บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

Genus *Salmonella*

ในปี 1900 Lignieres ได้เสนอชื่อสกุล (genus) Salmonella เป็นครั้งแรกในการอ้างอิงถึงงานวิจัยของนักจุลชีววิทยาชาวอเมริกัน D.E. Salmon กับ T. Smith ที่ทำในปี 1886 ซึ่งกล่าวถึงจุลินทรีย์รูปแท่งที่ทำให้เกิดโรคอหิวาต์ในหมู โดยทำให้เลือดออกหรือ 'swine plaque' ในหมู (Topley and Wilson, 1929; D'Aoust, 1989) ต่อมาในปี 1960 ชื่อ Salmonella ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายและถูกจัดอยู่ในวงศ์ (family) Enterobacteriaceae และได้รับการตีพิมพ์ในหนังสือชื่อ the Approved Lists of Bacterial Names ในปี 1980 (Bell and Kyriakides, 2002)

จีนัส (genus) *Salmonella* มีเซลล์รูปร่างเป็นแท่งตรงขนาด 0.7-1.5 x 2-5 ไมโครเมตร (μm) ติดสีกรัมลบ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) สามารถเจริญได้ในที่มีหรือไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) มีเมตาบอลิซึม 2 แบบ คือ การหายใจและการหมัก (chemoorganotropic) เมื่อสลายคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ และน้ำตาล D-Glucose ได้เป็นกรดและแก๊ส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส (Holt *et al*., 1994) และมีคุณลักษณะทางชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 1 และจากการศึกษาความสัมพันธ์ของ DNA สามารถจำแนกออกเป็น 2 กลุ่มสปีชีส์ คือ *enterica* และ *bongori* (Threlfall *et al*., 1999) โดย *S . enterica* ประกอบด้วย 6 ซับสปีชีส์ (subspecies) คือ *enterica, salamae, arizonae, diarizonae, boutenae* และ *indica* และ *S . bongori* ไม่มีซับสปีชีส์ (Le Minor and Popoff, 1987; Rowe and Hall, 1989; Old and Threlfall, 1998) ซับสปีชีส์ที่เกี่ยวพันกับความปลอดภัยในอาหารมากที่สุดคือ *S . enterica* subsp. *enterica* เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* ที่แยกจากมนุษย์ 99% อยู่ในซับสปีชีส์นี้ (Old, 1992) ในปี 1926 P.B White ได้เริ่มทำการจัดจำแนกเชื้อ *Salmonella* โดยใช้แอนติเจนและถูกพัฒนาโดย F. Kauffmann ในปี 1930 ซึ่งปัจจุบันการจัดจำแนกในระดับ serovar จะใช้ตามแบบแผนที่เรียกว่า Kauffmann – White scheme โดย serovar จะถูกนำเสนอในรูปแบบตัวเลขและตัวอักษรจากความแตกต่างของ O (somatic), Vi (capsular) และ H (flagella) แอนติเจน เช่น (6,7:r:1,7) คือ O แอนติเจน (6,7) ; phase 1 H แอนติเจน (r) ; และ phase 2 H แอนติเจน (1,7) ตามลำดับ (Holt *et al*., 1994)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.1 ลักษณะทางชีวเคมีของ *Salmonella*

ลักษณะทางชีวเคมี	ผลทางชีวเคมี
Catalase	+
Oxidase	-
Acid produced from lactose	-
Gas produced from glucose*	+
Indole	-
Urease produced	-
Hydrogen sulphide produced from triple-sugar iron agar	+
Citrate utilised as sole carbon source*	+
Methyl red	+
Voges-Proskauer	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	+

ที่มา: พัฒนาจาก Brenner(1984) และ Le Minor(1984)

หมายเหตุ; + หมายถึง มีหรือเกิดปฏิกริยา

- หมายถึง ไม่มีหรือไม่เกิดปฏิกริยา

* หมายถึง เฉพาะ Typhi จะให้ผลคือไม่มีหรือไม่เกิดปฏิกริยา (-)

แหล่งที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ

เชื้อ *Salmonella* อาศัยอยู่ในทางเดินอาหาร ลำไส้ของสัตว์ต่างๆ เช่น นก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์เลี้ยง คน และบางทีก็พบในแมลง แม้ว่าแหล่งกำเนิดของเชื้อคือลำไส้ของสัตว์แต่บ่อยครั้งที่พบเชื้อ *Salmonella* ตามร่างกายส่วนอื่นๆ ของสัตว์ด้วย (Jay, 1996) เนื่องจากสัตว์จะปล่อยเชื้อ *Salmonella* ผ่านทางอุจจาระซึ่งจะแพร่ผ่านแมลงและสัตว์อื่นๆ ขยายวงกว้างออกไป ด้วยเหตุนี้เชื้อ *Salmonella* อาจพบในน้ำ โดยเฉพาะในน้ำสกปรก และอาหารที่มีแมลงวันตอม เมื่อคนและสัตว์บริโภคอาหารและน้ำที่มีเชื้อนี้เข้าไป บางครั้งจะแสดงอาการป่วยออกมา แต่บางครั้งก็กลายเป็นพาหะ (carrier) คือไม่แสดงอาการป่วยทั้งๆ ที่มีเชื้อ *Salmonella* อยู่ในร่างกาย ทำให้กลายเป็นพาหะของเชื้อต่อไป มนุษย์และสัตว์ขับเชื้อ *Salmonella* ออกจากทางเดินอาหารทางอุจจาระ (สุมณฑา และคณะ, 2546) อรุณ และคณะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ได้ทำการสำรวจอุจจาระของผู้สัมผัสอาหารที่ปฏิบัติงานในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง พบอัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อ *Salmonella* สูงสุดร้อยละ 15.38 อัตราผู้เป็นพาหะของเชื้อ *Salmonella* สูงสุดในฤดูร้อน และต่ำสุดในฤดูฝน (อรุณ และคณะ, 2545) เชื้อ *Salmonella* ในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์สามารถแพร่กระจายไปในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อม ปนเปื้อนเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้หลายทาง ซึ่งจะเป็นอันตรายอย่างยิ่ง ถ้านำสัตว์ที่มีเชื้อ *Salmonella* มาใช้เป็นอาหาร ทำให้ผู้บริโภคมีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคอาหารเป็นพิษ (สุมณฑา และคณะ, 2546)

ในทางระบาดวิทยา จำแนกแหล่งที่อยู่อาศัย (host) ของเชื้อ *Salmonella* ออกเป็น 3 แหล่งดังนี้ (Jay, 1996)

1. เชื้อ *Salmonella* ที่อาศัยคนเป็น host

เชื้อนี้เป็นโรคติดต่อในคน ได้แก่ *S.* Typhi ทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ (enteric fever) เป็นสปีชีส์ที่มีอันตรายรุนแรงมากที่สุด ส่วน *S.* Paratyphi A และ *S.* Paratyphi C ทำให้เกิดโรคไข้รากสาดน้อย ซึ่งมีอาการคล้ายกับอาการของไข้ไทฟอยด์ แต่รุนแรงน้อยกว่า ไข้รากสาดน้อยเป็นโรคติดต่อในคน เช่นเดียวกันกับไข้ไทฟอยด์ มีระยะเวลาฟักตัวนาน ผู้ป่วยมีอุณหภูมิของร่างกายสูงมาก มีผลทำให้อัตราการตายสูง และอาจตรวจพบเชื้อ *S.* Typhi ในอุจจาระ และ/หรือในปัสสาวะของผู้ป่วยด้วย

2. เชื้อ *Salmonella* ที่ปรับตัวตาม host เชื้อ *Salmonella* ในกลุ่มนี้เป็นเชื้อที่แพร่จากสัตว์ที่เป็นโรคหรือเป็นพาหะมาสู่คน เนื่องจากอาศัยอยู่ในสัตว์ เมื่อนำสัตว์มาใช้เป็นอาหารก็จะแพร่มาสู่คน และทำให้คนเป็นโรคได้ ตัวอย่างเช่น *S.* Gallinarum และ *S.* Pullorum ซึ่งอาศัยเป็ดไก่เป็นโฮสต์ *S.* Dublin อาศัยวัวเป็นโฮสต์ *S.* Abortus-equi อาศัยม้าเป็นโฮสต์ *S.* Abortus-ovis อาศัยแกะเป็นโฮสต์ *S.* Choleraesuis อาศัยสุกรเป็นโฮสต์ และ *S.* Enteridis พบมากในไข่และในสัตว์ปีกที่มีชีวิต เป็นต้น

3. เชื้อ *Salmonella* ที่ไม่เลือก host เป็นเชื้อ *Salmonella* นอกเหนือจาก 2 กลุ่มที่กล่าวมาแล้ว สามารถแพร่จากคนหรือสัตว์เป็นโรค รวมทั้งอาหาร, น้ำ, ดิน และสิ่งแวดล้อม ได้แก่ เชื้อ *Salmonella* ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ดังนั้นจึงมีความสำคัญและต้องควบคุมผ่านกิจกรรมการจัดการสุขาภิบาลอาหารที่ดี เพื่อตัดวงจรการแพร่กระจายของโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

อาการของผู้ป่วยและความเป็นพิษของเชื้อ *Salmonella*

<u>อาการของผู้ป่วย</u> : ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ *Salmonella* มีอาการจำแนกออกได้เป็น 3 แบบ (ICMSF, 1996) ได้แก่

อาการของระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) โดยทั่วไปเกิดจากเชื้อ *Salmonella* ที่ไม่เลือกโฮสท์ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ช่วงระยะเวลาฟักตัวของเชื้ออยู่ระหว่าง 5 ชั่วโมง ถึง 5 วัน แต่ปกติสัญญาณบอกอาการของโรคมักเริ่มขึ้นประมาณ 12-36 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ ในกรณีที่ได้รับเชื้อเป็นจำนวนมาก อาการจะปรากฏขึ้นเร็วกว่าปกติด้วย อาการของผู้ป่วยประกอบด้วย ท้องเดิน คลื่นไส้ ปวดท้อง ไข้สูงปานกลาง หนาวสั่น อาการท้องร่วงจะรุนแรงต่างกันตามลักษณะการถ่ายอุจจาระ เช่น อุจจาระอาจมีลักษณะเหลวคล้ายน้ำซุปผัก จนถึงการถ่ายเป็นน้ำและเกิดอาการขาดน้ำขึ้น (dehydration) ในบางครั้งผู้ป่วยอาจอาเจียน อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ กระสับกระส่าย โดยทั่วไปอาการดังกล่าวจะปรากฏอยู่นาน 2-5 วัน ถ้านำสิ่งขับถ่ายของผู้ป่วยไปตรวจวิเคราะห์ในช่วงนี้มักจะพบเชื้อ *Salmonella* เป็นจำนวนมาก เมื่อเวลาผ่านไปจำนวนของเชื้อ *Salmonella* จะลดลง แต่ผู้ป่วยบางรายอาจขับถ่ายเชื้อ *Salmonella* ที่มิใช่ไทฟอยด์หลังจากนี้ไปแล้วอีก 3 เดือนก็เป็นได้

อาการไข้ไทฟอยด์ (enteric fever) เกิดจาก *S.* Typhi , *S*. Paratyphi A , *S*. Paratyphi B (*S*. Schottmuelleri) และ *S*. Paratyphi C (*S*. Hirschfeldii) ส่วน *S*. Typhimurium มีรายงานว่าเป็นเชื้อไข้ไทฟอยด์อยู่ระหว่าง 7-28 วัน (ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับ) เฉลี่ยประมาณ 14 วัน ผู้ป่วยมีอาการไม่สบาย ปวดศีรษะ ไข้ขึ้นสูงมากและทรงตัวอยู่หลายวัน ปวดท้องและปวดเมื่อยตามร่างกาย อ่อนเพลีย ถ่ายอุจจาระมีลักษณะเหลวคล้ายน้ำถั่ว (pea-like) หรือเหลวเป็นน้ำ นอกจากนี้ยังมีอาการคลื่นไส้อาเจียน ไอ มีเหงื่อออกตามตัว หนาวสั่น และเบื่ออาหาร มีจุดแดงตามลำตัว แผ่นหลังและหน้าอก หัวใจเต้นช้าและอ่อน ท้องบวมน้ำ ม้ามโต บางครั้งมีเลือดออกจากช่องท้องหรือจมูกด้วย ผู้ป่วยอาจหมดความรู้สึก อาการทุเลาช้า (ประมาณ 1-8 สัปดาห์) และบางครั้งผู้ป่วยอาจเป็นพาหะของโรคไปอีกหลายเดือนหรือเป็นปีก็ได้ ในกรณีนี้มักพบเชื้อ *Salmonella* ในถุงน้ำดี

อาการติดเชื้อในกระแสโลหิต (bacteraemia/septiceamia) เกิดจากเชื้อ *Salmonella* เข้าไปในกระแสโลหิต สืบเนื่องจากเชื้อฟักตัวในลำไส้เล็ก แล้วเข้าสู่กระแสโลหิต ผู้ป่วยจะมีไข้สูง ปวดหลัง ปวดท้อง และเจ็บหน้าอก หนาวสั่น เหงื่อออกตามลำตัว ไม่สบาย เบื่ออาหาร น้ำหนักลด อาการที่เกิดขึ้นอาจเป็นแบบสั้นๆ หรือเป็นเรื้องรังก็ได้ เชื้อ *Salmonella* ที่เป็นสาเหตุรวมถึง *S*. Typhi, *S*. Cholerae-suis และ *S*. Dublin เชื้อ *Salmonella* จากกระแสโลหิตอาจเข้าไปอยู่ตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย (Archer and Young, 1988; Smith *et al*, 1993)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเป็นพิษ

เชื้อ *Salmonella* อาจจะเข้าไปอยู่ในช่องว่าง (lumen) ของลำไส้เล็กส่วนปลาย และเพิ่มจำนวนขึ้น หลังจากนั้นจะไชผ่านผนังลำไส้เล็กเข้าสู่ระบบท่อน้ำเหลือง และจะทำลายเม็ดเลือดขาว จากนั้นจะเข้าไปในกระแสโลหิต ทำให้เลือดเป็นพิษ (septicaemia)

เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่า อาการเป็นพิษของซัลโมเนโลซีส (salmonellosis) เกี่ยวข้องกับสารพิษ 2 ชนิดคือ enterotoxin และ cytotoxin ในปี 1975 Koupal และ Deibel เป็นคนแรกที่แสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษของ enterotoxin ลักษณะของความเป็นพิษคล้ายกับพิษของ E. coli โดยมีการเพิ่มขึ้นของ camp (cyclic adenosine monophosphate) ในลำไส้ และชักนำให้ของเหลวในร่างกายสัตว์ทดลองตกตะกอน แต่แตกต่างจาก E. coli ตรงที่ enterotoxin ที่เชื้อ *Salmonella* ผลิตได้มีปริมาณน้อยกว่า และยากมากกว่าในการจำแนกสารพิษออกจากเซลล์ของแบคทีเรีย ยิ่งกว่านั้น enterotoxin ของเชื้อ *Salmonella* ยังคล้ายสารพิษของเชื้ออหิวาต์ (choleratoxin – CT) ในด้านลักษณะทางชีวภาพและทางพันธุกรรม (Koupal and Deibel, 1975) กระนั้นก็ตามเชื้อ *Salmonella* ก่อให้เกิดอาการคล้ายบิดด้วย คือมีการทำลายเนื้อเยื่อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นอาการที่รุนแรงมากกว่าที่จะเกิดจาก enterotoxin แต่เพียงอย่างเดียว ด้วยเหตุนี้ Koo และคณะ จึงทำการตรวจหา cytotoxin จากสารสกัดของเชื้อ *Salmonella* ลงในเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็กของกระต่ายหรือเซลล์เวอโร (Vero cells) ปรากฏว่าเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนขึ้น (Koo and Peterson, 1983; Koo *et al*, 1984) ดังนั้น นักวิจัยจึงสรุปว่าการทำลายเซลล์ของเชื้อ *Salmonella* ที่เกิดขึ้นกับเยื่อบุลำไส้เล็กหรือเซลล์เวอโรนั้นเป็นผลมาจาก cytotoxin นั่นคืออาการเป็นพิษของเชื้อ *Salmonella* เกิดจากสารพิษประเภท enterotoxin และ cytotoxin

สถานการณ์การแพร่ระบาดของเชื้อ *Salmonella* ในประเทศไทย

การศึกษาของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และกรุงเทพมหานคร เพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนของ enteropathogenic bacteria ในปี 1971 และ 1972 จากอาหารภัตตาคารและร้านอาหารในเขตกรุงเทพมหานครจำนวน 501 และ 217 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* 39 ตัวอย่าง (7.8%) และ 11 ตัวอย่าง (4.6%) ตามลำดับ และระหว่างปี 1972 – 1973 ในอาหารของการบินไทยจำนวน 276 ตัวอย่างพบ *Salmonella* 25 ตัวอย่าง (9.1%) ในปีพ.ศ. 1974 การศึกษาการปนเปื้อนจากอุจจาระของผู้สัมผัสอาหารจำนวน 462 ตัวอย่าง พบ *Salmonella* 35 ตัวอย่าง (7.6%) (รัตนสุดา, 1978)

จากการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อชนิดต่างๆได้แก่ ลูกชิ้นเนื้อ ลูกชิ้นกุ้ง ปูอัด ไส้กรอกหมู ลูกชิ้นหมู ลูกชิ้นไก่ ไส้กรอกไก่ หมูยอ และลูกชิ้นปลา จำนวนทั้งสิ้น 223 ตัวอย่าง ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จำหน่ายในตลาดสดและซูปเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพมหานครและนนทบุรี พบว่ามีการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* 42 ตัวอย่าง (18.82%) ในปี 2542 (อรุณ และคณะ, 2542)

ในปีพ.ศ. 2544 จากผลการตรวจยืนยันเชื้อ *Salmonella* จากสิ่งส่งตรวจได้แก่ อุจจาระ, Rectal swab, เลือด ปัสสาวะ, หนอง, ไขสันหลัง เป็นต้น จากผู้ป่วยที่เข้ามารักษาตัวตามโรงพยาบาลต่างๆทั้งในกรุงเทพมหานครและต่างจังหวัดทั่วประเทศรวม 13 เขต จำนวนทั้งสิ้น 4,188 ราย พบเชื้อในกลุ่ม *Salmonella* ที่ก่อให้เกิดโรค salmonellosis รวม 4,155 ราย แยกเป็น serovar ได้ 73 serovars โดยพบว่า *Salmonella enterica* Weltevreden เป็น serovar ที่ตรวจพบมากที่สุด (ร้อยละ 15.8) (อรุณ และคณะ, 2545) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Bangtrakulnonth และคณะในปี 2004 ซึ่งพบว่า *Salmonella enterica* Weltevreden เป็น serovar ที่พบมากและก่อให้เกิดโรค salmonellosis ในมนุษย์มากที่สุดในประเทศไทย โดยจำแนกจากตัวอย่างจำนวน 44,087 จากมนุษย์และจากแหล่งอื่นๆจำนวน 26,148 ตัวอย่างระหว่างปี 1993 ถึงปี 2002 (Bangtrakulnonth *et al*., 2004)

จากการสำรวจอาหารพร้อมปรุงบรรจุโฟมที่จำหน่ายในซุปเปอร์มาร์เก็ตจากพื้นที่กรุงเทพมหานคร นนทบุรี และ ปทุมธานี พบว่าอาหารพร้อมปรุง 173 ตัวอย่าง จากซุปเปอร์มาร์เก็ต 34 แห่ง มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ 105 ตัวอย่าง (60.69%) และและจากซุปเปอร์มาร์เก็ต 33 แห่ง (97.05%) เชื้อที่พบมากที่สุดคือ *Salmonella* spp. 100 ตัวอย่าง (57.80%) รองลงมาคือ *Clostridium perfringens* 36 ตัวอย่าง (20.81%) และ *Staphylococcus aureus* 31 ตัวอย่าง (17.92%) (อรุณ และคณะ, 2545)

วัตถุเจือปนในอาหาร

ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 84 (2527) และประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 119 (2532) ได้ให้คำจำกัดความของวัตถุเจือปนอาหารไว้ว่า

"วัตถุเจือปนอาหาร หมายถึง วัตถุที่ปกติมิได้ใช้เป็นอาหาร หรือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร ไม่ว่าวัตถุนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนในอาหาร เพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีในการผลิต การบรรจุ การเก็บรักษา หรือการขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพหรือมาตรฐาน หรือลักษณะของอาหาร แต่ใช้รวมอยู่กับอาหาร เพื่อประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นด้วย"

และตามคณะกรรมาธิการพิจารณาร่างมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission, CAC) กำหนดไว้ว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

"วัตถุเจือปนอาหาร หมายถึงสารซึ่งปกติมิได้ใช้บริโภคเป็นอาหาร หรือใช้เป็นส่วนประกอบหลักของอาหาร อาจมีคุณค่าทางอาหาร หรือไม่มีคุณค่าทางอาหารก็ได้ และวัตถุประสงค์ในการใช้สารนั้นในอาหาร ก็เพื่อประโยชน์ในด้านเกี่ยวกับเทคนิคในการแปรรูป (รวมถึงคุณลักษณะในด้านประสาทสัมผัส) กรรมวิธีในการแปรรูป การเตรียมวัตถุดิบ การบรรจุ การขนส่ง และอายุการเก็บของอาหารนั้น และมีผลหรืออาจมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อม ทำให้สารนั้นหรือผลิตผลพลอยได้ของสารนั้น กลายเป็นส่วนประกอบของอาหารนั้น หรือมีผลต่อคุณลักษณะของอาหารนั้น แต่ไม่ได้รวมถึง สารปนเปื้อน หรือสารที่เติมลงไป เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของอาหาร"

วัตถุประสงค์ในการเติมวัตถุเจือปนในอาหาร

1. การใช้วัตถุเจือปนเพื่อยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหารและลดการเสื่อมเสียของอาหาร เช่น การใช้วัตถุกันหืน (antioxidant) เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของไขมัน หรือน้ำมันซึ่งจะทำให้เกิดกลิ่นหืนอันไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การใช้วัตถุกันเสีย (preservative) เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์
2. การใช้วัตถุเจือปนเพื่อช่วยในการะบวนการผลิต เช่น การใช้กรดหรือด่างหรือบัฟเฟอร์ (buffer) เพื่อปรับ pH การเติมสารอีมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) เพื่อช่วยให้น้ำมันและน้ำผสมเป็นเนื้อเดียวกัน การเติมวัตถุกันการจับเป็นก้อน (anticaking) เพื่อกันการจับเป็นก้อนของอาหารแห้ง การเติมวัตถุกันการเกิดฟอง (antifoaming) ในระหว่างกระบวนการหมัก
3. การใช้วัตถุเจือปนเพื่อปรุงแต่งอาหาร เช่น การปรุงแต่งกลิ่นรสของน้ำผลไม้ด้วยสารแต่งกลิ่นรส (flavouring) การปรุงแต่งสีโดยใช้สีสังเคราะห์ การปรุงแต่งรสหวานโดยใช้สารให้ความหวานที่ไม่ใช่น้ำตาล
4. การใช้วัตถุเจือปนเพื่อปรับปรุงคุณค่าทางอาหารเพื่อช่วยลดหรือป้องกันการขาดสารอาหารบางชนิด เช่น การเติมกรดอะมิโนที่จำเป็นในนมผงหรืออาหารเด็กอ่อน การเติมธาตุไอโอดีน (iodine) ในเกลือป่นเพื่อป้องกันโรคกระดูกอ่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การควบคุมและความปลอดภัยในการใช้วัตถุเจือปนในอาหาร

เนื่องจากวัตถุเจือปนเป็นสารประกอบที่ไม่ใช่อาหารแต่เติมเข้าไปในอาหารด้วยจุดประสงค์ต่างๆ สารประกอบบางตัวอาจเป็นพิษต่อร่างกาย และทำให้เกิดโรคได้ จึงต้องมีการควบคุมการใช้และปริมาณที่ใช้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคโดยใช้ในปริมาณที่ต่ำสุด และต่ำกว่าระดับที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย

การควบคุมการใช้วัตถุเจือปนในอาหาร

กระทรวงสาธารณสุขได้ทำการควบคุมโดยกำหนดชนิดและปริมาณของวัตถุเจือปนที่อาจใช้และหลงเหลือในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทในพระราชบัญญัติอาหาร และกำหนดด้วยว่าหากมีการใช้วัตถุเจือปนในอาหารสำเร็จรูปจะต้องระบุที่ฉลากของผลิตภัณฑ์อาหารอย่างชัดเจน

ความปลอดภัยในการใช้วัตถุเจือปน

วัตถุเจือปนที่อนุญาตให้ใช้ในอาหาร จะต้องผ่านการตรวจสอบต่อไปนี้ คือ

1. ผลที่มีต่อสุขภาพของผู้บริโภค ว่าเป็นพิษหรือไม่ มีการสะสมในร่างกายของผู้บริโภค และอาจเป็นพิษในระยะยาวหรือไม่
2. ผลที่มีต่ออาหาร จะต้องตรวจสอบว่าวัตถุเจือปนจะมีผลต่อกลิ่น รส สี เนื้อสัมผัส และอายุการเก็บรักษาอาหารหรือไม่
3. ความอยู่ตัวของวัตถุเจือปนในระหว่างกระบวนการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร
4. ผลที่มีต่อคุณค่าทางอาหาร

ข้อจำกัดที่ต้องพิจารณาในการใช้วัตถุเจือปนในอาหาร

1. ประเมินปริมาณอาหารที่ใส่วัตถุเจือปนที่จะถูกบริโภคต่อวัน
2. ปริมาณต่ำสุดที่ทดลองในสัตว์ทดลอง แล้วไม่เกิดอาการผิดปกติ
3. ปริมาณต่ำสุดที่จะทำให้เกิดผลต่อสุขภาพน้อยที่สุด

การใช้วัตถุกันเสียในอาหาร

การเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหารในระหว่างการเก็บรักษา กระบวนการผลิตเนื่องจากจุลินทรีย์อาจป้องกันได้โดยการใช้วัตถุกันเสียซึ่งโดยทั่วไปการทำลายจุลินทรีย์หรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยใช้กระบวนการให้ความร้อน หรือ ฉายรังสี หรือการแช่แข็ง หรือใช้กับอาหารที่ผ่านกระบวนการเหล่านี้ แต่จุลินทรีย์ในอาหารไม่อาจถูกทำลายได้หมด

"วัตถุกันเสีย" หมายถึง สารเคมี หรือส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้ในอาหารเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยีสต์ และ รา หลังจากที่วัตถุดิบของอาหารนั้นถูกเก็บเกี่ยวรวมทั้งสารปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นสารประกอบที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วัตถุกันเสียที่ใช้ในอาหารประเภทต่างๆ ซึ่งการใช้วัตถุกันเสียจะต้องพิจารณาองค์ประกอบต่อไปนี้

1. ประเภทของจุลินทรีย์ที่ต้องการยับยั้งหรือทำลาย
2. กลไกของสารเคมีที่ต้องการ
3. การละลายของวัตถุกันเสียในอาหาร
4. ความสะดวกในการใช้
5. ความเป็นกรด เป็นด่างของอาหาร
6. ราคาของสารเคมี หรือ วัตถุกันเสียนั้นให้พิจารณาตามความเหมาะสม

ที่มา: กรมส่งเสริมการเกษตร (ทัศนีย์ และคณะ, 2530)

เชื้อ *Salmonella* ในอาหารสามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 130°C 1วินาทีหรือ63 °C 30 นาที (poultryindustrycouncil, 1993) ซึ่งอาหารบางประเภทที่อุณหภูมิเท่านี้อาหารจะเสียคุณค่าทางอาหารไปหรือสูญเสียคุณสมบัติทางกายภาพบางประการไป ดังนั้นอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตจึงนิยมใส่สารเคมีที่เป็นวัตถุกันเสียเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและเกิดการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหาร แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเหล่านั้นจะทำให้เกิดการระบาดของโรคภูมิแพ้ ซึ่งเป็นผลกระทบจากการรับประทานอาหารที่มีสารเคมีซึ่งเป็นวัตถุกันเสียเหล่านั้นในปริมาณมาก (Soon and Koo, 2003) ดังนั้นในปัจจุบันนี้คนเริ่มสนใจสุขภาพกันมากขึ้นการใช้วัตถุกันเสียที่เป็นสารธรรมชาติที่ทำให้เกิดความปลอดภัยต่อการบริโภคจึงถูกคิดค้นขึ้นมา อาทิเช่น สารโซเดียมแลกเทต (sodium lactate) เป็นต้น

โซเดียมแลกเทต (sodium lactate)

โซเดียมแลกเทตเป็นเกลือโซเดียมของกรดแลกติกซึ่งเตรียมขึ้นทางการค้าโดยทำให้เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือโพรพาโนอิก เอซิด 2 - ไฮดรอกซี – โมโนโซเดียม ซอลท์ สูตรเคมี $C_3H_5O_3Na$ มีน้ำหนักมวลโมเลกุลเท่ากับ 112.06 เป็นสารเหลวหนืด ใส ไม่มีสี จุดหลอมเหลว 17 องศาเซลเซียส จุดเดือด 113 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 1.3 กรัมต่อมิลลิลิตร มีความคงตัวเสถียร (Oxford University, 2005)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประสิทธิภาพของโซเดียมแลกเทต

ในปี ค.ศ.1997 Scannell และคณะพบว่าเมื่อผสมโซเดียมแลกเทต กับ ไนซิน จะมีประสิทธิภาพในการช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ และเพิ่มการป้องกันการถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเช่นเชื้อ *Salmonella* spp. ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูสด (Scannell *et al*., 1997) และ จากการศึกษาของ Feng-Sheng ในปี ค.ศ. 2000โดยใช้โซเดียมแลกเทต 3% ในไส้กรอกแบบจีนที่ถูกบรรจุในสภาพสุญญากาศแล้วเก็บที่ 20 องศาเซลเซียส พบว่าโซเดียมแลกเทตจะยับยั้งจุลินทรีย์โดยการเปลี่ยนแปลงทางเคมีระหว่างการเก็บรักษาทำให้อายุการเก็บรักษาเป็น 25 วัน (Wang, 2000) ต่อมาจากการศึกษาของ Mbandi และ Shelef กล่าวว่าเมื่อใช้โซเดียมแลกเทต 1.8% สามารถลดอัตราการเติบโตของเชื้อ *Salmonella* ได้ และเมื่อใช้สารโซเดียมแลกเทต 2.5% ร่วมกับสารโซเดียมไดอะซิเทต 0.2% พบว่าสามารถเพิ่มความปลอดภัยในเนื้อพร้อมบริโภคที่ถูกเก็บในอุณหภูมิไม่เหมาะสมและในตู้เย็นได้ (Mbandi and Shelef, 2001) Cegielska-Radziejewska และ Pikul กล่าวว่าเมื่อใช้ สารโซเดียมแลกเทต 1% จะให้ผลพอๆกับการใช้สารโซเดียมแลกเทต 2% โดยพบว่าความเข้มข้นทั้งสองสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของไส้กรอกไก่สไลด์ที่บรรจุใน air atmosphere ซึ่งถูกเก็บที่อุณหภูมิ 5-7 องศาเซลเซียส โดยยืดระยะเวลาในการเก็บมากกว่าเดิม 3-4 เท่าตามลำดับ และไส้กรอกไก่สไลด์ที่เติมสารโซเดียมแลกเทต 2% แล้วนำมาบรรจุในไนโตรเจน จะมีอายุการเก็บที่ยาวนานที่สุด (35วัน) (Cegielska-Radziejewska and Pikul, 2004)

กลไกของโซเดียมแลกเทตต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

1.<u>ผลกระทบต่อค่า pH ภายในเซลล์</u>

โซเดียมแลกเทตจะแตกตัวให้กรดแลคติกออกมา ซึ่งสามารถผ่านไปยังส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ภายในเซลล์ โดยกรดจะปล่อยโปรตอน (proton) ออกมาทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ลดลง โดยปกติค่า pH ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์จะสูงกว่าภายนอกเซลล์ ดังนั้นเซลล์จุลินทรีย์จึงแบ่งพลังงานบางส่วนเพื่อกำจัดโปรตอนออกจากเซลล์ ทำให้พลังงานจลน์ที่ใช้ในการเจริญเติบโตช้าลง (Cassio *et al*., 1987; Ten Brink and Konings, 1980; Ten Brink *et al*., 1985) และเมื่อระบบนี้ถูกกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง จึงมีการสันนิษฐานว่าระบบการสร้างATP และการลำเลียงสารอาหารภายในเซลล์โดยวิธี active transportation อาจถูกกระทบไปด้วย และหน้าที่อื่นของเซลล์นอกจากเมตาบอลิซึมของพลังงานก็จะถูกกระทบด้วยเหมือนกัน ซึ่ง Freese และคณะ (1973) และ Eklund (1980) ระบุว่าการส่งผ่านกรดอะมิโนที่เนื้อเยื่อเลือกผ่านถูกรบกวนโดยความแตกต่างของโปรตอน (Hunter and Segal, 1973)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การยับยั้งการลำเลียงสารอาหารด้วยวิธี active transportation โดยการกระตุ้นเฉพาะแรงบางส่วนสามารถอธิบายผลกระทบต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตในจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์ได้ (Eklund, 1983) และเมื่อค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตในจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น (Farber *et al*., 1989; Corner *et al*., 1990; Ita and Hutkins, 1991) เมื่อเปรียบเทียบจุลินทรีย์ที่ใช้กระบวนการหมักกับจุลินทรีย์ที่ใช้กระบวนการหายใจ พบว่า อัตราเร็วในการเจริญคงที่โดยที่ระยะเวลานานขึ้น (Mitchell, 1961; Mitchell and Moyle, 1969) เนื่องจากจุลินทรีย์มีความสามารถในการรักษาค่าคงที่ของ pH ภายในเซลล์แตกต่างกัน (Booth, 1985)

2. <u>ผลกระทบต่อค่า a_w</u>

Loncin (1975) พบว่าโซเดียมแลกเทต มีผลกระทบต่อค่า a_w มากกว่าสารประกอบอินทรีย์อื่นหรือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นเป็นโมลาร์เท่ากัน ต่อมาในปี 1993 Houstma และคณะ พบว่าผลกระทบของการยับยั้งด้วยโซเดียมแลกเทตมีความรุนแรงมากกว่าการตอบสนองจากโซเดียมคลอไรด์และประจุของแลกเทตส่งผลกระทบอย่างเฉพาะเจาะจงต่อการเจริญของเซลล์ โดยในเชื้อแบคทีเรียกรัมลบพบว่า โซเดียมแลกเทตความเข้มข้นต่ำสุดซึ่งต่ำกว่าคลอไรด์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้

ในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเนื้อพบว่าโซเดียมแลกเทตจะแตกตัวให้แลกเทตไอออน ซึ่งแลกเทตไอออนส่วนใหญ่จะละลายในน้ำ ทำให้ค่า a_w ลดลง (Miller, 1992; Nolan *et al*., 1992; Shelef, 1994)

จุลินทรีย์ทุกชนิดต้องการสารอาหารจากน้ำที่อยู่ล้อมรอบ ดังนั้นจึงต้องการน้ำมากกว่า 80-90% สำหรับใช้ในการเจริญ เมื่อเซลล์จุลินทรีย์อยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นมากกว่าภายในเซลล์ น้ำภายในเซลล์จะไหลออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ไปยังภายนอกเซลล์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์หดตัวแยกจากผนังเซลล์ การเจริญเติบโตจึงถูกยับยั้ง (Tortura *et al*., 1998) ทำให้จุลินทรีย์เติบโตช้าลง ดังนั้นการเติมโซเดียมแลกเทตจะสามารถจำกัดการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในอาหารได้โดยโซเดียมแลกเทตจะลดค่า a_w แต่ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อเริ่มต้นได้ โดยพบว่าโซเดียมแลกเทตจะเพิ่มช่วงแลกเฟส (lag phase) และทำให้การเจริญเติบโตในช่วง 1 log cycle ยาวนานขึ้น ซึ่งสามารถเติมได้มากกว่า 4% สำหรับยับยั้งจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม (Miller, 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การประยุกต์ใช้โซเดียมแลกเทต

1.การเติมโซเดียมแลกเทตจะช่วยปรับปรุงสีโดยรวมของอาหาร โดยช่วยทำให้สีคงตัวระหว่างการเก็บรักษาและช่วยเพิ่มเวลาในการถนอมสีระหว่างการเก็บรักษาให้นานขึ้น

2.การเติมโซเดียมแลกเทตจะช่วยเพิ่มความฉ่ำน้ำของเนื้อทำให้น้ำหนักเพิ่มขึ้น โดยช่วยให้ค่า pH ของเนื้อเพิ่มขึ้น จึงทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อดีขึ้น และลดการสูญเสียระหว่างการทำอาหารได้ เนื้อจึงนุ่มขึ้น

3.สารโซเดียมแลกเทตทำให้เนื้อหมูที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วมีกลิ่นรสดีขึ้น และจำกัดการลดลงของกลิ่นอโรมาติกของผลิตภัณฑ์เนื้อหมูระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็น โดยลดการพัฒนาของกลิ่นไม่พึงประสงค์อันเกิดจากปฏิกริยาออกซิเดชั่นของไขมันระหว่างการเก็บในตู้เย็นได้ โดย USDA, FSIS ระบุว่าโซเดียมแลกเทตสามารถใช้มากกว่า 2% ในการเสริมรสชาดอาหาร (Miller, 1999)

ความปลอดภัยในการใช้

ได้รับการรับรองจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration) ว่าเป็นสารที่อยู่ใน GRAS (generally recognized as safe) ซึ่งปลอดภัยต่อการบริโภค โดยไม่จำกัดปริมาณการใช้ในอาหาร แต่ห้ามใช้ในอาหารสำหรับเด็กทารก (FDA, 2004)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสภาวะกรด-เบส (pH) กับเชื้อ *Salmonella*

ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรด-เบส กับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* แสดงในตารางที่ 2.2 ค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อ *Salmonella* ชนิดที่ทนกรดมากที่สุดจะเจริญได้อยู่ที่ pH 3.8 และ pH สูงสุดอยู่ที่ 9.5 ช่วง pH ที่เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากเจริญได้ดีอยู่ระหว่าง 7-7.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เชื้อเจริญเติบโตและชนิดของเชื้อ *Salmonella* แต่ละสปีชีส์ด้วย

ตารางที่ 2.2 ปัจจัยด้านอุณหภูมิ pH และ a_w ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Salmonella*

สภาวะ	ค่าต่ำสุด	ค่าเหมาะสม	ค่าสูงสุด
อุณหภูมิ	5.2 *	35-43	46.2
pH	3.8	7-7.5	9.5
a_w	0.94	0.99	>0.99

* เชื้อ *Salmonella* ส่วนมากไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส

ที่มา : ICMSF, 1996. P.225

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการทดลองของ Chung and Goepfert (1970) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Salmonella* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและทำการปรับค่า pH ที่เชื้อจะสามารถเจริญได้โดยใช้กรดต่างชนิดกัน พบว่ากรดที่ใช้ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการมีผลต่อการปรับตัวของเชื้อ *Salmonella* กล่าวคือ ในกรณีที่ใช้กรดเกลือและกรดซิตริกปรับ pH เชื้อ *Salmonella* ปรับตัวกับการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าการใช้กรดอะซิติก (ตารางที่ 2.3) และที่ค่า pH ในตารางที่ 2.3 ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนไม่ได้ เซลล์ตาย และอัตราการตายจะสูงที่สุดเมื่อใช้อุณหภูมิสูงขึ้นเช่น 43 องศาเซลเซียส (สุมณฑา และคณะ, 2546; Bell and Kyriakides, 2002)

ในปี 1997 Membre และคณะศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิ (15-35 องศาเซลเซียส), pH (4.5-6.5), ระดับกลูโคส (1-4% น้ำหนักต่อปริมาตร) และระดับกรดซิตริก (0.05-0.1%) ในมายองเนสแคโลรี่ต่ำ ที่มีการเติมเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ไข่ลงไป ซึ่งพบว่าไม่ว่าสภาวะจะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร จำนวนประชาที่มีชีวิตก็ยังคงลดลง แต่เฉพาะหลังจากช่วงเวลาจาก 11-85 วันแล้ว (Membre *et al*., 1997) แม้ว่าเชื้อ *Salmonella* จะสามารถเติบโตในช่วง pH กว้างๆได้ และจะเจริญช้าลงที่ขอบเขตสูงสุดหรือต่ำสุดของช่วงการเจริญ การตายจะเกิดขึ้นที่ด้านนอกของช่วงแต่เซลล์ทั้งหมดจะยังไม่ตายในทันที ซึ่งเกิดจากการลดลงของประชากรแบบค่อยเป็นค่อยไป โดยบางเซลล์อาจจะรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์เป็นกรดในช่วงเวลายาวนาน (Bell and Kyriakides, 2002)

ตารางที่ 2.3 ค่า pH ต่ำสุดที่เชื้อ *Salmonella* เจริญได้ภายใต้สภาวะที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

กรดที่ใช้ปรับ	pH
กรดเกลือ (hydrochloric acid)	4.05
กรดซิตริก (citric acid)	4.05
กรดกลูโคนิก (gluconic acid)	4.20
กรดแลคติก (lactic acid)	4.40
กรดกลูทาริก (glutaric acid)	4.70
กรดอะซิติก (acetic acid)	5.40

หมายเหตุ: ใช้ Trytone-yeast extract-glucose broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะเชื้อ *Salmonella* ที่ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร (ใช้ *S*. Anatum, *S*. Tennessee หรือ *S*. Senftenberg)

ที่มา: Chung and Goepfert, 1970.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า a_w กับเชื้อ *Salmonella*

วอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w) มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* โดยค่า a_w ต่ำสุดอยู่ที่ 0.94 ส่วนค่า a_w สูงสุดอยู่ในช่วง 0.99-1.00 (ตารางที่ 2.2)

ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ในอาหารจะลดลงเมื่อเติม โซเดียมคลอไรด์ น้ำตาล และ/หรือตัวทำละลายอื่นๆ เมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายสูงค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ของผลิตภัณฑ์จะลดลง (จากตารางที่ 2.4) ในผลิตภัณฑ์ที่มีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ต่ำกว่าค่าต่ำสุดที่เชื้อ *Salmonella* จะเจริญได้พบว่าการเจริญเติบโตจะคงที่ตลอดช่วงอายุของผลิตภัณฑ์ (Bell and Kyriakides, 2002) และในสภาวะที่สิ่งแวดล้อมเอื้อต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* เช่น มีอาหารเหมาะสม มี a_w เหมาะสม มีอุณหภูมิเหมาะสม พบว่าเชื้อ *Salmonella* สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้มากกว่าปกติ ฉะนั้นปัจจัยรวม (combined effects) จึงมีความสำคัญในแง่ของการประยุกต์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อ *Salmonella* มากกว่าปัจจัยใดปัจจัยหนึ่งเพียงปัจจัยเดียว

ในปี ค.ศ. 1995 McKay และ Peters ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ 0.5-3.5% และ pH 7.0-5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ต่อการเติบโตของโคโลนี (colony) ของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และลด pH จะทำให้การเติบโตช้าลง (McKay and Peters, 1995) และจากการทำการศึกษา *Salmonella* Choleraesuis ซึ่งเป็นเชื้อผลิตสาร cytotoxin พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ที่สภาวะ pH 6.0-8.0 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 4.0% หรือมากกว่านั้นพบว่าเชื้อไม่มีการสร้างสารพิษ cytotoxin แต่เมื่อใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.5% พบว่ามีการผลิตสาร cytotoxin ในปริมาณสูงที่สุด (Ho and Chou, 2001)

ตารางที่ 2.4 ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และซูโครสแตกต่างกัน

Water activity (a_w)	Sodium chloride (%,w/w)	Sucrose (%,w/w) ($^{\circ}$Brix)
1.000	0	0
0.99	1.74	15.45
0.98	3.43	26.07
0.96	6.57	39.66
0.94	9.38	48.22
0.92	11.90	54.36

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2.4 (ต่อ) ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และซูโครสแตกต่างกัน

Water activity (a_w)	Sodium chloride (%,w/w)	Sucrose (%,w/w) ($^{\circ}$Brix)
0.90	14.18	58.45
0.88	16.28	62.77
0.86	18.18	65.63

ที่มา: International Commission on Microbiological Specification for Foods (1980)
(Bell and Kyriakides, 2002)

ความสัมพันธ์ระหว่างค่าอุณหภูมิกับเชื้อ *Salmonella*

จากการทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 15-40 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันมีผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ *Salmonella typhimurium* โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ช่วง Lag phase ของเชื้อสั้นลง (Dickson *et al*.,1992) เมื่อทดสอบ *Salmonella Mbandaka* โดยใช้ 2.4% acetic acid 5 นาที พบว่า 30-40% ของเซลล์ *Salmonella* ที่เหลืออยู่บนผิวแอปเปิ้ลฝานจะบาดเจ็บ และเมื่อนำมาบ่มที่ 4, 20 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 20 องศาเซลเซียส หรือ 35 องศาเซลเซียส เซลล์สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ ขณะที่ 4 องศาเซลเซียส เซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้ (Liao & Fett, 2004)

ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (Growth Curve of bacteria) (Tortora *et al.,*1998; นงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หมายถึง การเพิ่มจำนวน ไม่ใช่การขยายขนาดของเซลล์แต่ละเซลล์ แบคทีเรียทั่วไปจะสืบพันธุ์โดยการแบ่งตัวจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ (binary fission) ขั้นตอนแรกในการแบ่งตัว 1) การเจริญตามยาวของเซลล์ (cell elongation) และมีการจำลอง DNA ในโครโมโซม 2) ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์จะเริ่มเว้าเข้าจากทุกด้านที่บริเวณตรงกลางระหว่าง DNA ในโครโมโซมทั้ง 2 ด้าน 3) ในที่สุดผนังเซลล์ที่เว้าเข้าด้านในจะบรรจบกันและเกิดเป็นผนังเซลล์ตามขวาง และ 4) เกิดเป็น 2 เซลล์แยกจากกัน ซึ่งแต่ละเซลล์จะเหมือนกันทุกประการและมีเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน

เมื่อเรานำแบคทีเรียใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มันจะเพิ่มจำนวนขึ้นและเมื่อนำจำนวนแบคทีเรียที่ได้ในระยะเวลาต่างๆ กัน มาเขียนกราฟโดยเทียบกับระยะเวลา อาจใช้จำนวนแบคทีเรียเป็นค่า log หรือจำนวนจริงของแบคทีเรียก็ได้ ซึ่งประชากรของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เช่นนี้จะเกิดขึ้นเพียงระยะหนึ่งของการเจริญทั้งหมด ในความเป็นจริง เมื่อเรานำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารใหม่และนับจำนวนแบคทีเรียเป็นระยะ ๆ ภายในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง และนำมาพลอต (plot) กราฟระหว่างจำนวนล็อก (log) ของแบคทีเรียกับระยะเวลา จะได้กราฟการเจริญดังภาพที่ 2.1 ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่างๆ 4 ระยะคือ

1. Lag phase

เป็นระยะช่วงแรกของการเจริญเติบโตนับตั้งแต่เริ่มใส่แบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่แบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนแบคทีเรียยังไม่เพิ่มขึ้นเพราะยังไม่แบ่งเซลล์ แต่เซลล์จะว่องไว และสังเคราะห์โพรโทพลาซึมใหม่ รวมทั้งเอนไซม์ DNA RNA เพื่อให้เพียงพอต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีกิจกรรมทางสรีรวิทยาสูง ขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการเพิ่มความยาว และมีการเพิ่มโปรตีนและน้ำหนักแห้งด้วยตอนปลายของระยะนี้ แบคทีเรียจะแบ่งตัว แต่เนื่องจากแบคทีเรียทุกตัวไม่ได้แบ่งตัวพร้อมกัน ดังนั้นจำนวนประชากรจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น

ความยาวของระยะ lag phase จะยาวนานเพียงใดขึ้นกับสภาพแวดล้อม และชนิดของแบคทีเรีย เช่น ถ้านำแบคทีเรียเลี้ยงในอาหารหนึ่งไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดิมระยะ lag phase จะสั้น หรือถ้าเราใส่เชื้อที่พร้อมจะแบ่งตัว (ในปลายระยะ lag phase หรือในระยะ log phase) ลงในอาหารใหม่ ระยะ lag phase จะสั้นเข้า แต่ถ้าเชื้อนั้นมีความผิดปกติหรือเป็นเชื้อที่เก็บไว้นาน ก็จะต้องใช้เวลานานในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่

2. Logarithmic phase หรือ Exponential phase หรือระยะ Log phase

เป็นระยะทีแบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่า ๆ กัน ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์ว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว การแบ่งเซลล์จะสัมพันธ์กับการสังเคราะห์โพรโทพลาซึม และกิจกรรมทางแบคทีเรียของแบคทีเรีย จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า จึงทำให้ลักษณะของ curve เป็น exponential

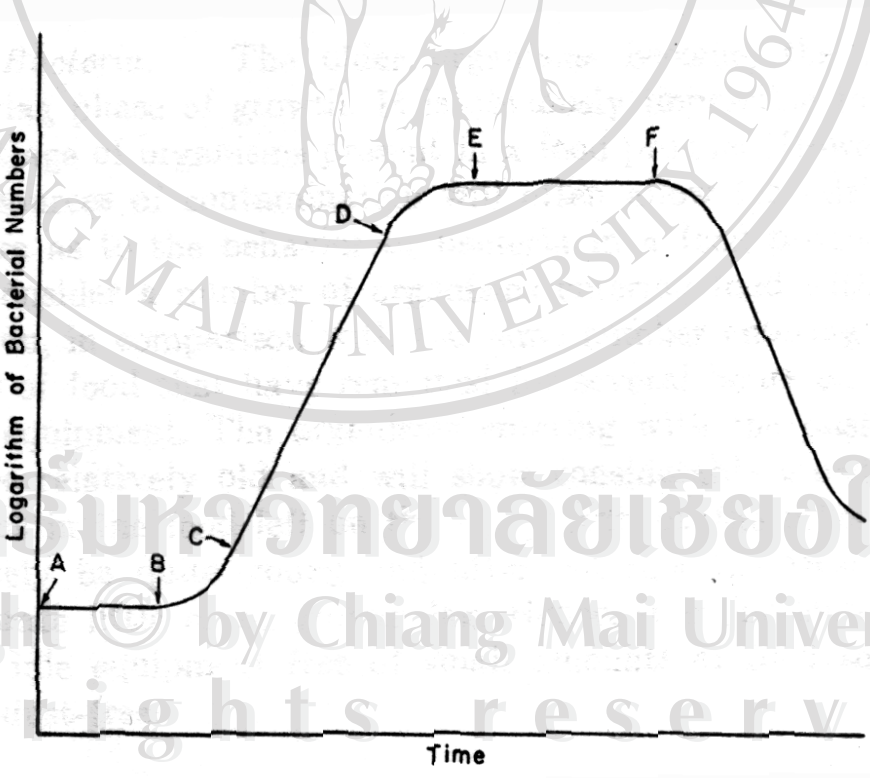
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3. Stationary phase

ระยะนี้แบคทีเรียจะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก คือ ถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

4. Death phase หรือ Decline phase

เป็นระยะที่แบคทีเรียจะตายอย่างรวดเร็วและตายมากขึ้นจนสม่ำเสมอเป็น exponential หรือ logarithm สาเหตุการตายอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไปและเกิดการสะสมของเสียและสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม แบคทีเรียจะมีอัตราการตายที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เช่น พวกทรงกลม แกรมลบ จะตายอย่างเร็วมากภายใน 2 – 3 วัน และเหลือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่น้อยมาก เชื้อบางชนิดตายจึงทำให้มีแบคทีเรียมีชีวิตเหลืออยู่เป็นเวลานานหลายเดือน



ภาพที่ 2.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

A-B คือ ระยะ lag phase

C-D คือ ระยะ log phase

E-F คือ ระยะ stationary phase

ระยะเวลาในการเจริญของจุลินทรีย์ (Generation time)

จากการศึกษาการทวีจำนวนของแบคทีเรียโดยทั่วไป โดยวิธีแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสองนั้น พบว่าแบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนจาก 1 $\longrightarrow$ 2 $\longrightarrow$ 4 $\longrightarrow$ 8 $\longrightarrow$ 16 $\longrightarrow$ 32 .... หรือเขียนเป็น 1 $\longrightarrow$ 2^1 $\longrightarrow$ 2^2 $\longrightarrow$ 2^3 $\longrightarrow$ 2^4 $\longrightarrow$ 2^5 ... จำนวนครั้งที่แบ่งเซลล์ได้เรียก generation ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งเพื่อทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่านั้นเรียกว่า generation time แบคทีเรียแต่ละชนิดมี generation time ไม่เท่ากัน เช่น *E. coli* ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ครั้งละประมาณ 15 – 20 นาที *Lactobacillus acidophilus* ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ครั้งละประมาณ 66 – 87 นาที นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งยังแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมต่างๆ ด้วย เช่น ชนิดของอาหาร อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ ฯลฯ

ในการศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง อาจทำได้โดยการนับจำนวนด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการใส่แบคทีเรียที่ทราบจำนวนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไว้ให้แบคทีเรียเจริญในสภาพที่เหมาะสม แล้วนับจำนวนอีกครั้งหนึ่ง ในการคำนวณหา generation time จะต้องทราบจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น จำนวนแบคทีเรียในครั้งสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดลองและระยะเวลาที่แบคทีเรียเจริญ

ดังนั้นถ้าเริ่มต้นจาก 1 เซลล์ เมื่อผ่าน generation time แต่ละครั้ง จะได้จำนวนแบคทีเรีย เป็น 2 เซลล์ 4 เซลล์ 8 เซลล์ 16 เซลล์ ... 2^n ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ในแต่ละ generation จำนวนประชากรของแบคทีเรียจะเพิ่มเป็น 2 เท่าเสมอ (Tortora *et al*.,1998; นงลักษณ์ และปรีชา, 2544)

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับ generation time แสดงในรูปของสมการ โดยกำหนดให้

สมการ Generation time (Gibson *et al*., 1988)

$$\text{Generation time (h)} = \frac{\log_{10} 2 \text{ (e)}}{BxC}$$

เมื่อ C = log maximum cell population - log initial cell population (log cfu/ml)

B = growth rate at M (log cfu/ml/h)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรแกรมการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์

การทำแบบจำลองของพฤติกรรมจุลินทรีย์ในอาหารเริ่มต้นตั้งแต่ปี 1920 และมีการพัฒนาวิธีการคำนวณ thermal death time (เวลาในการใช้ความร้อนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์) ซึ่งถูกวิวัฒนาการมาจากอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง แบบจำลองการทำนายการเจริญถูกฟื้นฟูขึ้นอีกครั้งในยุค 1980 โดยมีแรงผลักดันมาจากการแพร่พันธุ์ของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิตู้เย็นและการที่อาหารมีอายุการเก็บรักษาจำกัด การพัฒนาการถนอมอาหารแบบใช้ Hurdle หลายชนิด และการพัฒนาของคอมพิวเตอร์, อุปกรณ์ทางจุลินทรีย์, ทางคณิตศาสตร์และทางสถิติได้เกิดขึ้นมาก่อนและขยายไปสู่การใช้แบบจำลอง (Whiting and Buchanan, 2001)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ถูกใช้เพื่อประมาณพารามิเตอร์ (specific growth rate และ lag time) ที่ต้องการเพื่อศึกษาการเจริญภายใต้สภาวะทางกายภาพและเคมีที่แตกต่างกัน เพื่อตรวจสอบผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อหาสูตรที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือเพื่อสร้างแบบจำลองในการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหาร และจุลชีววิทยาทางการหมัก (McMeekin *et al*., 1993; Whiting and Buchanan, 1997)

ในปี 1988 Gibsons และคณะ ได้นำสมการ Gompertz มาใช้ในจุลินทรีย์ทางอาหาร ได้มีการประเมินชุดฟังก์ชั่นรูป sigmoid และสมการ Gompertz ที่มีเส้นโค้งระหว่างการเจริญเติบโตช่วง lag และ exponential มากกว่าช่วงคงที่ใน stationary phase ซึ่งเหมาะสมกับข้อมูลของจุลินทรีย์มากกว่าฟังก์ชั่น sigmoid อื่น สมการ Gompertz ถูกใช้อย่างกว้างขวางเพื่อจะใช้สร้างแบบจำลองการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

สมการ Gompertz equation

$$N_t = A + C\, e^{-e^{-B(t-M)}}$$

เมื่อ N_t = log cell population (log cfu/ml)

A = log initial cell population (log cfu/ml)

C = log maximum cell population - log initial cell population (log cfu/ml)

B = growth rate at M (log cfu/ml/h)

M = time,when growth rate reach maximum (h)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แบบจำลองที่แยกออกมาจะจำเพาะเจาะจงกับ พารามิเตอร์แต่ละตัว ก็คือ B, M, C และ A ซึ่งค่าของพารามิเตอร์ใดๆที่กำหนดมาจะถูกทำนายโดยไม่ขึ้นกับพารามิเตอร์อื่น ซึ่งในความเป็นจริงแล้วพารามิเตอร์เหล่านี้ไม่ได้เป็นอิสระ และค่าของพารามิเตอร์หนึ่งจะขึ้นอยู่กับส่วนหนึ่งของค่าของพารามิเตอร์อื่น สิ่งสำคัญในการจัดทำแบบจำลองของพารามิเตอร์จะต้องกำหนดไว้ว่าค่าที่ทำนายจะต้องไม่ติดลบ การฟิตแบบจำลอง polynomial โดยตรงของค่าพารามิเตอร์ นำไปสู่การทำให้ค่าการทำนายติดลบได้ ดังนั้นการจัดทำโมเดลทั้งหมดจะต้องเกิดขึ้นหลังจากการเทค natural log (ln) ของตัวแปร B, M, C และ A ซึ่งมีประโยชน์ ในการทำให้ความแปรปรวนคงที่ และทำให้การทดสอบแบบจำลองดูหนักแน่นขึ้น ขั้นตอนดังกล่าวจำเป็นมากเพราะค่าความแปรปรวนของพารามิเตอร์ จะเพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนกับขนาดข้อมูล (Gibson *et al*., 1988)

แบบจำลอง Gompertz ถูกศึกษาอย่างแพร่หลาย และใช้ในโปรแกรมการทำนายทางจุลินทรีย์ เช่น Pathogen Modeling Programs (PMP) (//www.arserrc.gov/mfs/) และ Food micro model (McClure et al., 1994) ซึ่งเป็นที่รู้จักในระดับสากล (Fujikawa *et al*., 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved