มีสีชมพู ซึ่งอาจจะมีหรือไม่มีสีดำตรงกลางก็ได้ เขี่ยลงในหลอด TSI และ LIM เช่นเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าหากโคโลนีนั้นเป็น *Salmonella* จะพบว่าบริเวณผิวเอียงของหลอด TSI เป็นสีแดงและก้นหลอดเป็นสีเหลือง อาจจะมีหรือไม่มีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ก็ได้ ส่วนในหลอด LIM พบว่าอาหารขุ่น และเมื่อหยด Kovacs' reagent ลงไปบนผิวหน้า 2-3 หยด พบว่าเป็นวงแหวนสีเหลือง

2. *Staphylococcus aureus*

ชั่งเนื้อสุกรและแหนมตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงไป นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 1 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ถึงระดับความเจือจาง 10^{-2} ปิเปตตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2} ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร BP (ความเจือจางละ 2 ซ้ำ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 5-10 นับจำนวนโคโลนีและเขี่ยโคโลนีที่มีรอยขุ่นใต้โคโลนี และอาจมีโซนใสใต้รอยขุ่นนั้นลงในหลอดอาหาร TSA และอาหารเหลว BHI ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตน้ำเลือดกระต่าย (rabbit plasma) ลงไป 0.3 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เอียงหลอด 45 องศา ถ้าพบว่ามีตะกอนหรือลิ่มเกิดขึ้นแสดงว่าเป็น *S. aureus*

3. *Clostridium perfringens*

ชั่งแหนมตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงไป นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 1 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ถึงระดับความเจือจาง 10^{-2} ปิเปตตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2} ความเจือจางละ 1มิลลิลิตร ลงในหลอด cooked meat medium นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อจากก้นหลอดมาขีดแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร modified BHI นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณร้อยละ 5-10 นับจำนวนโคโลนีที่มีสีเหลืองและมีโซนขุ่นขาวรอบๆโคโลนี เขี่ยโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวลงในหลอด thioglycolate broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาย้อมสีแกรม ส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรจากหลอด thioglycolate broth ลงในหลอด Iron milk medium (modified) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สังเกตลักษณะการเกิด stormy fermentation ซึ่งจะมีการตกตะกอนของนมอย่างรวดเร็ว

4. *E. coli*

ชั่งแหนมตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงไป นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 1 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ตัวอย่างมีระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ปิเปตตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด LST ที่มีหลอดดักก๊าซ ความเจือจางละ 3 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำหลอดที่ให้ผลบวก(เกิดก๊าซ)ไปเทียบกับตาราง MPN และใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกลงในหลอดอาหาร EC หลอดต่อหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกมาขีดแยกโคโลนีเดี่ยวบน EMB agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีขนาดเล็ก สีเข้ม อาจจะมีหรือไม่มีลักษณะ metallic sheen ก็ได้ ประมาณ 5 โคโลนี ขีดลงหลอดอาหาร PCA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อมาย้อมสีแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำไปทดสอบ IMViC เพื่อยืนยันว่าเป็น *E. coli*

5. ยีสต์และรา

ชั่งแหนมตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ปลอดเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงไป นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 1 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} แล้วเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เพื่อให้ได้ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ปีเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร acidified PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (ถ้าไม่มีเชื้อขึ้นให้บ่มต่ออีก 2 วัน) แล้วนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร

6. แบคทีเรียโคลิฟอร์ม

ชั่งเนื้อสุกรตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อจากนั้นเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงไป นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 2 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางต่อไปด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนถึงระดับความเจือจาง 10^{-3} ปีเปตตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจาง (10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหาร LST ที่มีหลอดดักก๊าซ ความเจือจางละ 3 หลอด นำหลอดอาหารทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่ให้ผลบวก แล้วนำหลอดที่เกิดก๊าซไปทดสอบขั้นยืนยันต่อไปโดยใช้ลูปที่ปราศจากเชื้อถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร LST ทุกหลอดที่เกิดก๊าซ 1 ลูปเต็ม ลงในหลอดอาหาร BGLB ที่มีหลอดดักก๊าซหลอดต่อหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดก๊าซ และนับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซเพื่อยืนยันการเกิดก๊าซของหลอดอาหาร LST นำไปคำนวณหาค่า MPN ของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม จากตาราง MPN

7. จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

ชั่งเนื้อสุกรและแหนมตัวอย่างละ 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อจากนั้นเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตรลงไป นำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่นเป็นเวลา 1 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางต่อไปด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้มีระดับความเจือจางเท่ากับ 10^{-6} และ 10^{-7} (ความเจือจางละ 2 ซ้ำ) จากนั้นหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธี pour plate ลงในอาหาร PCA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญในอาหาร

2. มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (เนื้อสุกร) มกอช.6000-2547

1 ขอบข่าย

มาตรฐานเนื้อสุกรนี้ เป็นมาตรฐานของเนื้อจากสัตว์ในวงศ์ Suidae โดยเป็นเนื้อสดที่ยังไม่ผ่านกระบวนการแปรรูป ครอบคลุมจากโรงฆ่าสัตว์ถึงการขนส่งสู่ตลาด

2. บทนิยาม

2.1 ซากสุกร (pig carcass) หมายถึง ส่วนร่างกายทั้งหมดของสุกรหลังเอาเลือด ขน หัว เครื่องใน มันเปลว และเล็บออกแล้ว

2.2 เนื้อสุกร (pork) หมายถึง เนื้อเยื่อจากซากสุกรซึ่งสามารถใช้บริโภคเป็นอาหารได้ โดยมีกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) จากสุกรเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในปริมาณสูงสุด อาจผ่านกระบวนการแช่เย็น แต่ยังไม่ได้ถูกกระทำใดๆ อย่างอื่นเพื่อวัตถุประสงค์ในการถนอมอาหาร และต้องเป็นไปตามข้อกำหนดในมาตรฐานนี้

2.3 หนังสุกร (skin) หมายถึง ส่วนของหนังที่เลาะออกมาจากซากสุกร และผ่านกระบวนการขูดขนแล้ว

2.4 เครื่องใน (offal) หมายถึง อวัยวะภายในที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่าสามารถบริโภคได้

2.5 ไขมันสุกร (fat) หมายถึง ส่วนของซากสุกรที่เป็นเนื้อเยื่อไขมัน ที่ได้แยกส่วนของกล้ามเนื้อและกระดูกออกแล้ว

2.6 มันเปลวสุกร (fat leaf) หมายถึง มันของสุกรที่ไม่ได้ติดอยู่กับชั้นผิวหนัง

2.7 เลือดสุกร (blood) หมายถึง ของเหลวที่อยู่ในเลือดและหัวใจของสุกร ปกติมีสีแดง

2.8 สุกรผ่าซีก (side)หมายถึง ซากสุกรที่ถูกตัดแบ่งครึ่งตามแนวของกระดูกสันหลัง

2.9 ส่วนหัว (head) หมายถึง ส่วนของหัวสุกรที่ตัดออกจากร่างกายสุกรบริเวณกระดูกสันหลังส่วนคอข้อที่ 1

3. ประเภท

เนื้อสุกรแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

3.1 ประเภทผ่าซีก

3.2 ประเภทแยกชิ้น ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ 1

4. คุณภาพ

4.1 เนื้อสุกรตามมาตรฐานนี้ ต้องมีคุณสมบัติดังนี้

4.1.1 อยู่ในสภาพปกติ สะอาด ไม่มีกลิ่นผิดปกติ กลิ่นแปลกปลอม หรือกลิ่นไม่พึงประสงค์ และต้องไม่มีรอยฟกช้ำ รอยขีดข่วน หรือแผลหนอง

4.1.2 มีสีชมพูปนเทาจนถึงชมพูเข้ม โดยตรวจดูที่กล้ามเนื้อสันนอก (Longissimus dorsi) ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ 2

4.1.3 มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ไม่ต่ำกว่า 5.7 หลังฆ่า 1 ชั่วโมง และ/หรือ มีความเป็นกรดด่างไม่เกิน 6.2 หลังฆ่าที่ 24 ชั่วโมง โดยวัดที่กล้ามเนื้อ Longissimus dorsi หรือ Semimembranosus

4.1.4 มีปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ คือ มากที่สุด มาก ปานกลาง และน้อย ดังแสดงในภาคผนวก ก รูปที่ 3 การทดสอบให้ทำโดยการตรวจพินิจ

4.1.5 ปราศจากวิการของโรคติดเชื้อและพยาธิต่างๆ

4.1.6 ปราศจากพยาธิในเนื้อ ได้แก่ *Trichinella spiralis*, *Cysticercus cellulosae*, *Sarcocystis* spp. เป็นต้น

4.1.7 ปราศจากสิ่งแปลกปลอมที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

4.2 คุณภาพซาก

ซากสุกรแบ่งตามคุณภาพ (เกรดของซาก) ดังแสดงในภาคผนวก ข

5. สารปนเปื้อน

ปริมาณสารปนเปื้อนที่พบในเนื้อสุกรให้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมายที่เกี่ยวข้อง และข้อกำหนดของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติเรื่อง สารปนเปื้อน

6. สารพิษตกค้าง

ปริมาณสารพิษตกค้างที่พบในเนื้อสุกรให้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมายที่เกี่ยวข้อง และข้อกำหนดของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติเรื่อง สารพิษตกค้าง

7. ยาสัตว์ตกค้าง

ปริมาณยาสัตว์ตกค้างที่พบในเนื้อสุกรให้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมายที่เกี่ยวข้อง และข้อกำหนดของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติเรื่อง ยาสัตว์ตกค้าง

8. สุขลักษณะ

8.1 การผลิตเนื้อสุกรต้องปฏิบัติอย่างถูกสุขลักษณะ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค โดยให้เป็นไปตามข้อกำหนดของกฎหมายที่เกี่ยวข้อง และข้อกำหนดของมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติเรื่อง การปฏิบัติที่ดีสำหรับโรงฆ่าสุกร

8.2 ข้อกำหนดด้านจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนเนื้อสุกร ต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

8.2.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน $5x10^5$ โคโลนี ต่อตัวอย่าง 1 กรัม วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 966.23C หรือวิธีการทดสอบที่เทียบเท่า

8.2.2 โคลิฟอร์ม (Coliform organisms) กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ต้องไม่เกิน $5x10^3$ วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 966.24 หรือวิธีการทดสอบที่เทียบเท่า

8.2.3 ซาลโมเนลลา (*Salmonella* spp.) ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 967.26 หรือวิธีการทดสอบที่เทียบเท่า

8.2.4 สตาฟิโลคอคคัส ออเรียส (*Staphylococus aureus*) กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ต้องไม่เกิน $1x10^2$ วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 975.55 หรือวิธีการทดสอบที่เทียบเท่า

9. การบรรจุและเก็บรักษา

ในกรณีที่มีการบรรจุเนื้อสุกรในบรรจุภัณฑ์ ให้ปฏิบัติดังนี้

9.1 เนื้อสุกรต้องบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่สะอาด และปิดมิดชิดเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากภายนอก มีความทนทานต่อการขนส่งและสามารถป้องกันการดูดซึมของกลิ่นได้

9.2 เนื้อสุกรที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์แล้วต้องเก็บให้มีอุณหภูมิภายในของเนื้อไม่สูงกว่า 10 องศาเซลเซียสตลอดเวลา แต่ต้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง หรือมีอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสตลอดเวลา แต่ต้องไม่เกิน 7 วัน

9.3 เนื้อสุกรต้องเก็บไม่ให้ปนเปื้อน กลิ่น จากแหล่งและสภาพแวดล้อม

9.4 เนื้อสุกรต้องถูกเก็บในภาชนะหรือวัสดุที่ทนทานต่อการฉีกขาดและเป็นรู เมื่อเก็บรักษาในที่อุณหภูมิต่ำ

10. เครื่องหมายและฉลาก

เนื้อสุกรทุกหน่วยอย่างน้อยต้องมีหมายเลข อักษร และเครื่องหมาย แจ้งรายละเอียดให้เห็นได้ง่ายชัดเจนดังต่อไปนี้

10.1 ประเภทของเนื้อสุกร

10.2 คุณภาพซาก

10.3 น้ำหนักสุทธิ เป็นกรัมหรือกิโลกรัม

10.4 อุณหภูมิที่เก็บรักษา และวัน เดือน ปี ที่ตัดแต่งและบรรจุ วันเดือนปี ที่หมดอายุ

10.5 ชื่อผู้ผลิตหรือฟาร์มที่ผลิต หรือผู้จัดจำหน่าย หรือเครื่องหมายการค้า และสถานที่ตั้ง ในกรณีที่ฉลากใช้ภาษาต่างประเทศต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้

10.6 การแสดงเครื่องหมายการตรวจสอบทางราชการหรือเครื่องหมายรับรองให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์เงื่อนไขของหน่วยตรวจหรือหน่วยรับรองที่ได้รับการยอมรับจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (แหนม) มผช. 145/2546

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ครอบคลุมแหนมที่ทำจากเนื้อหมู หนังหมู หูหมูและจมูกหมู ไม่ครอบคลุมแหนมกระดูกหมูอ่อน แหนมข้อไก่และอื่นๆ

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 แหนม หมายถึง ผลิตภัณฑ์ทำจากเนื้อหมูส่วนสะโพกที่แยกไขมันและเอ็นออกแล้ว ผสมกับหนังหมู อาจผสมหูหมูหรือจมูกหมูที่ต้มสุกและหั่นเป็นเส้นแล้ว เติมเกลือ ข้าวสุก กระเทียมบด น้ำตาลทราย ผสมให้เข้ากัน อาจเติมพริกสดด้วยก็ได้ ห่อเป็นมัด หรือบรรจุในภาชนะบรรจุลักษณะอื่นๆ หมักจนมีรสเปรี้ยว

3. คุณลักษณะที่ต้องการ

3.1 ลักษณะทั่วไป

ในภาชนะบรรจุเดียวกัน ต้องมีรูปทรงเดียวกัน และมีขนาดใกล้เคียงกัน มีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้ทำผสมกันอย่างทั่วถึง ลักษณะเนื้อแน่น ไม่มีโพรงอากาศ และมีน้ำที่เกิดจากการหมักได้เล็กน้อย

3.2 สี

ต้องมีสีชมพูตามธรรมชาติของแหนม

3.3 กลิ่นรส

ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติที่เกิดจากการหมักของส่วนประกอบที่ใช้ มีรสเปรี้ยวพอเหมาะ ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นเหม็น

3.4 ลักษณะเนื้อสัมผัส

ต้องเนื้อแน่น ไม่ยุ่ย

เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ 8.1 แล้วต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจากผู้ตรวจสอบทุกคนไม่น้อยกว่า 3 คะแนน และไม่มีลักษณะใดได้ 1 คะแนน จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง

3.5 สิ่งแปลกปลอม

ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

๓.๖ วัตถุเจือปนอาหาร

๓.๖.๑ ห้ามใช้สีผสมอาหารทุกชนิด

๓.๖.๒ หากมีการใช้วัตถุเจือปนอาหาร ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กำหนดดังต่อไปนี้

๓.๖.๒.๑ โซเดียมไนไทรต์หรือโพแทสเซียมไนไทรต์ (คำนวณเป็นโซเดียมไนไทรต์) ต้องไม่เกิน ๑๒๕ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือถ้าใช้ในรูปของผงเพรก (เกลือ : เกลือไนไตรท์ ในสัดส่วนร้อยละ ๙๔ : ๖) ต้องไม่เกิน ๒ กรัมต่อเนื้อสัตว์ ๑ กิโลกรัม

๓.๖.๒.๒ ฟอสเฟตในรูปของโมโน- ได- และโพลิของเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียมอย่างใดอย่างหนึ่งหรือรวมกันในผลิตภัณฑ์สำเร็จ (คำนวณเป็น P_2O_5 จากฟอสฟอรัสทั้งหมด) ต้องไม่เกิน ๓ ๐๐๐ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

๓.๗ ความเป็นกรด-ด่าง

ต้องไม่เกิน ๔.๖

๓.๘ จุลินทรีย์

๓.๘.๑ ซาลโมเนลลา ต้องไม่พบในตัวอย่าง ๒๕ กรัม

๓.๘.๒ สตาฟิโลค็อกคัส ออเรียส ต้องไม่พบในตัวอย่าง ๐.๑ กรัม

๓.๘.๓ คลอสตริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ ต้องไม่พบในตัวอย่าง ๐.๑ กรัม

๓.๘.๔ เอสเชอริเชีย โคไล โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า ๓ ต่อตัวอย่าง ๑ กรัม

๓.๘.๕ ยีสต์และรา ต้องน้อยกว่า ๑๐ โคโลนีต่อตัวอย่าง ๑ กรัม

๓.๙ พยาธิ

พยาธิทริคิเนลลา สไปราลิส ต้องไม่พบในตัวอย่าง ๑๐๐ กรัม

๔. สุขลักษณะ

๔.๑ สุขลักษณะในการทำแหนม ให้เป็นไปตามคำแนะนำตามภาคผนวก ก.

๕. การบรรจุ

๕.๑ ให้บรรจุแหนมในภาชนะบรรจุที่สะอาด แห้ง ผนึกได้เรียบร้อย และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้

๕.๒ น้ำหนักสุทธิของแหนมในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

๖. เครื่องหมายและฉลาก

๖.๑ ที่ภาชนะบรรจุแหนมทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

(๑) ชื่อเรียกผลิตภัณฑ์ เช่น แหนมหูหมู แหนมตุ้ม

(๒) วัตถุเจือปนอาหาร (ถ้าใช้)

(๓) น้ำหนักสุทธิ

(๔) วัน เดือน ปีที่เริ่มบริโภคได้

(๕) วัน เดือน ปี ที่ทำและวัน เดือน ปีที่หมดอายุ หรือข้อความว่า "ควรบริโภคก่อน (วัน เดือน ปี)"

(๖) ข้อแนะนำในการเก็บรักษาและการบริโภค เช่น ควรเก็บไว้ในที่เย็น เพื่อความปลอดภัยและรสชาติที่ดี เริ่มบริโภคได้ (วัน เดือน ปี)

(๗) ชื่อผู้ทำ หรือสถานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน

ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

๗. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

๗.๑ รุ่น ในที่นี้ หมายถึง แหนมที่มีส่วนประกอบเดียวกัน ทำในระยะเวลาเดียวกัน

๗.๒ การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้

๗.๒.๑ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบสิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน ๓ หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตาม ข้อ ๓.๕ ข้อ ๕. และข้อ ๖. จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๒.๒ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัส ให้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบตามข้อ ๗.๒.๑ แล้ว จำนวน ๓ หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๑ ถึงข้อ ๓.๔ จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๒.๓ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบวัตถุเจือปนอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง และจุลินทรีย์ ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน ๕ หน่วยภาชนะบรรจุ นำมาทำเป็นตัวอย่างรวม โดยมีน้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า ๕๐๐ กรัม เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๖ ถึงข้อ ๓.๘ จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๒.๔ การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบพยาธิ ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน ๓ หน่วยภาชนะบรรจุ นำมาทำเป็นตัวอย่างรวม โดยมีน้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า ๕๐๐ กรัม เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ ๓.๙ จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

๗.๓ เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างแหนมต้องเป็นไปตามข้อ ๗.๒.๑ ข้อ ๗.๒.๒ ข้อ ๗.๒.๓ และข้อ ๗.๒.๔ ทุกข้อ จึงจะถือว่าแหนมรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้

๘. การทดสอบ

๘.๑ การทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัส

๘.๑.๑ ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบแหนมอย่างน้อย ๕ คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

๘.๑.๒ นำตัวอย่างแหนมมาตรวจสอบโดยพิจารณาจากแหนมดิบ โดยการตรวจพินิจและชิม

๘.๑.๓ หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามตารางที่ ๑

ตารางที่ ๑ หลักเกณฑ์การให้คะแนน

(ข้อ ๘.๑.๓)

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	ระดับการตัดสิน (คะแนน)			
		ดีมาก	ดี	พอใช้	ต้องปรับปรุง
ลักษณะทั่วไป	ในภาชนะบรรจุเดียวกัน ต้องมีรูปทรงเดียวกันและมีขนาดใกล้เคียงกันมีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้ทำผสมกันอย่างทั่วถึง ลักษณะเนื้อแน่น ไม่มีโพรงอากาศ และมีน้ำที่เกิดจากการหมักได้เล็กน้อย	๔	๓	๒	๑
สี	ต้องมีสีชมพูตามธรรมชาติของแหนม	๔	๓	๒	๑
กลิ่นรส	ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติที่เกิดจากการหมักและของส่วนประกอบที่ใช้ มีรสเปรี้ยวพอเหมาะ ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นอับ กลิ่นเหม็น	๔	๓	๒	๑
ลักษณะเนื้อสัมผัส	ต้องมีเนื้อแน่น ไม่ยุ่ย	๔	๓	๒	๑

๘.๒ การทดสอบสิ่งแปลกปลอม ภาชนะบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก
ให้ตรวจพินิจ

๘.๓ การทดสอบวัตถุเจือปนอาหารและความเป็นกรด-ด่าง
ให้ใช้วิธีทดสอบตาม AOAC หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

๘.๔ การทดสอบจุลินทรีย์
ให้ใช้วิธีตาม AOAC หรือ BAM หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

๘.๕ การทดสอบพยาธิ
ให้ใช้วิธีส่องด้วยกล้องทริคิโนสโกป หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

๘.๖ การทดสอบน้ำหนักสุทธิ
ให้ใช้เครื่องชั่งที่เหมาะสม

ภาคผนวก ก.
สุขลักษณะ
(ข้อ ๔.๑)

ก.๑ สถานที่ตั้งและอาคารที่ทำ

ก.๑.๑ สถานที่ตั้งตัวอาคารและที่ใกล้เคียง อยู่ในที่ที่จะไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ทำเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย โดย

ก.๑.๑.๑ สถานที่ตั้งตัวอาคารและบริเวณโดยรอบ สะอาด ไม่มีน้ำขังแฉะและสกปรก

ก.๑.๑.๒ อยู่ห่างจากบริเวณหรือสถานที่ที่มีฝุ่น เขม่า ควัน มากผิดปกติ

ก.๑.๑.๓ ไม่อยู่ใกล้เคียงกับสถานที่น่ารังเกียจ เช่น บริเวณเพาะเลี้ยงสัตว์ แหล่งเก็บหรือกำจัดขยะ

ก.๑.๒ อาคารที่ทำมีขนาดเหมาะสม มีการออกแบบและก่อสร้างในลักษณะที่ง่ายแก่การบำรุงรักษา การทำความสะอาด และสะดวกในการปฏิบัติงาน โดย

ก.๑.๒.๑ พื้น ฝาผนัง และเพดานของอาคารที่ทำ ก่อสร้างด้วยวัสดุที่คงทน เรียบ ทำความสะอาด และซ่อมแซมให้อยู่ในสภาพที่ดีตลอดเวลา

ก.๑.๒.๒ แยกบริเวณที่ทำออกเป็นสัดส่วน ไม่อยู่ใกล้ห้องสุขา ไม่มีสิ่งของที่ไม่ใช้แล้วหรือไม่เกี่ยวข้องกับการทำอยู่ในบริเวณที่ทำ

ก.๑.๒.๓ พื้นที่ปฏิบัติงาน ไม่แออัด มีแสงสว่างเพียงพอ และมีการระบายอากาศที่เหมาะสม

ก.๒ เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ในการทำ

ก.๒.๑ ภาชนะหรืออุปกรณ์ในการทำที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ ทำจากวัสดุมีผิวเรียบ ไม่เป็นสนิม ล้างทำความสะอาดได้ง่าย

ก.๒.๒ เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ สะอาด เหมาะสมกับการใช้งาน ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนติดตั้งได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอ รวมทั้งสามารถทำความสะอาดได้ง่ายและทั่วถึง

ก.๓ การควบคุมกระบวนการทำ

ก.๓.๑ วัตถุดิบและส่วนผสมในการทำ สะอาด มีคุณภาพดี มีการล้างหรือทำความสะอาดก่อนนำไปใช้

ก.๓.๒ การทำ การเก็บรักษา การขนย้าย และการขนส่ง มีการป้องกันการปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์

ก.๔ การสุขาภิบาล การบำรุงรักษา และการทำความสะอาด

ก.๔.๑ น้ำที่ใช้ล้างทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์ และมือของผู้ทำ เป็นน้ำสะอาดและมีปริมาณเพียงพอ

ก.๔.๒ มีวิธีการป้องกันและกำจัดสัตว์นำเชื้อ แมลงและฝุ่นผง ไม่ให้เข้าในบริเวณที่ทำตามความเหมาะสม

ก.๔.๓ มีการกำจัดขยะ สิ่งสกปรก และน้ำทิ้ง อย่างเหมาะสม เพื่อไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนกลับลงสู่ผลิตภัณฑ์

ก.๔.๔ สารเคมีที่ใช้ล้างทำความสะอาด และใช้กำจัดสัตว์นำเชื้อและแมลง ใช้ในปริมาณที่เหมาะสม และเก็บแยกจากบริเวณที่ทำ เพื่อไม่ให้ปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์ได้

ก.๕ บุคลากรและสุขลักษณะของผู้ทำ

ผู้ทำทุกคน ต้องรักษาความสะอาดส่วนบุคคลให้ดี เช่น สวมเสื้อผ้าที่สะอาด มีผ้าคลุมผมเพื่อป้องกันไม่ให้เส้นผมหล่นลงในผลิตภัณฑ์ ไม่ไว้เล็บยาว ล้างมือให้สะอาดทุกครั้งก่อนปฏิบัติงาน หลังการใช้ห้องสุขา และเมื่อมือสกปรก

ภาคผนวก ง

1. การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ในแต่ละหลุม

สารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ความเข้มข้น x มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นคือ

สารละลาย 1,000 ไมโครลิตร มีเนื้อสาร x มิลลิกรัม

สารละลาย 100 ไมโครลิตร มีเนื้อสาร $\frac{x}{10}$ มิลลิกรัม

เติมอาหาร MHB 100 ไมโครลิตร

ดังนั้นในหลุมมีปริมาตรทั้งหมด 200 ไมโครลิตร มีเนื้อสาร $\frac{x}{20}$ มิลลิกรัม

เติมเชื้ออีก 20 ไมโครลิตร ดังนั้น ในหลุมที่ 1 มีปริมาตรทั้งหมด 120 ไมโครลิตร

ปริมาตร 120 ไมโครลิตร มีเนื้อสาร $= \frac{x}{20}$ มิลลิกรัม

ถ้าปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร มีเนื้อสาร $= \frac{x}{20} \times \frac{1,000}{120}$ มิลลิกรัม

$= \frac{5x}{12}$ มิลลิกรัม

ดังนั้นในหลุมที่ 1 มีความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ $\frac{5x}{12}$ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

ผลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกร 30 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ค่า pH	ค่า a_w	จุลินทรีย์ที่วิเคราะห์			
			จุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัม)	แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (MPN ต่อกรัม)	*Salmonella* spp.	*Staphylococcus aureus* (โคโลนีต่อกรัม)
1	5.86	0.96	2.29×10^{9}	> 1100	-	3.8×10^{5}
2	5.67	0.98	2.14×10^{9}	> 1100	+	2.6×10^{6}
3	5.56	0.98	1.9×10^{8}	> 1100	-	-
4	5.88	0.98	3.18×10^{8}	> 1100	+	-
5	5.72	0.93	2.63×10^{9}	> 1100	+	2.7×10^{6}
6	5.51	0.97	4.65×10^{6}	> 1100	+	2.5×10^{5}
7	5.65	0.97	1.7×10^{8}	> 1100	+	-
8	5.83	0.98	1.1×10^{8}	> 1100	+	-
9	5.50	0.96	2.3×10^{9}	240	+	-
10	5.54	0.98	2.4×10^{9}	> 1100	-	4.2×10^{2}
11	5.72	0.99	1.8×10^{9}	> 1100	+	-
12	5.68	0.98	3.42×10^{7}	> 1100	+	-
13	5.80	0.98	5.89×10^{8}	> 1100	+	-
14	6.01	0.97	8.23×10^{6}	> 1100	+	2.3×10^{5}
15	5.53	0.97	5.1×10^{8}	> 1100	+	-
16	5.61	0.98	3.5×10^{8}	> 1100	+	3.0×10^{2}
17	5.77	0.98	6.24×10^{8}	> 1100	+	2.96×10^{6}
18	5.84	0.98	4.6×10^{6}	> 1100	+	7.6×10^{5}
19	5.53	0.97	8.35×10^{6}	> 1100	+	5.2×10^{6}
20	5.59	0.98	3.8×10^{8}	> 1100	+	-
21	5.64	0.97	1.56×10^{8}	> 1100	+	2.0×10^{3}
22	5.72	0.98	1.75×10^{9}	> 1100	+	5.0×10^{6}
23	5.55	0.98	4.67×10^{7}	> 1100	-	-
24	5.53	0.98	1.22×10^{9}	> 1100	+	-
25	5.59	0.98	1.0×10^{9}	> 1100	+	1.57×10^{5}
26	5.51	0.98	1.45×10^{9}	> 1100	+	-
27	5.52	0.97	2.2×10^{9}	> 1100	+	-
28	5.57	0.98	1.7×10^{9}	> 1100	+	-
29	5.65	0.98	6.25×10^{6}	> 1100	+	-
30	5.50	0.98	5×10^{8}	> 1100	+	-

หมายเหตุ + พบในตัวอย่าง 25 กรัม

- ไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม

ตารางที่ จ.2 คุณภาพทางจุลินทรีย์ของแหนม

ตัวอย่าง	ค่า pH	ค่า a_w	จุลินทรีย์ที่วิเคราะห์					
			จุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัม)	*C. perfringens* (โคโลนีต่อกรัม)	*E. coli* (MPN ต่อกรัม)	*S. aureus* (โคโลนีต่อกรัม)	*Salmonella* spp.	ยีสต์และรา (โคโลนีต่อกรัม)
1	4.20	0.93	2.5×10^8	-	< 3.0	-	+	1.09×10^4
2	4.13	0.95	2.12×10^8	-	< 3.0	-	-	6.6×10^5
3	4.34	0.94	1.31×10^8	-	< 3.0	-	-	1.0×10^3
4	4.22	0.93	1.03×10^8	-	< 3.0	-	-	9.1×10^3
5	5.10	0.95	1.5×10^8	-	< 3.0	-	+	2.0×10^2
6	4.71	0.95	2.85×10^8	-	93	5.9×10^3	-	-
7	4.40	0.94	1.0×10^8	-	1100	2.5×10^3	+	-
8	4.51	0.93	1.2×10^8	-	460	1.6×10^3	-	2.9×10^5
9	4.66	0.93	2.1×10^8	-	> 1100	-	-	4.5×10^5
10	4.56	0.93	2.0×10^8	-	< 3.0	-	-	7.3×10^2
11	4.95	0.95	2.5×10^8	-	< 3.0	-	+	1.1×10^3
12	4.56	0.94	1.25×10^8	1.0×10^2	< 3.0	-	-	1.83×10^3
13	5.48	0.94	2.36×10^8	-	> 1100	3.6	+	2.2×10^3
14	4.63	0.94	1.07×10^8	-	290	-	-	1.85×10^4
15	4.71	0.94	1.37×10^8	-	23	-	-	1.01×10^4
16	5.24	0.95	2.48×10^8	-	7.4	-	-	6.0×10^3
17	4.82	0.96	1.98×10^8	-	< 3.0	-	-	1.45×10^3
18	4.74	0.95	1.60×10^8	1.0×10^2	9.2	-	+	5.0×10^2
19	5.28	0.96	1.87×10^8	-	9.2	-	+	2.36×10^4
20	4.79	0.96	1.43×10^8	-	< 3.0	-	+	3.35×10^4
21	4.51	0.94	2.71×10^8	-	460	2.81×10^3	+	1.9×10^3
22	4.47	0.94	1.88×10^8	-	< 3.0	6.03×10^2	-	2.5×10^3
23	4.35	0.94	2.23×10^8	-	21	4.23×10^2	-	6.7×10^3
24	4.22	0.96	2.09×10^8	-	36	-	+	5.5×10^2
25	4.23	0.98	2.56×10^8	-	< 3.0	-	-	1.6×10^3
26	4.27	0.98	1.32×10^8	-	43	4.0×10^2	-	1.0×10^2
27	4.27	0.98	1.76×10^8	-	< 3.0	-	-	1.0×10^2
28	4.39	0.97	2.03×10^8	-	< 3.0	-	+	2.3×10^3
29	4.29	0.94	2.39×10^8	-	20	-	-	6.9×10^5
30	4.83	0.95	2.79×10^8	-	> 1100	-	-	-
เฉลี่ย	4.60	0.95						

หมายเหตุ + พบในตัวอย่าง 25 กรัม

- ไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม

ตารางที่ จ.3 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 1

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด		โซเดียมอะซิเตด		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival
0	6.4935	100	6.2565	100	6.6946	100	6.2553	100
12	6.0755	93.56	5.8976	94.26	5.7404	85.75	6.0414	96.58
24	5.3160	81.87	5.4094	86.46	5.1818	77.40	5.8921	94.19
48	5.3579	82.51	5.4698	87.42	5.0969	76.13	5.2553	84.01
72	5.2014	80.10	5.3531	85.56	5.0969	76.13	5.2041	83.20

ตารางที่ จ.4 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 2

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด		โซเดียมอะซิเตด		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival
0	6.4945	100	6.3135	100	6.4106	100	6.6232	100
12	6.2878	96.82	5.9542	94.31	6.0128	93.79	6.1875	93.42
24	5.5966	86.17	5.5119	87.30	5.6946	88.83	5.5441	83.71
48	6.0043	92.45	5.4983	87.09	5.3160	82.92	5.3222	80.36
72	5.6385	86.82	5.4843	86.87	5.2122	81.30	5.2788	79.70

ตารางที่ จ.5 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 3

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด		โซเดียมอะซิเตด		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	Log CFU/ml	% survival
0	6.2148	100	6.0000	100	6.1523	100	6.2095	100
12	6.1399	98.79	5.9469	99.12	5.5502	90.21	6.0170	96.90
24	5.4548	87.77	5.3579	89.30	5.4183	88.07	5.3979	86.93
48	5.0644	81.49	5.4771	91.29	5.2553	85.42	5.2601	84.71
72	5.1139	82.28	5.2833	88.06	5.1875	84.32	5.2148	83.98

ตารางที่ จ.6 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 1

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด		โซเดียมอะซิเตด		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell
0	5.8129	10.48	5.3560	14.39	5.3838	19.58	5.5563	11.17
12	5.0000	17.70	4.8976	16.96	4.6020	19.83	5.3692	11.13
24	4.6955	11.67	4.7202	12.74	4.3010	17.00	4.6232	21.54
48	4.6580	13.06	4.4091	19.39	4.3384	14.88	4.4771	14.81
72	4.5051	13.39	4.4504	16.86	4.3617	14.42	4.5682	12.22

ตารางที่ จ.7 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 2

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด		โซเดียมอะซิเตด		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell
0	5.6522	12.97	5.0253	20.40	5.2765	17.69	5.2672	20.47
12	4.8096	23.51	4.8603	18.37	5.0492	16.02	5.0969	17.62
24	4.4698	20.13	4.5292	17.83	4.6128	19.00	4.6180	16.70
48	4.4623	25.68	4.5911	16.50	4.4137	16.97	4.4150	17.04
72	4.4532	21.02	4.2558	22.40	4.1523	20.33	4.2148	20.16

ตารางที่ จ.8 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 3

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด		โซเดียมอะซิเตด		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell
0	5.4082	12.98	4.7634	20.61	4.6990	23.62	4.9614	20.10
12	4.8663	20.74	4.4771	24.72	4.3979	20.76	4.4843	25.47
24	4.3579	20.11	4.5441	15.19	4.2988	20.66	4.1324	23.44
48	3.9494	22.02	4.2041	23.24	4.0607	22.73	4.2405	19.38
72	3.8538	24.64	3.9494	25.25	3.9652	23.56	3.7924	27.28

ตารางที่ จ.9 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่เย็นและทำให้ละลาย ครั้งที่ 1

ระยะเวลาในการแช่เย็น (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด (% dead cell)	โซเดียมอะซิเตด (% dead cell)	โพแทสเซียมซอร์เบต (% dead cell)	ไม่มีการเติมเกลือ (% dead cell)
0	0	0	0	0
12	6.44	5.74	14.25	3.42
24	18.13	13.54	22.60	5.81
48	17.49	12.57	23.86	15.99
72	19.90	14.44	23.86	16.80

ตารางที่ จ.10 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่เย็นและทำให้ละลาย ครั้งที่ 2

ระยะเวลาในการแช่เย็น (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด (% dead cell)	โซเดียมอะซิเตด (% dead cell)	โพแทสเซียมซอร์เบต (% dead cell)	ไม่มีการเติมเกลือ (% dead cell)
0	0	0	0	0
12	3.18	5.69	6.20	6.58
24	13.82	12.70	11.17	16.29
48	17.49	12.91	17.07	19.64
72	13.18	13.13	18.69	20.30

ตารางที่ จ.11 จำนวนเซลล์ *S.* Rissen ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่เย็นและทำให้ละลาย ครั้งที่ 3

ระยะเวลาในการแช่เย็น (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด (% dead cell)	โซเดียมอะซิเตด (% dead cell)	โพแทสเซียมซอร์เบต (% dead cell)	ไม่มีการเติมเกลือ (% dead cell)
0	0	0	0	0
12	1.20	0.89	9.79	3.10
24	12.23	10.70	11.93	13.07
48	18.51	8.72	14.58	15.29
72	17.71	11.94	15.68	16.02

ตารางที่ จ.12 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 1

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตต		โซเดียมอะซิเตต		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival
0	6.4843	100	6.1599	100	6.0414	100	6.5051	100
12	5.9614	91.94	5.9085	95.92	5.9638	98.72	5.9845	92.00
24	5.5450	85.51	5.7404	93.19	5.6990	94.33	5.9164	90.95
48	5.3054	81.82	5.5911	90.77	5.5855	92.45	5.7593	88.54
72	5.2553	81.05	5.3979	87.63	5.3979	89.35	5.4983	84.52

ตารางที่ จ.13 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 2

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตต		โซเดียมอะซิเตต		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival
0	6.3160	100	6.0492	100	6.2148	100	6.1818	100
12	5.9566	94.31	5.9004	97.54	5.9731	96.11	5.9890	96.88
24	5.7597	92.26	5.8921	97.40	5.8388	93.95	5.9445	96.16
48	5.5911	88.52	5.7404	94.90	5.6767	91.34	5.7160	92.46
72	5.3655	84.95	5.2405	86.63	5.5911	89.96	5.4548	88.24

ตารางที่ จ.14 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่รอดชีวิตในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 3

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตต		โซเดียมอะซิเตต		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival	log CFU/ml	% survival
0	6.2430	100	6.2923	100	6.0531	100	6.1139	100
12	5.8633	93.92	5.9518	94.59	5.8779	97.10	5.8949	96.42
24	5.7708	92.44	5.9370	94.35	5.6201	92.85	5.9004	96.51
48	5.4482	87.27	5.7993	92.16	5.6628	93.55	5.7033	93.28
72	5.2148	83.53	5.2304	83.12	5.6532	93.39	5.4183	88.62

ตารางที่ จ.15 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 1

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตต		โซเดียมอะซิเตต		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell
0	5.3424	17.61	5.7669	6.38	5.5490	8.15	5.9314	8.82
12	5.4499	8.58	5.4742	7.35	5.4784	8.14	5.5943	6.52
24	5.2716	4.93	5.2502	8.54	5.1986	8.78	5.3798	9.07
48	5.2831	0.42	5.2881	5.42	5.3202	4.75	5.5623	3.42
72	5.0524	3.86	5.2970	1.87	5.1788	4.06	5.3850	2.06

ตารางที่ จ.16 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 2

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตต		โซเดียมอะซิเตต		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell
0	5.2429	16.99	5.5054	8.99	5.4473	12.35	5.1804	16.20
12	5.4533	8.45	5.4986	6.81	5.1584	13.64	5.4482	9.03
24	5.2482	8.88	5.2428	11.02	5.2468	10.14	5.7905	2.59
48	5.4474	2.57	5.3977	5.97	5.1522	9.24	5.5205	3.42
72	5.2389	2.36	5.1425	1.87	5.3658	4.03	5.3424	2.06

ตารางที่ จ.17 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่บาดเจ็บในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 3

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตต		โซเดียมอะซิเตต		โพแทสเซียมซอร์เบต		ไม่มีการเติมเกลือ	
	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell	เซลล์แข็งแรง (log CFU/ml)	% injured cell
0	5.1617	17.32	5.2673	16.29	5.4151	10.54	5.3631	12.28
12	5.5619	5.14	5.5626	6.54	5.4470	7.33	5.5477	5.89
24	5.4615	5.36	5.4502	8.20	5.0884	9.46	5.6455	4.32
48	5.1208	6.01	5.0089	13.63	5.2664	7.00	5.5082	3.42
72	5.1705	0.85	5.1326	1.87	5.0494	10.68	5.3067	2.06

ตารางที่ จ.18 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 1

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด (% dead cell)	โซเดียมอะซิเตด (% dead cell)	โพแทสเซียมซอร์เบต (% dead cell)	ไม่มีการเติมเกลือ (% dead cell)
0	0	0	0	0
12	8.06	4.08	1.28	8.00
24	14.48	6.81	5.67	9.05
48	18.18	9.23	7.55	11.46
72	18.95	12.37	10.65	15.48

ตารางที่ จ.19 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 2

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด (% dead cell)	โซเดียมอะซิเตด (% dead cell)	โพแทสเซียมซอร์เบต (% dead cell)	ไม่มีการเติมเกลือ (% dead cell)
0	0	0	0	0
12	5.69	2.46	3.89	3.12
24	8.81	2.60	6.05	3.84
48	11.48	5.10	8.66	7.54
72	15.05	13.37	10.04	11.76

ตารางที่ จ.20 จำนวนเซลล์ *S. aureus* ที่ตายในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วนำไปแช่แข็งและทำให้ละลาย ครั้งที่ 3

ระยะเวลาในการแช่แข็ง (ชั่วโมง)	โซเดียมแลคเตด (% dead cell)	โซเดียมอะซิเตด (% dead cell)	โพแทสเซียมซอร์เบต (% dead cell)	ไม่มีการเติมเกลือ (% dead cell)
0	0	0	0	0
12	6.08	5.41	2.89	3.58
24	7.56	5.65	7.15	3.49
48	12.73	7.83	6.45	6.72
72	16.47	16.88	6.61	11.38

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางที่ ฉ.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S.* Rissen ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ANOVA

survival

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	83.422	3	27.807	3.206	.083
Within Groups	69.389	8	8.674		
Total	152.812	11			

survival

Duncan

		Subset for alpha = .05	
salt	N	1	2
ps	3	89.9167	
control	3		95.6333
sa	3		95.8967
sl	3		96.3900
Sig.		1.000	.770

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Multiple range test : DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เกลือของกรดอินทรีย์ที่เติม	จำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย (ร้อยละ)
โซเดียมแลคเตต	96.39 a
โซเดียมอะซิเตต	95.90 a
โพแทสเซียมซอร์เบต	89.92 b
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือ)	95.63 a

ตารางที่ ฉ.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S.* Rissen ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ANOVA

survival

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27.246	3	9.082	.448	.726
Within Groups	162.203	8	20.275		
Total	189.449	11			

survival

Duncan

salts	N	Subset for alpha = .05 1
3.00	3	84.7667
1.00	3	85.2700
2.00	3	87.6867
4.00	3	88.2767
Sig.		.394

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Multiple range test : DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เกลือของกรดอินทรีย์ที่เติม	จำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย (ร้อยละ)
โซเดียมแลคเตต	85.27 a
โซเดียมอะซิเตต	87.69 a
โพแทสเซียมซอร์เบต	84.77 a
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือ)	88.23 a

ตารางที่ ฉ.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S.* Rissen ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ANOVA

survival

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	86.753	3	28.918	1.637	.257
Within Groups	141.362	8	17.670		
Total	228.115	11			

survival

Duncan

salt	N	Subset for alpha = .05 1
ps	3	81.4900
control	3	83.0267
sl	3	85.4833
sa	3	88.6000
Sig.		.088

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Multiple range test : DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เกลือของกรดอินทรีย์ที่เติม	จำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย (ร้อยละ)
โซเดียมแลคเตต	85.48 a
โซเดียมอะซิเตต	88.60 a
โพแทสเซียมซอร์เบต	81.49 a
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือ)	83.03 a

ตารางที่ ฉ.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S.* Rissen ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ANOVA

survival

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	62.590	3	20.863	2.340	.150
Within Groups	71.336	8	8.917		
Total	133.926	11			

survival

Duncan

		Subset for alpha = .05	
salt	N	1	2
ps	3	80.5833	
control	3	82.2933	82.2933
sl	3	83.0667	83.0667
sa	3		86.8300
Sig.		.357	.112

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Multiple range test : DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เกลือของกรดอินทรีย์ที่เติม	จำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย (ร้อยละ)
โซเดียมแลคเตต	83.07 ab
โซเดียมอะซิเตต	86.83 a
โพแทสเซียมซอร์เบต	80.58 b
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือ)	82.29 ab

ตารางที่ ฉ.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ANOVA

survival

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24.440	3	8.147	2.547	.129
Within Groups	25.588	8	3.199		
Total	50.028	11			

survival

Duncan

		Subset for alpha = .05	
salt	N	1	2
sl	3	93.3900	
control	3	95.1000	95.1000
sa	3	96.0167	96.0167
ps	3		97.3100
Sig.		.123	.185

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Multiple range test : DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เกลือของกรดอินทรีย์ที่เติม	จำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย (ร้อยละ)
โซเดียมแลคเตต	93.39 b
โซเดียมอะซิเตต	96.02 ab
โพแทสเซียมซอร์เบต	97.31a
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือ)	95.10 ab

ตารางที่ ฉ.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ANOVA

survival

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44.876	3	14.959	1.954	.200
Within Groups	61.239	8	7.655		
Total	106.115	11			

survival

Duncan

salt	N	Subset for alpha = .05 1
sl	3	90.0700
ps	3	93.7100
control	3	94.5400
sa	3	94.9800
Sig.		.076

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Multiple range test : DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เกลือของกรดอินทรีย์ที่เติม	จำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย (ร้อยละ)
โซเดียมแลคเตต	90.07 a
โซเดียมอะซิเตต	94.98 a
โพแทสเซียมซอร์เบต	93.71 a
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือ)	94.54 a

ตารางที่ ฉ.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ANOVA

survival

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	91.518	3	30.506	4.931	.032
Within Groups	49.495	8	6.187		
Total	141.013	11			

survival

Duncan

		Subset for alpha = .05	
salt	N	1	2
sl	3	85.8700	
control	3		91.4267
ps	3		92.4467
sa	3		92.6100
Sig.		1.000	.591

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Multiple range test : DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เกลือของกรดอินทรีย์ที่เติม	จำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย (ร้อยละ)
โซเดียมแลคเตต	85.87 b
โซเดียมอะซิเตต	92.61 a
โพแทสเซียมซอร์เบต	92.45 a
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือ)	91.43 a

ตารางที่ ฉ.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ในเนื้อสุกรที่เติมเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ANOVA

survival

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	93.145	3	31.048	6.408	.016
Within Groups	38.763	8	4.845		
Total	131.908	11			

survival

Duncan

		Subset for alpha = .05	
salt	N	1	2
sl	3	83.1767	
sa	3	85.7933	
control	3	87.1267	87.1267
ps	3		90.9000
Sig.		.068	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Multiple range test : DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เกลือของกรดอินทรีย์ที่เติม	จำนวนเซลล์รอดชีวิตเฉลี่ย (ร้อยละ)
โซเดียมแลคเตต	83.18 b
โซเดียมอะซิเตต	85.79 b
โพแทสเซียมซอร์เบต	90.90 a
ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเกลือ)	87.13 ab

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกัญญารัตน์ จูปรางค์ เกิดวันที่ 25 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดพระนครศรีอยุธยา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนจอมสุรางค์อุปถัมภ์ ปีการศึกษา 2542 เข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2545และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2546 ถึงปีการศึกษา 2549