

จุดชีววิทยาอาหาร

ธีรพร กงบังเกิด

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

2546

จุลชีววิทยาอาหาร

(Food Microbiology)

โดย

ธีรพร กงบังเกิด

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

2546

ชื่อหนังสือ จุลชีววิทยาอาหาร (Food Microbiology)

ชื่อผู้แต่ง ดร. ชีรพร กงบังเกิด
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและ
สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000

ISBN 974-7195-23-2

คำนำ

หนังสือจุลชีววิทยาอาหารเล่มนี้ มีเนื้อหาโดยส่วนใหญ่ที่แปลและเรียบเรียงขึ้นมาจาก Essential of Food Microbiology : John Garbutt, 1997 ซึ่งเป็นหนังสือที่ข้าพเจ้าได้นำมาใช้ประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมอาหารและจุลชีววิทยาผลิตภัณฑ์เกษตร เนื่องจากมีเนื้อหาที่อ่านแล้วเข้าใจง่ายและสรุปเรื่องพื้นฐานสำคัญที่เกี่ยวข้องกับจุลชีววิทยาทางอาหารได้ค่อนข้างครอบคลุมและค่อนข้างทันสมัย รวมทั้งมีเนื้อหาไม่มากจนเกินไป ทำให้มองเห็นภาพรวมของวิชานี้ได้ค่อนข้างชัดเจนและเข้าใจมากยิ่งขึ้น

การที่หนังสือเล่มนี้สามารถเป็นรูปเล่มขึ้นมาได้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาที่เป็นกำลังใจมาตลอด นอกจากนั้นขอขอบพระคุณภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่สนับสนุนในการจัดพิมพ์ต้นฉบับ โดยเฉพาะคุณสุพรรณิ สหสังขนิโสภิต หากหนังสือเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้ายินดีน้อมรับและพร้อมเป็นอย่างยิ่งที่จะแก้ไขเพื่อที่จะทำให้เนื้อหาของหนังสือมีความถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เพื่อจะได้ปรับปรุงและจัดพิมพ์ในโอกาสต่อไป

ธีรพร กงบังเกิด

มกราคม 2546

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

อ.เมือง จ. พิษณุโลก

สารบัญ

คำนำ	i
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 โครงสร้างของจุลินทรีย์	4
แบคทีเรีย.....	4
การย้อมแกรม.....	4
โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย.....	6
โครงสร้างของเชื้อรา.....	14
ไวรัส.....	19
บทที่ 3 การเรียกชื่อ การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์จุลินทรีย์	22
การจัดจำแนกจุลินทรีย์.....	24
การจัดจำแนกแบคทีเรีย.....	25
การจัดจำแนกเชื้อรา.....	26
การจัดจำแนกยีสต์.....	29
การจัดจำแนกไวรัส.....	29
บทที่ 4 การเจริญของจุลินทรีย์	31
การเจริญของเซลล์จุลินทรีย์.....	31
การเจริญของจุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดียว.....	31
การเจริญของเส้นใยเชื้อรา.....	39
การเพิ่มจำนวนของไวรัส.....	41
การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร.....	42

บทที่ 5 อาหารของจุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง	43
สารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์.....	43
องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์.....	43
ประเภทของจุลินทรีย์ตามความต้องการสารอาหาร.....	45
ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์.....	53
อาหารมนุษย์และสารอาหารของจุลินทรีย์.....	54
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์.....	56
บทที่ 6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์	62
ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของจุลินทรีย์.....	62
ผลของการแช่เยือกแข็งต่อจุลินทรีย์.....	69
การเจริญของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแช่เยือกแข็ง.....	69
วอเตอร์ แอกติวิตี.....	71
ผลของ a_w ต่อจุลินทรีย์.....	74
ชนิดของอาหารแบ่งตามค่า a_w และจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสีย.....	78
ผลของค่า pH ต่อการเจริญของจุลินทรีย์.....	79
การถนอมรักษาอาหาร โดยการปรับค่า pH.....	84
ผลของออกซิเจนและรีดอกซ์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์.....	86
ความเป็นพิษของออกซิเจนต่อเซลล์จุลินทรีย์.....	88
ปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์.....	94
บทที่ 7 การตายของจุลินทรีย์	96
การตายของจุลินทรีย์เนื่องจากความร้อน.....	97
ค่า D.....	98
ผลของปัจจัยอื่นๆ และสภาพแวดล้อมต่อการทนความร้อนของจุลินทรีย์.....	100
ค่า z.....	100
การถนอมรักษาอาหารด้วยความร้อน.....	102
การพาสเจอร์ไรส์.....	104

การควบคุมจุลินทรีย์โดยใช้สารเคมี.....	104
คุณสมบัติของสารเคมีชนิดต่างๆที่ยับยั้งจุลินทรีย์.....	107
กลไกการทำลายจุลินทรีย์ของสารกันเสีย.....	113
ผลของเซอร์เบิลและการถนอมรักษาอาหาร.....	116
การประเมินอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร.....	117
ผลของการฉายรังสีต่อจุลินทรีย์.....	118
การใช้ความดันสูงในการถนอมรักษาอาหาร.....	121
 บทที่ 8 การเสื่อมเสียของอาหาร.....	 122
การเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์.....	122
การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในพืชและสัตว์.....	123
แหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอาหาร.....	123
ปัจจัยที่กำหนดชนิดจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย.....	124
ผลของกระบวนการแปรรูปอาหารต่ออัตราการเสื่อมเสียและประเภท.....	128
การเสื่อมเสียของอาหาร	
การเสื่อมเสียของอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ	130
การรอดชีวิตของแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์.....	138
 บทที่ 9 โรคอาหารเป็นพิษและความเป็นพิษของอาหาร.....	 140
โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์.....	140
แบคทีเรียที่สร้างสารพิษในอาหารและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ.....	149
โรคอาหารเป็นพิษจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบอาหาร.....	152
โดยจุลินทรีย์	
 บทที่ 10 อาหารหมัก.....	 157
การหมัก.....	157
อาหารหมัก.....	158
ประเภทของกระบวนการหมักอาหาร.....	161

จุลชีววิทยาของกระบวนการหมักอาหารที่เป็นกรด.....	162
เมตาโบลิซึมของแบคทีเรียแลคติก.....	163
อาหารหมักบางชนิดและจุลชีววิทยาของอาหารหมัก.....	165
กระบวนการหมักผัก.....	171
 บทที่ 11 การควบคุมคุณภาพทางจุลินทรีย์และความปลอดภัยของอาหาร	175
วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และระดับของการ.....	175
ปนเปื้อนจากสภาวะการผลิต	
เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์.....	175
วิธีรวดเร็วสำหรับวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์.....	181
การทดสอบเชื้อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร.....	186
การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสภาวะแวดล้อมในการผลิต.....	189
ข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาอาหาร.....	190
การวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม.....	196
 เอกสารอ้างอิง	198

บทที่ 1

บทนำ

วิชาจุลชีววิทยาเป็นสาขาหนึ่งของวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา สาหร่ายบางชนิด โปรโตซัว ไวรัส ไวรอยด์ (viroids) และไพรอน (prion) โดยลักษณะร่วมที่สำคัญของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้แก่การที่มีขนาดเล็กและไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าของมนุษย์ ต้องอาศัยเครื่องมือได้แก่กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะของเซลล์หรือโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อนและสามารถเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการที่คล้ายคลึงกันได้

การศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาเริ่มต้นเมื่อ ค.ศ. 1677 โดย Antony van Leeuwenhoek ประดิษฐ์กล้องจุลทรรศน์เป็นครั้งแรกและได้สังเกตเห็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กหลายชนิดเช่น โปรโตซัว สาหร่าย เชื้อราและแบคทีเรียขนาดใหญ่ จากนั้นมีการพัฒนาประสิทธิภาพของกล้องดังกล่าว จนมีการประดิษฐ์กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ที่สามารถมองเห็นไวรัสได้ รวมทั้งทำให้สังเกตเห็นความแตกต่างระหว่างโครงสร้างของแบคทีเรียและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และทำให้ทราบขนาดของเซลล์ จุลินทรีย์ชนิดต่างๆซึ่งพบว่ามีขนาดแตกต่างกันอย่างมาก เช่นอะมีบา (amoeba) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 500 ไมโครเมตร ซึ่งมนุษย์สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ในขณะที่ไวรัสชนิดที่มีขนาดเล็กที่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 ไมโครเมตร

วิธีการดั้งเดิมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ คือเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยทำการแยกเชื้อที่ต้องการมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้วิธีการปลอดเชื้อ (aseptic techniques) ซึ่งเป็นวิธีการที่สำคัญและทำให้เกิดการพัฒนาเกี่ยวกับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตามลำดับ

การศึกษาด้านจุลินทรีย์ได้มีการแบ่งเป็นสาขาย่อย ที่เน้นศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เฉพาะชนิด ได้แก่แบคทีเรียวิทยา (bacteriology) ราวิทยา (mycology) โปรโตซัววิทยา (protozoology) สาหร่ายวิทยา (phycology หรือ algology) และไวรัสวิทยา (virology) โดยแต่ละสาขาย่อยจะเน้น

เกี่ยวกับความรู้พื้นฐานด้านลักษณะโครงสร้าง ชีวเคมี สรีรวิทยาและพันธุกรรมเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ยังสามารถแบ่งเป็นสาขาวิชาประยุกต์ในด้านต่างๆ โดยเน้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ สิ่งแวดล้อมและกิจกรรมของมนุษย์ ทำให้สามารถแบ่งเป็นสาขาต่างๆ ได้แก่ จุลชีววิทยาทางการแพทย์ (medical microbiology) ซึ่งรวมถึงการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเชื้อโรค ภูมิคุ้มกันและระบาดวิทยา จุลชีววิทยาทางการเกษตร (agricultural microbiology) ที่เกี่ยวข้องกับโรคในสัตว์ต่างๆ ที่มนุษย์นำมาบริโภค โรคพืช และจุลชีววิทยาของดิน จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม (industrial microbiology) และเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้จุลินทรีย์ให้เกิดประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ รวมทั้งจุลชีววิทยาทางอาหาร (food microbiology) ซึ่งเป็นการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของจุลินทรีย์ในการถนอมอาหาร จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย รวมทั้งที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยทั่วไปนักจุลชีววิทยาทางอาหาร มุ่งความสนใจหลักไปที่การศึกษาต่างๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับอาหารหมัก คุณภาพของน้ำ การถนอมอาหาร การเสื่อมเสียของอาหาร การควบคุมคุณภาพ เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค สุขลักษณะที่ดีของอาหาร และการจัดการห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามศาสตร์เฉพาะด้านต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วมีความเหลื่อมล้ำกันอยู่และไม่สามารถแยกจากกันได้ โดยเด็ดขาด ตัวอย่างเช่นการศึกษาด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร จะมีความเกี่ยวข้องกันกับจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพในการผลิตอาหารหมักและโปรตีนเซลล์เดียว หรือในการศึกษาเกี่ยวกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์ จะมีความเกี่ยวข้องกันระหว่างจุลชีววิทยาทางการแพทย์และจุลชีววิทยาทางการเกษตร เป็นต้น

แม้ว่ากระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของอาหาร วิธีการถนอมรักษาอาหารและการหมักอาหารจะเป็นที่รู้จักกันมานานตั้งแต่สมัยโบราณ แต่การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์และอาหารเพิ่งเริ่มต้นเมื่อต้น ค.ศ. 1800 โดยในปี ค.ศ. 1837 Shwann รายงานว่า ยีสต์ที่พบในช่วงการหมักแอลกอฮอล์เป็นพืชที่มีขนาดเล็กและไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ และระหว่างปี ค.ศ. 1857 และ 1876 Pasteur พิสูจน์ให้เห็นว่าจุลินทรีย์เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในอาหารและเครื่องดื่ม ซึ่งการศึกษาดังกล่าวได้ทำให้เกิดการพัฒนาการของวิชาจุลชีววิทยาทางอาหารขึ้นจนถึงปัจจุบัน อย่างไรก็ตามระดับความสนใจของนักจุลชีววิทยาอาหารต่อจุลินทรีย์แต่ละชนิด มีความแตกต่างกัน โดยมักให้ความสำคัญกับแบคทีเรียเป็นอันดับแรก ตามด้วยเชื้อราและยีสต์ ส่วนไวรัสนั้นเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจน้อยที่สุด

ในส่วนของนักจุลชีววิทยาอาหารจะต้องมีความรู้เฉพาะที่ต้องอาศัยความรู้พื้นฐาน ได้แก่ โครงสร้างของจุลินทรีย์ การจำแนก และการแยกจุลินทรีย์ การเจริญและปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การควบคุมและการตายของจุลินทรีย์ อาหารของจุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

จุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ได้แก่แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ มีความเกี่ยวข้องกับโรคอาหารเป็นพิษ การเสื่อมเสียของอาหาร การหมักอาหาร การผลิตวัตถุเจือปนอาหารและเอ็นไซม์และการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว รวมทั้งไวรัสที่ทำให้กระบวนการหมักผลิตภัณฑ์เช่นการหมักนํ้านมข้นเหลวหรืออาจใช้ไวรัสในการแยกชนิดของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

บทที่ 2

โครงสร้างของจุลินทรีย์

แบคทีเรีย

แบคทีเรียมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวและรูปร่างไม่ซับซ้อน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 0.2 – 3.0 ไมโครเมตร และความยาวระหว่าง 0.5 – 10.0 ไมโครเมตร ซึ่งมนุษย์ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า การศึกษาเซลล์ของแบคทีเรียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ร่วมกับการย้อมสี ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับรูปร่าง ขนาดและการจัดเรียงตัวของเซลล์จุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น เช่นการย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู (methylene blue) จะทำให้เห็นเซลล์เป็นสีน้ำเงินหรือฟ้า เนื่องจากสีดังกล่าวจะรวมตัวกับกรดไรโบสนิวคลีอิก (ribose nucleic acid) ลักษณะของเซลล์และการจัดเรียงตัวของแบคทีเรีย แสดงดังภาพที่ 1

การย้อมแกรม (Gram stain)

การย้อมแกรมเป็นเทคนิคที่สำคัญและใช้ในการศึกษาเซลล์ของแบคทีเรียร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง (light microscope) เทคนิคนี้คิดค้นในปี ค.ศ. 1984 โดย Christian Gram ชาวเดนมาร์ก เพื่อใช้ในการจำแนกแบคทีเรียจากตัวอย่าง ในปัจจุบันวิธีนี้เป็นขั้นตอนแรกในการจำแนกแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบชนิด โดยสามารถแบ่งตามการติดสีของเซลล์เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแกรมบวก (Gram positive) ที่ยังคงติดสีม่วงแดงของสารประกอบเชิงซ้อนคริสตอลไวโอเลต-ไอโอดีน (crystal violet iodine complex) หลังจากที่ถูกชะด้วยสารชะสี (decolorizing agent) และกลุ่มแกรมลบ (Gram negative) ซึ่งย้อมไม่ติดสีดังกล่าว แต่สามารถย้อมติดสีของซาฟรานิน (safranin) ซึ่งทำให้เห็นเซลล์เป็นสีชมพู

Spherical cells – cocci

Diplococci – cells divide in one plane and remain attached in pairs



Diplococcus spp

Cocco bacilli – sometimes diplococci are not true spheres but appear as elongated structures



Moraxella spp
Acinetobacter spp

Streptococci – cells divide in one plane but remain attached to form chains. These chains have a tendency to break up into pairs



Streptococcus spp
Leuconostoc spp
Lactococcus spp

Tetrads – cells divide in two planes producing groups of four cells



Micrococcus spp

Staphylococci – cells divide in three planes in an irregular pattern producing bunches of cocci



Staphylococcus spp

Rod shaped cells – bacilli

Short rods



Pseudomonas spp
Shewanella spp
Vibrio spp

Long to medium size rods



Escherichia coli
Salmonella spp

Rods forming chains



Bacillus spp
Lactobacillus spp

Curved or helical cells – spirillar

Comma shaped



Vibrio comma

Curved



Campylobacter spp

ภาพที่ 1 ลักษณะของเซลล์และการจัดเรียงตัวของจุลินทรีย์

ที่มา : Garbutt (1997)

อย่างไรก็ตามลักษณะทางสรีรวิทยาของเซลล์มีผลต่อการย้อมแกรม โดยทั่วไปมักใช้เซลล์ที่มีอายุไม่เกิน 18 ชั่วโมงหรือน้อยกว่า ซึ่งในส่วนของแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์บางชนิด เช่น *Micrococcus* spp. มีแนวโน้มสูญเสียคุณสมบัติในการคงสารประกอบเชิงซ้อนคริสตอลไวโอเลต - ไอโอดีนไว้บนเซลล์ เมื่ออายุของเชื้อดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น ส่วนเชื้อที่มีอายุมากอาจย้อมติดทั้งสีแกรมบวกและ แกรมลบ หรืออาจย้อมติดสีแกรมลบเพียงอย่างเดียวในบางกรณี จุลินทรีย์ชนิดนี้อาจเรียกว่า Gram variable และจุลินทรีย์แกรมบวกทุกชนิดจะสูญเสียคุณสมบัติการย้อมแกรมทันทีที่เซลล์ตายและเริ่มสลายตัว

โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย

โครงสร้างที่เฉพาะของเซลล์แบคทีเรีย เช่นสปอร์ สามารถทำให้มองเห็นได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงร่วมกับเทคนิคเฉพาะในการย้อมสี แต่บางเทคนิคเช่นที่ใช้ดูลักษณะของแฟลกเจลลา (flagella) นั้นมีขั้นตอนยุ่งยากและให้ผลที่ไม่แน่นอน ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ซึ่งได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงร่วมกับเทคนิคการย้อมสี ทำให้สามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้ในการจำแนกแบคทีเรียในการตรวจวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการได้

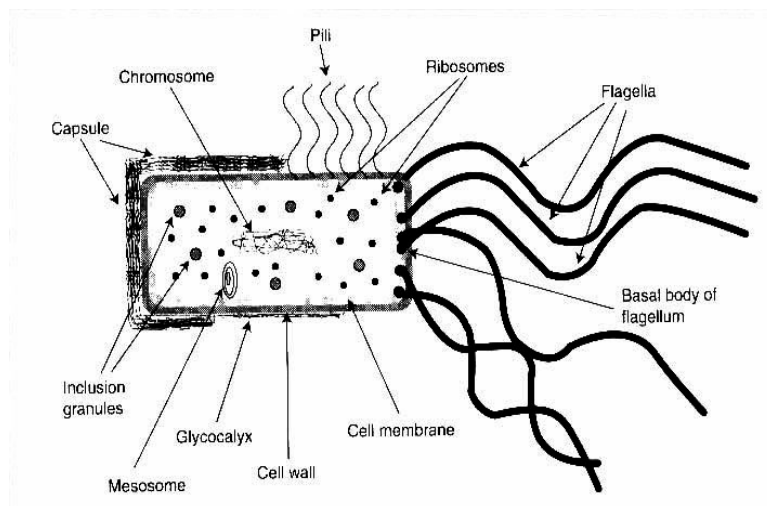
ตารางที่ 1 โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียที่สังเกตได้โดยวิธีการต่างๆ

ลักษณะเซลล์	วิธีการ
รูปร่างเซลล์	การย้อมสีธรรมดาหรือการย้อมแกรม
ขนาดของเซลล์	การย้อมสีธรรมดาหรือการย้อมแกรม
ลักษณะการจับกลุ่ม	การย้อมสีธรรมดาหรือการย้อมแกรม
การติดสีแกรม	การย้อมแกรม
แฟลกเจลลา	วิธี hanging drop motility
สปอร์	การย้อมสปอร์ เช่น hot spore stain

ที่มา : Garbutt (1997)

ในการศึกษาโครงสร้างของจุลินทรีย์อย่างละเอียดนั้น จำเป็นต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) เนื่องจากกล้องจุลทรรศน์พื้นสว่าง (bright field microscope) จะมีข้อจำกัดของ resolving power (ความสามารถในการให้รายละเอียดและแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งของหรือวัตถุสองสิ่งที่อยู่ใกล้กันได้) ค่า resolving power ของกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่ใช้เลนส์กำลังขยายประมาณ 1,000 เท่า มีค่าประมาณ 0.2 ไมโครเมตร ซึ่งหมายความว่าสิ่งของหรือวัตถุที่มีขนาดเล็กกว่า 0.2 ไมโครเมตร และวัตถุที่อยู่ใกล้กันน้อยกว่า 0.2 ไมโครเมตร กล้องนี้ จะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ในส่วนของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามีกำลังขยายสูงถึง 1 แสนเท่า และสามารถแยกและทำให้มองเห็นวัตถุที่อยู่ใกล้กันถึง 2.5 นาโนเมตรได้

รายละเอียดของโครงสร้างเซลล์แบคทีเรียและองค์ประกอบของเซลล์ สามารถศึกษาได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ส่วนโครงสร้างภายในของเซลล์สามารถศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทรานส์มิชชัน (transmission electron microscope) ร่วมกับการเคลือบด้วยโลหะ ส่วนพื้นผิวของเซลล์ศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสแกน (scanning electron microscope) โครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียแสดงดังภาพที่ 2



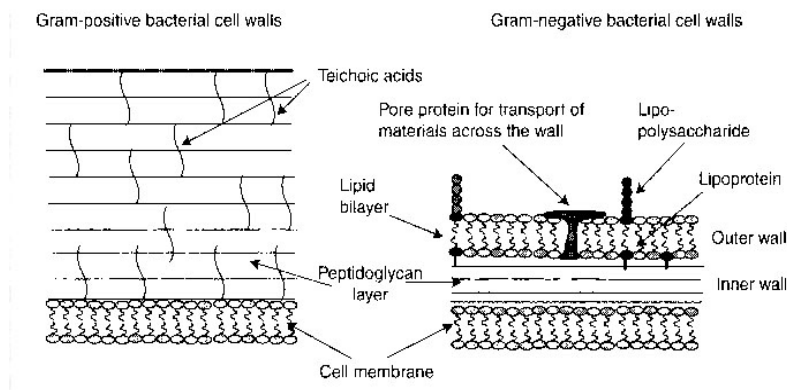
ภาพที่ 2 โครงสร้างเซลล์แบคทีเรีย

ที่มา : Garbutt (1997)

แบคทีเรียทุกชนิดมีโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบเซลล์ได้แก่ ผนังเซลล์ (cell wall) เซลล์เมมเบรน (cell membrane) ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โครโมโซมเดี่ยว (single chromosome) และไรโบโซม (ribosomes) และในแบคทีเรียบางชนิดจะมีแคปซูล (capsules) ไกลโคคาลิกซ์ (glycocalyx) ฟิมเบรีย (fimbriae) หรือพิลไล (pili) มีโซโซม (mesosomes) แฟลกเจลลา อินคลูชันแกรนูล (inclusion granules) และสปอร์

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะเป็นชั้นที่ค่อนข้างแข็งแรงล้อมรอบเซลล์เมมเบรนและมีหน้าที่เป็นโครงสร้างของเซลล์ โดยป้องกันเซลล์จากแรงดันออสโมติกและจากแรงกลภายนอก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียส่วนใหญ่ประกอบด้วยโพลีเมอร์ที่มีสาร N-acetyl glucosamine และ N-acetyl muramic acid ต่อสลับกัน โดยสารชนิดแรกเป็นองค์ประกอบของไคติน (chitin) พบในผนังเซลล์ของเส้นใยเชื้อราและโครงสร้างภายนอกของแมลง ส่วนสารชนิดหลังเป็น amino sugar ที่พบเฉพาะในผนังเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น สารทั้งสองชนิดเกาะกันด้วยกรดอะมิโนทำให้ได้โครงสร้าง 3 มิติ เรียกว่าเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) หรือมูริน (murein) มิวโคเปปไทด์ (mucopeptide) หรือมิวโคคอมเพลกซ์ (mucocomplex)

ในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีองค์ประกอบของโครงสร้างผนังเซลล์ที่แตกต่างกันอย่างมากรอกเหนือจากเปปติโดไกลแคนแล้วยังพบ teichoic acid ที่เชื่อมกับเปปติโดไกลแคนด้วยพันธะโคเวเลนต์และช่วยเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์ ชั้นของเปปติโดไกลแคนในแบคทีเรียแกรมลบบางกว่าของแกรมบวกมาก (ประมาณ 1 ใน 10) และมีพันธะเปปไทด์ที่เชื่อมระหว่างเส้นเปปติโดไกลแคนน้อยกว่า และไม่มีพันธะของ teichoic acid ที่เพิ่มความแข็งแรง ดังนั้นผนังเซลล์ของพวกแกรมลบจึงแข็งแรงน้อยกว่าแกรมบวกมาก ชั้นนอกที่ติดกับเปปติโดไกลแคน คือชั้นของไลโปโปรตีน (lipoprotein) ฟอสโฟไลปิด (phospholipid) และสารโพลีเมอร์คือไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ที่พบเฉพาะในผนังเซลล์ของแกรมลบเท่านั้น ชั้นนอกสุดของผนังเซลล์หรือ outer envelope หรือ outer membrane มีโครงสร้างเหมือนกับเมมเบรนอื่น ๆ ที่พบทั่วไป โดยมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากและประกอบด้วยแอนติเจนที่เหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และความเป็นพิษของแบคทีเรียแกรมลบทำให้เกิดอาการไข้ ช็อค และอาการอื่น ๆ นอกจากนั้นชั้นนอกสุดนี้ยังทำหน้าที่ป้องกันสารเคมีที่เป็นพิษเข้าสู่ภายในเซลล์ ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและลบ



ภาพที่ 3 ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

ที่มา : Garbutt (1997)

เซลล์เมมเบรน (plasma หรือ cytoplasmic membrane) เป็นชั้นบางของโครงสร้างที่ประกอบด้วยไขมันและโปรตีนที่กั้นระหว่างไซโตพลาสซึมและภายนอกเซลล์ โดยมีความหนาเพียง 7 นาโนเมตร ประกอบด้วยฟอสโฟลิปิด 2 ชั้นที่มีโมเลกุลของโปรตีนอื่น ๆ อยู่ตรงกลางหน้าที่ยของเซลล์เมมเบรนได้แก่

- กั้นแบ่งระหว่างไซโตพลาสซึมและภายนอกเซลล์
- ควบคุมการไหลเข้าและออกของสารภายในเซลล์ โดยโปรตีนที่เมมเบรนทำหน้าที่เหมือนรู (pores) เข้าออกของน้ำและสารอื่นๆอย่างรวดเร็วโดยมีเอ็นไซม์ permeases ช่วยขนส่งระหว่างเมมเบรน
- ในแบคทีเรียบางชนิดมีการสร้างเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ (respiratory enzyme) ที่เซลล์เมมเบรน
- ในระหว่างการแบ่งเซลล์สารพันธุกรรมจะเกาะติดที่เซลล์เมมเบรน ซึ่งมีบทบาทในการทำให้เกิดการสร้างสารพันธุกรรมชิ้นใหม่ของเซลล์ลูกที่เกิดใหม่ทั้งสองเซลล์
- เอ็กโซเอ็นไซม์ (exoenzymes หรือ extracellular enzymes) จะถูกปล่อยออกมาที่พื้นผิวของเซลล์ที่ติดกับเมมเบรน

ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์แบคทีเรียมีลักษณะเป็นของไหล ประกอบด้วยน้ำประมาณร้อยละ 75 รวมทั้งโปรตีน เอนไซม์ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เกลืออนินทรีย์ และของเสียจากเมตาโบลิซึม รวมทั้งไรโบโซมและ DNA

จีโนมของแบคทีเรีย (bacterial genome) หมายถึง สารพันธุกรรมของแบคทีเรียซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมรูปร่างวงแหวนเพียงอันเดียวและพลาสมิด (plasmids) หรืออีพิโซม (episomes) โครโมโซมวงแหวนมีเส้นสายของโมเลกุล DNA 2 ชั้น มีข้อมูลทางพันธุกรรม (ประมาณ 4,000 ยีนส์) ซึ่งควบคุมพัฒนาการและกิจกรรมเมตาโบลิซึมของเซลล์ โมเลกุล DNA สายคู่นี้จะพันและอัดแน่นเป็นก้อนที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2 ไมโครเมตร และกินเนื้อที่ประมาณร้อยละ 15-25 ของไซโตพลาสซึม ส่วนพลาสมิดเป็นโครงสร้างของสารพันธุกรรมขนาดเล็กที่แตกต่างจากโครโมโซม ในแบคทีเรียจะพบเป็นโครงสร้างวงแหวนขนาดเล็กที่ประกอบด้วย 5-10 ยีน และเก็บข้อมูลที่ไม่เกี่ยวข้องกับการมีชีวิตรอดของเซลล์ แต่อาจช่วยในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่นพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการต้านยาปฏิชีวนะของเซลล์หรือพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบอื่นๆ ที่ผิดปกติ โดยสามารถนำพลาสมิดไปใส่ในเซลล์ของแบคทีเรียอื่น ๆ ได้

ไรโบโซม (ribosomes) มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25 นาโนเมตรและประกอบด้วยโปรตีนและ RNA ไรโบโซมมีหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนให้แก่เซลล์และพบมากในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งเมื่อย้อมเซลล์แบคทีเรียด้วยสีเมธิลีนบลู ไรโบโซมจะติดสีน้ำเงินเข้ม ไรโบโซมของแบคทีเรีย คือชนิด 70s (s คือ Svedberg units เป็นหน่วยที่วัดอัตราเร็วสัมพัทธ์ในการตกตะกอนจากเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง)

แคปซูล (capsules) หรือเมือก (slime layers) เป็นสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมาเคลือบผนังเซลล์ โดยถ้ามองเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงจะเรียกว่าแคปซูล แต่ถ้าชั้นนี้หลุดออกและปะปนอยู่ในตัวกลางทำให้คล้ายเมือก แคปซูลประกอบด้วยโพลิแซคาไรด์หรือโพลิเปปไทด์ ขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียนำมาใช้และมีหน้าที่ดังนี้

- ปกป้องการสูญเสียน้ำของเซลล์
- ช่วยให้แบคทีเรียเกาะติดกับพื้นผิว
- ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียเกาะติดกัน
- เป็นชั้นป้องกันอันตรายจากสารปฏิชีวนะและฟาโกไซต์ (phagocytes)
- อาจป้องกันการสูญเสียธาตุอาหารของเซลล์
- ช่วยดูดซึมแคตไอออน (cation) เนื่องจากมีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl) ในโครงสร้าง
- แคปซูลที่สร้างจากโพลีแซคคาไรด์อาจช่วยทำให้ไวรัสมาเกาะติดง่ายขึ้น
- ป้องกันเซลล์จากแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage)

แบคทีเรียหลายชนิดทำให้อาหารเสื่อมเสียโดยสร้างเมือกขึ้น เช่น ในเนยแข็งคottage (cottage cheese) ที่มีเมือกจากการเจริญของจุลินทรีย์พวกแกรมลบรูปแท่ง ส่วนเมือกที่สร้างจากสตาร์ทเตอร์ (starter) ที่ใช้ผลิตโยเกิร์ตจะทำให้ได้ลักษณะเนื้อสัมผัสเฉพาะ

ไกลโคคาลิกซ์ (glycocalyx) เป็นโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์ขนาดยาวที่พันกันและอยู่ห่างจากพื้นผิวของเซลล์ซึ่งจะสามารถเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเท่านั้น โครงสร้างนี้ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียยึดติดกันหรือยึดเกาะกับพื้นผิวได้

พิลไล (pili, fimbriae) มีโครงสร้างเป็นท่อ ความยาวแตกต่างกันและสร้างขึ้นออกมาจากเซลล์เมมเบรน โดยมีความยาวระหว่าง 0.2 - 20 ไมโครเมตรและเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.02 ไมโครเมตร มักพบในแบคทีเรียแกรมลบ เช่น ในตระกูล Enterobacteriaceae และ Pseudomonadaceae มีหน้าที่ช่วยให้เซลล์เกาะติดกับพื้นผิวหรือเกาะระหว่างจุลินทรีย์ด้วยกัน ส่วน sex pili เกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายสารพันธุกรรมของแบคทีเรีย

การที่แบคทีเรียสามารถเกาะติดกับพื้นผิวได้ เนื่องจากแคปซูล ไกลโคคาลิกซ์ หรือพิลไล ทำให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ในท่อซึ่งทำความสะอาดได้ยากหรือพวกโคลิฟอร์ม อาจเกาะติดกับหัวจุลกวนที่ใช้ในเครื่องบรรจุขวดซึ่งอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้

มีโซโซม (mesosomes) พบในแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดและมักไม่พบในพวกแกรมลบ มีลักษณะเป็นโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนที่พับกัน มีหน้าที่ในการเพิ่มกระบวนการหายใจของเซลล์ เช่น ในการสร้างผนังเซลล์ใหม่ ช่วยในการแบ่งตัวของโครโมโซมหรือช่วยในการหลั่งเอ็นไซม์ penicillinase ในพวก *Bacillus*

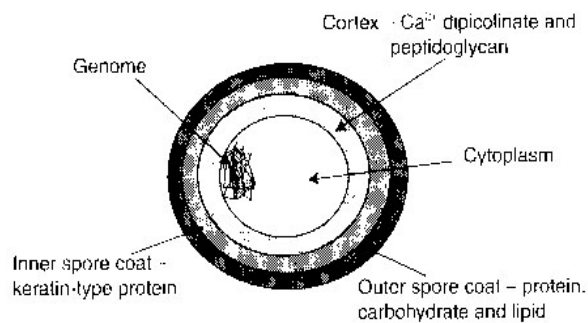
แฟลกเจลลา (flagella) มีลักษณะคล้ายเส้นผม ความยาวประมาณ 10 - 20 ไมโครเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.1 - 0.7 ไมโครเมตร โดยงอกออกมาจากเซลล์ในแบคทีเรียบางชนิด แฟลกเจลลากำเนิดจากเซลล์เมมเบรนและติดยึดกับเซลล์เมมเบรนและผนังเซลล์ตรงบริเวณ basal body และประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นเกลียวเรียกว่า flagellin แฟลกเจลลามีหน้าที่ในการเคลื่อนที่ของเซลล์ในของเหลว ตำแหน่งของแฟลกเจลลาที่พบในแบคทีเรียทั่วไปจะเรียงตัวรอบๆ เซลล์เรียกว่า peritrichous หรือ อยู่บริเวณขั้วเซลล์ซึ่งอาจมีหนึ่งเส้นหรือมากกว่าเรียกว่า polar

ตำแหน่งการเรียงตัวของแฟลกเจลลานั้นมีความสำคัญ โดยสามารถนำมาใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ โดยแบคทีเรียตระกูล Bacillaceae และ Enterobacteriaceae จะพบชนิด peritrichous ส่วนพวก Pseudomonadaceae พบแฟลกเจลลาชนิด polar และเนื่องจากแฟลกเจลลามีความหนาประมาณ 0.1 - 0.7 ไมโครเมตร ดังนั้นจึงต้องใช้เทคนิคพิเศษเพื่อทำให้มองเห็นได้ เช่น เทคนิค hanging drop หรือวิธีทางอ้อม เพื่อสังเกตการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยใช้ motility agars

แกรนูลสะสมอาหาร (storage granules) ใช้เป็นแหล่งสะสมอาหารของแบคทีเรียและไม่ทำให้เกิดผลจากแรงดันออสโมติก เช่น polyphosphate (volutin) granules เป็นแหล่งของฟอสเฟตสำหรับการสังเคราะห์ RNA และ DNA ภายในเซลล์ polyhydroxybutyrate (PHB) เป็นกรดไขมันสายโซ่สั้น และ glycogen granules เป็นแหล่งของพลังงาน

เ็นโดสปอร์ (endospores) สร้างในเซลล์แม่ (mother cell) และพบในแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ *Clostridium* และ *Bacillus* ซึ่งมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจาก สปอร์ทนต่อสภาวะที่แห้งแล้งได้มากกว่าเซลล์ปกติ เช่น ความร้อน สารเคมี (สารฆ่าเชื้อและวัตถุกันเสีย) การแช่แข็ง สภาวะของ pH ที่ต่ำหรือสูงเกินไป การทำแห้งหรือการดึงน้ำออก การฉายรังสี การทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง และสภาวะที่มี a_w ต่ำ

ในกระบวนการแปรรูปอาหาร เช่น การผลิตอาหารบรรจุกระป๋องจะกำหนดให้ใช้ความร้อนฆ่าสปอร์ของแบคทีเรียก่อโรค คือ *Clostridium botulinum* ในอาหารที่เป็นกรดต่ำ (low acid foods) โครงสร้างของสปอร์แบคทีเรีย แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 โครงสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย

ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 4 จะเห็นว่าโครงสร้างภายนอกของสปอร์แบคทีเรียประกอบด้วยโปรตีนที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) จำนวนมาก ซึ่งภายในโมเลกุลโปรตีนจะมีพันธะระหว่างกำมะถัน (S-S bridges) ทำให้ทนต่อสารเคมีและสภาวะแห้งแล้งอื่น ๆ ส่วนชั้นคอร์เท็กซ์ (cortex) ประกอบด้วยกรด dipicolinic ซึ่งพบเฉพาะในสปอร์แบคทีเรียเท่านั้น โดยกรดนี้จะจับกับไอออนแคลเซียม ซึ่งมีรายงานว่าทำให้สปอร์ทนต่อความร้อน

สปอร์ประกอบด้วยน้ำประมาณร้อยละ 15 ซึ่งอาจช่วยในการทนต่อความร้อน การแช่เยือกแข็งและการฉายรังสี นอกจากนี้ยังพบว่าสปอร์มีเมตาโบลิซึมต่ำเช่นการหายใจและมีปริมาณเอนไซม์ต่ำและมีขนาดเล็ก ทำให้ทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่มีในเซลล์ปกติและการสังเกตสปอร์แบคทีเรียโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะต้องย้อมสปอร์ก่อน โดยใช้สีมาลาไคท์ (malachite) และให้ความร้อนประมาณ 5 นาที ซึ่งจะช่วยให้สีแทรกซึมไปยังผนังของสปอร์และอาจย้อมทับด้วยสีซาฟรานิน เพื่อแยกความแตกต่างของเซลล์ที่ไม่สร้างสปอร์ ตำแหน่งของสปอร์

อาจอยู่ตรงกลางภายในหรือปลายเซลล์ หรือบริเวณกลางหรือปลายของเซลล์ ซึ่งทำให้ลักษณะของเซลล์พองออก

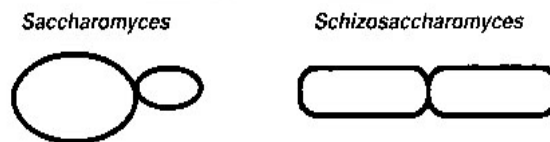
เมื่อแบคทีเรียสร้างสปอร์แล้ว เซลล์แม่จะแตกตัวปล่อยให้สปอร์อยู่ในสภาพแวดล้อมและรอการงอกอีกครั้ง โดยการกระตุ้นจากสารเคมีหรือความร้อนสูง ซึ่งในการใช้ความร้อนสูงในอุตสาหกรรมอาหารจะเหนี่ยวนำให้สปอร์งอกหลังจากอาหารเย็นลง ทำให้เกิดเซลล์ปกติและแบ่งตัวจนสามารถทำให้เกิดอาหารเป็นพิษขึ้นได้

โครงสร้างของเชื้อรา

เชื้อรามีโครงสร้างที่แตกต่างจากแบคทีเรียเป็นอย่างมาก โดยในไซโตพลาสซึมประกอบด้วยนิวเคลียส (nucleus) ที่แท้จริงและมีโครงสร้างที่ซับซ้อน เชื้อราจึงจัดเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดยูคาริโอต (eucaryotes) เนื่องจากการมีนิวเคลียสดังกล่าว

โครงสร้างของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง

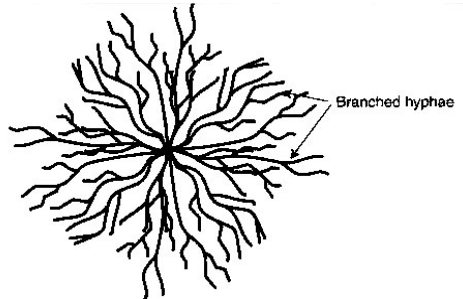
เชื้อราสามารถแบ่งได้เป็น 2 จำพวก ตามโครงสร้างที่พบได้แก่ พวกเซลล์เดี่ยว (unicellular) เช่น ยีสต์และพวกที่สร้างเส้นใย (hyphae) เช่น เชื้อราและพวกเห็ดต่าง ๆ พวกยีสต์มีรูปร่างกลมรี เช่น *Saccharomyces* spp. *Candida* spp. และ *Torula* spp. หรืออาจมีรูปร่างแท่ง เช่น *Schizosaccharomyces* spp. ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 ลักษณะของยีสต์และการแตกหน่อ (budding)

ที่มา : Garbutt (1997)

เส้นใยเชื้อรามีการแตกเป็นสาขากลายท่อฟิลาเมนต์ (filaments) กลุ่มก้อนของเส้นใย เรียกว่าไมซีเลียม (mycelium) ซึ่งมักกำเนิดจากสปอร์หรือชิ้นส่วนของเส้นใย โดยมีลักษณะเป็นปุย เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะไมซีเลียมของเชื้อราแสดงดังภาพที่ 6

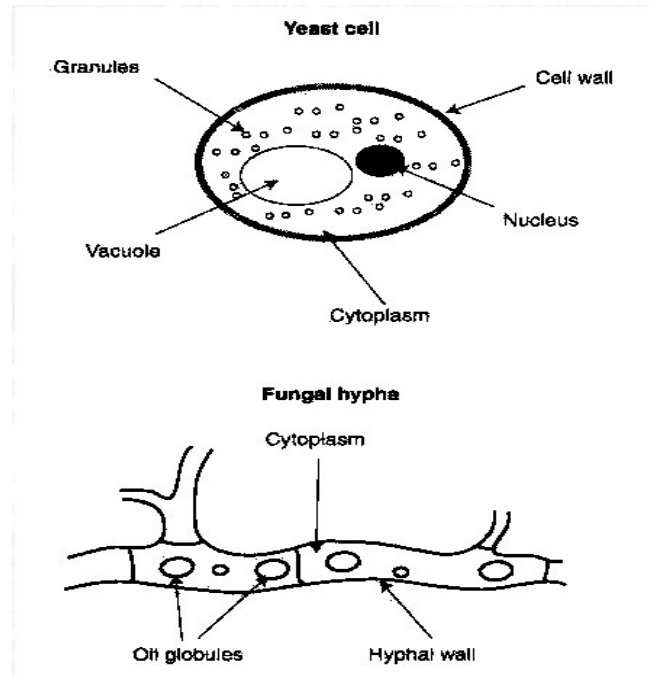


ภาพที่ 6 ไมซีเลียมของเชื้อรา

ที่มา : Garbutt (1997)

ไมซีเลียมอาจมีสีเนื่องมาจากสีของสปอร์หรือสีของเส้นใย การสังเกตโครงสร้างภายในของเส้นใยเชื้อราโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นแกรนูล (granules) โกลบูล (globules) และแวคคิวโอล (vacuoles) ส่วนนิวเคลียสของเชื้อราต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast โครงสร้างของยีสต์และเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแสดงดังภาพที่ 7

โครงสร้างเชื้อราจะแตกต่างกันไปตามชนิด พวก *Rhizopus* และ *Mucor* พบว่าเส้นใยที่มีอายุน้อยจะไม่แบ่งเป็นช่องๆ (non-septate) แต่ในเส้นใยที่มีอายุมากจะพบเม็ดไขมันขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นอาหารสำรองและมีผนังหนาขึ้นแต่ละช่อง กลุ่มที่มีผนังกันแบ่งเป็นช่องในเส้นใยซึ่งมีความสำคัญในอุตสาหกรรมได้แก่ พวก *Penicillium* และ *Aspergillus* รวมทั้งพวกแอสโคไมยซีท (ascomycetes) นอกจากนี้เส้นใยแต่ละเส้นยังเชื่อมโยงกันไปมาเป็นโครงสร้างสามมิติ ส่วนพวกเบซิดิโอไมยซีท (basidiomycetes) จะมีโครงสร้างเรียกว่า clamp เชื่อมต่อระหว่างเส้นใย เช่นในพวกเห็ดชนิดต่างๆ

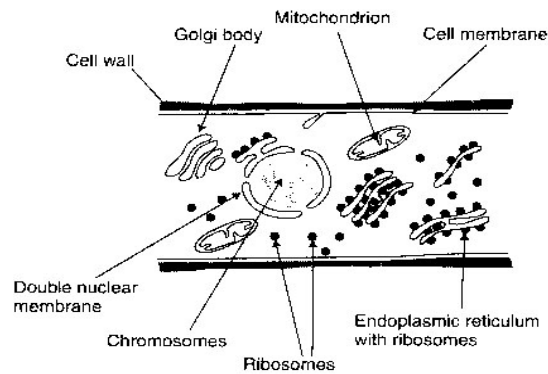


ภาพที่ 7 โครงสร้างของยีสต์และเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง
ที่มา : Garbutt (1997)

เส้นใยเชื้อราของพวก *Mucor* และ *Rhizopus* นั้นไม่ใช่เซลล์ที่มีไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสที่ล้อมรอบด้วยพลาสมาเมมเบรน แต่เป็นก้อนของไซโตพลาสซึมในท่อที่มีนิวเคลียสหลายอัน ส่วนพวก *Penicillium* ซึ่งมีผนังภายในเส้นใยแต่ละช่องพบว่ามีรูตรงกลางผนังกัน (septal pore) ซึ่งทำให้โครงสร้างของเซลล์ภายในท่อรวมทั้งบรรดานิวเคลียสเคลื่อนที่ไปมาได้ ส่วนเส้นใยชนิดพิเศษจะมีหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างสปอร์และฟรุ๊ตบอดี้ (fruit bodies) เช่นเห็ดต่างๆ

โครงสร้างของเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อศึกษาโครงสร้างภายในของเชื้อราชี้ให้เห็นว่ามีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากกว่าแบคทีเรีย ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 โครงสร้างภายในเส้นใยเชื้อราจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ที่มา : Garbutt (1997)

ผนังเซลล์ของเชื้อราล้อมรอบไซโตพลาสซึม มีหน้าที่ให้โครงสร้างและป้องกันแรงดันออสโมติกและแรงกลจากภายนอก เชื้อราส่วนใหญ่มีไคติน (chitin) เป็นองค์ประกอบและอาจมีเซลลูโลส (cellulose) ส่วนในยีสต์ผนังเซลล์จะมีโพลิเมอร์ของน้ำตาลแมนโนส (mannose) และโปรตีนบางชนิดเป็นองค์ประกอบ

เมมเบรนไซโตพลาสซึม (cytoplasmic membrane) ประกอบด้วยฟอสโฟไลปิด 2 ชั้น และโปรตีน แต่ในผนังเซลล์ของเชื้อราจะพบไขมันประเภทสเตอรอล (sterols) ซึ่งทำให้เมมเบรนนี้แข็งแรง เมมเบรนไซโตพลาสซึมทำหน้าที่แบ่งกั้นระหว่างไซโตพลาสซึมและสิ่งแวดล้อมภายนอก รวมทั้งควบคุมการเข้าออกของสารเคมี ในส่วนของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจจะอยู่ที่เมมเบรนชั้นในของไมโทคอนเดรีย และเมมเบรนไซโตพลาสซึมไม่มีบทบาทเกี่ยวกับการส่งถ่ายสารพันธุกรรมในระหว่างการแบ่งเซลล์

ซีเลีย (cilia) และแฟลกเจลลา (flagella) ใช้ในการเคลื่อนที่ของพวุกยูคาริโอต แต่มักไม่พบในพวกเชื้อรา โดยอาจพบในเซลล์สืบพันธุ์ของราพวกที่มีวิวัฒนาการต่ำ และไม่พบในเชื้อราที่มีความเกี่ยวข้องกับอาหาร

ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เป็นสารละลายคอลลอยด์ที่ประกอบด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเกลืออนินทรีย์ รวมทั้งโครงสร้างเมมเบรนของพวกยูคาริโอต

นิวเคลียส (nucleus) เป็นองค์ประกอบที่ใหญ่ที่สุดในเซลล์ของยูคาริโอต (เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ไมโครเมตร) มีเมมเบรนหุ้มสองชั้นและมีรูพรุนจำนวนมาก ซึ่งโปรตีนและ RNA สามารถเคลื่อนที่ได้ ทำให้สามารถควบคุมปฏิกิริยาชีวเคมีภายในไซโตพลาสซึมได้ นิวเคลียสประกอบด้วยดีเอ็นเอ (DNA) และนิวคลีโอไล (nucleoli) หนึ่งอันหรือมากกว่า ซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์ ribosomal RNA

จีโนม (genome) เป็นสารพันธุกรรมภายในนิวเคลียส โดยมีลักษณะคล้ายเส้นด้ายพันกันเป็นก้อน เมื่อมองจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เส้นเหล่านี้ประกอบด้วย DNA และโปรตีน ในระหว่างการแบ่งเซลล์เส้นเหล่านี้จะรวมตัวกันเป็นโครโมโซม (chromosomes) ซึ่งมองเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง

ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานเคมีในรูปของ ATP ที่เมมเบรนชั้นในของไมโทคอนเดรีย เป็นที่สร้างเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ

ไรโบโซม (ribosomes) ในเซลล์เป็นชนิด 80s เช่นเดียวกับพวกยูคาริโอตทั่วไป และมีหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมบางอันจะเกาะติดกับเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอ็นไซม์ซึ่งจะหลั่งออกนอกเซลล์ ส่วนไรโบโซมอื่นๆ จะลอยอยู่ในไซโตพลาสซึม โดยทำหน้าที่สังเคราะห์ทั้งเอ็นไซม์และโปรตีนโครงสร้างอื่นๆ

แกรนูลสะสมอาหาร (storage granules) เป็นที่เก็บสะสมอาหารเช่นเดียวกับที่พบในแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่เป็นไกลโคเจน (glycogen) และไขมัน

เอ็นโดพลาสมิก เรติคูลัม (endoplasmic reticulum) และกอลจิเมมเบรน (golgi membranes) ของเซลล์สร้างจากเมมเบรนของนิวเคลียส โดยมีไรโบโซมเกาะติดอยู่เรียกว่า rough

endoplasmic reticulum ส่วนกอลจิเมมเบรนมีลักษณะเรียบ (smooth) และเป็นที่สังเคราะห์โปรตีน

แวคคิวโอล (vacuoles) พบทั่วไปในไซโตพลาสซึมของเชื้อราและมีเมมเบรนล้อมรอบ เข้าใจว่าทำหน้าที่สำรองน้ำภายในเซลล์

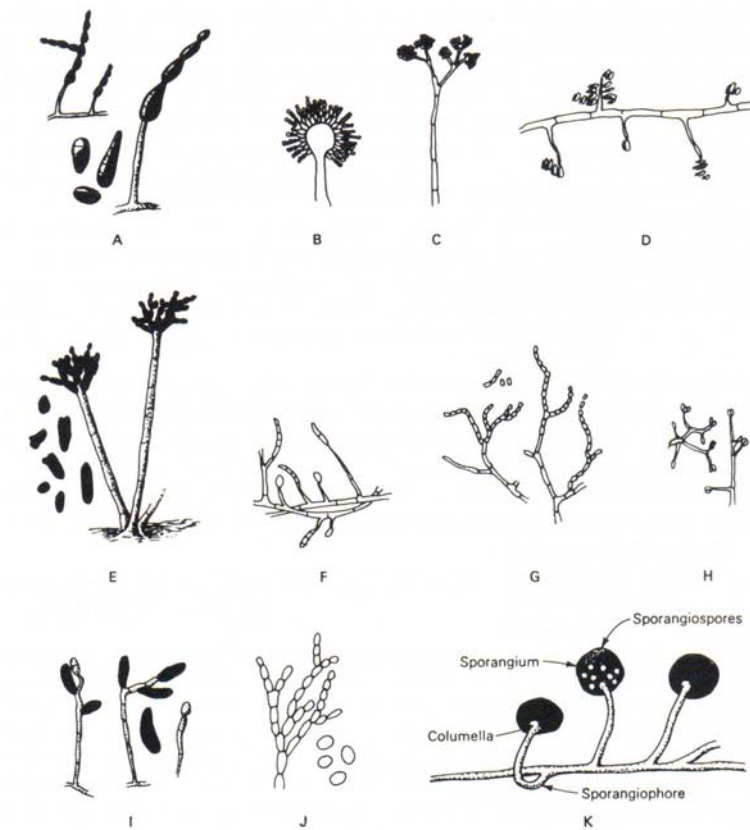
สปอร์ (spores) ของเชื้อรามีลักษณะเป็น asexual และทนต่อความร้อนได้ใกล้เคียงกับเส้นใย เชื้อราพวกแอสโคไมซีต (ascomycetes) จะสร้าง sexual spores เรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospores) ซึ่งจะทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี และมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น พวกยีสต์ที่สร้างแอสโคสปอร์ในน้ำผลไม้พาสเจอร์ไรส์ และ *Byssochlamys fulva* ที่สร้างแอสโคสปอร์ในผลไม้บรรจุกระป๋อง

เส้นใยเชื้อราบางชนิดจะสร้างก้อนกลมที่มีสีและมีผนังหนาเรียกว่าคลามัยโดสปอร์ (chlamydospores) ซึ่งทนต่อสภาพแห้งแล้งได้ แต่พบว่าไม่มีความสำคัญเกี่ยวกับการแปรรูปอาหาร ภาพที่ 9 แสดงเชื้อราที่พบโดยทั่วไปในอาหาร

ไวรัส (viruses)

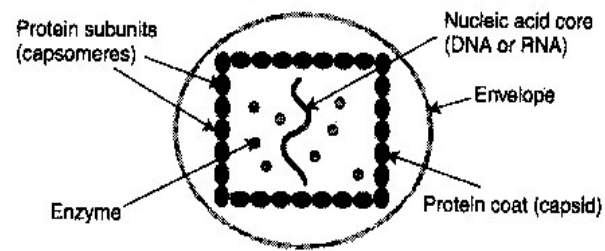
ไวรัสเป็นจุลินทรีย์ที่มีความแตกต่างจากจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ ในด้านโครงสร้างและการทำงาน โดยทั่วไปมีขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 20-30 นาโนเมตร การศึกษาโครงสร้างของไวรัสต้องใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเท่านั้น

ไวรัสมีกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ที่ถูกหุ้มด้วยชั้นโปรตีน เรียกว่าแคปซิด (capsids) ที่ประกอบด้วยแคปโซเมอร์ (capsomeres) หลายอัน กรดนิวคลีอิกอาจเป็น DNA หรือ RNA ซึ่งกรดทั้งสองชนิดเป็นแม่แบบสำหรับการสร้างกรดนิวคลีอิกและโปรตีนใหม่



ภาพที่ 9 เชื้อราที่พบโดยทั่วไปในอาหาร (A- *Alternaria*, B- *Aspergillus*, C- *Botrytis*, D- *Cephalosporium*, E- *Cladosporium*, F- *Fusarium*, G- *Geotrichum*, J- *Monilia*, K- *Mucor*)
ที่มา : ดัดแปลงจาก James (1992)

นอกจากนั้นไวรัสอาจมีเอนไซม์หนึ่งหรือสองชนิดซึ่งจะทำให้โฮสต์ (host) ที่ไวรัสอาศัยอยู่เกิดโรคขึ้นได้ ไวรัสบางชนิดอาจมีชั้นไลโปโปรตีนจากโฮสต์และรวมกับโปรตีนของไวรัสล้อมรอบ และอาจมีโครงสร้างคล้ายหนามซึ่งมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนโดยใช้เกาะกับโฮสต์ โครงสร้างของไวรัสแสดงดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 โครงสร้างของไวรัส

ที่มา : Garbutt (1997)

บทที่ 3

การเรียกชื่อ การจัดจำแนกและการพิสูจน์เอกลักษณ์จุลินทรีย์

อนุกรมวิธาน (taxonomy) เป็นสาขาหนึ่งของวิทยาศาสตร์ชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตโดยแบ่งเป็นการศึกษาใน 3 หมวดใหญ่ ๆ คือ การตั้งชื่อ (nomenclature) การจัดจำแนก (classification) และการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) สิ่งมีชีวิตแต่ละกลุ่ม

ระบบการตั้งชื่อของสิ่งมีชีวิตมีมาตั้งแต่ศตวรรษที่ 18 โดยนักอนุกรมวิธานชื่อ Linnaeus (Carls von Linne) ซึ่งใช้ระบบไบนามียล (binomial) ตามหลักการดังนี้

- สิ่งมีชีวิตเฉพาะแต่ละชนิดจัดเป็นหนึ่งสปีชีส์ (species)
- ชื่อแต่ละสปีชีส์ประกอบด้วยคำสองคำ
- คำแรกเป็นชื่อของจีนัส (generic name) และตัวอักษรตัวแรกเขียนด้วยตัวพิมพ์ใหญ่ ส่วนคำที่สองคือสปีชีส์ (specific name) เขียนเป็นตัวพิมพ์เล็กทั้งหมด และมักบอกรู้หรืออธิบายเกี่ยวกับชนิดของสิ่งมีชีวิต ตัวอย่างเช่น *Escherichia* (โดย Professor Escherich) *coli* (อาศัยในลำไส้ใหญ่) เป็นต้น

โดยปกติชื่อที่เขียนด้วยลายมือมักขีดเส้นใต้ทั้งสองคำแยกจากกันแต่ถ้าพิมพ์มักใช้ตัวเอน (italics) และการย่อคำซึ่งทำให้สะดวกในการเขียนบทความทางวิทยาศาสตร์หรือหนังสือหลังจากเขียนชื่อเต็มครั้งแรกไปแล้ว แสดงดังตารางที่ 2

การตั้งชื่อที่ถูกต้องให้แก่จุลินทรีย์นั้นมีความสำคัญ เนื่องจากให้รายละเอียดเกี่ยวกับทางวิทยาศาสตร์ และสามารถนำมาใช้เปรียบเทียบเพื่อการจัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่เพิ่งถูกค้นพบ รวมทั้งการจัดจำแนก ในบางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงชื่อวิทยาศาสตร์ดังกล่าว เช่น จากเดิม *Pseudomonas putrefaciens* เปลี่ยนเป็น *Shewanella putrefaciens* ในปัจจุบัน แต่มักไม่พบการเปลี่ยนแปลงชื่อบ่อยนัก การเปลี่ยนแปลงชื่อดังกล่าวอาจเนื่องมาจากการค้นพบใหม่ที่สำคัญและแตกต่างจากเดิม เป็นการเปลี่ยนแปลงให้เหมาะสมมากขึ้น เพราะเทคนิคหรือวิธีการศึกษาก่อนหน้าที่ยังไม่ได้มีการ

ตารางที่ 2 คำย่อของชื่อจีนัสของจุลินทรีย์บางชนิด

ชื่อเต็ม	คำย่อ
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staph. aureus</i>
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Ps. fluorescens</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>C. botulinum</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>B. cereus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp <i>thermophilus</i>	<i>Strep. salivarius</i> subsp <i>thermophilus</i>
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>P. citrinum</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Sacc. cerevisiae</i>

ที่มา : Garbutt (1997)

พัฒนาให้เจริญขึ้นดังเช่นในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น เทคนิคในการวิเคราะห์ ribosomal RNA ในการศึกษาเกี่ยวกับลำดับเบสของ ribosomal RNA ทำให้สามารถตั้งจีนัสใหม่ขึ้นมาได้ เช่น กรณีของ streptococci และ lactobacilli ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชื่อจีนัสใหม่ของ lactobacilli และ streptococci

ชื่อเดิม	ชื่อใหม่
<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>
<i>Streptococcus cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>cremoris</i>
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> var <i>diacetylactis</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp <i>thermophilus</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus delbreukii</i> subsp <i>bulgaricus</i>

ที่มา : Garbutt (1997)

โดยปกติสปีชีส์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อย่างชัดเจน โดยมีลักษณะร่วมแบบเดียวกันค่อนข้างมาก จุลินทรีย์บางชนิดเช่นแบคทีเรียจะไม่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแต่อาจใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมกันในรูปของพลาสมิด (plasmids) และชิ้นของ DNA โดยส่งถ่ายผ่านกระบวนการคอนจูเกชัน (conjugation) หรือทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation) อย่างไรก็ตามลักษณะดังกล่าวมักพบบ่อยๆ ในจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ไม่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่สายพันธุ์ที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน (เช่น สายพันธุ์ของ *E. coli*) อาจไม่สามารถแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างกันได้ ซึ่งการตั้งสปีชีส์ของจุลินทรีย์พวกนี้มักใช้ลักษณะที่สังเกตได้ง่าย เช่น โครงสร้างและปฏิกิริยาชีวเคมี รวมทั้งการวิเคราะห์สารพันธุกรรม เช่น ลำดับเบสใน ribosomal RNA และ DNA หรือ DNA hybridization

การจัดจำแนกจุลินทรีย์

การจัดจำแนกจุลินทรีย์แต่ละชนิดกระทำเพื่อใช้แยกจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มออกจากกันและทำให้ทราบว่าแต่ละกลุ่มย่อยจัดอยู่ในกลุ่มใหญ่ของจุลินทรีย์กลุ่มใด โดยเรียกระบบนี้ว่า hierarchical ในการจัดกลุ่มดังกล่าวอาจแบ่งได้เป็น 2 ระบบ คือ ระบบที่แบ่งกลุ่มโดยใช้หลักพื้นฐานอย่างง่าย แต่ไม่บอกให้รู้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ที่แท้จริงของแต่ละลักษณะเรียกว่า artificial (utilitarian) หรือแบ่งกลุ่มโดยใช้หลักการของความสัมพันธ์ที่แท้จริงเรียกว่า natural (phylogenetic) การจัดกลุ่มของสิ่งมีชีวิตตามลำดับชั้น โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะจัดอยู่ใน kingdom phylum division class order family genus และ species เรียงตามลำดับลงมา โดยพวกที่อยู่ลำดับล่างๆ จะมีความใกล้เคียงกันมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นในแต่ละลำดับชั้นอาจมีลำดับชั้นย่อย (subgroup) ได้ถ้าจำเป็น

ความแตกต่างที่สำคัญในระดับเซลล์ระหว่างยูคาริโอตและโปรคาริโอตเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ คือพวกยูคาริโอตจะมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) รวมทั้งโครงสร้างอื่นๆ เช่น ไมโทคอนเดรีย เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม กอลจิโบดี้ และคลอโรพลาสต์ (chloroplast) แต่ในปัจจุบันมีการศึกษาโครงสร้างเซลล์และ ribosomal RNA พบว่าสามารถแบ่งสิ่งมีชีวิตเป็น 3 kingdom ได้แก่

- ยูคาริโอต (eukaryotes) เช่น พืช สัตว์ เชื้อรา และ โปรติสตา (protista) (เช่น สาหร่าย

และโปรโตซัว)

- ยูแบคทีเรีย (eubacteria) เช่น แบคทีเรียต่าง ๆ และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue-green algae)
- อาร์คีแบคทีเรีย (archaeobacteria) เช่น พวกฮาโลไฟล์ (halophiles) เมทาโนเจน (methanogens) และพวกเทอร์โมไฟล์ (thermophiles) ซึ่งมีองค์ประกอบของผนังเซลล์ RNA โปรตีนและไขมันแตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ

ในส่วนของไวรัสนั้นอาจไม่สามารถจัดกลุ่มเข้าไว้ในระบบที่กล่าวมาแล้ว เนื่องจากขาดคุณสมบัติหลายอย่างที่สิ่งมีชีวิตควรมี นอกจากนั้นสิ่งที่มีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้แก่ ไวรอยด์ (viroids) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนของ RNA และเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคพืชหลายชนิดและโปรตีนไพรอน (prion protein) ซึ่งเป็นเส้นใยโปรตีนที่ทำให้เกิดโรค เช่น โรค BSE ในวัว เป็นต้น

การจัดจำแนกแบคทีเรีย

วิธีดั้งเดิมในการจัดจำแนกแบคทีเรียมักใช้ลักษณะที่ตรวจสอบได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ เช่น การย้อมแกรม การเรียงตัวของเซลล์ และปฏิกิริยาชีวเคมี โดยในบางครั้งได้ยกความสำคัญของบางลักษณะมากกว่าทำให้เกิดอคติขึ้นได้ แต่ในปัจจุบันการจัดกลุ่มแบคทีเรียจะพิจารณาจากรหัสพันธุกรรม (genetic code) ของจุลินทรีย์ รวมทั้งการแปลรหัส (translation) พันธุกรรมไปเป็นโครงสร้างโปรตีน

การจัดจำแนกแบคทีเรียตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ที่รวมไปถึงกลุ่มแบคทีเรียที่นักจุลชีววิทยาอาหารให้ความสนใจในลักษณะต่างๆ ได้แก่ปฏิกิริยาแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงของเซลล์ รวมทั้งความต้องการออกซิเจน แต่การจัดกลุ่มในลักษณะนี้พบว่าแบคทีเรียจะสามารถจัดได้เพียง species genera และ families แต่ไม่สามารถจัดกลุ่มในลำดับ orders และ classes ได้ ซึ่งแสดงถึงความยากลำบากในการแสดงลักษณะที่เกี่ยวข้องระหว่าง genera ดังนั้นจึงจัดกลุ่มแบคทีเรียดังกล่าวแยกไว้และรวมเรียกว่า Genera of uncertain affinity

การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในห้องปฏิบัติการมีหลักการใหญ่ 2 ประการได้แก่ การแยกเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด differential หรือ selective ตามด้วยการทดสอบยืนยัน (confirmatory test) เช่นการย้อมสี ทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมี ทดสอบทางซีรัมวิทยา (serology) และ phage typing และการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด general purpose ตามด้วยวิธีการทดสอบมาตรฐานได้แก่ การย้อมแกรม ย้อมสปอร์ การตรวจสอบการเคลื่อนที่ การหมักน้ำตาล การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และออกซิเดส (oxidase) เป็นต้น ซึ่งการทดสอบเหล่านี้สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์จุลินทรีย์ได้จนถึงลำดับ genera และ families ส่วนลำดับ species จะต้องทำการทดสอบด้านอื่น ๆ เพิ่มเติม

การจัดจำแนกเชื้อรา

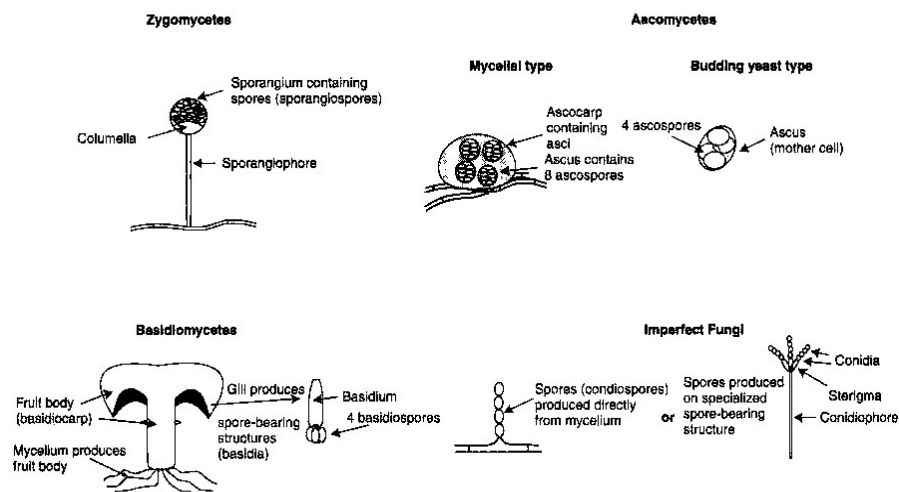
เชื้อราสามารถจำแนกตามวงจรชีวิต โครงสร้างและวิธีการสืบพันธุ์ ซึ่งกลุ่มที่มีความสำคัญสำหรับนักจุลชีววิทยาทางอาหารมีดังต่อไปนี้

Zygomycetes เป็นเชื้อราที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์เรียกว่าไซโกสปอร์ (zygospores) และสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยสร้างสปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospores) โดยปกติเส้นใยที่มีอายุน้อยของเชื้อราในกลุ่มนี้มักจะไม่มีผนังกันแบ่งเป็นช่อง (non-septate) เช่น *Rhizopus* *Mucor* และ *Thamnidium*

Ascomycetes มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospores) ในโครงสร้างที่เรียกว่าแอสไซ (asci) (ใน 1 แอสคัส (ascus) มักมีประมาณ 8 แอสโคสปอร์) ได้แก่ *Byssoschlamys* เชื้อราในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจะสร้างแอสโคสปอร์เพียง 4 อัน นอกจากนั้นยังมียีสต์ชนิดอื่น ๆ เช่น *Schizosaccharomyces* และพวกที่มีเส้นใยเช่น *Eurotium* และ *Xeromyces*

Basidiomycetes โดยปกติจะสร้างฟรุ๊ตติ้งบอดี้ (fruiting bodies) หรือเบสิดิโอคารป์ (basidiocarp) ขนาดใหญ่ที่เป็นที่อยู่ของเบสิดิโอสปอร์ (basidiospores) เช่นพวกเห็ดชนิดต่าง ๆ

Deuteromycetes (imperfect fungi) เป็นพวกที่สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยปกติไม่ซีเลียมจะสร้างโคนิเดีย (conidia) เช่น *Penicillium* *Aspergillus* *Botrytis* *Alternaria* *Fusarium* *Monilia* *Wallemia* และ *Cladosporium* พวกที่เป็นยีสต์จะสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ เช่น *Rhodotorula* และ *Candida* ในเชื้อราบางพวกที่อยู่ในกลุ่มนี้มีระบบที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม ascomycetes เช่น *Eurotium echinulatum* และ *Aspergillus echinulatus* *Neurospora intermedia* และ *Monilia sitophila* โครงสร้างพื้นฐานของเชื้อราแต่ละกลุ่มแสดงดังภาพที่ 11

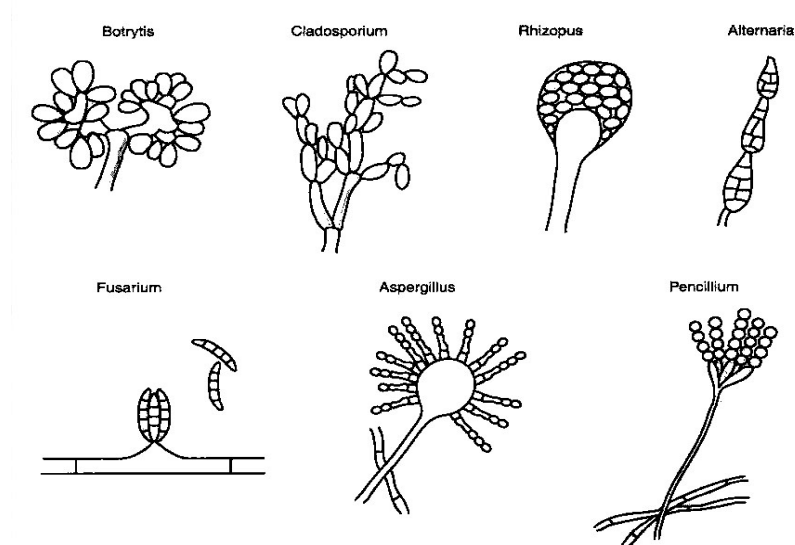


ภาพที่ 11 โครงสร้างที่ใช้สืบพันธุ์ของเชื้อรากลุ่มต่าง ๆ

ที่มา : Garbutt (1997)

ศัพท์ที่เกี่ยวข้องกับเชื้อรา

Moulds เป็นคำที่ใช้เรียกเชื้อราที่สร้างเส้นใยและมีความสำคัญในอุตสาหกรรม เช่น เชื้อราที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย เชื้อราที่เกี่ยวข้องกับการหมักทางอุตสาหกรรม หรือในกระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพ เช่น กลุ่ม zygomycetes, fungi imperfecti และเชื้อราบางชนิดในกลุ่มของ ascomycetes โครงสร้างที่มีสปอร์ในเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของอาหารและการหมักอาหารแสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 โครงสร้างที่มีสปอร์ชนิดไม่อาศัยเพศของเชื้อราบางชนิด

ที่มา : Garbutt (1997)

การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา

การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรามักกระทำโดยสังเกตลักษณะโครงสร้างจากกล้องจุลทรรศน์ใช้แสง เช่น ลักษณะของโครงสร้างที่มีสปอร์และโครงสร้างที่ใช้สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ รวมทั้งลักษณะของสปอร์ที่สร้างขึ้น

ยีสต์

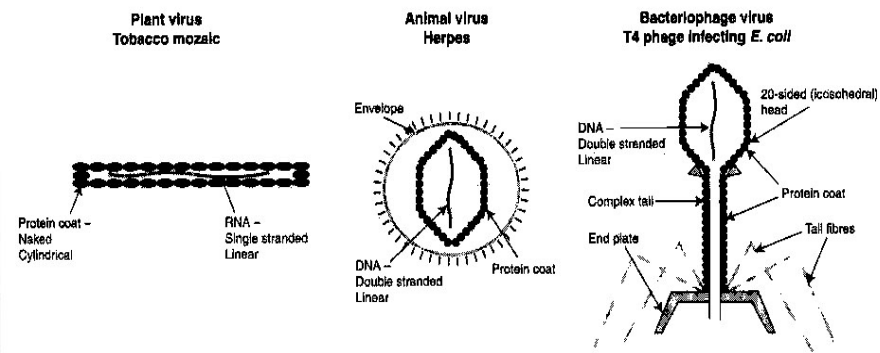
ยีสต์เป็นพวกเชื้อราเซลล์เดียวที่สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ(budding)หรือแบ่งตัว (fission) เชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ พวก ascomycetes และ imperfect fungi

การจัดจำแนกยีสต์

การจัดจำแนกยีสต์ทำได้โดยสังเกตจากลักษณะของโครงสร้าง (ชนิดของการสืบพันธุ์ แบบไม่อาศัยเพศ ความสามารถในการสร้างเส้นใยและสร้างแอสโคสปอร์ รวมทั้งปฏิกิริยาทางชีวเคมี (การสร้างเม็ดสี การหมักน้ำตาล ความสามารถในการใช้ในเตรทเป็นแหล่งของไนโตรเจน ความสามารถในการใช้เอธานอลเป็นแหล่งของคาร์บอนและความต้องการวิตามิน) แต่เนื่องจากการ ชักนำให้ยีสต์สร้างแอสโคสปอร์ในห้องปฏิบัติการกระทำได้ยาก ดังนั้นการจัดจำแนกยีสต์จึงใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีเป็นส่วนใหญ่

การจัดจำแนกไวรัส

ในระยะแรกการจัดจำแนกไวรัสกระทำโดยแบ่งตามกลุ่มของโฮสต์ (hosts) ที่ไวรัสทำให้เกิดโรค เช่น สัตว์ พืช แบคทีเรียหรือเชื้อรา ต่อมาการจัดจำแนกกระทำโดยแบ่งตามลักษณะต่างๆ ของไวรัส เช่น ชนิดของโรคที่ไวรัสเป็นสาเหตุ ชนิดของกรดนิวคลีอิกที่พบ (ลักษณะกลม เส้นตรง DNA หรือ RNA ชนิดสายเดี่ยวหรือสายคู่) โครงสร้างของโปรตีนที่ห่อหุ้ม ลักษณะของไวรัสที่มีหรือปราศจากเปลือกนอก โครงสร้างของไวรัสชนิดต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ไวรัสชนิดต่าง ๆ

ที่มา : Garbutt (1997)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ไวรัส

การพิสูจน์เอกลักษณ์ไวรัสกระทำโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์หรือเนื้อเยื่อและการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

บทที่ 4

การเจริญของจุลินทรีย์

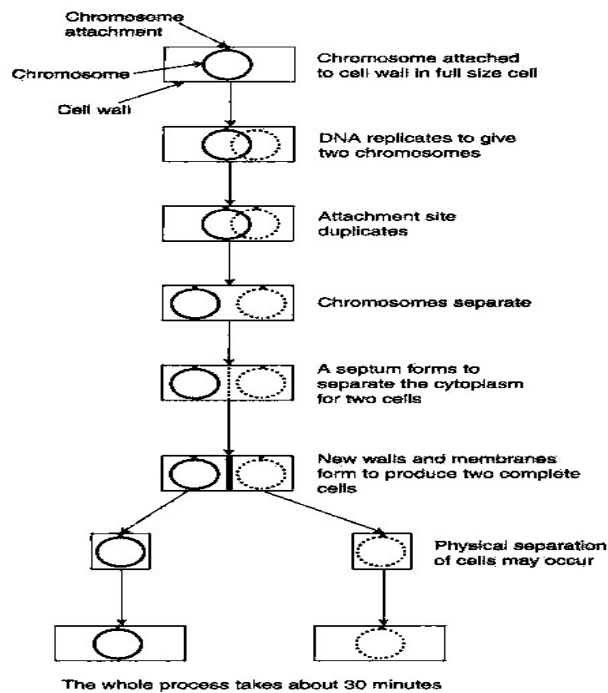
การเจริญของเซลล์จุลินทรีย์

การเจริญ (growth) เป็นกระบวนการที่จุลินทรีย์สังเคราะห์โครงสร้างต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบและจำเป็นต่อการมีชีวิต เช่น ผนังเซลล์ ไรโบโซม โปรตีน เมมเบรนและสารพันธุกรรม โดยเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) เช่น โปรตีนและกรดนิวคลีอิก การเจริญมักหมายถึงความถึงการเพิ่มขนาดและจำนวนเซลล์ จุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดียว (unicellular) เช่น แบคทีเรียและยีสต์บางชนิดจะแบ่งตัวเป็นสองส่วนเท่ากันเรียก binary fission และเนื่องจากแต่ละเซลล์ของแบคทีเรียมีขนาดเล็กมาก การศึกษาการเจริญจึงทำได้ยาก ในพวกยีสต์อาจวัดการเจริญโดยการวัดน้ำหนักแห้ง (dry weight) ต่อเวลาที่เพิ่มขึ้น การเจริญของเซลล์แบคทีเรียและ binary fission แสดงดังภาพที่ 14

การเพิ่มจำนวนเซลล์ของยีสต์ส่วนใหญ่ เช่น *Saccharomyces* spp. เรียกว่า การแตกหน่อ (budding) ดังภาพที่ 15

การเจริญของจุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดียว (unicellular)

การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดียวโดยทั่วไปเมื่อกล่าวถึงการเจริญของจุลินทรีย์ มักหมายถึง การเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งจะสามารถศึกษาได้ง่ายกว่าเซลล์เดี่ยว ๆ การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีปริมาณจำกัด จะพบการเปลี่ยนแปลงของธาตุอาหารและของเสียที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เรียกการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบนี้ว่า batch culture เนื่องจากไม่มีการเติมหรือถ่ายเทอาหารออกจากภาชนะที่ใช้เลี้ยง ตัวอย่างเช่น การผลิตเบียร์แบบดั้งเดิมในถังหรือการหมักโยเกิร์ตวิธีดั้งเดิมในถังหมัก การศึกษาการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์สามารถกระทำโดยการสุ่มตัวอย่างออกมาและวัดปริมาณต่างๆ เช่น

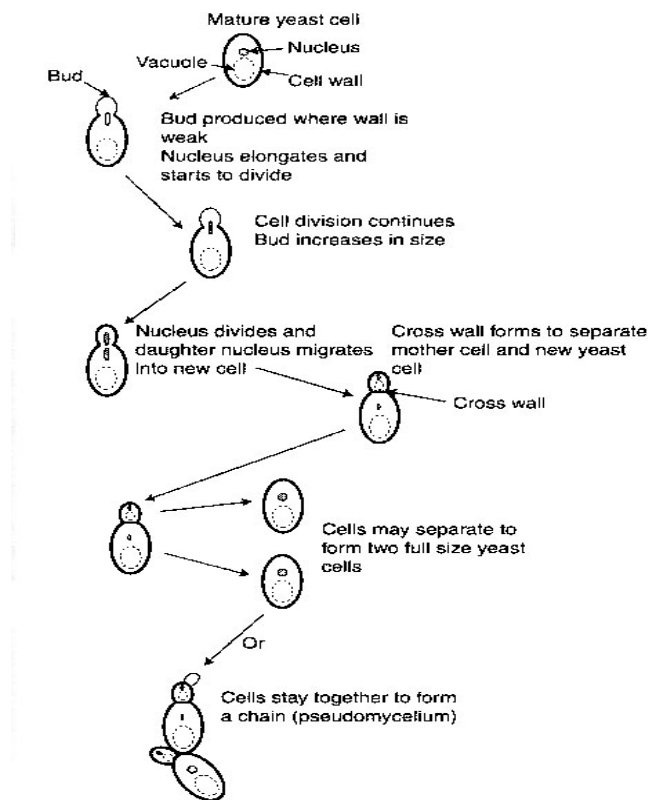


ภาพที่ 14 การเจริญของเซลล์แบคทีเรียและ binary fission

ที่มา : Garbutt (1997)

- วัดน้ำหนักแห้งของสารที่สร้างขึ้น
- วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์
- วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ
- วัดปริมาณสารที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ที่เพิ่มปริมาณขึ้นเมื่อมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ เช่น ปริมาณ ATP

ถ้าทดลองเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ซึ่งมีการแบ่งตัวแบบ binary fission จะพบว่าจำนวนเซลล์หลังจากแบ่งตัวจนถึงรุ่นที่สิบ แสดงดังตารางที่ 4



ภาพที่ 15 การแตกหน่อของยีสต์

ที่มา : Garbutt (1997)

จากตารางที่ 4 เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นในแต่ละรุ่น (generation) จุลินทรีย์จะแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เวลาที่ใช้เพิ่มจำนวนขึ้นเป็นสองเท่า เรียกว่า generation time หรือ population doubling time แต่โดยทั่วไปใช้คำว่า mean generation time ซึ่งเวลาดังกล่าวจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์คือตั้งแต่ 2 - 3 นาที ไปจนถึงหลายชั่วโมง ในแบคทีเรียทั่วไปพบว่ามี generation time ประมาณ 30 นาที โดยเชื่อที่พบว่ามีอัตราการเจริญเร็วที่สุดคือ *Clostridium perfringens* ซึ่งเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าในเวลา 8 - 10 นาที ถ้าเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารต่างๆ สมบูรณ์ที่ค่า pH 7.0 และอุณหภูมิ 45°C

ตารางที่ 4 จำนวนของเซลล์ที่แบ่งตัวแบบ binary fission

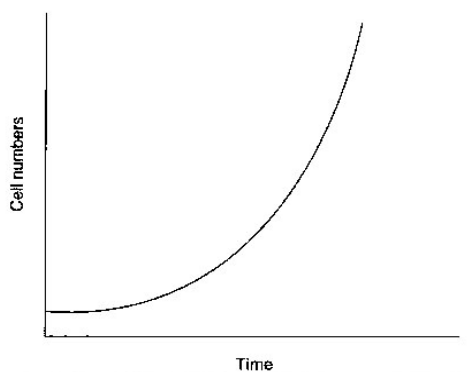
รุ่นที่	จำนวนเซลล์
0	1
1	2
2	4
3	8
4	16
5	32
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1024

ที่มา : Garbutt (1997)

โดยทั่วไป generation time มีค่าค่อนข้างคงที่ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเช่นมีปริมาณสารอาหารที่พอเพียง ค่า a_w อุณหภูมิ ค่า pH และรีดอกซ์โพเทนเชียล (redox potential) ที่เหมาะสม แต่ถ้าปัจจัยต่างๆ เหล่านี้สูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้ generation time มีค่าเพิ่มขึ้น ถ้านำปริมาณของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นมาสร้างกราฟกับเวลา จะได้ดังภาพที่ 16

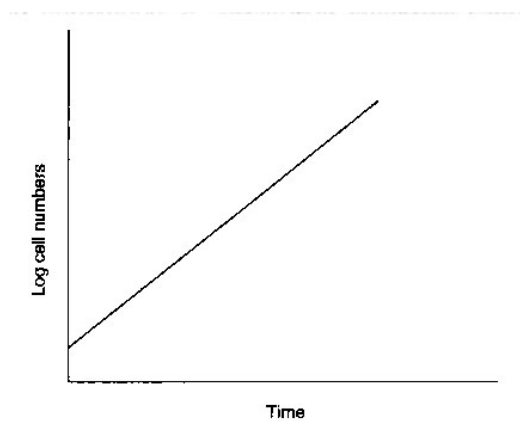
จากภาพที่ 16 จะเห็นว่าความชันของกราฟมีลักษณะเป็นเอ็กซ์โปเนนเชียล (exponential) หรือลอการิทึม (logarithm) ซึ่งเป็นลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดี่ยวที่แบ่งตัวแบบ binary fission

ถ้านำค่าลอการิทึมของปริมาณจุลินทรีย์มาสร้างกราฟกับเวลาจะได้เส้นกราฟเป็นเส้นตรง ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 16 ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นที่เวลาต่าง ๆ

ที่มา : Garbutt (1997)



ภาพที่ 17 ค่าลอการิทึมของปริมาณจุลินทรีย์ที่เวลาต่าง ๆ

ที่มา : Garbutt (1997)

โดยค่าลอการิทึมฐาน 10 ($\log_{10}$) มักนำมาใช้ในการสร้างกราฟเนื่องจากทำให้ง่ายขึ้น ข้อมูลจากตารางที่ 4 สามารถเขียนปริมาณของเซลล์ที่สร้างขึ้นในรูปเอ็กซ์โปเนนเชียลได้แสดง ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ที่เขียนในรูปเอ็กซ์โปเนนเชียล

รุ่น	จำนวนเซลล์	จำนวนเซลล์ในรูปเอ็กซ์โปเนนเชียล
0	1	2^0
1	2	2^1
2	4	2^2
3	8	2^3
4	16	2^4
5	32	2^5
6	64	2^6
7	128	2^7
8	256	2^8
9	512	2^9
10	1024	2^{10}

ที่มา : Garbutt (1997)

ถ้ากำหนดจำนวนเซลล์เริ่มต้น (เวลาที่ 0) คือ NO หลังจากผ่านไป 1 รุ่น จำนวนเซลล์จะเท่ากับ 2^1NO หรือ 2NO และหลังจากผ่านไป 2 รุ่น จำนวนเซลล์จะเท่ากับ 2^2NO หรือ 4NO ดังนั้น ถ้าผ่านไป N รุ่น จำนวนจุลินทรีย์ที่เวลา t หรือ N_t จะแสดงได้ดังสมการ

$$N_t = 2^n \text{NO}$$

ถ้าเขียนใหม่เป็นสมการลอการิทึม จะได้

$$\log N_t = n \log 2 + \log \text{NO}$$

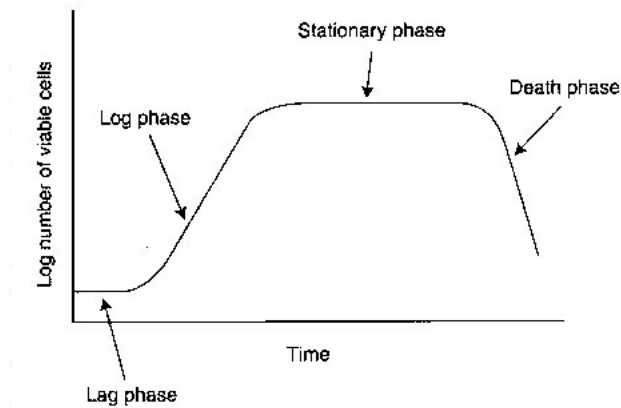
$$\text{ดังนั้น } n = \frac{\log N_t - \log \text{NO}}{\log 2} = \frac{\log N_t - \log \text{NO}}{0.3010}$$

ส่วนค่า mean generation time (g) ซึ่งเป็นเวลาที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนขึ้นเป็นสองเท่า จะเท่ากับ t/n ซึ่ง t คือเวลาดั้งแต่ NO จนถึง N_t ตัวอย่างการคำนวณเช่น *E. coli* มี generation time เท่ากับ 20 นาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ถ้ามีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 10^3 เซลล์แล้วหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้นเป็นเท่าใด ?

จากโจทย์ ค่า g ของ *E. coli* เท่ากับ 20 นาที ดังนั้น ค่า n ของเชื้อหลังจาก 24 ชั่วโมง เท่ากับ $24 \times 60 = 72$ เนื่องจากเราต้องการค่า N_t หลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และมี NO เท่ากับ 10^3 เซลล์

$$\begin{aligned} \text{จาก } n &= \frac{\log N_t - \log NO}{\log 2} = \frac{\log N_t - \log NO}{0.3010} \\ 72 &= \frac{\log N_t - \log 10^3}{0.3010} \\ (72 \times 0.3010) + 3 &= \log N_t \\ \log N_t &= 24.672 \\ N_t &= \text{antilog } 24.672 = 4.7 \times 10^{24} \end{aligned}$$

จากค่าที่ได้จากการคำนวณจะเห็นว่า *E. coli* จะเพิ่มจำนวนอย่างมากมาย ซึ่งถ้าคำนวณน้ำหนักของเซลล์ทั้งหมด (แบคทีเรีย 1 เซลล์หนักประมาณ 10^{-12} กรัม) จะได้เท่ากับ $4.7 \times 10^{24} \times 10^{-12} = 4.7 \times 10^{12}$ กรัม ซึ่งเป็นตัวเลขที่สูงมาก แต่ในความเป็นจริงพบว่าตัวเลขดังกล่าวไม่สามารถเป็นจริงได้ในการเลี้ยงเซลล์แบบ batch เนื่องจากไม่มีที่เพียงพอสำหรับจำนวนเซลล์ขนาดดังกล่าว โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะมีเนื้อที่ให้เซลล์แบคทีเรียเจริญได้ประมาณ 10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือยีสต์เจริญได้ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งที่จริงแล้วแบคทีเรียจะหยุดการเจริญเมื่อมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตรหรือยีสต์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร การเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปแสดงดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 การเจริญของจุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดียวในการเลี้ยงแบบ batch
ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 18 จะเห็นว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่นำมาใช้สร้างกราฟเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตมากกว่าที่จะเป็นจุลินทรีย์ทั้งหมดที่รวมไปถึงเซลล์ที่ตายแล้วและจากกราฟจะเห็นว่ามีเพียงระยะเดียวที่การเจริญของจุลินทรีย์เป็นแบบลอการิทึม การเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปแบ่งเป็น 4 ระยะได้แก่

ระยะ lag (lag phase) เป็นระยะเริ่มต้นที่เดิมจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาจมีการเพิ่มจำนวนเล็กน้อยหรือลดจำนวนลง เนื่องจากเกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ มีการสังเคราะห์เอนไซม์และเพิ่มขนาดของเซลล์ก่อนที่จะเริ่มแบ่งเซลล์ ถ้าเดิมจุลินทรีย์ในรูปของสปอร์จะต้องใช้เวลาในการงอกก่อน ระยะนี้จะแตกต่างกันไปตามสภาวะที่เชื้อถูกเลี้ยงมาก่อนหน้านี้ รวมทั้งจำนวนเซลล์ที่เติมลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการบ่มเชื้อ

ระยะ log หรือ เอ็กซ์โปเนนเชียล (log/exponential phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าในแต่ละ generation time ซึ่งจะเพิ่มจำนวนได้มากในระยะเวลาสั้น โดยเฉพาะในกรณีที่มีสภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิที่ไต่บ่ม ค่า a_w และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ระยะคงที่ (stationary phase) ระยะนี้จุลินทรีย์ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื่องจาก สารอาหารบางชนิดที่จุลินทรีย์ต้องใช้หมดลง หรือเนื่องจาก pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเช่น กรดแลกติก (lactic acid) นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากสาร ที่เป็นพิษต่อเซลล์เกิดจากเมตาโบลิซึม เช่น เอทานอล (ethanol) และจากการที่มีปริมาณออกซิเจน ไม่เพียงพอต่อการเจริญของพวกจุลินทรีย์ที่ใช้ ออกซิเจน ในระยะนี้แบคทีเรียพวก *Bacillus* spp. และ *Clostridium* spp. จะมีการสร้างสปอร์

ระยะตาย (death phase) เมื่อผ่านระยะคงที่แล้วจุลินทรีย์จะเริ่มตายหรือลดจำนวนลง โดย ลักษณะการลดจำนวนจะเป็นแบบเอ็กซ์โปเนนเชียล และในจุลินทรีย์หลายชนิดพบว่าเซลล์จะแตก สลาย (cell lysis) ทั้งนี้ เนื่องมาจากแหล่งพลังงานในเซลล์หมดลงและ pH ของอาหารที่ เปลี่ยนแปลงไปรวมทั้งสารพิษที่เกิดขึ้นเป็นผลให้เซลล์ถูกทำลาย

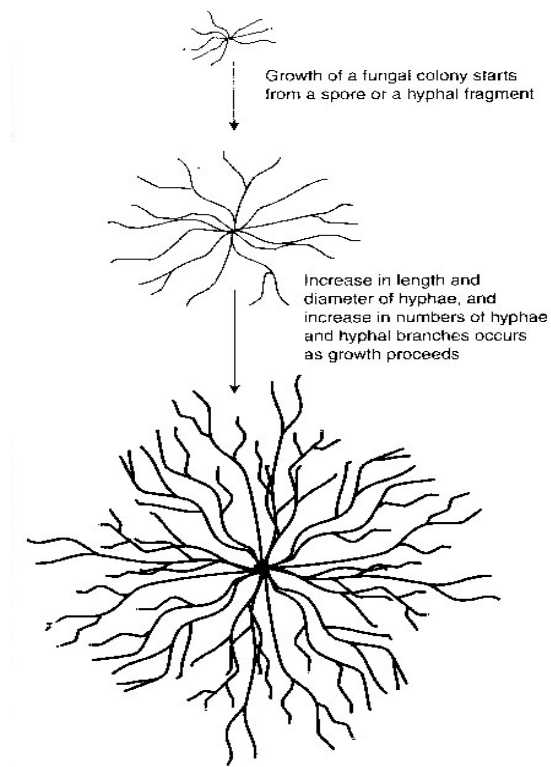
การเจริญขึ้นเป็นโคโลนีของจุลินทรีย์ชนิดเซลล์เดี่ยว จะเจริญบนหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดแข็ง โดยแต่ละโคโลนีเกิดจากเซลล์เดี่ยวหรือกลุ่มเซลล์ และมีเซลล์หลายล้านเซลล์รวมทั้งสาร ที่จับออกนอกเซลล์เป็นองค์ประกอบ รูปร่าง ลักษณะ ขนาดและสีของโคโลนีจะมีความสม่ำเสมอ ภายใต้อาหารที่เหมาะสม จึงสามารถนำลักษณะดังกล่าวไปใช้ในการแยกเชื้อได้ แบคทีเรียบาง ชนิดอาจเจริญแผ่กระจายบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่จำกัดขนาด เรียกว่า spreaders

การเจริญของเส้นใยเชื้อรา

การเจริญของเส้นใยเชื้อราเป็นการเพิ่มความยาวและปริมาตรของเส้นใยแสดงดังภาพที่

19

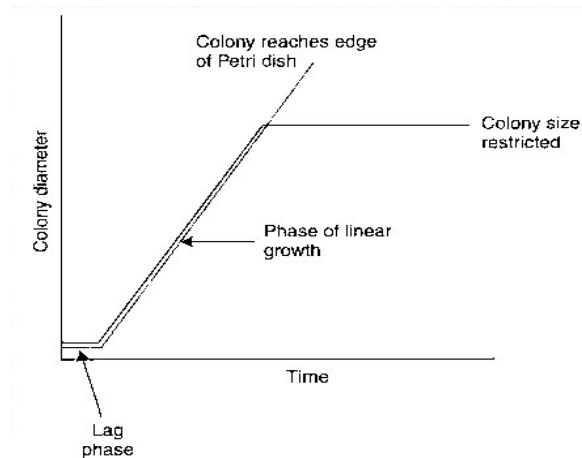
การแบ่งนิวเคลียสจะเกิดภายในเส้นใยขณะที่เชื้อราเจริญและลักษณะการเจริญของเชื้อรา เมื่อวัดจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะพบว่าเป็นเส้นตรง แสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 19 การเจริญของเส้นใยเชื้อรา

ที่มา : Garbutt (1997)

ในเชื้อราบางชนิดเช่น *Rhizopus* spp. พบว่าความยาวของเส้นใยจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ครอบคลุมพื้นที่ที่มีพื้นผิวว่างบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ส่วนเชื้อราชนิดอื่น ๆ เช่น *Penicillium* spp. พบว่าขนาดของโคโลนีจะถูกจำกัดเนื่องจากการสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งเรียกผลจากสาเหตุดังกล่าวว่า staling effect และเชื้อราบางชนิดพบว่าการเจริญของเส้นใยและสร้างฟรุตติงบอดี ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ตัวอย่างฟรุตติงบอดีเช่น ดอกเห็ด ซึ่งเกิดจากเส้นใยชนิดพิเศษเป็นต้น



ภาพที่ 20 การเจริญของโคโลนีเชื้อราบนผิวหน้าอาหาร

ที่มา : Garbutt (1997)

การเพิ่มจำนวนของไวรัส

การเพิ่มจำนวนของไวรัสนั้นมักไม่ใช่คำว่าเจริญแต่จะจำลองตัว (replicate) ภายในเซลล์ของโฮสต์ โดยใช้สารต่างๆ จากเมตาโบลิซึมของโฮสต์ ไวรัสทำตัวเหมือนพาราไซต์ของโฮสต์ที่มีชีวิตและจะทำลายเซลล์โฮสต์ในที่สุด โดยไวรัสที่เกาะติดและแทรก DNA เข้าไปภายในเซลล์โฮสต์ที่เป็นแบคทีเรีย เรียกว่า bacteriophage viruse ส่วนในพืชและสัตว์นั้นไวรัสจะเข้าไปภายในเซลล์โดยวิธีพินไซโตซิส (pinocytosis) จากนั้นไวรัสจะปล่อยเชื้อหุ้มออกภายนอกเซลล์โฮสต์ (ยกเว้นโฮสต์ที่เป็นแบคทีเรียเชื้อหุ้มจะยังเกาะติดอยู่) และปล่อยกรดนิวคลีอิก (DNA หรือ RNA) เข้าไปภายในเซลล์โฮสต์ และเริ่มจำลองตัวเองโดยการสังเคราะห์และจำลองกรดนิวคลีอิกและสังเคราะห์โปรตีนขึ้น เมื่อเจริญจนเต็มเซลล์โฮสต์แล้วจะทำให้เซลล์โฮสต์แตกโดยไลโซไซม์ (lysozyme)

การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร

การเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ชนิดเซลล์เดียวในอาหาร จะคล้ายคลึงกับที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเจริญของสตาฟิโลค็อกคัสที่ใช้ในการผลิตอาหารบางชนิดเช่น โยเกิร์ตหรือ การเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียหรือทำให้อาหารเป็นพิษ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และอาหารประเภทต่างๆ

บทที่ 5

อาหารของจุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง

สารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์

ในสภาวะการเจริญที่เฉพาะนั้น จุลินทรีย์ต้องการสิ่งที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต 2 ประเภท ได้แก่ แหล่งพลังงานและแหล่งของสารเคมีที่จำเป็นต่อการสร้างองค์ประกอบที่สำคัญต่างๆ ของเซลล์ โดยเรียกรวมกันว่าสารอาหาร (nutrients) ซึ่งจุลินทรีย์นำมาใช้ในการเจริญและการสืบพันธุ์ อย่างไรก็ตามการที่จุลินทรีย์จะสามารถเจริญได้จะต้องมีองค์ประกอบอื่นๆ ที่เหมาะสมหลายอย่างเช่น ปริมาณน้ำ pH อุณหภูมิ รีดักชัน/ออกซิเดชัน โปเทนเชียล (reduction/oxidation potential) ปริมาณออกซิเจน จุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ และสารยับยั้ง สารอาหารตามธรรมชาติที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ได้จากอาหารของมนุษย์ เช่น นม หรือถ้าเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ อาหารที่นำมาใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะเรียกว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium)

องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับสารอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตพบว่ามีน้ำเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 70 - 90 โดยน้ำเป็นองค์ประกอบของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีที่สำคัญภายในเซลล์ จึงถือว่าน้ำเป็นสารอาหารที่จำเป็น ส่วนองค์ประกอบที่เหลือประมาณร้อยละ 10 - 30 ของเซลล์เรียกว่า น้ำหนักแห้ง (dry weight) ซึ่งประกอบด้วยธาตุและสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่สำคัญและจำเป็นต่อโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ โดยพบว่าธาตุคาร์บอนเป็นธาตุที่มีมากที่สุดและธาตุออกซิเจน ไนโตรเจน ไฮโดรเจนและธาตุอื่นๆ มีปริมาณรองลงมาตามลำดับ แสดงดังตารางที่

ตารางที่ 6 ปริมาณของธาตุต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์

ธาตุ	ร้อยละ (โดยน้ำหนักแห้ง)
คาร์บอน	50
ออกซิเจน	20
ไนโตรเจน	14
ไฮโดรเจน	8
ฟอสฟอรัส	3
กำมะถัน	1
โปแตสเซียม	1
โซเดียม	1
แคลเซียม	0.5
แมกนีเซียม	0.5
คลอรีน	0.5
เหล็ก	0.2
โบรอน โคบอลต์ แมงกานีส ทองแดง สังกะสี โมลิบดีนัม วานาเดียม นิกเกิล	รวมกัน 0.3

ที่มา : Garbutt (1997)

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ต้องการธาตุแต่ละชนิดมากน้อยแตกต่างกัน ตั้งแต่ธาตุคาร์บอนลงมาถึงธาตุเหล็ก พบว่าจุลินทรีย์ต้องการในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ซึ่งธาตุเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างที่สำคัญของเซลล์รวมทั้งเอนไซม์และสารเมตาโบไลต์ที่สำคัญ ส่วนธาตุอื่นๆ ที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อย (trace elements) แต่มีความสำคัญโดยมีส่วนทำให้การดำเนินกิจกรรมของเซลล์เป็นไปได้ดี ธาตุสังกะสี ทองแดง แมงกานีส โมลิบดีนัม และนิกเกิล เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ เช่นโคแฟกเตอร์ (cofactor) หรือช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น

เซลล์ของจุลินทรีย์นั้นพบว่า มีความซับซ้อนประกอบด้วยโมเลกุลของสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ อีออนและน้ำ ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของเซลล์และไซโตพลาสซึม เอนไซม์และสารตั้งต้น

ที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ รวมทั้งสารอาหารที่เก็บไว้ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ บทบาทของธาตุต่างๆ ต่อเซลล์ของจุลินทรีย์แสดงดังตารางที่ 7

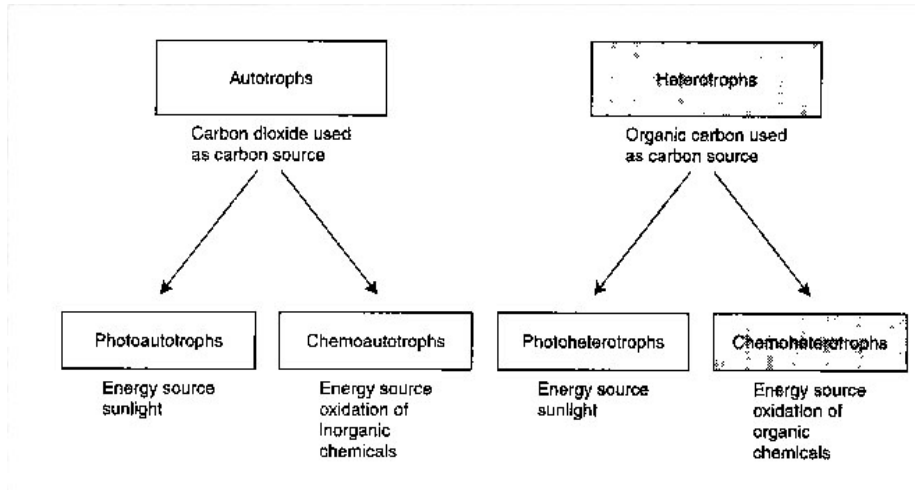
ตารางที่ 7 บทบาทของธาตุชนิดต่างๆ ต่อเซลล์จุลินทรีย์

ธาตุ	บทบาทหน้าที่
ไฮโดรเจน	องค์ประกอบของน้ำและโมเลกุลของสารอินทรีย์ภายในเซลล์
ออกซิเจน	องค์ประกอบของน้ำและโมเลกุลของสารอินทรีย์ภายในเซลล์ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในการหายใจแบบใช้ออกซิเจน
คาร์บอน	องค์ประกอบของสารอินทรีย์ภายในเซลล์
ไนโตรเจน	องค์ประกอบของกรดอะมิโนและโปรตีน รวมทั้งเบสในนิวคลีโอไทด์
กำมะถัน	พบในกรดอะมิโนซิสทีนและเมทไธโอนีน รวมทั้งโคเอนไซม์บางชนิด
ฟอสฟอรัส	พบใน DNA และ RNA รวมทั้งฟอสโฟไลปิดและโคเอนไซม์บางชนิด
โปแตสเซียม	มีบทบาทในการคงแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ และเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์บางชนิด
แมกนีเซียม	องค์ประกอบของเซลล์เมมเบรน ไรโบโซม DNA และ RNA และเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด
แคลเซียม	ทำให้ผนังเซลล์แข็งแรง เป็นองค์ประกอบของเอ็นโดสปอร์ของแบคทีเรีย
เหล็ก	องค์ประกอบของไซโตโครมและเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์บางชนิด
trace elements	องค์ประกอบของระบบเอนไซม์และโคเอนไซม์

ที่มา : Garbutt (1997)

ประเภทของจุลินทรีย์ตามความต้องการสารอาหาร

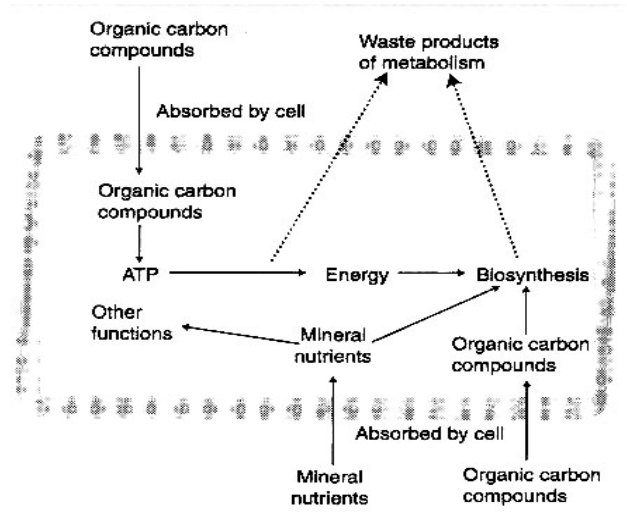
จุลินทรีย์สามารถแบ่งตามความต้องการธาตุหรือสารอาหารหลักคือธาตุคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 ประเภทจุลินทรีย์แบ่งตามความต้องการสารอาหาร

ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 21 จุลินทรีย์ประเภทโฟโตออโตโทรป (photoautotroph) สามารถสังเคราะห์แสงได้ (photosynthetic) และรวมถึงพืชชั้นสูง เช่น สบู่และแบคทีเรียสังเคราะห์แสง ส่วนประเภทโฟโตเฮเทอโรโทรป (photoheterotroph) นั้น สังเคราะห์แสงได้เช่นกันแต่ไม่สามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์จากคาร์บอนไดออกไซด์ได้จึงต้องการแหล่งของธาตุคาร์บอน เช่น แบคทีเรียพวก non-sulfur purple พวกคีโมออโตโทรป (chemoautotroph) เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการออกซิไดซ์โมเลกุลของสารอนินทรีย์และอาจเรียกได้อีกอย่างหนึ่งว่าคีโมลิโธโทรป (chemolithotroph) ซึ่งจุลินทรีย์พวกนี้มีความสำคัญต่อพืชชั้นสูงในการนำสารต่างๆ กลับมาใช้ เช่น แบคทีเรีย nitrifying ซึ่งออกซิไดซ์แอมโมเนียมเป็นไนไตรต์และไนไตรต์เป็นไนเตรทในรูปที่พืชต่างๆ สามารถนำไปใช้ได้ จุลินทรีย์พวกคีโมเฮเทอโรโทรป (chemoheterotroph) นั้นมีบทบาทมากเกี่ยวกับจุลชีววิทยาทางอาหาร ซึ่งได้แก่พวกที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย จุลินทรีย์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ และพวกที่เกี่ยวข้องกับการหมักต่างๆ โดยจุลินทรีย์พวกนี้จะใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานเพื่อสร้าง ATP สำหรับใช้ในกิจกรรมของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์สารประกอบของเซลล์และกระบวนการที่ใช้พลังงาน เช่น การเคลื่อนไหว นอกจากนั้นยังใช้สารอินทรีย์ในการสังเคราะห์เซลล์เมมเบรน ผนังเซลล์ โครโมโซม ไรโบโซม โปรตีนและเอนไซม์ ภาพที่ 22 แสดงการใช้สารอาหารของจุลินทรีย์ พวกคีโมเฮเทอโรโทรป



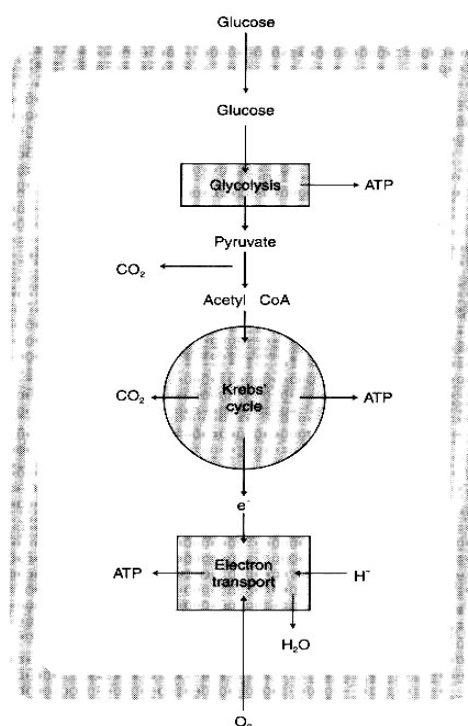
ภาพที่ 22 การใช้สารอาหารของจุลินทรีย์พวกคีโมเฮเทอโรโทรป

ที่มา : Garbutt (1997)

ในบางกรณีอาจเรียกพวกคีโมเฮเทอโรโทรปว่าคีโม-ออร์แกโนโทรป(chemo-organotroph) ซึ่งเป็นคำที่ใช้เน้นสำหรับจุลินทรีย์ที่ได้พลังงานจากการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ โดยอาจเขียนเต็มๆว่าคีโมแกโนเฮเทอโรโทรป (chemorganoheterotroph) แต่คำหลังนี้ไม่นิยมใช้

สารอาหารของจุลินทรีย์พวกคีโมเฮเทอโรโทรป

ธาตุคาร์บอนจากสารอินทรีย์จะถูกนำมาใช้สังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์และเป็นแหล่งของพลังงานสำหรับการเจริญ โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถในการนำธาตุคาร์บอนจากสารอินทรีย์มาใช้แตกต่างกันออกไป แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราส่วนใหญ่มักใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักและกลูโคสจะถูกนำมาใช้ก่อนในกรณีที่มีแหล่งคาร์บอนอื่นๆอยู่ด้วย เนื่องจากกลูโคสจะถูกดูดซึมได้ง่ายและย่อยสลายให้พลังงานในรูปของสารอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) จึงมักนิยมใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อและในกระบวนการหมักทางอุตสาหกรรม ภาพที่ 23 แสดงกระบวนการสร้างพลังงานจากกลูโคสในสภาวะที่มีออกซิเจน



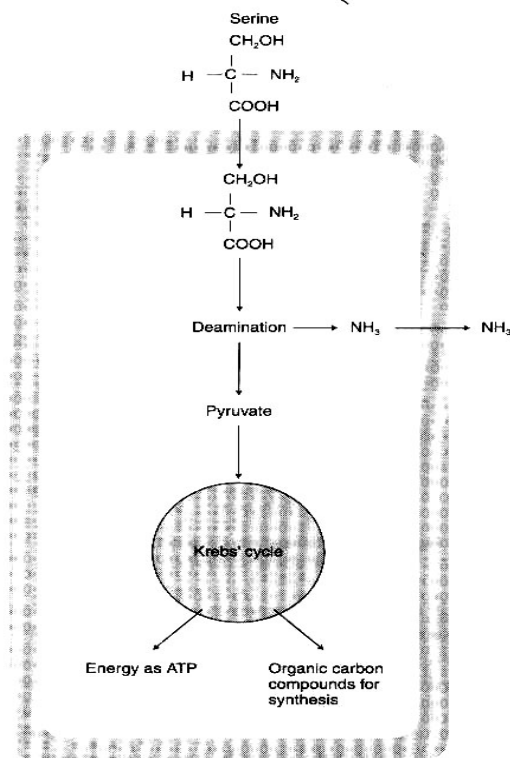
ภาพที่ 23 กระบวนการสร้างพลังงานโดยใช้กลูโคสเป็นสารเริ่มต้น
ที่มา : Garbutt (1997)

นอกจากนั้นกลูโคสยังมีบทบาทในวงจรเครบส์ (Krebs'cycle) ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบคาร์บอนอื่นๆ ที่เซลล์จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ เป็นแหล่งคาร์บอนได้นอกจากกลูโคส โดยแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการนำน้ำตาลและ sugar alcohols ไปใช้ได้แตกต่างกัน ซึ่งสามารถนำคุณสมบัตินี้ไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ได้

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ในการใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของสารที่มีปริมาณเฉพาะ แต่ผลสุดท้ายแล้ว

จะเหมือนกับการใช้กลูโคส เช่นได้พลังงานในกระบวนการสังเคราะห์สารต่างๆ และได้แหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นอาจไม่ต้องใส่สารคาร์โบไฮเดรต แต่อาจใช้กรดอะมิโนหรือโปรตีนที่ถูกย่อยสลายทำให้ได้สารที่มีโมเลกุลเล็กลง การใช้กรดอะมิโนในลักษณะนี้เกี่ยวข้องกับการดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโน (deamination) ทำให้ได้กรดคีโต (keto acid) ซึ่งสามารถเข้าสู่วัฏจักรเครบส์และได้พลังงานและสารประกอบคาร์บอน แอมโมเนียที่เกิดจาก deamination เป็นของเสียและจะถูกปล่อยจากเซลล์ ภาพที่ 24 แสดงการใช้กรดอะมิโนเซรีน (serine) เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 24 การใช้กรดอะมิโนเซรีนเป็นแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์

ที่มา : Garbutt (1997)

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้สารอินทรีย์หลายประเภทเป็นแหล่งของคาร์บอนได้ เช่น *Pseudomonas cepacia* สามารถใช้สารอินทรีย์ต่างๆ ประมาณ 90 ชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนั้นอาจใช้สตาร์ช (starch) หรือสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ถ้าจุลินทรีย์นั้นสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายสารเหล่านั้นได้

แหล่งของไนโตรเจน

จุลินทรีย์สามารถใช้สารหลายชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน DNA RNA และสารอื่นๆ ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถใช้กรดอะมิโน รวมทั้งแอมโมเนียมและส่วนน้อยสามารถใช้ไนเตรทหรือไนไตรท์ พวกเชื้อราส่วนใหญ่พบว่ามีความสามารถในการใช้ในเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนพวกที่สามารถใช้ในไนโตรเจนจากบรรยากาศพบว่ามีน้อยมาก จุลินทรีย์พวกนี้ได้แก่ *Rhizobium* spp. และ *Azotobacter* spp. ตารางที่ 8 แสดงแหล่งของไนโตรเจนที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้

ตารางที่ 8 แหล่งของไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้

แหล่งไนโตรเจน	ใช้โดย
ไนโตรเจน ไนเตรทและไนไตรท์ แอมโมเนีย กรดอะมิโน โปรตีน	พวกที่ตรึงไนโตรเจนเท่านั้น จุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อรา แบคทีเรียส่วนใหญ่และเชื้อรา จุลินทรีย์ทุกชนิด เฉพาะพวกที่สร้างเอนไซม์โปรตีนเนสได้

ที่มา : Garbutt (1997)

แหล่งของกำมะถัน

โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะใช้กำมะถันในรูปไอออนซัลเฟต (SO_4^{2-}) ในสารละลาย แต่ในบางครั้งอาจใช้สารอนินทรีย์อื่นๆ เป็นแหล่งของซัลเฟอร์ได้ เช่น ซัลไฟด์ (SO_3^{2-}) นอกจากนั้นอาจได้จากกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น ซีสเตอีน (cysteine) และเมทไธโอนีน (methionine)

แหล่งของฟอสฟอรัส

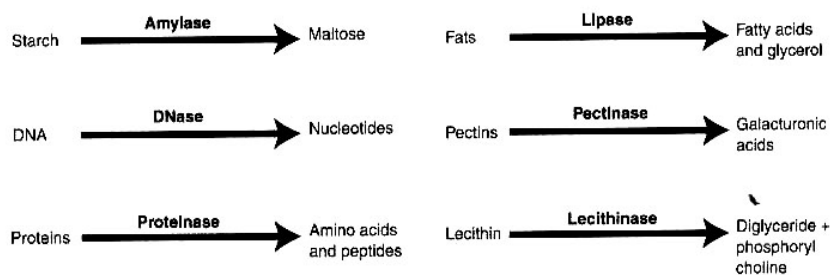
แหล่งของฟอสฟอรัสของจุลินทรีย์มักอยู่ในรูปไอออนของสารอินทรีย์ เช่น ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (H_2PO_4^-) และจุลินทรีย์ส่วนมากสามารถใช้ฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่มีฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบได้เช่น นิวคลีโอไทด์ (nucleotides)

ธาตุอื่น ๆ

จุลินทรีย์จะได้รับธาตุชนิดอื่น ๆ จากสิ่งแวดล้อมที่อยู่รอบ ๆ เช่น โปตัสเซียมในรูป K^+ และแมกนีเซียมในรูป Mg^{2+} เป็นต้น

สารอาหารที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่

สารโมเลกุลขนาดใหญ่เช่นสตาร์ชและโปรตีน ไม่สามารถผ่านเข้าออกพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ได้จึงต้องถูกย่อยสลายให้มีขนาดเล็กลงเสียก่อน โดยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ เอนไซม์เหล่านี้จะสร้างจากพลาสมาเมมเบรนในแบคทีเรียหรือจากกอลจิเมมเบรน (golgi membrane) ในเชื้อรา เรียกว่า extracellular หรือ exoenzymes ตัวอย่างปฏิกิริยาของเอนไซม์เหล่านี้แสดงดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 ตัวอย่างของ exoenzyme ที่สร้างโดยจุลินทรีย์

ที่มา : Garbutt (1997)

เอนไซม์ชนิด exoenzymes บางชนิดจากจุลินทรีย์มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม เช่น เพคตินเนส (pectinase) จากเชื้อรา ซึ่งใช้ทำให้น้ำผลไม้ใส หรือ โปรตีนเนส ที่ใส่ลงในผงซักฟอกเพื่อใช้กำจัดโปรตีนออกจากเสื้อผ้า นอกจากนั้นยังมีบทบาทในอาหาร เช่น ทำให้อาหารเกิดการหืนเนื่องจากเอนไซม์ไลเปส (lipase) และทำให้ผักและผลไม้เน่าเนื่องจากเอนไซม์เพคตินเนส จากแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิด ความสามารถของจุลินทรีย์ในการสร้าง exoenzyme สามารถนำมาใช้พิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ได้ ตารางที่ 9 แสดง exoenzyme บางชนิดที่สร้างจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

ตารางที่ 9 exoenzyme บางชนิดจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

exoenzyme	จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์
อะมัยเลส (amylase)	<i>Bacillus cereus</i> <i>Aspergillus niger</i>
โปรตีนเนส (proteinase)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Aspergillus oryzae</i>
เพคตินเนส (pectinase)	<i>Penicillium citrinum</i> <i>Aspergillus</i> spp. <i>Erwinia carotovora</i>
ไลเปส (lipase)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
ดีเอ็นเอส (DNase)	<i>Staphylococcus aureus</i>
เลซิทีเนส (lecithinase)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i>

ที่มา : Garbutt (1997)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

แบคทีเรียและเชื้อราส่วนใหญ่จะสามารถสร้างพลังงานและสังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพื้นฐาน รวมทั้งสารอาหารอื่นๆ ในรูปสารอนินทรีย์ ตัวอย่างเช่น *E. coli* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ น้ำกลูโคส แอมโมเนียมคลอไรด์ (ammonium chloride) โพแทสเซียมฟอสเฟต (potassium phosphate) แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate) แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride) และธาตุอาหารอื่นๆ ในปริมาณเล็กน้อย ส่วนเชื้อรา *Aspergillus niger* สามารถเจริญได้ถ้าเติมเมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นแหล่งของไนโตรเจน

ในขณะที่จุลินทรีย์หลายชนิดจะไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเพียงเท่านี้ เนื่องจากต้องการสารอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่จำเป็นในการเจริญ สารอินทรีย์ที่เซลล์ของจุลินทรีย์ไม่สามารถสร้างได้เองและต้องการจากแหล่งภายนอกเรียกว่า growth factors

growth factors สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่

- 1) กรดอะมิโน ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์
- 2) พิวรีน (purines) และไพริมิดีน (pyrimidines) ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก

DNA และ RNA

- 3) วิตามิน (vitamins) จะถูกเปลี่ยนไปเป็นโคเอนไซม์ (coenzymes) ซึ่งเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็กที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์บางชนิด

การสังเคราะห์สารประกอบเหล่านี้มีขั้นตอนที่ซับซ้อนที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ ถ้าเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้จะทำให้ไม่เกิดสารผลิตภัณฑ์ที่จะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตได้ เช่น *Salmonella typhi* ต้องการ growth factor คือกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophane) ซึ่งโดยปกติไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดนี้ได้ แต่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ได้ รวมทั้งวิตามิน พิวรีน และไพริมิดีน ดังนั้น ถ้าขาดทริปโตเฟน เชื้อนี้จะไม่สามารถเจริญได้ ความต้องการ growth factors ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ความต้องการ growth factor ของจุลินทรีย์ต่างๆ

จุลินทรีย์	กรดอะมิโน	วิตามิน	พิวรีนและไพริมิดีน
<i>E. coli</i>	ไม่ต้องการ	ไม่ต้องการ	ไม่ต้องการ
<i>Salmonella typhi</i>	ทริปโตเฟน	ไม่ต้องการ	ไม่ต้องการ
<i>Proteus vulgaris</i>	ไม่ต้องการ	ไนอะซิน	ไม่ต้องการ
<i>Staph. aureus</i>	อาร์จินีน ซีสเทอีน	ไรโอามินและ	ไม่ต้องการ
	เฟนิลอะลานีน	ไนอะซิน	
<i>Leuconostoc mesenteroids</i>	กรดอะมิโน 19 ชนิด	วิตามิน 10 ชนิด	พิวรีนและไพริมิดีน
<i>Aspergillus niger</i>	ไม่ต้องการ	ไม่ต้องการ	ไม่ต้องการ
<i>Mucor hiemalis</i>	ไม่ต้องการ	ไรโอามิน	ไม่ต้องการ
<i>Sac. cerevisiae</i>	ไม่ต้องการ	กลุ่มวิตามินบี	ไม่ต้องการ

ที่มา : Garbutt (1997)

จากตารางที่ 10 จะเห็นว่า *Leuconostoc mesenteroids* ต้องการกรดอะมิโน 19 ชนิด วิตามิน 10 ชนิด (โดยเฉพาะวิตามินบี) และพิวรีนและไพริมิดีน 4 ชนิด จุลินทรีย์ประเภทนี้ต้องการ growth factor ค่อนข้างสูงเพื่อการเจริญจะเรียกว่าเป็นพวก fastidious

จุลินทรีย์บางชนิดที่ต้องการวิตามินหรือกรดอะมิโนที่เฉพาะสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณของสารเหล่านี้ในอาหารได้เรียกว่าวิธี bioassays ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus plantarum* สามารถใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไบโอตินในตัวอย่างยีสต์สกัดได้ วิธีนี้มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์อาหารที่มีสารดังกล่าวในปริมาณน้อย

อาหารมนุษย์และสารอาหารของจุลินทรีย์

อาหารของมนุษย์ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ มากมายที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ เช่น น้านม เนื้อสัตว์ เนื้อปลา ซึ่งแม้แต่จุลินทรีย์ชนิด fastidious ก็สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ เช่น ในพวก *Leuconostoc* spp. และ *Lactobacillus* spp. เป็นต้น ตารางที่ 11 แสดงสารอาหารชนิดต่างๆ ในน้านมที่จุลินทรีย์ชนิดต่างๆสามารถนำไปใช้ได้

ตารางที่ 11 สารอาหารชนิดต่างๆ ในน้ำนมที่จุลินทรีย์ชนิดต่างสามารถนำไปใช้ได้

สารอาหาร	จุลินทรีย์ที่นำไปใช้ประโยชน์
แหล่งคาร์บอน	
กลูโคส	โดยจุลินทรีย์ทุกชนิด
กาแลกโตส	โดยจุลินทรีย์บางชนิด
แลกโตส	โดยแบคทีเรียแลกติกและโกลีฟอร์ม
ไขมัน	โดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปส เช่น <i>Pseudomonas fluorescens</i>
โปรตีน	โดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเนส เช่น <i>P. fluorescens</i>
กรดอะมิโน	โดยจุลินทรีย์ทุกชนิด
ซีเตรท	โดยจุลินทรีย์บางชนิด เช่น <i>Klebsiella</i> spp.
แหล่งไนโตรเจน	
กรดอะมิโน	โดยจุลินทรีย์ทุกชนิด และจำเป็นในบางชนิด
ยูเรีย	โดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส เช่น <i>Proteus</i>
โปรตีน	โดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเนส เช่น <i>P. fluorescens</i>
เกลือแร่	โดยจุลินทรีย์ทุกชนิดและจำเป็นในทุกชนิด
trace elements	โดยจุลินทรีย์ทุกชนิดและจำเป็นในทุกชนิด
วิตามิน	โดยจุลินทรีย์ทุกชนิดและจำเป็นในบางชนิด
ฟิวรีนและไฟริมิติน	โดยจุลินทรีย์ทุกชนิดและจำเป็นในบางชนิด

ที่มา : Garbutt (1997)

การเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารของมนุษย์ นอกจากจะขึ้นกับปริมาณของสารอาหารแล้วยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ปริมาณน้ำ หรือค่า pH ตัวอย่างการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่จำกัดด้วยสารอาหาร เช่น ในข้าวเจ้าสุกที่อาจมีเฉพาะจุลินทรีย์ชนิดที่สร้างเอนไซม์อะมัยเลสที่สามารถย่อยสลายสตาร์ชไปเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ได้

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (culture media)

อาหารเลี้ยงเชื้อใช้สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการและเนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการสารอาหารที่แตกต่างกันออกไป ดังนั้นจึงไม่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดหนึ่งชนิดใดที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทุกชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งในรูปของเหลวและของแข็งรวมทั้งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว (เจล) ชนิดของเหลวเรียกว่า broths และชนิดของแข็งหรือกึ่งแข็งเรียกว่า agar ในส่วนของ agar ประกอบด้วย agar-agar (หรือ agar) ซึ่งผลิตจากสาหร่ายทะเลสีแดง แล้วนำมาทำแห้ง agar ดังกล่าวเป็นสารซัลโฟเนตมิวโคโพลิแซ็กคาไรด์ (sulphonated mucopolysaccharide) โดยปกติใช้ปริมาณร้อยละ 1.5 เพื่อทำให้เจลแข็งตัว แต่อาจใช้ปริมาณน้อยกว่านี้ถ้าต้องการลักษณะที่เป็นกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยปกติอาหารเลี้ยงเชื้อ agar มักเทใส่จานเพาะเชื้อหรือหลอดแก้วที่ตั้งเอียงและรอให้แข็งตัว เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวหน้าให้มากขึ้น

การใช้ agar สามารถใช้ได้ทั้งเทคนิค pour plate และ streak plate ซึ่งเป็นเทคนิคสำคัญที่ใช้ในจุลชีววิทยาทางอาหาร โดยสามารถใช้จำแนกและแยกเชื้อโดยวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ ความสำคัญของ agar ได้แก่

- เจลมีความแข็งแรงแม้ที่ความเข้มข้นต่ำ หมายความว่า ความแข็งของเจลสูงพอที่จะไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เนื่องมาจากทำให้ค่า a_w ลดต่ำลง
- ความเข้มข้นของ agar ที่ใช้พบว่าให้เจลที่มีความแข็งพอที่จะสามารถทำให้สารละลายเชื้อแพร่กระจายบนผิวหน้า และทำให้เกิดโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ได้
- อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม agar จะยังคงสภาพของแข็งตลอดช่วงระยะเวลาบ่มในตู้บ่มเชื้อ
- การใช้ agar ร้อยละ 1.5 ทำให้ได้เจลแข็งที่ 32 - 39°C หลังจากที่ได้เจลแข็งตัวแล้ว จะไม่เกิดการละลายถ้าอุณหภูมิไม่สูงเกินกว่า 85°C
- สามารถเติมสารละลาย agar ที่มีอุณหภูมิ 40 - 45°C ลงไปในสารละลายเชื้อโดยตรงและไม่มีผลต่อจุลินทรีย์โดยส่วนใหญ่
- agar จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์บางชนิดในทะเล ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้สำหรับจุลินทรีย์ปกติได้โดยไม่ถูกทำให้เหลว

ส่วนผสมที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื่อนอกจากน้ำและ agar แล้วยังมีส่วนผสมอื่นๆ ได้แก่ เปปโตน (peptones) ยีสต์สกัด (yeast extract) และเนื้อวัวสกัด (beef extract)

เปปโตนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนและสามารถละลายน้ำได้ มีกรดอะมิโนอิสระและสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้ เช่น เปปไทด์ (peptides) และโปรติโอส (protease) แหล่งโปรตีนที่นิยมนำมาผลิตเปปโตนได้แก่ เนื้อสัตว์ เคซีน (โปรตีนนม) เจลาติน (gelatine) และถั่วเหลือง (soybean) การย่อยสลายโปรตีนอาจใช้กรดเกลือหรือเอนไซม์ เช่น ทริปซิน (trypsin) หรือเปปซิน (pepsin) โดยกรดอะมิโน เปปไทด์และโปรติโอสจะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน คาร์บอนหรือทั้งสองอย่าง สารอาหารอื่นๆ ที่มีในเปปโตนได้แก่ วิตามิน เกลือแร่ พิวรีนและไพริมิดีน

ยีสต์สกัด ใช้เป็นแหล่งของสารกลุ่มวิตามินบี และสารอื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบได้แก่ พิวรีน ไพริมิดีน รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายโปรตีนเช่น กรดอะมิโนและเกลือแร่

เนื้อวัวสกัดประกอบด้วย กรดอะมิโนต่างๆ ที่ครบถ้วน และช่วยกระตุ้นการเจริญของเชื้อเนื่องจากมี growth factor และวิตามินชนิดต่างๆ

ประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อในทางจุลชีววิทยามีหลายประเภทขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้ ได้แก่

- ใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เฉพาะชนิด เช่น แบคทีเรีย
- ช่วยคงสภาพจุลินทรีย์ในการเก็บรักษาเชื้อ
- ใช้แยกความแตกต่างระหว่างจุลินทรีย์
- ใช้แยกจุลินทรีย์เฉพาะชนิดออกจากสภาพแวดล้อม เช่น จากอาหาร
- ช่วยในการจัดจำแนกจุลินทรีย์

- ช่วยในการวิเคราะห์ปริมาณสารอาหารหรือสารยับยั้งจุลินทรีย์

อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งออกเป็นหลายประเภท ดังนี้

General purpose media (non-selective) มีปริมาณสารอาหารที่พอเพียงสำหรับการเจริญของทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา โดยมีองค์ประกอบที่ซับซ้อนเตรียมจากวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น เนื้อสัตว์ ยีสต์ ผักสกัด และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของโปรตีน มักใช้อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ในการเก็บรักษาเชื้อและวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมด ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ได้แก่ nutrient agar (NA) plate count agar (PCA) หรือ tryptone dextrose agar malt extract agar หรือ broth และ potato dextrose agar (PDA)

Selective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด แต่ยอมให้จุลินทรีย์อื่นๆ เจริญได้ ซึ่งทำได้โดยการเติมสารเคมีต่างๆ เพื่อใช้คัดเลือกจุลินทรีย์เฉพาะชนิดโดยมีกลไกดังนี้

- การปรับ pH เช่น การเติมกรดซิตริก (citric acid) ในอาหารเพื่อแยกเชื้อรา
- การปรับค่า a_w เช่น การเติมเกลือหรือน้ำตาลเพื่อแยกฮาโลไฟล์ (halophiles)

หรือพวกออสโมฟิลิก (osmophilic organisms)

- การจำกัดปริมาณของสารอาหารเช่น ใช้เพียงไนโตรเจนเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งใช้แยกจุลินทรีย์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนไปเป็นแอมโมเนียได้

- การเติมสารรีดิวซ์ซึ่งช่วยคัดเลือกพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobes) เช่น เมตาไบซัลไฟต์ (metabisulphite)

- การเติมสารที่ยับยั้งวิธีเมตาโบลิซึมหรือทำลายเซลล์เมมเบรน เช่น โซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ทาลัสอะซิเตต (thallous acetate) ลิเทียมคลอไรด์ (lithium chloride) และ โพตัสเซียมเทลลูไรต์ (potassium tellurite) ที่ยับยั้งพวกแกรมลบ และ crystal violet bile salts และ surfactant บางชนิดที่ยับยั้งแกรมบวก

- การเติมสารปฏิชีวนะและสารเคมีบางชนิด เช่น oxytetracycline ในการยับยั้งแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกและวิเคราะห์เชื้อรา หรือสาร polymyxin ที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง

Enrichment media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะเป็นของเหลวประกอบด้วยสารเคมีที่ช่วยยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและช่วยส่งเสริมให้การเจริญของจุลินทรีย์หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ต้องการเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งจะทำให้ง่ายต่อการแยกเชื้อที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น selenite broth ที่ใช้สำหรับแยก *Salmonella* spp. ซึ่งประกอบด้วยซีลีไนต์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งช่วยยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากซาลโมเนลลา

Differential media ประกอบด้วยส่วนผสมที่เกิดการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะทำให้มองเห็นได้ชัดเจนในงานเพาะเชื้อ ในหลอดหรือในอาหารเหลวที่จุลินทรีย์เจริญ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์และสังเกตเห็นด้วยสายตาในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเช่น

- การเปลี่ยนแปลงความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- การเปลี่ยนแปลงของสีเนื่องจาก pH โดยการเติมอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- การใช้สารเคมีที่ทำปฏิกิริยากับสารที่เกิดจากการเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์และทำให้โคโลนีหรืออาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเปลี่ยนแปลงไป

สารเคมีที่ใช้ทำให้เกิดความแตกต่างซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ ได้แก่

- สารตั้งต้น (substrates) ที่ใช้ทดสอบ extracellular enzyme เช่น เลซิทีเนส (lecithinase) โปรตีนเอส (proteinase) ฮีโมไลซิน (haemolysin) และดีเอ็นเอส (DNase)
- น้ำตาล โดยการเติมอินดิเคเตอร์ที่วัดการเปลี่ยนแปลงค่า pH เช่น โบโร โมคลีซอล เพอร์เฟล (bromocresol purple) หรือเมทิลเรด (methyl red) ที่ใช้ทดสอบการสร้างกรด
- กรดอะมิโน โดยการเติมอินดิเคเตอร์ที่วัดความเป็นด่างที่เกิดจากการย่อยสลายกรดอะมิโน
- สารเคมีบางชนิดที่ถูกรีดิวซ์จากกระบวนการเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์ เช่น โพแตสเซียมเทลลูไรด์ ถูกรีดิวซ์ไปเป็นสารเทลลูเรียม (tellurium) สีดำ หรือปฏิกิริยารีดิวซ์สารไตรเฟนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ (triphenyl tetrazolium chloride) ไปเป็นสารฟอร์มาซาน (formazan) ที่มีสีแดง

- การเติมเกลือของเหล็ก (iron salts) เพื่อตรวจไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) โดยการเกิดสารสีดำของไอรอนซัลไฟด์ (iron sulfide)

Selective / differential media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้อย่างแพร่หลายในการแยกจุลินทรีย์เฉพาะชนิด และทำให้เกิดความแตกต่างกันโดยจุลินทรีย์อาจอยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน ตัวอย่างเช่น Macconkey agar ซึ่งประกอบด้วยเบปโตน มีการเติมเกลือน้ำดี (bile salts) เพื่อใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก แต่ยอมให้พวก Enterobacteriaceae เจริญ (กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E.coli* *Enterobacter* spp. *Salmonella* spp. และ *Proteus* spp.) โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้น เนื่องมาจากการเติมแลคโตสและอินดิเคเตอร์ที่มีสีแดง พวกที่หมักแลคโตสได้จะให้โคโลนีสีแดง เช่น *E. coli* ขณะที่พวกที่หมักไม่ได้เช่น *Salmonella* spp. จะให้โคโลนีที่ไม่มีสี

Chemically defined media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบปริมาณที่แน่นอนของแต่ละองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้อาจเป็น general purpose หรือ selective หรือ differential media ก็ได้ ตัวอย่างเช่น minerals modified glutamate medium ซึ่งใช้วิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอर्मในน้ำ

Elective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้แยกจุลินทรีย์เฉพาะชนิดที่ต้องการสารอาหารที่พิเศษ โดยการเติมสารเคมีบางชนิดเข้าไปแล้วทำให้เชื้อที่ต้องการแยกเจริญได้ดีขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้แตกต่างจาก selective medium ตรงที่สารที่เติมเข้าไปเพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการ ไม่ได้ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ ตัวอย่างเช่น Tomato juice agar ที่ใช้เลี้ยงพวก lactobacilli ที่ประกอบด้วยน้ำมะเขือเทศ เบปโตนและ peptonized milk และมีค่า pH 6.1 โดยน้ำมะเขือเทศดังกล่าวมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ แมกนีเซียมและแมงกานีส ซึ่งกระตุ้นการเจริญของ lactobacilli แต่ไม่ได้เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ

Living media หมายถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นเซลล์ที่มีชีวิต เช่น ตัวอ่อน (embryo) หรือเนื้อเยื่อบางชนิดที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงไวรัสเนื่องจากจะสามารถเจริญได้ในโฮสต์ (host) เท่านั้น

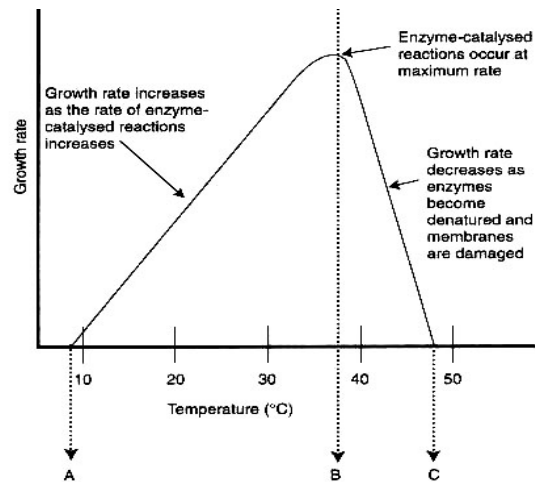
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปเริ่มจากชั่งส่วนผสม นำมาละลายในน้ำหรืออาจต้มให้เดือดเพื่อละลาย agar จากนั้น ทำการปรับ pH และแบ่งใส่ภาชนะเช่น หลอดแก้ว ขวดพลาสติก แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เวลา 15 นาที สำหรับอาหารที่มี pH กลางๆ หรือ 115°C เวลา 10 นาที สำหรับอาหารที่มี pH ต่ำหรือเป็นกรด และในอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดอาจฆ่าเชื้อด้วยการต้มพอเดือด ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบที่สลายตัวง่ายด้วยความร้อน อาจกำจัดจุลินทรีย์โดยการกรองและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารปฏิชีวนะมักเติมสารดังกล่าวหลังจากที่ผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้เย็นลงแล้ว

บทที่ 6

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของจุลินทรีย์

โดยทั่วไปจุลินทรีย์สามารถเจริญได้ระหว่างอุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งเล็กน้อยจนถึงสูงกว่า 100°C แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป เนื่องจากอุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเซลล์เมมเบรนและเอนไซม์ภายในเซลล์ ภาพที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญของ *E. coli* ที่อุณหภูมิต่างๆ



ภาพที่ 26 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย

ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 26 จะเห็นว่าอัตราการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นคล้ายคลึงกับอัตราการเพิ่มของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง โดยอาจเพิ่มขึ้นประมาณสองเท่าทุกๆอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 10°C (ในช่วง A ถึง B) ที่จุด B เป็นจุดที่มีอัตราการเจริญสูงสุด และหลังจากนั้นอัตราการเจริญของเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงจุด C ซึ่งเป็นจุดที่เชื้อหยุดการเจริญ อุณหภูมิที่จุด A เป็น

อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ (minimum temperature) ซึ่งถ้าต่ำกว่าที่จุดนี้คุณสมบัติของเซลล์เมมเบรนจะเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ ที่จุด B เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (optimum temperature) และจุด C เป็นอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญ (maximum temperature) ซึ่งที่อุณหภูมิสูงกว่านี้เอนไซม์ภายในเซลล์จะเสียสภาพธรรมชาติ รวมทั้งโปรตีนและไขมันที่เซลล์เมมเบรนจะไม่ทำงานและอาจทำให้เซลล์ตายเนื่องจากความร้อนได้

อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดอาจเป็นช่วงกว้าง เช่น *Clostridium perfringens* ที่มีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ระหว่าง 37 - 45°C นอกจากนั้นอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่เชื้อเจริญได้จะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น pH และ a_w ซึ่งถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะที่เหมาะสมก็จะทำให้อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อเจริญได้เพิ่มสูงขึ้นและอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อเจริญได้ลดต่ำลง ตัวอย่างเช่น อุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดของ *Staphylococcus aureus* ที่สามารถเจริญได้ คือ 6.7°C และ 48°C ตามลำดับ เมื่อเจริญในอาหารที่มีค่า pH 7.0 และค่า a_w 0.99 ถ้า pH เปลี่ยนเป็น 5.0 และทำให้ค่า a_w ลดลงโดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3.0 จะทำให้เชื้อไม่เจริญที่อุณหภูมิ 48°C และอุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้คือ 30°C

จากการที่จุลินทรีย์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน จึงสามารถแบ่งประเภทของจุลินทรีย์ตามระดับอุณหภูมิได้เป็น 5 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 กลุ่มของจุลินทรีย์แบ่งตามช่วงอุณหภูมิที่เจริญ

กลุ่มจุลินทรีย์	Minimum (°C)	Optimum (°C)	Maximum (°C)
Obligate psychrophile	-10	10-15	20
Psychrotroph	-10	20-30	42
Mesophile	5	28-43	52
Thermophile	30	50-65	70
Extreme thermophile	65	80-90	100

ที่มา : Garbutt (1997)

มีโซไฟล์ (mesophiles) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง โดยปรับตัวให้เจริญได้ในคนและสัตว์เลือดอุ่นรวมทั้งในดินและแหล่งน้ำในเขตร้อน คุณสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์กลุ่มนี้คือไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิแช่เย็น (-1 ถึง 5°C) และโดยส่วนใหญ่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 37°C จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 อุณหภูมิที่ต่ำสุดและสูงสุดและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ทำให้อาหารเป็นพิษ

จุลินทรีย์	Minimum (°C)	Optimum (°C)	Maximum (°C)
<i>Salmonella</i> spp.	5.3	37	45 - 47
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.7	37	45
<i>Clostridium perfringens</i>	20	37 - 45	50
<i>Clostridium botulinum</i> A/B	12.5	37 - 40	50
<i>Campylobacter jejuni</i>	30	42 - 45	47
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10	30 - 37	42
<i>Bacillus cereus</i>	10	28 - 35	48

ที่มา : Garbutt (1997)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโรค อาจแตกต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษ เช่น ในกรณีของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมและอุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการสร้างสารพิษ มีค่าสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมและอุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อเจริญได้ ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 อุณหภูมิต่างๆ สำหรับการเจริญและการสร้างสารพิษของ *Staphylococcus aureus*

	อุณหภูมิสำหรับการเจริญ (°ซ)	อุณหภูมิสำหรับการสร้างสารพิษ (°ซ)
Minimum	6.7	10
Optimum	37	40 - 45
Maximum	45.6 (หรือ 48)	45.6 (หรือ 48)

ที่มา : Garbutt (1997)

Obligate psychrophiles เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยในแถบมหาสมุทรอาร์กติก และแอนตาร์กติกหรือในบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำ (ในช่วง 0 - 5°ซ) ตลอดทั้งปีโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้อาจมีอุณหภูมิที่ต่ำสุดที่เจริญได้ที่ -10°ซ

ไซโครโทรป (psychrotrophs) เป็นจุลินทรีย์ที่พบในแหล่งน้ำและดินในแถบที่มีอุณหภูมิต่ำก่อนข้างสูงในฤดูร้อนและอุณหภูมิต่ำในฤดูหนาว อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อ *Pseudomonas fragii* เชื้อรา และยีสต์ *Debariomyces hansenii* สามารถเจริญได้คือ -6.5 - 10 และ -12.5°ซ ตามลำดับ แต่สำหรับจุลินทรีย์โดยทั่วไปในกลุ่มนี้มีอุณหภูมิต่ำสุดที่เจริญได้คือที่ -12°ซ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 25 - 30°ซ ส่วนอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 30 - 42°ซ จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่สำคัญและเป็นสาเหตุทำให้อาหารที่แช่เย็นเกิดการเสื่อมเสีย (อุณหภูมิระหว่าง -1 ถึง 5 หรือ 7°ซ) ซึ่งได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ดังแสดงในตารางที่ 15

ส่วนเชื้อราชนิดต่างๆ ที่ทำให้อาหารเป็นพิษจะมีอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่เจริญได้และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ แสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 15 จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารแช่เย็นเสื่อมเสีย

แบคทีเรีย	ยีสต์	เชื้อรา
<i>Pseudomonas</i>	<i>Candida</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Alteromonas</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Shewanella</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Debariomyces</i>	<i>Botrytis</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Alternaria</i>
<i>Lactobacillus</i>		<i>Trichosporon</i>
<i>Brochothrix</i>		

ที่มา : Garbutt (1997)

ตารางที่ 16 อุณหภูมิต่าง ๆ ในการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษ

จุลินทรีย์	Minimum (°ซ)	Optimum (°ซ)	Maximum (°ซ)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	- 1.3	28 - 29	44
<i>Listeria monocytogenes</i>	- 0.4	30 - 37	45
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0 - 4	37	45
<i>Clostridium botulinum</i> E	3.3	35	45

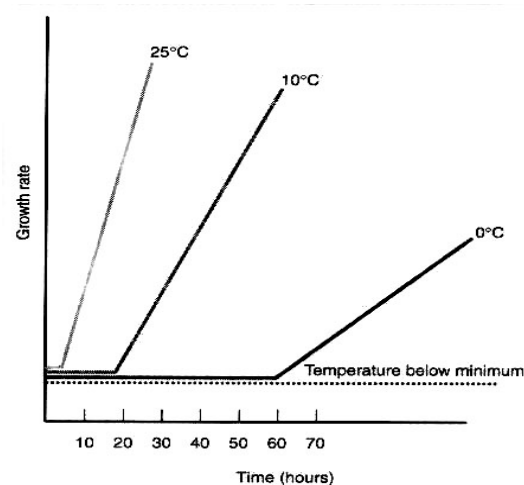
ที่มา : Garbutt (1997)

เทอร์โมไฟล์ (thermophiles) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง เช่นในดิน กองปุ๋ยหมักหรือไซเลจ (silage) ซึ่งอาจมีอุณหภูมิสูงถึง 70°ซ ส่วนพวก extreme thermophiles พบในน้ำพุร้อนและกระแสน้ำอุ่นในมหาสมุทรที่อาจมีอุณหภูมิสูงถึง 100°ซ จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอาหารกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus stearothermophilus* *Clostridium thermosaccharolyticum* และ *Desulfotomaculum nigrificans* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้อาหารกระป๋องที่เก็บในอุณหภูมิสูงเกิดการเสื่อมเสีย

สาเหตุที่จุลินทรีย์พวกไซโครโทรปสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำในขณะที่พวกมีโซไฟล์เจริญไม่ได้ นั่นเกิดจากความแตกต่างของโครงสร้างเซลล์เมมเบรน ในพวกไซโครโทรปพบว่าเซลล์เมมเบรนมีองค์ประกอบของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูงกว่า ทำให้สามารถรักษาสภาพของพลาสมาเมมเบรนให้เป็นของเหลวและเคลื่อนไหวได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5°C

ส่วนการที่เทอร์โมไฟล์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงนั้น เนื่องจากองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนมีปริมาณของกรดไขมันที่อิ่มตัวมากกว่าปกติ นอกจากนั้นโปรตีนเอนไซม์และไรโบโซมสามารถทนต่อความร้อนได้ดีกว่า ทำให้สามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อระยะ lag ของการเจริญได้แก่ในกรณีที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงต่ำลงไปใกล้กับ minimum temperature จะทำให้ระยะ lag เพิ่มขึ้นและมีผลทำให้อัตราการเจริญลดลง ผลของอุณหภูมิต่อระยะ lag ของไซโครโทรป แสดงดังภาพที่ 27



ภาพที่ 27 ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญและระยะ lag ของไซโครโทรป
ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 27 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 25°C ไชโครโทรปมีระยะ lag 1 ชั่วโมง แต่ถ้าอุณหภูมิเปลี่ยนเป็น 10 และ 0°C ระยะ lag จะเพิ่มเป็นประมาณ 18 และ 60 ชั่วโมงตามลำดับ

การเก็บรักษาอาหารโดยการแช่เย็น โดยใช้น้ำแข็งหรือตู้แช่ที่อุณหภูมิในช่วง -1 ถึง 5°C พบว่าไชโครโทรปสามารถเจริญและทำให้อาหารเสื่อมเสียได้ แต่ระยะ lag จะเพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญจะลดลง อายุการเก็บรักษาของอาหารแช่เย็นจะขึ้นกับอุณหภูมิที่แช่ ปริมาณของไชโครโทรปเริ่มต้น องค์ประกอบของอาหารและการใช้วิธีการอื่นๆร่วมด้วย เช่นการบรรจุแบบสุญญากาศ เป็นต้น นอกจากนั้นการแช่เย็นอาหารเป็นการยับยั้งการเจริญของพวกมีโซไฟล์ โดยเฉพาะที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ทำให้อาหารมีความปลอดภัยเพิ่มขึ้น

ในขณะที่แช่เย็นซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิปกติไปเป็นอุณหภูมิต่ำพบว่าเซลล์จุลินทรีย์จะถูกทำลายได้เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า chilling injury ซึ่งมี 2 ลักษณะ คือ

1. cold shock หรือ direct chilling injury เกิดจากการแช่เย็นอาหารโดยตรง ระดับความรุนแรงต่อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของการแช่เย็น ถ้าอัตราการแช่เย็นช้าจะทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บมากกว่าการแช่เย็นในอัตราที่เร็วกว่า ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์เมมเบรนเป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของสารเมตาโบไลต์ต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน และ ATP และจุลินทรีย์ในระยะคงที่ (stationary) จะทนได้น้อยกว่าระยะ lag

2. indirect chilling injury เกิดเมื่อเก็บรักษาอาหารโดยการแช่เย็นเป็นเวลานาน (หลายวัน)และไม่ขึ้นกับอัตราการแช่เย็น เนื่องจากการแลกเปลี่ยนสารเข้าออกของเซลล์จุลินทรีย์หยุดลง ทำให้สารพิษสะสมอยู่ในเซลล์หรือสูญเสียสารที่สำคัญเช่น ATP ทำให้เซลล์ขาดอาหารและตายในที่สุด

chilling injury มักเกิดกับพวก mesophiles โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เช่น *Salmonella* spp. ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจลดปริมาณลง แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่งจะสามารถเจริญและอาจทำให้อาหารเป็นพิษได้

ผลของการแช่เยือกแข็งต่อจุลินทรีย์

อุณหภูมิที่ทำให้เกิดสภาวะแช่เยือกแข็งขึ้นกับความเข้มข้นของตัวถูกละลายของแข็งที่มีสารละลายที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ อาหารส่วนใหญ่จะเยือกแข็งที่อุณหภูมิประมาณ -0.5 ถึง -3.0°C การแช่แข็งเป็นการลดค่า a_w ของอาหาร โดยทำให้น้ำอยู่ในรูปของผลึกน้ำแข็ง ค่า a_w ของน้ำบริสุทธิ์คือ 1.0 ที่ 0°C และลดลงเหลือ 0.907 ที่ -10°C และ 0.841 ที่ -18°C ตามลำดับ การที่น้ำกลายเป็นน้ำแข็งจึงทำให้ตัวถูกละลายมีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นและมีผลต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์

การเจริญของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแช่เยือกแข็ง

มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า -5°C เนื่องจากอัตราการเจริญถูกจำกัดจากค่า a_w ที่ต่ำและจากผลของ a_w เพียงอย่างเดียวต่อการเจริญของจุลินทรีย์พบว่า ยีสต์และเชื้อราอาจเจริญได้ที่อุณหภูมิ -20°C แต่ที่จริงแล้วมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิด ที่สามารถเจริญได้ที่ต่ำกว่า -10°C และมีเพียง *Debaromyces* ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง -12.5°C ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของเซลล์เมมเบรนเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำอาหารเข้าสู่เซลล์ได้

การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะแช่เยือกแข็ง พบว่าโดยทั่วไปจุลินทรีย์อาจรอดชีวิตประมาณร้อยละ 40 - 90 โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ต่อไปนี้

1. ชนิดของจุลินทรีย์ โดยปกติพวกแกรมลบจะทนต่อการแช่เยือกแข็งได้ต่ำกว่าแกรมบวกและสปอร์แบคทีเรีย และไวรัสมักทนต่อการแช่เยือกแข็งได้สูงมาก
2. อายุของเซลล์จุลินทรีย์ จุลินทรีย์ในช่วงที่มีอัตราการเจริญสูงจะทนต่อการแช่เยือกแข็งได้ต่ำกว่าพวกที่อยู่ในระยะคงที่ เนื่องจากมีปริมาณของไขมันในเซลล์เมมเบรนต่ำกว่า
3. อัตราเร็วของการแช่เย็นซึ่งมีผลทำให้จุลินทรีย์เกิด chilling injury
4. อัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง ถ้าเกิดเร็วจะทำให้จุลินทรีย์ถูกทำลายได้น้อยกว่า
5. อุณหภูมิสุดท้ายของการแช่เยือกแข็ง ยังมีอุณหภูมิต่ำโอกาสรอดของจุลินทรีย์จะ

ต่ำลง

6. องค์ประกอบของอาหาร พบว่าอาหารที่เป็นกรดจะทำให้จุลินทรีย์ทนต่อการแช่เยือกแข็งได้เรียกสารประเภทนี้ว่า cryoprotectants

7. เวลาที่เก็บรักษาอาหารแช่เยือกแข็ง พบว่ายิ่งเก็บรักษาอาหารไว้นานจะทำให้จุลินทรีย์ลดปริมาณลงไปเรื่อยๆ โดยเฉพาะพวกแกรมลบรูปแท่ง

8. วิธีการขึ้นต้นก่อนการแช่เยือกแข็ง อาจทำให้เซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลายได้บางส่วน เช่น การลวก (blanching)

9. การละลายน้ำแข็ง (thawing) โดยจะขึ้นอยู่กับอัตราการแช่เยือกแข็งขณะเริ่มต้น กรณีที่แช่เยือกแข็งแบบช้า พบว่าการละลายน้ำแข็งจะมีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์น้อย แต่ถ้าใช้วิธีแช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็วและนำมาละลายน้ำแข็งอย่างช้า ๆ จะทำให้ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นภายในเซลล์เพิ่มขนาดขึ้นระหว่างการละลายน้ำแข็ง ทำให้เซลล์ถูกทำลายได้และถ้าใช้วิธีแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็วจะไม่มีผลต่อเซลล์จุลินทรีย์

การแช่เยือกแข็งมีผลต่อจุลินทรีย์โดยทำให้เซลล์บาดเจ็บและตาย ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของการแช่เยือกแข็ง ดังนี้

1. การแช่เยือกแข็งแบบช้า (slow freezing) เช่น ภายในช่องแช่แข็งของตู้เย็น จะทำให้น้ำกลายเป็นผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ ดังนั้นความเข้มข้นของตัวถูกละลายรอบๆ เซลล์เพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดพลาสมอลิซิส (plasmolysis) เซลล์เกิดการหดตัวและอาจตายได้ การแช่เยือกแข็งแบบช้านี้จะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์จุลินทรีย์ได้มากที่สุด

2. การแช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็ว (fast freezing) จะทำให้ผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นภายในเซลล์จุลินทรีย์ และทำให้เซลล์ถูกทำลายโดยอาจเนื่องมาจากเซลล์เมมเบรนหรือ DNA ถูกทำลายจากผลึกน้ำแข็ง หรือความเข้มข้นของตัวถูกละลายในเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้ค่า pH เปลี่ยนแปลง และทำให้ค่าความแรงของไอออน (ionic strength) เพิ่มขึ้น เป็นผลให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกถูกทำลาย หรือจากการที่เกิดฟองแก๊ส (gas bubbles) ระหว่างการละลายน้ำแข็งซึ่งทำให้เซลล์เมมเบรนถูกทำลาย

3. การแช่เยือกแข็งอย่างรวดเร็วมาก (Ultra fast freezing) เป็นการแช่เยือกแข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่อุณหภูมิ -196°C ทำให้น้ำกลายเป็นผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กมาก และไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์

หลังจากผ่านการละลายน้ำแข็งแล้ว พบว่าเซลล์ของจุลินทรีย์ที่บาดเจ็บสามารถซ่อมแซมตัวเองและเจริญขึ้นมาอีกได้ ทรายไคที่ยังมีสารอาหารและไม่มีสารยับยั้งการเจริญ

การใช้วิธีการแช่เยือกแข็งเพื่อถนอมรักษาอาหาร เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ของแบคทีเรียที่สร้างขึ้นและปล่อยออกนอกเซลล์อาจทำให้อาหารเสื่อมเสียก่อนการแช่เยือกแข็งหรือจากเซลล์ที่บาดเจ็บระหว่างการเก็บรักษา โดยการแช่เยือกแข็งจะมีผลต่อคุณภาพของอาหาร เช่นไลเปส (lipase) ที่ทำให้เกิดกลิ่นหืนและโปรตีนเอส (proteinase) ที่ทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสเกิดการเปลี่ยนแปลง ในส่วนของไวรัส สปอร์ของแบคทีเรียและสารพิษจากแบคทีเรียจะไม่ถูกทำลายโดยการแช่เยือกแข็ง

วอเตอร์ แอกติวิตี (water activity : a_w)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการน้ำและมีน้ำเป็นองค์ประกอบไม่ต่ำกว่าร้อยละ 75 ถ้ามีปริมาณน้ำต่ำกว่านี้จะทำให้ไม่สามารถเจริญและสืบพันธุ์ได้ เซลล์ที่ทนต่อสภาวะแห้งแล้งเช่น สปอร์ของแบคทีเรียมีปริมาณน้ำต่ำคือร้อยละ 15 ซึ่งไม่เพียงพอที่จะดำเนินกิจกรรมเมตาโบลิซึม

ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหาร บางส่วนจะถูกยึดเกาะแน่นกับโมเลกุลของสารที่เป็นองค์ประกอบอาหาร ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ โดยอาจเนื่องมาจาก

1. ในน้ำมีตัวถูกทำลายเป็นองค์ประกอบเช่น เกลือหรือน้ำตาล
2. น้ำกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง
3. น้ำอยู่ในสภาวะ crystallization หรือ hydration
4. น้ำถูกดูดซับบนพื้นผิวหน้า (matrix effects)

ยกตัวอย่างเช่น ถ้าเติมทราย เกลือ และวุ้น ลงในภาชนะแยกกันที่มีน้ำอยู่ด้วย จะพบว่าในภาชนะที่มีน้ำและที่เติมทรายจะไม่มีผลต่อปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ ส่วนในภาชนะที่เติมเกลือจะพบว่าเกลือสามารถละลายน้ำได้และเพิ่มแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำน้ำที่ละลายเกลือนี้นำไปใช้ได้ และในภาชนะที่เติมวุ้นลงไปจะทำให้เกิดเป็นสารละลายคอลลอยด์ ซึ่งวุ้นจะดูดซึมน้ำเข้าไปในโครงสร้าง ดังนั้น จุลินทรีย์จึงไม่

สามารถนำน้ำไปใช้ได้ เช่นเดียวกับที่น้ำที่ใส่ในภาชนะแล้วนำไปแช่เยือกแข็ง ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งและจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้

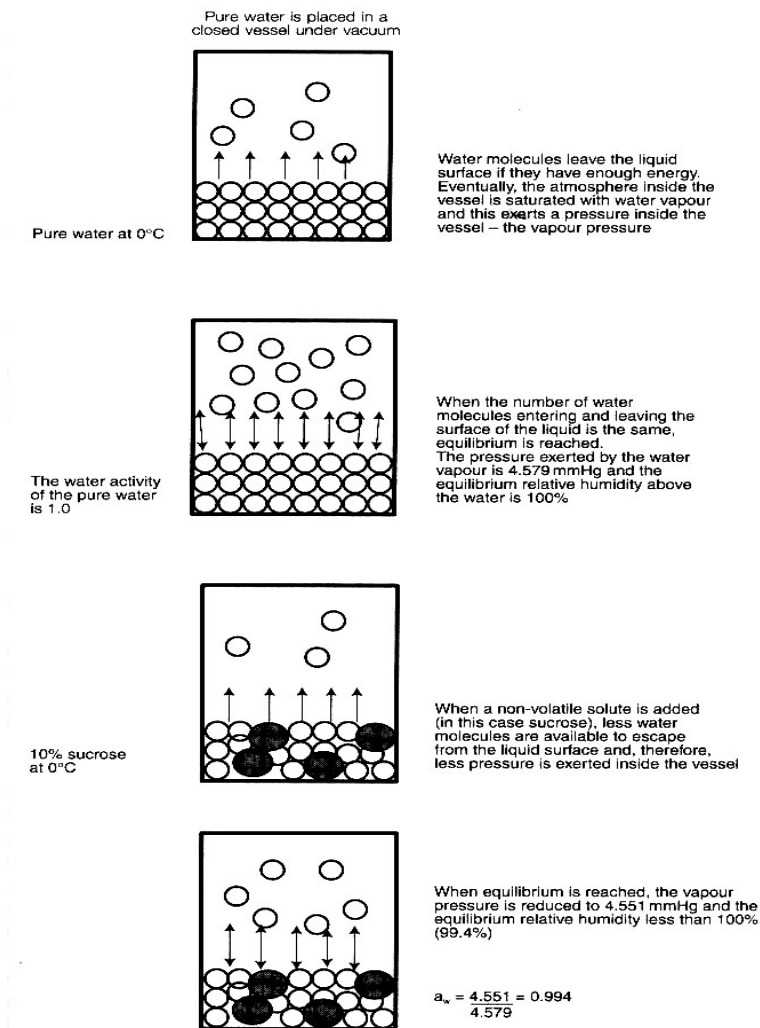
ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ เรียกว่า วอเตอร์ แอกติวิตี (a_w) ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนระหว่างความดันไอของสารละลายต่อความดันไอของน้ำ ที่อุณหภูมิเดียวกัน ความดันไอ (vapour pressure) มีหน่วยมิลลิเมตรปรอท (mmHg) และขึ้นกับอุณหภูมิ ที่ 0°C น้ำบริสุทธิ์มีความดันไอ 4.679 mmHg และที่ 25°C ความดันไอเพิ่มขึ้นเป็น 23.8 mmHg ภาพที่ 28 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความดันไอและค่า a_w

จากภาพที่ 28 ในภาชนะปิดที่ 0°C โมเลกุลของน้ำจะหลุดออกจากผิวหน้า ทำให้บรรยากาศภายในภาชนะปิดอึดอัดไปด้วยไอน้ำและเกิดความดันไอลดลง เมื่อถึงสมดุลโมเลกุลของน้ำที่เข้าและออกจากผิวหน้าจะเท่ากัน ที่จุดนี้ไอน้ำมีความดันไอเท่ากับ 4.579 mmHg และความชื้นสัมพัทธ์ที่จุดสมดุลเท่ากับร้อยละ 100 ($a_w = 1.0$) แต่เมื่อเติมน้ำตาลซูโครสลงไปร้อยละ 10 จะทำให้ปริมาณน้ำที่หลุดออกจากผิวหน้าลดลง ดังนั้นความดันไอที่เกิดขึ้นจึงลดลงตามไปด้วย และเมื่อถึงสมดุล ความดันไอลดลงเท่ากับ 4.551 mmHg และความชื้นสัมพัทธ์จะเท่ากับร้อยละ 99.4 ($a_w = 4.551/4.579 = 0.994$)

a_w มีค่าอยู่ระหว่าง 0 - 1.0 และมีความสัมพันธ์กับค่าความชื้นสัมพัทธ์สมดุล (equilibrium relative humidity, ERH) ที่หมายถึงปริมาณน้ำเหนือบรรยากาศของอาหารที่จุดสมดุล โดย $ERH = a_w \times 100\%$ การคำนวณค่า a_w โดยใช้กฎของ Raoult มีสูตรดังนี้

$$a_w = \frac{n}{N + n} = \frac{(w/m)}{(w/m) + (W/M)}$$

โดย n = โมลของตัวถูกละลาย N = โมลของตัวทำละลาย (น้ำ)
 w = น้ำหนักของตัวทำละลาย W = น้ำหนักของตัวถูกละลาย
 m = น้ำหนักโมเลกุลของตัวทำละลาย และ
 M = น้ำหนักโมเลกุลของตัวถูกละลาย



ภาพที่ 28 ความสัมพันธ์ระหว่างความดันไอและค่า a_w

ที่มา : Garbutt (1997)

ยกตัวอย่างเช่น สารละลายซูโครสในน้ำร้อยละ 5 (w/v) จะมีค่า a_w เท่าใด จากโจทย์ทำให้ทราบว่าน้ำหนักโมเลกุลของน้ำ = 18 และน้ำหนักโมเลกุลกลูโคส = 342

$$\text{ดังนั้น} \quad a_w = (100 / 18) / ((5 / 342) + (100 / 18)) = 0.997$$

อย่างไรก็ตามกฎของ Raoult จะทำให้ทราบเพียงค่าประมาณ ของ a_w ในอาหารเนื่องจากอาหารมีองค์ประกอบที่สลับซับซ้อน ซึ่งการวัด a_w ด้วยเครื่องมือที่เฉพาะ จะทำให้ได้ค่าที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า

ค่า a_w ของอาหารนั้นพบว่า มีความสัมพันธ์เล็กน้อยกับปริมาณน้ำในอาหาร เช่น เนื้อสัตว์มีปริมาณน้ำประมาณร้อยละ 75 แต่มีค่า a_w เท่ากับ 0.98 เนื่องจากในเนื้อสัตว์ประกอบด้วยโปรตีนและไขมันเป็นส่วนใหญ่ซึ่งไม่ละลายน้ำ และปริมาณสารที่ละลายน้ำได้ในเนื้อสัตว์เช่น กลูโคส กรดอะมิโน เกลือแร่ต่าง ๆ และวิตามิน มีอยู่ในปริมาณต่ำ ดังนั้น ทำให้ค่า a_w ของเนื้อสัตว์มีค่าสูง

ในอาหารที่มีปริมาณเกลือต่ำแต่อาจมีค่า a_w ต่ำ เช่นเนยเหลวชนิดเค็มเกลือ (salted butter) ซึ่งเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water in oil emulsion) มีเกลือประมาณร้อยละ 2-3 แต่มีค่า a_w อยู่ระหว่าง 0.993 - 0.989 เนื่องจากเกลือเป็นสารที่มีขั้ว (polar molecule) จึงละลายเฉพาะในส่วนที่เป็นน้ำ ทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 18 ซึ่งค่า a_w ที่แท้จริงและมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในส่วนที่เป็นน้ำคือที่ 0.86

ผลของ a_w ต่อจุลินทรีย์

ผลของ a_w ต่อจุลินทรีย์ จะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งจะมีช่วง a_w ที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญเข้าใกล้ 1.0 ซึ่งนอกจากมีปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์นำไปใช้ได้แล้ว ยังต้องมีสารอาหารที่พอเพียงต่อการเจริญ ค่า a_w ต่ำสุดของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ค่า a_w ต่ำสุดที่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้

จุลินทรีย์	ค่า a_w ต่ำสุดที่เจริญได้
Proteolytic <i>Clostridium botulinum</i> A และ B	0.94
Non-proteolytic <i>Clostridium botulinum</i> B E และ F	0.975
<i>E. coli</i>	0.93
<i>Salmonella</i>	0.93
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.94
<i>Clostridium perfringens</i>	0.93
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94
<i>Staph. aureus</i>	0.86
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.98
<i>Campylobacter jejuni</i>	0.98
<i>Bacillus cereus</i>	0.91
เชื้อราชนิดที่สร้างสารพิษ	0.8 – 0.61

ที่มา : ดัดแปลงจาก Garbutt (1997)

โดยปกติแบคทีเรียจะทนต่อการเปลี่ยนแปลงของ a_w ที่ลดลงได้ต่ำที่สุด ในขณะที่ยีสต์และเชื้อราทนได้มากกว่า ค่า a_w ต่ำที่สุดที่จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญได้คือต่ำกว่า 0.61 โดยที่ค่านี้การเสื่อมเสียของอาหาร มักมีสาเหตุจากปฏิกิริยาเคมีมากกว่าจากจุลินทรีย์

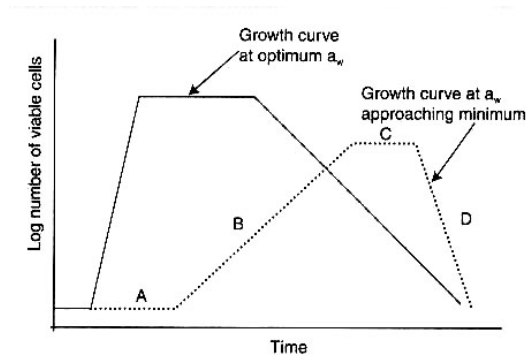
จุลินทรีย์พวกฮาโลไฟล์ (halophiles) เป็นพวกที่ทนเกลือและต้องการไอออนโซเดียม (Na^+) ในการเจริญ ส่วนมากซีโรไฟล์ (xerophiles) เป็นพวกที่ชอบความแห้งแล้งมากหรือเจริญที่ค่า a_w ต่ำ และจะไม่เจริญถ้าค่า a_w สูงกว่า 0.96 จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น *Xeromyces bisporus* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ปลาเค็มเสื่อมเสีย พวกฮาโลไฟล์แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ moderate halophiles ซึ่งต้องการโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 1 – 10 เช่น *Vibrio parahaemolyticus* อีกชนิดหนึ่งได้แก่ extreme halophiles ซึ่งจะเจริญเฉพาะในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูงมาก โดยผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยโปรตีนและไอออนโซเดียมซึ่งจะมีผลทำให้โปรตีนมี

ความคงตัวสูงขึ้น เช่น *Halobacterium salinarum* ที่พบในเกลือทะเล เชื้อนี้จะเจริญเฉพาะในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ระหว่างร้อยละ 12 - 36 (ค่า a_w 0.928 - 0.760)

พวกฮาโลโทเลอแรนท์ (halotolerant) หรือฮาโลดิวริก (haloduric) สามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง แต่ไม่จำเป็นต้องมีโซเดียมคลอไรด์ก็สามารถเจริญได้ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Pediococcus halophilus* ซึ่งเจริญได้ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ถึงร้อยละ 20 (ค่า a_w 0.83)

พวกออสโมฟิลิก (osmophilic) สามารถเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่ไม่เจริญในที่ที่มีค่า a_w ต่ำ เช่น *Saccharomyces rouxii* (*Zygosaccharomyces rouxii*) จะเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 70 และไม่เจริญที่ a_w สูงกว่า 0.62 หรือความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำกว่าร้อยละ 20 (ค่า a_w 0.980)

พวกออสโมโทเลอแรนท์ (osmotolerant) ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ที่เจริญได้ดีในที่ที่มี a_w สูง แต่สามารถทนความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงได้ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 60 หรือสูงกว่านี้ ผลของค่า a_w ต่อการเจริญของจุลินทรีย์แสดงดังภาพที่ 29



ภาพที่ 29 ผลของค่า a_w ต่อการเจริญของจุลินทรีย์

ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 29 เมื่อค่า a_w ลดลงจะทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง โดยมีระยะ lag เพิ่มขึ้นและทำให้การเพิ่มจำนวนของเซลล์ลดลงรวมทั้งทำให้เซลล์ตายอย่างรวดเร็วในระยะตาย (death)

จุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมซึ่งมีค่า a_w ต่ำกว่าปกติจะค่อยๆ ลดจำนวนลง โดยถ้าถูกซบไว้ที่ผิวหน้าจะยับยั้งการเจริญแต่จุลินทรีย์จะยังคงรอดชีวิต เช่น ในอาหารที่ทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็งซึ่งมีค่า a_w ต่ำกว่า 0.1 ซึ่งน้ำจะถูกดึงออกจากเซลล์ของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะแห้งแล้งและสามารถรอดชีวิตได้เป็นระยะเวลานาน วิธีนี้ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อที่ใช้เป็นสตาร์ทเตอร์ในอุตสาหกรรมหมัก ซึ่งจะสามารถเก็บรักษาและนำไปใช้ได้สะดวกขึ้น

จุลินทรีย์พวกที่เจริญในอาหารที่มีเกลือหรือน้ำตาลสูงกว่าภายในเซลล์ (hypertonic) จะทำให้เกิดการไหลของน้ำออกจากเซลล์ ซึ่งสามารถทำลายและทำให้เซลล์ตายได้ ทั้งนี้ เนื่องจากเซลล์สูญเสีย turgor pressure ที่ใช้ในการเจริญและการแบ่งเซลล์ เซลล์เมมเบรนจะถูกทำลายรวมทั้งเอ็นไซม์ที่สร้างบริเวณเซลล์เมมเบรนและภายในเซลล์จุลินทรีย์จะถูกทำลายเช่นเดียวกัน

ภายในเซลล์จุลินทรีย์ไม่มีโครงสร้างพิเศษที่ทำหน้าที่ควบคุมแรงดันออสโมติก แต่จะสามารถปรับตัวได้บ้างตามสภาวะของแรงดันออสโมติกภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น อาจสะสมตัวถูกละลายที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ไว้ภายใน โดยสารเหล่านี้อาจสังเคราะห์ขึ้นได้ภายในเซลล์ เช่น ในพวกแกรมบวก ยีสต์และเชื้อรา ยกเว้นพวกแกรมลบ หรืออาจได้จากสิ่งแวดล้อมภายนอก สารดังกล่าวได้แก่ อีออนโปตัสเซียม (K^+) กรดอะมิโน หรือโพลีออล (polyols) ได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol) อาราบิทอล (arabitol) ทรีฮาโลส (trehalose) หรือแมนนิทอล (mannitol) ซึ่งจะสามารถสะสมได้แตกต่างกันออกไปและในจุลินทรีย์บางชนิดอาจปรับสภาพของเซลล์เมมเบรน เช่น องค์ประกอบของฟอสโฟไลปิด ซึ่งทำให้ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติกได้เพิ่มขึ้น

การถนอมรักษาอาหารโดยการลดค่า a_w เป็นวิธีที่กระทำมาตั้งแต่โบราณ โดยใช้สารที่เรียกว่า humectant ซึ่งเป็นสารที่ละลายในน้ำ เมื่อเติมในอาหารจะทำให้ค่า a_w ลดลงและ humectant บางชนิดอาจมีคุณสมบัติเป็นวัตถุกันเสียได้ การลดค่า a_w ของอาหารทำได้โดยการเติม

เกลือ น้ำตาลหรือ sugar alcohols การทำแห้ง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและการแช่เยือกแข็งอาหาร

การควบคุมการเน่าเสียของอาหารโดยการลดค่า a_w ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาอาหารที่มีค่า a_w สูงได้ ลักษณะการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียสำหรับอาหารที่ลดค่า a_w ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบ วิธีการลดค่า a_w รวมทั้งความเข้มข้นของสาร humectant ที่ใช้ เช่น ในปลาเค็มที่เสื่อมเสียจาก *Halobacterium salinarum* ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนในเกลือทะเลและความเข้มข้นของเกลือที่ใช้

ชนิดอาหารแบ่งตามค่า a_w และจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสีย

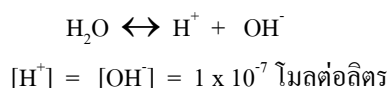
ชนิดอาหารแบ่งตามค่า a_w และจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสียได้ดังนี้

1. อาหารที่มีความชื้นสูง (high moisture foods) (a_w 0.99 - 0.95) ได้แก่ อาหารสด หรืออาหารแปรรูปเล็กน้อย เช่น เนื้อสัตว์ปีก เนื้อสัตว์ ผลไม้ นํ้านม ไข่ ผัก น้ำผลไม้ ชีสสเปรด (cheese spread) และคottageชีส (cottage cheese) ซึ่งมักเสื่อมเสียโดยแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อราและยีสต์ที่ไม่ทนแรงดันออสโมติก
2. อาหารที่มีความชื้นสูง (a_w 0.95 - 0.90) เช่น อาหารที่ผ่านการทำแห้งบางส่วนหรืออาหารที่มีการเติมเกลือ หรือน้ำตาล เช่น ขนมหั้ว ชีสหมัก เนยเหลวชนิดเค็ม ไข่กรอกหมัก เบคอน และแฮม ซึ่งอาหารเหล่านี้มักเสื่อมเสียโดยแบคทีเรียแกรมบวก เชื้อราและยีสต์
3. อาหารที่มีความชื้นปานกลาง (intermediate moisture foods) (a_w 0.90 - 0.61) เช่น อาหารที่ผ่านการทำแห้งมากพอควรหรือที่มีการเติมเกลือหรือน้ำตาลในปริมาณสูง เช่น ซาลามิ (salami) น้ำผลไม้เข้มข้น ผลไม้แห้ง (ลูกพรุน อินทผาลัม) ปลาเค็ม ปลาแห้ง แยม แยม และข้าว อาหารเหล่านี้มักเสื่อมเสียจากยีสต์ เชื้อราชนิดซีโรไฟล์และยีสต์ออสโมฟิลิก รวมทั้งแบคทีเรียพวกฮาโลไฟล์
4. อาหารที่มีความชื้นต่ำ (low moisture foods) (a_w ต่ำกว่า 0.61) เช่น อาหารที่ผ่านการทำแห้งมาอย่างดี เช่น ช็อคโกแลต ชุปผง นมผง น้ำผึ้ง แป้ง พาสต้า บิสกิต ผักทำแห้ง ธัญชาติ แครกเกอร์และน้ำตาล อาหารเหล่านี้มักไม่เสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์นอกจากจะได้รับความชื้นเพิ่มขึ้นจากบรรยากาศ

การลดค่า a_w ในอาหารเป็นวิธีการที่สำคัญและสามารถใช้ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษโดยเชื้อเหล่านี้จะไม่เจริญที่ a_w ต่ำกว่า 0.93 (ซูโครสร้อยละ 48 หรือ โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10) ยกเว้น *Staphylococcus aureus* *Bacillus cereus* และ เชื้อราที่สร้างสารพิษ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจยังมีชีวิตรอดได้เป็นระยะเวลานาน เพียงแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตเท่านั้น โดยเฉพาะในอาหารแห้ง ตัวอย่างเช่น *Salmonella* spp. จะสามารถรอดชีวิตในนมผงได้เป็นเวลาหลายเดือน

ผลของค่า pH ต่อการเจริญของจุลินทรีย์

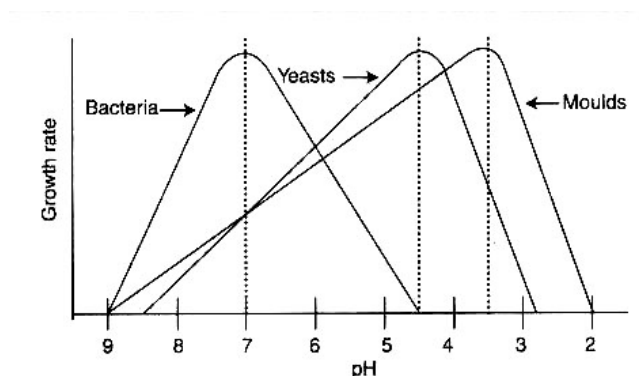
ค่า pH เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเจริญและการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหาร ค่า pH เป็นค่าที่บอกความเป็นกรด-ด่างหรือเป็นกลางในปฏิกิริยาเคมี เมื่อน้ำบริสุทธิ์ถูกทำให้แตกตัวเป็นไอออนจะได้ H^+ และ OH^- และจะมีความเข้มข้นของแต่ละไอออนเท่ากับ 1×10^{-7} โมลต่อลิตร ดังสมการ



ในสารละลายที่มีไอออนของ H^+ และ OH^- ปริมาณเท่ากันจะมีฤทธิ์เป็นกลาง ถ้ามี H^+ มากกว่าจะมีฤทธิ์เป็นกรด (acid) และถ้า OH^- มากกว่าจะมีฤทธิ์เป็นด่าง (alkaline) ค่าสเกล pH แสดงในรูปของเลขยกกำลังที่เป็นค่าบวกของความเข้มข้นของ H^+ เช่น สารละลายที่มี H^+ 10^{-7} และ 10^{-5} โมลต่อลิตร จะมี pH เท่ากับ 7 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งสเกลดังกล่าวเป็นค่าสเกล log และมีค่าเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่า เช่น ที่ pH 4.0 จะมีค่าความเป็นกรดมากกว่าที่ pH 7.0 อยู่ 1,000 เท่า เป็นต้น

ช่วง pH สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงของ pH ที่เหมาะสมและเฉพาะเช่น *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเจริญได้ในช่วง pH ในช่วง 2.35 - 8.60 แต่ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ ที่ 4.5 ผลของ pH ต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ แสดงดังภาพที่ 30

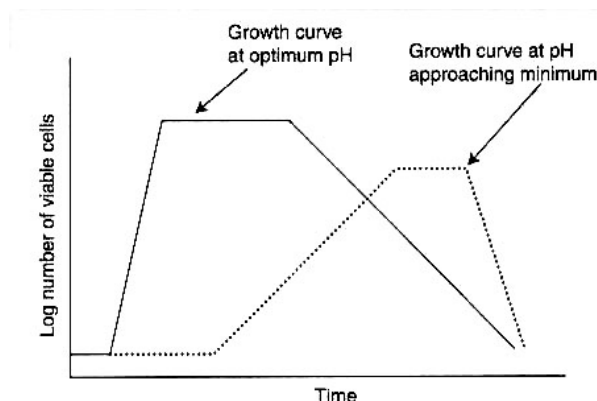


ภาพที่ 30 ผลของ pH ต่ออัตราการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ

ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 30 จะเห็นว่าแบคทีเรียมี pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ (minimum pH) ที่ประมาณ 4.0 - 4.5 และมีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ (optimum pH) ที่ 6.8 - 7.2 และช่วง pH สูงสุดที่เจริญได้ (maximum pH) ที่ 8.0 - 9.0 ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิดเช่น *Lactobacillus* spp. ที่เจริญในช่วง pH 3.8 - 7.2 และมี optimum pH ที่ 5.0 และ *Acinetobacter* spp. เจริญที่ pH ระหว่าง 2.8 - 4.3 และมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 3.0

ส่วนยีสต์และเชื้อราจะทนต่อ pH ได้ดีกว่าแบคทีเรียและสามารถเจริญได้ที่ pH ช่วงกว้างกว่า เช่น *Fusarium* spp. สามารถเจริญได้ในช่วง pH ระหว่าง 1.8 - 11.0 ยีสต์มีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วง 4.0 - 4.5 และเชื้อราอยู่ระหว่าง pH 3.0 - 3.5 ค่า pH นอกจากมีผลต่ออัตราการเจริญแล้วยังมีผลต่อกราฟการเจริญของจุลินทรีย์ ดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 ผลของ pH ที่ใกล้ minimum ต่อการเจริญของจุลินทรีย์

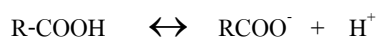
ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 31 จะเห็นว่าเมื่อ pH เข้าใกล้ค่า pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้จะมีผลทำให้ อัตราการเจริญลดลง ปริมาณเซลล์สูงสุดที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ลดลงและทำให้มีระยะ lag แต่ลดระยะคงที่ลง รวมทั้งเพิ่มอัตราการตายของจุลินทรีย์ ค่า pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ของ จุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม ปริมาณสารอาหาร ค่า a_w และสารยับยั้งจุลินทรีย์

ผลของ pH ต่อเซลล์ของจุลินทรีย์

ภายในเซลล์จุลินทรีย์จะมีค่า pH ประมาณ 7.0 (ยกเว้นยีสต์มีค่าประมาณ 5.8) ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมสำหรับเมตาโบลิซึม ที่บริเวณเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์จะไม่ยอมให้ H^+ และ OH^- ผ่านเข้าออกแต่จะมีกลไกปั๊ม H^+ ออกนอกเซลล์ การที่จุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่า pH สูงหรือต่ำกว่าค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญอาจทำให้มีผลต่อเอนไซม์เพอร์มิเอส (permeases) ที่ใช้ในการนำสารอาหาร รวมทั้งไอออนที่จำเป็นเข้าสู่เซลล์ การสร้างเอนไซม์ที่หลั่งออกภายนอกเซลล์ และมีผลต่อการสร้าง ATP ในแบคทีเรีย ถ้าเซลล์จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีค่า pH สูงมาก จะทำให้เซลล์เมมเบรนถูกทำลาย ทำให้ H^+ และ OH^- เข้าสู่ภายในเซลล์จนเป็นผลให้เอนไซม์ถูกทำลายและทำให้เซลล์ตายในที่สุด

การแตกตัวของกรดอ่อนขึ้นอยู่กับการค่า pH ของสภาพแวดล้อม ดังสมการ



ในสภาวะที่เป็นกรดซึ่งมี H^+ อยู่มากพบว่าสมดุลจะเลื่อนจากขวาไปซ้าย ปริมาณของกรดอ่อนที่แตกตัวที่ pH หนึ่งๆ เรียกว่าค่า pK และที่ pH ซึ่งกรดแตกตัวไปร้อยละ 50 เรียกว่า pKa พวกกรดที่ไม่แตกตัวจะสามารถละลายในไขมันและเคลื่อนที่ผ่านเซลล์เมมเบรนได้ ขณะที่กรดที่แตกตัวไม่สามารถผ่านได้ หมายความว่ายังมีสภาพที่เป็นกรดมากขึ้นเท่าไร กรดในรูปที่ไม่แตกตัวจะสามารถเข้าสู่เซลล์ได้มากเท่านั้น ขณะที่ภายในเซลล์ กรดที่ไม่แตกตัวจะสามารถแตกตัวภายใต้สภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อย เซลล์จะปั๊ม H^+ ที่เกินออกมาภายนอก แต่ในที่สุดแล้วค่า pH ภายในเซลล์จะลดลงและมีผลต่อเอนไซม์และกรดนิวคลีอิก ทำให้เซลล์ตาย ตัวอย่างกรดอ่อนที่ใช้ เช่น กรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous acid) เป็นต้น ผลของกรดอ่อนต่อเซลล์ของจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ความเข้มข้นของกรดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และทำให้เซลล์ตายนั้น จะมีผลต่อจุลินทรีย์น้อยลงถ้าอุณหภูมิต่ำลง ความแรงของกรดต่างๆ ที่ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์เรียงลำดับจากมากไปน้อยดังนี้ โพรพิโอนิก (propionic) อะซิติก (acetic) แลคติก (lactic) ซิตริก (citric) ฟอสฟอริก (phosphoric) และไฮโดรคลอริก (hydrochloric)

ค่า pH ที่เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์จะขึ้นกับชนิดของกรดที่อยู่ในสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญจะสูงขึ้นถ้าสภาพแวดล้อมเป็นกรดอินทรีย์ ตารางที่ 18 แสดงค่า pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ สำหรับการเจริญของ *Salmonella* spp. เมื่อปรับค่า pH โดยใช้กรดชนิดต่างๆ

ค่า pH และการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร

อาหารแต่ละชนิดมีค่า pH ที่แตกต่างกันออกไป อาหารส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในช่วงเป็นกรด ตั้งแต่เป็นกรดมากไปจนถึงค่า pH ที่เป็นกลาง อาหารที่มีฤทธิ์เป็นด่างมักไม่ค่อยพบเช่นไข่ เป็นต้น ค่า pH ของอาหารชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 19

ตารางที่ 18 ผลของกรดชนิดต่าง ๆ ต่อค่า pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ของ *Salmonella* spp.

กรด	Minimum pH ของการเจริญ
ไฮโดรคลอริก	4.05
ซิตริก	4.05
มาลิก	4.30
แลกติก	4.40
อะซีติก	5.40
โพรพิโอนิก	5.40

ที่มา : Garbutt (1997)

ตารางที่ 19 ค่า pH ของอาหารชนิดต่าง ๆ

อาหาร	ค่า pH
มะนาว	2.2 - 2.4
สตรอเบอร์รี่	3.1 - 3.9
มะเขือเทศ	3.9 - 4.6
แพร์	3.7 - 4.7
กล้วย	4.5 - 4.7
แครอท	5.0 - 6.0
เนื้อสัตว์	5.4 - 6.9
ผักกาดหอมห่อ	6.0
ปลาคอด	6.2 - 6.6
น้ำมัน	6.3 - 6.6
ไข่ขาว	8.6 - 9.6

ที่มา : Garbutt (1997)

กรดอ่อนที่พบในผลไม้ได้แก่กรดซิตริก และทาร์ทาริก (tartaric acid) เป็นต้น ในอาหารสดนั้นมักเสี่ยงง่ายจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่

จุลินทรีย์คู่แข่ง ตัวอย่างเช่น ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราสามารถเจริญได้บนเนื้อสัตว์ แต่ความจริงแล้วจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่สุดคือแบคทีเรียเนื่องจากเนื้อสัตว์มีค่า a_w สูง เป็นต้น

การที่อาหารมีค่า pH เปลี่ยนแปลงไปอาจเนื่องมาจากการกระทำของจุลินทรีย์เช่น ใน นํ้านมเปรี้ยวซึ่งเกิดจากพวก streptococci และ lactobacilli ที่สร้างกรดแลกติก ในเนื้อสัตว์พบว่าทำให้เกิดสภาพที่เป็นด่างเมื่อเสื่อมเสีย เนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง เช่น *Pseudomonas* spp. ซึ่งใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เกิดแอมโมเนียขึ้น แต่ในอาหารบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่ต้านการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ตัวอย่างเช่นอาหารประเภทโปรตีนเช่น เนื้อสัตว์ ในส่วนของกรดอินทรีย์ที่ใช้ในอาหารมีเพียงไม่กี่ชนิด เช่นกรดไฮโดรคลอริกและ ฟอสฟอริกซึ่งใช้ในการผลิตน้ำหวานอัดแก๊ส เช่น โคลา ซึ่งมีกรดฟอสฟอริกเป็นองค์ประกอบ

การถนอมรักษาอาหารโดยการปรับค่า pH

การปรับค่า pH ของอาหารโดยใช้กรดอินทรีย์ เป็นวิธีการถนอมรักษาอาหารที่สำคัญ โดยสามารถใช้ควบคุมการเจริญของทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสียและที่ทำให้อาหารเป็นพิษ กรดที่ใช้ส่วนใหญ่ได้แก่ กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติกและซิตริก รวมทั้งกรดอ่อนชนิดอื่นๆ เช่น อะซิติก ในอาหารที่มี pH ต่ำกว่า 4.2 มักมีความปลอดภัยจากเชื้อโรค ช่วง pH สำหรับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 20

หลังจากปรับค่า pH ให้ต่ำกว่าค่า pH ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ของเชื้อโรคโดยใช้กรดอินทรีย์แล้ว ที่สำคัญจะต้องคงอาหารไว้ระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะนำไปจำหน่าย เนื่องจากจุลินทรีย์จะเกิดระยะ lag ก่อนหน้าที่จะเริ่มสู่ระยะตาย ตัวอย่างเช่น ในมายองเนสซึ่งมีไข่เป็นส่วนผสมโดยไข่เป็นแหล่งของเชื้อ *Salmonella* ดังนั้นหลังจากผลิตมายองเนสได้แล้วจะต้องทิ้งไว้ไม่ต่ำกว่า 72 ชั่วโมงก่อนนำไปจำหน่ายเพื่อรอให้ถึงระยะตายของเชื้อดังกล่าวก่อน

ตารางที่ 20 ช่วง pH ของจุลินทรีย์ก่อโรคนิคมต่าง ๆ ที่เจริญได้

จุลินทรีย์	Minimum pH	Optimum pH	Maximum pH
<i>Staph. aureus</i>	4.0	6.0 - 7.0	9.8
<i>Clostridium perfringens</i>	5.5	7.0	8.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.1	6.0 - 8.0	9.6
<i>Salmonella</i> spp.	4.05	7.0	9.0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.8	7.0	11.0
<i>Bacillus cereus</i>	4.9	7.0	9.3
<i>Campylobacter</i>	4.9	7.0	9.0
<i>Yersinia</i>	4.6	7.0 - 8.0	9.0
<i>Clostridium botulinum</i>	4.2	7.0	9.0

ที่มา : Garbutt (1997)

ในอาหารบรรจุกระป๋องชนิดที่เป็นกรดต่ำ (pH สูงกว่า 4.5 หรือ 4.6) จะต้องได้รับความร้อนสูงในระดับที่เรียกว่า botulinum cook และเนื่องจากที่ pH ต่ำกว่า 4.5 เชื้อดังกล่าวไม่สามารถเจริญและสร้างสารพิษได้ ดังนั้นอาหารที่มี pH ต่ำกว่าจุดนี้ จึงไม่ต้องใช้ความร้อนสูงมากในการฆ่าเชื้อ

ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อมีการปรับ pH เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และในบางครั้งอาจปรับ pH เพื่อใช้จำแนกเชื้อเฉพาะชนิดจากอาหาร เช่นใน Rappaport Vasiliadis จะปรับค่า pH ไปที่ 5.2 เพื่อช่วยให้ *Salmonella* เจริญได้ดีกว่าเชื้อกลุ่มอื่นๆ การเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (pH drift) อาจเกิดเนื่องจากแหล่งคาร์บอนหรือไนโตรเจนในอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น น้ำตาลถูกหมักกลายเป็นกรดชนิดต่างๆ กรดอะมิโนที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเปลี่ยนเป็นแอมโมเนีย โซเดียมไนเตรทที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพด่างมากขึ้นหรือแอมโมเนียมคลอไรด์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพกรดมากขึ้น

อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดอาจมีสารที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของค่า pH เช่น กรดอะมิโน ซึ่งทำหน้าที่คล้ายบัฟเฟอร์ และในบางครั้งอาจมีการเติมบัฟเฟอร์ เช่น ฟอสเฟตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ การควบคุมค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดคือการใช้อิเล็กโตรดวัดซึ่งนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการและการหมักในระดับอุตสาหกรรม

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยในการจำแนกแบคทีเรียได้เนื่องจาก pH ที่เปลี่ยนแปลงนั้น เนื่องมาจากปฏิกิริยาชีวเคมี ตัวอย่างเช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ lysine iron agar ที่มีกรดอะมิโนไลซีนและอินดิเคเตอร์โบโรโมครีซอล มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 6.7 ซึ่งมีสีน้ำเงิน ถ้าแบคทีเรียที่เติมลงไปสร้างเอนไซม์ไลซีนดีคาร์บอกซิเลส (lysine decarboxylase) ได้จะทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนเป็นเอมีน (amine) ที่มีฤทธิ์เป็นด่างและทำให้สีของอาหารเลี้ยงเชื้อกลายเป็นสีม่วงเข้ม

ผลของออกซิเจนและรีดอกซ์ (redox) ต่อการเจริญของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความต้องการออกซิเจนแตกต่างกันออกไป สภาวะที่มีออกซิเจนในการเจริญเรียกว่า aerobic และในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเรียกว่า anaerobic โดยจุลินทรีย์ต่างๆ อาจใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนในการสร้าง ATP ก็ได้ โดยทั่วไปสามารถแบ่งกลุ่มของจุลินทรีย์ต่างๆ ตามความต้องการออกซิเจนได้ดังนี้

Obligate aerobes เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ กระบวนการสร้างพลังงานของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) วงจรเครบส์และระบบการส่งถ่ายอิเล็กตรอน ซึ่งออกซิเจนจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย พลังงานที่ได้จะมาจากการออกซิเดชันที่สมบูรณ์ของกลูโคสไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ทำให้ได้ ATP 38 โมเลกุล จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อราและสาหร่ายส่วนใหญ่ รวมทั้งแบคทีเรียและโปรโตซัว แบคทีเรียที่พบบ่อยได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* เชื้อราเช่น *Penicillium* spp. และยีสต์เช่น *Pichia* spp. และ *Hansenula* spp.

Microaerophiles เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญแต่ไม่สามารถเจริญได้ในบรรยากาศปกติที่มีออกซิเจนร้อยละ 20 เช่น *Campylobacter* spp. จะเจริญในที่ที่มีปริมาณออกซิเจนร้อยละ 1.0 – 10.0 และระดับออกซิเจนที่เหมาะสมคือร้อยละ 6.0 ถ้าสูงกว่านี้จะเป็นพิษและทำให้เซลล์ตายได้

Facultative anaerobes จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถเจริญในที่ที่มีหรือไม่มีออกซิเจน โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนอยู่มาก จะสร้างพลังงานโดยกระบวนการไกลโคไลซิส วงจรเครบส์และระบบการส่งถ่ายอิเล็กตรอน แต่ถ้าปราศจากออกซิเจนจะใช้สารอินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทน ทำให้ได้พลังงานน้อยกว่าการหายใจแบบใช้ออกซิเจน ตัวอย่างเช่น ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้กลูโคส 1 โมเลกุล ในสภาวะที่มีออกซิเจนทำให้ได้ ATP 38 โมเลกุล แต่ในสภาวะที่ขาดออกซิเจนจะได้เอธานอล (ethanol) และ ATP เพียง 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ซึ่งในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยจะทำให้เซลล์เจริญและแบ่งตัวได้ดีกว่า จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่พวก Enterobacteriaceae เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. และรวมทั้ง *Staphylococcus aureus*

Obligate anaerobes เป็นพวกที่เจริญได้ในที่ปราศจากออกซิเจนเท่านั้นและได้พลังงานจากวิถีกระบวนการหมัก เนื่องจากออกซิเจนเป็นพิษต่อเซลล์และทำลายเซลล์ เช่นแบคทีเรียบางชนิดที่มีความสำคัญในอาหารเช่น จีโนส *Clostridium* เช่น *Cl. botulinum* แต่มีจุลินทรีย์บางชนิดในกลุ่มนี้ที่ทนต่อออกซิเจนเรียกว่าแอโรโทเลอแรนท์ (aerotolerant) เช่น *Cl. perfringens*

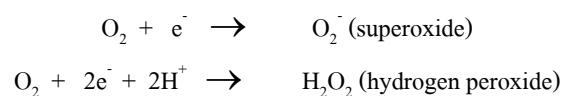
Oxygen-dependent organisms ได้แก่ พวกแบคทีเรียแอโรบิก ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะทั้งที่มีหรือไร้ออกซิเจนซึ่ง byproducts และปริมาณของพลังงานที่ได้ในสภาวะทั้งสองจะเท่ากัน ในบางครั้งแบคทีเรียแอโรบิกถูกจัดเป็น facultative anaerobes หรือ microaerophiles แต่คำดังกล่าวอาจไม่เหมาะสม เนื่องจากทำให้เกิดการหมักเพียงอย่างเดียวและไม่ทำให้เกิดไซโตโครม

จุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดการหมัก (fermentative organisms) เป็นพวกที่ใช้สารอินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการสร้างพลังงานนอกเหนือจากออกซิเจนสารพวกคาร์โบไฮเดรตหรือสารอินทรีย์อื่นๆ จะถูกออกซิไดส์เพียงบางส่วนทำให้เหลือเป็น byproducts โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดในกลุ่มนี้จะมีเมตาโบลิซึมและทำให้เกิด byproducts ที่แตกต่างกันและอาจ

จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobes หรือ oxygen-independent หรือ obligate anaerobes เช่น พวก clostridia เป็นต้น

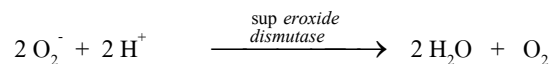
ความเป็นพิษของออกซิเจนต่อเซลล์จุลินทรีย์

ในเซลล์มีชีวิตที่ดูดซับออกซิเจนไว้ จะทำให้เกิดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ ไม่ว่าเซลล์นั้นจะหายใจแบบใช้ออกซิเจนหรือไม่ก็ตาม ตัวส่งถ่ายอิเล็กตรอนภายในเซลล์อาจส่งถ่ายอิเล็กตรอนให้ออกซิเจนทำให้เกิดซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ดังสมการ

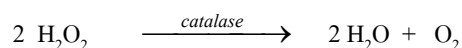


สารที่เกิดขึ้นทั้งสองชนิดเป็นสารที่มีอันตรายต่อเซลล์อย่างมาก เนื่องจากเป็นด่างออกซิไดส์ที่รุนแรงและสามารถออกซิไดส์สารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ฟอสโฟไลปิดในเซลล์เมมเบรน ทำให้เซลล์บาดเจ็บและตายได้

จุลินทรีย์พวก obligate aerobes facultative anaerobes microaerophiles และแบคทีเรียแลคติกมีเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลับของซูเปอร์ออกไซด์ไปเป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และออกซิเจนดังสมการ



ส่วนไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำและออกซิเจนโดยเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ดังสมการ



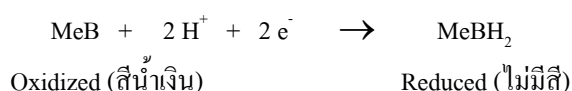
เอนไซม์คะตะเลส ดังกล่าวพบในพวก obligate aerobes facultative anaerobes microaerophiles และพวก aerotolerant anaerobes ส่วนแบคทีเรียแลคติกจะใช้เอนไซม์เพอร์ออก

ซิงเดส (peroxidase) ในการสลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และใช้แมงกานีสที่สะสมภายในเซลล์เพื่อทำลายซูเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นการที่พวก obligate anaerobes ขาดเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสและคะตะเลส จึงไม่สามารถอยู่ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนส่วนพวก microaerophiles จะทนต่อความเป็นพิษของซูเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ได้น้อยกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ

ออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียล (oxidation-reduction potential) และการเจริญของจุลินทรีย์

ออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียล (OR) หรือรีดอกซ์โพเทนเชียล (redox potential ; Eh) บ่งถึงความสามารถในการรับอิเล็กตรอน (ถูรีดิวซ์) หรือสูญเสียอิเล็กตรอน (ถูกออกซิไดส์) การวัดรีดอกซ์โพเทนเชียลทำได้วัดอ้างอิงกับอิเล็กโตรมาตรฐานไฮโดรเจน/แพลตตินัมที่ประกอบด้วยอิเล็กโตรดแพลตตินัมในบรรยากาศไฮโดรเจนที่ความดันบรรยากาศ และต่อเข้ากับโวลต์มิเตอร์ วัตถุที่อยู่ในสถานะออกซิไดส์ (มีแนวโน้มที่จะรับอิเล็กตรอน) จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น และให้ค่าเป็นบวก ขณะที่วัตถุอยู่ในสภาวะรีดิวซ์ (มีแนวโน้มสูญเสียอิเล็กตรอน) จะให้ค่าลบ กระแสไฟฟ้าที่ไหลมีหน่วยเป็นมิลลิโวลต์ (mV) และอิเล็กโตรดอ้างอิงให้ค่าเท่ากับ 0 มิลลิโวลต์

รีดอกซ์อินดิเคเตอร์ (redox indicators) เป็นสีจากสารอินทรีย์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อรีดอกซ์โพเทนเชียลในสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลง ตัวอย่างเช่นสีเมธิลีนบลู ในสถานะออกซิไดส์จะมีสีน้ำเงิน (เมื่อค่า Eh สูงกว่า +11 มิลลิโวลต์) และในสถานะรีดิวซ์จะไม่มีสี (เมื่อค่า Eh ประมาณ -10 มิลลิโวลต์) โดยเมื่อเติมสีนี้ลงไปในอาหารจะพบว่า พวกจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีจะสร้างสารที่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ ซึ่งจะรีดิวซ์เมธิลีนบลู ดังสมการ



แต่ถ้ามีออกซิเจนจะทำให้ปฏิกิริยาเลื่อนกลับจากขาวไปซ้ำย ตัวอย่างของรีดอกซ์อินดิเคเตอร์ชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในงานทางด้านจุลชีววิทยาได้แก่ไตรเฟนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ (triphenyl tetrazolium chloride) และริซาซูริน (resazurin) โดยอินดิเคเตอร์เหล่านี้สามารถนำมาใช้ในงานต่างๆ เช่น

- 1) ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เพื่อแสดงว่าอาหารนั้นอยู่ในสภาวะรีดิวซ์และเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในสภาพไร้ออกซิเจน
- 2) ในโถแก๊สเพื่อแสดงว่าเกิดสภาพไร้ออกซิเจนและยังคงสภาวะนี้ไว้
- 3) ในอาหารเลี้ยงเชื้อของแข็งเพื่อช่วยในการจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สูง เช่น ไตรเฟนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ ที่ใช้เติมลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ faecal streptococci
- 4) ในการควบคุมคุณภาพของอาหาร โดยใช้ในการประมาณจำนวนของจุลินทรีย์ เช่น วิธี dye reduction ในการทดสอบคุณภาพของนม เป็นต้น

ผลของรีดอกซ์โพเทนเชียลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และรีดอกซ์ของอาหาร

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีช่วงรีดอกซ์แตกต่างกันไปตามปฏิกิริยาที่มีต่อออกซิเจนในสภาพแวดล้อม ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ช่วงรีดอกซ์และลักษณะของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับออกซิเจน

จุลินทรีย์	ช่วงรีดอกซ์ (มิลลิโวลต์)	ลักษณะของแบคทีเรีย
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+500 → +100	Obligate aerobe
<i>Staphylococcus aureus</i>	+180 → -230	Facultative anaerobe
<i>Proteus vulgaris</i>	+150 → -600	Facultative anaerobe
<i>Clostridium</i> spp.	-30 → -550	Obligate anaerobe
<i>Clostridium perfringens</i>	+216 → -230	Aerotolerant anaerobe

ที่มา : Garbutt (1997)

ความสัมพันธ์ระหว่างรีดอกซ์และการเจริญของจุลินทรีย์ค่อนข้างซับซ้อน โดยทั่วไปการเจริญของจุลินทรีย์จะทำให้รีดอกซ์ของสภาพแวดล้อมลดลง เนื่องจากการใช้ออกซิเจนหรือทำให้เกิดสารรีดิวซ์ต่างๆ หรือเกิดขึ้นทั้งสองอย่าง กรณีที่มีจุลินทรีย์อยู่ร่วมกันหลายชนิดและต้องการรีดอกซ์ที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอาจทำให้รีดอกซ์ลดต่ำลงและทำให้สภาพที่เกิดขึ้นเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งได้

รีดอกซ์ของอาหารและการเจริญของจุลินทรีย์

จากการที่เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตมีกระบวนการหายใจ ดังนั้นจึงมีแนวโน้มให้เกิดสภาวะรีดอกซ์ที่เป็นลบ นอกจากนั้นยังมีสารที่เกิดจากกระบวนการดังกล่าวและมีคุณสมบัติรีดิวซ์ เช่น กรดแอสคอร์บิกในผักและผลไม้ น้ำตาลรีดิวซ์ในผลไม้และหมู่ซัลไฟไฮดริล (sulphydryl group) ในโปรตีนจากเนื้อสัตว์ เป็นต้น ค่ารีดอกซ์ที่แท้จริงของอาหารขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ปริมาณของออกซิเจนรอบๆ อาหารและความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่อาหาร ความหนาแน่นของโครงสร้างอาหารที่มีผลต่อการแทรกซึมของออกซิเจน ความเข้มข้นและชนิดของสารรีดิวซ์ในอาหารที่ต้านการเปลี่ยนแปลงรีดอกซ์ไปเป็นสภาพบวก (ความต้านทานการเปลี่ยนแปลงของรีดอกซ์ในอาหารเรียกว่า poisoning capacity) กระบวนการผลิตอาหาร รวมทั้งค่า pH ของอาหาร โดยค่า pH ที่ลดลง 1 หน่วย จะทำให้ Eh เพิ่มขึ้น +58 มิลลิโวลต์ ที่ผิวหน้าของอาหารซึ่งสัมผัสกับอากาศ จะมีสภาพรีดอกซ์เป็นบวก ขณะที่ภายในอาหารจะมีค่าเป็นลบ เช่น ผิวหน้าของเนื้อสัตว์ที่จะมีสภาพรีดอกซ์ประมาณ +200 มิลลิโวลต์ และภายในมีค่าประมาณ -150 มิลลิโวลต์

ในกระบวนการผลิตอาหารจะทำให้สภาพรีดอกซ์เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น การผสมอาหารในที่ที่มีอากาศจะทำให้สภาพรีดอกซ์เพิ่มขึ้น เช่น น้ำนมระหว่างการบรรจุ หรือการบดเนื้อสัตว์ที่ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสต่อปริมาตรเพิ่ม และการให้ความร้อนแก่อาหารจะทำให้ออกซิเจนออกมาจากอาหารและช่วยเพิ่มปริมาณของสารรีดิวซ์ในอาหาร เช่น อาหารบรรจุกระป๋องซึ่งมีค่ารีดอกซ์เป็นลบ การบรรจุอาหารโดยได้ออกซิเจนออกจะช่วยคงสภาพรีดอกซ์ต่ำไว้ภายในตัวอาหาร หรือการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารที่บรรจุในสภาพไร้อากาศ ทำให้มีคาร์บอนไดออกไซด์สะสม และการดัดแปลงสภาพบรรยากาศภายในภาชนะบรรจุอาหาร ค่ารีดอกซ์ของอาหารชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ค่ารีดอกซ์ของอาหารชนิดต่าง ๆ

อาหาร	ค่ารีดอกซ์ (มิลลิโวลต์)
ไข่	+500
น้ำองุ่น	+400
น้ำมันดิบ	+200
เนื้อดิบสด	+200
เนื้อดิบ-ที่ผิวหนัง	+200
เนื้อบรรจุกระป๋อง	-150
เนื้อดิบ-ภายใน	-200
มันฝรั่ง	-150
ตับ	-200

ที่มา : คัดแปลงจาก Garbutt (1997)

การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารมีความสัมพันธ์กับรีดอกซ์ดังนี้

- ที่ผิวหนังของอาหารที่สัมผัสกับบรรยากาศ จะมีจุลินทรีย์พวก obligate aerobes facultative anaerobes หรือพวก oxygen independent เจริญได้ดี
- อาหารที่มีการปล่อยออกซิเจนออก เช่น โดยการให้ความร้อนและอาหารที่มีความสามารถในการรีดิวซ์สูงจะมีพวก obligate anaerobes facultative anaerobe และพวก oxygen independent เจริญได้ดี
- อาหารที่ปล่อยออกซิเจนออกบางส่วนจะมีพวก microaerophiles เจริญได้ดี

อย่างไรก็ตามชนิดของจุลินทรีย์ที่เจริญจะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ค่า pH ค่า a_w ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ด้วย ในส่วนของเชื้อราจะสามารถเจริญได้ที่เฉพาะผิวหนังของอาหารขกเว้น *Byssoschlamys fulva* ที่เป็นสาเหตุทำให้ผลไม้บรรจุกระป๋องเสื่อมเสียและ *Rhizopus* spp. สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจนต่ำแต่จะไม่สร้างสปอร์จนกว่าจะได้รับอากาศอย่างเต็มที่

การสร้างสภาวะรีดอกซ์ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มที่ต้องการเพาะเลี้ยงเจริญได้ดีกระทำดังนี้

obligate aerobes/facultative anaerobes ซึ่งเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญ จะถูกบ่มในตู้บ่มในสภาวะบรรยากาศปกติ โดยช่องว่างอากาศเหนืออาหารในจานเพาะเชื้อหรือหลอดทดลองจะมีออกซิเจนที่พอเพียงต่อการเจริญของเชื้อ รวมทั้งการใช้จุกสำลีในการปิดขวดหรือหลอดทดลองและการนำภาชนะดังกล่าวไปวางบนเครื่องเขย่า เพื่อเพิ่มการได้รับออกซิเจน ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีขึ้น

แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่เป็นพวก oxygen independent จึงสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือขาดออกซิเจน แต่การเจริญจะถูกกระตุ้นเมื่อมีคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมักกระทำในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์

obligate anaerobes เจริญในสภาวะไร้ออกซิเจนหรือรีดอกซ์ต่ำ จึงต้องใช้โถบ่มเชื้อเรียกว่า anaerobic jar นอกจากนั้นจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรีดอกซ์ต่ำ ซึ่งมีสารรีดิวซ์ต่างๆ เป็นองค์ประกอบ เช่น ซัลไฟต์ (sulfites) ไธโอไกลโคเลต (thioglycolate) ตับอักเสบดีและซิสเทอีน (cysteine) ซึ่งจะกำจัดออกซิเจนในอาหารให้หมดไปและคงสภาพรีดอกซ์ต่ำ (ประมาณ -200 มิลลิโวลต์)

microaerophiles เป็นพวกที่เจริญในบรรยากาศที่มีออกซิเจนต่ำกว่าที่มีในบรรยากาศปกติ (ประมาณร้อยละ 6.0) และการเจริญจะถูกกระตุ้นเมื่อมีคาร์บอนไดออกไซด์ (ประมาณร้อยละ 10.0) การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มนี้อาจใช้โถ anaerobic jar โดยใช้ช่องบรรจุสารเคมีที่ทำให้เกิดคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจนในระดับที่เพียงพอที่จะลดปริมาณของออกซิเจนภายในโถให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม

ปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปค่าต่ำสุดและสูงสุดของแต่ละปัจจัยมักจะหาได้จากสภาวะที่ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเจริญอยู่ในจุดที่เหมาะสม เช่น *Clostridium botulinum* สายพันธุ์ที่ข่อยสลายโปรตีนได้ จะสามารถเจริญในอาหารที่มีโซเดียม

กลอไรด์ร้อยละ 10.0 ที่ค่า optimum pH คือ 7.2 และ optimum temperature 35°C เท่านั้น แต่ถ้าลดค่า pH ลงเหลือ 5.2 จะพบว่าเชื้อนี้จะถูกยับยั้งการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 5.0

โดยทั่วไปอาหารมักมีสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการครบและสภาพการเจริญอาจเป็นได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งปฏิสัมพันธ์หลักส่วนใหญ่คือจากปัจจัยระหว่างค่า a_w pH และอุณหภูมิ แต่สำหรับพวก facultative anaerobes แล้วจะมีสภาพไร้ออกซิเจนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เช่น minimum a_w ของการเจริญของ *Staphylococcus aureus* อยู่ที่ 0.86 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน แต่ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนพบว่าจะเพิ่มเป็น 0.90

ในกรณีที่ค่าของปัจจัยใดๆ ที่มีผลต่อการเจริญ ห่างจากค่าที่เหมาะสม (optimum) จะมีผลทำให้ค่าต่ำสุด (minimum) ของปัจจัยอื่นๆ มีแนวโน้มเข้าใกล้ค่าที่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น และถ้ามีหลายปัจจัยที่ห่างจากค่าที่เหมาะสม อาจทำให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญก่อนที่จะถึงจุดต่ำสุดของปัจจัยใดปัจจัยหนึ่ง ซึ่งปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวจะกลายเป็นสิ่งกีดขวาง (hurdle) ทำให้อัตราการเจริญช้าลงและเพิ่มระยะ lag ดังนั้นการที่มีสิ่งกีดขวางจากหลายปัจจัยที่กล่าวมาแล้วจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งหลักการนี้ได้นำมาใช้ในการถนอมรักษาอาหาร ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและพวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้

ปฏิสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมักเป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure cultures) ซึ่งลักษณะการเจริญจะขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ไรด็อกซ์ และอุณหภูมิที่ใช้บ่ม แต่ในอาหารสดพบว่า จะถูกปนเปื้อนจากจุลินทรีย์หลากหลายชนิดและกระบวนการผลิตทำให้สัดส่วนของจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนั้นการปนเปื้อนภายหลังมีผลทำให้จุลินทรีย์ต่างๆ แข่งขันการเจริญ ซึ่งพวกที่เจริญได้รวดเร็วกว่าในสภาวะหนึ่งๆ จะเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากกว่าชนิดอื่นๆ แต่ถ้ามีระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่สูงตั้งแต่เริ่มต้น จะยังคงทำให้จุลินทรีย์นั้นเจริญได้ดีกว่าเช่น ในเนื้อสัตว์ที่เสื่อมเสียจาก *Brochothrix thermosphacta* ซึ่งเจริญได้

ดีกว่าจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษซึ่งถูกกวดการเจริญโดยจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิด
การเสื่อมเสีย

จุลินทรีย์บางชนิดอาจสร้างสภาวะต้านหรือสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์
อื่นๆ เช่น การสร้างกรดแลกติกในน้ำนมที่อุณหภูมิห้องโดยแบคทีเรียแลกติก ซึ่งยับยั้งพวกแกรม
ลบรูปแท่ง หรือการสร้างสารชนิดอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และไนซิน (nisin) ที่สร้าง
โดย *Lactococcus lactis* ที่ยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก เป็นต้น และในบางครั้งจุลินทรีย์บางชนิดจะ
สร้างสารที่กระตุ้นการเจริญจุลินทรีย์อื่น ๆ เช่น ยีสต์ในคีเฟอร์ (Kefir) ที่สร้างวิตามินบีที่กระตุ้น
การเจริญของแบคทีเรียแลกติก เป็นต้น นอกจากนี้จุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เจริญร่วมกันอาจ
ส่งเสริมการเจริญซึ่งกันและกัน เช่น กระบวนการหมักโยเกิร์ตที่มีเชื้อ *Streptococcus salivarius*
spp. *thermophilus* และ *Lactobacillus delbreukii* spp. *bulgaricus* มีการเจริญที่ส่งเสริมซึ่งกัน
และกัน เป็นต้น

บทที่ 7

การตายของจุลินทรีย์

การยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์สามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การใช้ความร้อนชื้น (wet heat) ความร้อนแห้ง (dry heat) การใช้สารเคมีต่างๆ เช่น สารฆ่าเชื้อ (disinfectants) สารกันเสีย (preservatives) และสารปฏิชีวนะ (antibiotics) การปรับค่า pH การฉายรังสี (เช่นรังสีอัลตราไวโอเลต รังสีอินฟราเรดหรือไมโครเวฟ) การลดค่า a_w การแช่เยือกแข็ง การแช่เย็น (ซึ่งทำให้เกิด cold shock) การใช้แอลกอฮอล์ รวมทั้งการใช้ความดันสูง เป็นต้น การตายของจุลินทรีย์อาจเกิดเนื่องจากองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ถูกทำลายเช่น ผนังเซลล์ เซลล์เมมเบรน โปรตีนรวมทั้งเอนไซม์ RNA DNA และกลไกต่างๆ ของเซลล์

การที่จะทราบว่าจุลินทรีย์ตายหรือไม่ในทางปฏิบัติจะดูที่การเกิดโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (broth) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดจากเมตาโบลิซึมของเซลล์ซึ่งสามารถสังเกตได้ง่าย อย่างไรก็ตามเซลล์จุลินทรีย์อาจบาดเจ็บและสามารถรอดชีวิตได้อีกเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น เซลล์อาจสูญเสียเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็นหลังจากที่ผ่านการให้ความร้อน แต่ถ้านำเซลล์นั้นมาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดอะมิโน อาจทำให้เซลล์นั้นสามารถสร้างเอนไซม์ขึ้นมาได้อีก ทำให้สามารถรอดชีวิตและสืบพันธุ์ต่อไปได้โดยไม่ต้องอาศัยกรดอะมิโนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นอีกต่อไป ในขณะเดียวกันถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีกรดอะมิโน อาจทำให้เชื่อนั้นไม่สามารถเจริญต่อไปได้และตายในที่สุด

ในการทดลองที่ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์นั้น มักใช้วิธีนับปริมาณเชื้อที่เจริญในจานเพาะเชื้อ และอาจต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารที่สมบูรณ์ เช่นมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนครบถ้วน รวมทั้งวิตามินและเบสพิวรีน/ไพริมิดีน ซึ่งจะทำให้สามารถนับปริมาณเชื้อที่บาดเจ็บและรอดชีวิตได้ นอกจากนี้การใช้สารละลายเจือจางตัวอย่างอาหารที่เหมาะสมจะไม่ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์บาดเจ็บมากยิ่งขึ้น

การตายของจุลินทรีย์เนื่องจากความร้อน (thermal death)

การศึกษาการทนความร้อนของจุลินทรีย์ มักพบปัญหาเนื่องจากมีระยะเวลาก่อนหรือหลังให้ความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง ตัวอย่างเช่น นำเชื้อที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาให้ความร้อนที่สูงกว่าค่า maximum temperature และนำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต ทุก 5 นาที ผลการทดลองที่ได้อาจแสดงดังตารางที่ 23

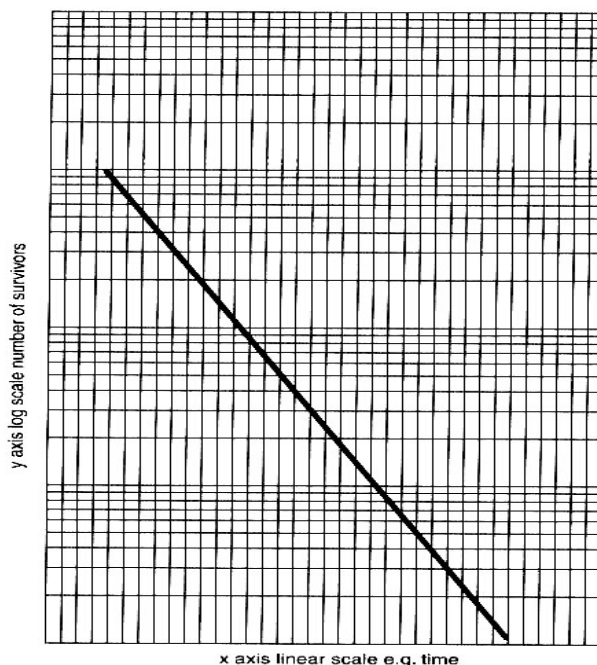
ตารางที่ 23 ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจากการให้ความร้อนที่ระยะเวลาต่าง ๆ

เวลาที่ให้ความร้อน (นาที)	ปริมาณเซลล์ ที่ตาย	ปริมาณเซลล์ ที่รอดชีวิต	ค่า $\log_{10}$ ของเซลล์ ที่รอดชีวิต
0	0	10^6	6
5	900,000	10^5	5
10	990,000	10^4	4
15	999,000	10^3	3
20	999,900	10^2	2
25	999,990	10^1	1
30	999,999	10^0	0
35	999,999.9	10^{-1}	-1
40	999,999.99	10^{-2}	-2

ที่มา : Garbutt (1997)

จากตารางที่ 23 จะสังเกตว่าหลังจากที่ให้ความร้อนแก่เชื้อเป็นเวลา 35 นาที พบว่าเชื้อที่รอดชีวิตมีน้อยกว่า 1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (0.1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งหมายความว่า ถ้าสุ่มตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตร 10 ครั้ง นำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจะพบว่ามี 1 ครั้งที่จะตรวจพบเชื้อที่รอดชีวิตเรียกว่ามีความน่าจะเป็น 1 ใน 10 นั่นเอง และถ้ายังคงให้ความร้อนต่อไป โอกาสที่จะพบเชื้อจะลดน้อยลงไปเรื่อยๆ ในทางทฤษฎีพบว่าโอกาสที่จะไม่พบเชื้อที่รอดชีวิตนั้นไม่อาจเกิดขึ้นได้ แต่ในทางปฏิบัติสามารถกระทำได้เมื่อปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมีน้อยมากจนสามารถคัดทิ้งได้

โดยปกติแล้วข้อมูลที่ได้จะนำมาสร้างกราฟบนกระดาษเซมิล็อก (semi-log) ซึ่งแกน x เป็นสเกลปกติและแกน y แบ่งเป็นช่องเท่าๆ กันในแต่ละ log เช่น 10^1 10^2 หรือ 10^3 เป็นต้น และแต่ละช่อง log จะเป็นช่องเล็กๆ ตามสเกลล็อก ดังภาพที่ 32



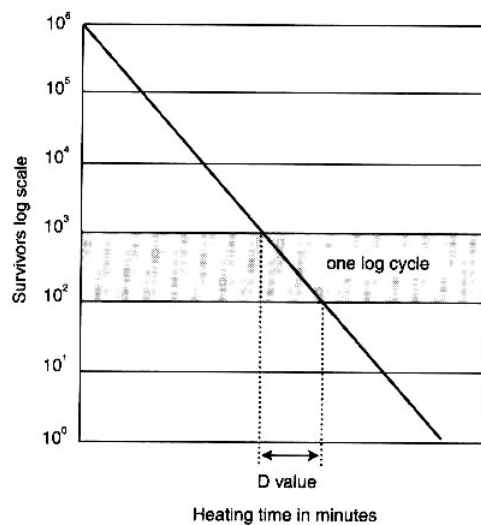
ภาพที่ 32 กราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์บนกระดาษเซมิล็อก

ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 32 เมื่อเส้นกราฟผ่าน 1 วงจรล็อก (log cycle) หมายถึงปริมาณของเซลล์จุลินทรีย์มีค่าลดลงร้อยละ 90 หรืออีกนัยหนึ่งคือเซลล์จุลินทรีย์รอดชีวิตร้อยละ 10

ค่า D (D values)

ค่า D (decimal reduction time) หมายถึง เวลาที่ประชากรจุลินทรีย์ลดลงร้อยละ 90 หรือ 1 วงจรล็อก แสดงดังภาพที่ 33



ภาพที่ 33 กราฟแสดงค่า D ที่อุณหภูมิหนึ่งๆ

ที่มา : Garbutt (1997)

โดยทั่วไปค่า D มักเขียนตัวเลขอุณหภูมิห้อยกำกับหลัง เช่น D_{121} หมายถึง เวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อให้ลดลงร้อยละ 90 ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นต้น ค่า D ใช้ในการคำนวณเวลาที่ต้องใช้ในการฆ่าเชื้ออาหารบรรจุกระป๋องรวมทั้งใช้เปรียบเทียบการทนความร้อนของจุลินทรีย์ต่างๆ

ค่า D ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป เช่น สปอร์ของแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ ซึ่งทนความร้อนได้สูงที่สุด เช่น *Bacillus stearothermophilus* มีค่า D_{121} ประมาณ 4 - 5 นาที ส่วนสปอร์ของพวกมิโซไฟล์ทนความร้อนได้น้อยกว่าและมีค่า D_{121} อยู่ระหว่าง 0.20 - 0.01 นาที และเซลล์แบคทีเรียปกติรวมทั้งเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ ยีสต์และเชื้อรา มีค่า D_{121} อยู่ระหว่าง 0.5 - 3.0 นาที แอสโคสปอร์ของยีสต์และเชื้อราบางชนิดจะทนต่อความร้อนมากกว่าเซลล์ปกติของแบคทีเรียแต่ทนน้อยกว่าสปอร์ของแบคทีเรีย ส่วนจุลินทรีย์ที่ทนต่อความร้อนได้ต่ำที่สุดคือพวกไซโครโทรปและไซโครไฟล์

ผลของปัจจัยอื่นๆ และสภาพแวดล้อมต่อการทนความร้อนของจุลินทรีย์

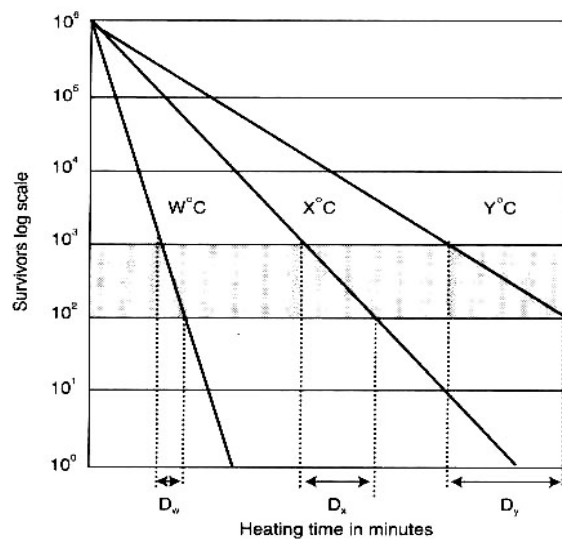
ค่า D ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่

1. ระยะการเจริญของจุลินทรีย์ โดยพบว่าจุลินทรีย์ในระยะคงที่ (stationary phase) จะทนต่อความร้อนได้ดีกว่าในระยะ log เช่น ค่า D_{55} ของ *Salmonella* มีค่า 4.8 นาที ในช่วงระยะ log แต่ถ้าอยู่ในระยะคงที่พบว่า ค่า D_{55} จะเพิ่มขึ้นเป็น 14.6 นาที
2. อุณหภูมิที่จุลินทรีย์เจริญ โดยปกติพบว่าพวกที่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่ามักทนต่อความร้อนได้ดีกว่า เช่น *Salmonella* ที่ระยะคงที่และบ่มที่ 44°C มีค่า D_{55} เท่ากับ 42 นาที ในขณะที่เซลล์ที่บ่มที่ 35°C มีค่า D_{55} เพียง 14.6 นาที
3. ค่า pH ทั้งจุลินทรีย์และสเปิร์มมีแนวโน้มในการทนต่อความร้อนมากกว่าที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (optimum pH) และจะทนได้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำไปจากจุดนี้ เช่น ที่ optimum pH 7.0 เชื้อ *Streptococcus faecalis* มีค่า D_{60} เท่ากับ 13 นาที แต่ที่ pH 8.0 และ 6.0 พบว่าค่า D_{60} ลดลงเหลือ 2.5 และ 2.2 นาที ตามลำดับ
4. ปริมาณไขมันและโปรตีน พบว่ามีผลในการปกป้องเชื้อจุลินทรีย์จากความร้อน ทำให้การทนต่อความร้อนของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น
5. การลดค่า a_w โดยการทำให้แห้งหรือการเติมตัวถูกละลายเช่น น้ำตาลจะทำให้การทนต่อความร้อนของจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้น

ผลของไขมัน โปรตีนและน้ำตาล พบว่ามีความสำคัญและทำให้จุลินทรีย์รอดชีวิตได้ดีมากขึ้น มีการศึกษาพบว่า *Salmonella typhimurium* ในซ็อกโกแลตมีค่า D_{90} อยู่ระหว่าง 72 - 78 นาที ในขณะที่ค่า D ของเชื้อนี้ในน้ำนมมีค่าเท่ากับ 0.0008 นาที เท่านั้น (ทนความร้อนได้มากกว่าถึงประมาณ 90,000 เท่า)

ค่า z (z values)

ถ้านำข้อมูลจากการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่างๆ มาสร้างกราฟ โดยกำหนดให้อุณหภูมิ $w > x > y$ จะทำให้ได้กราฟดังภาพที่ 34

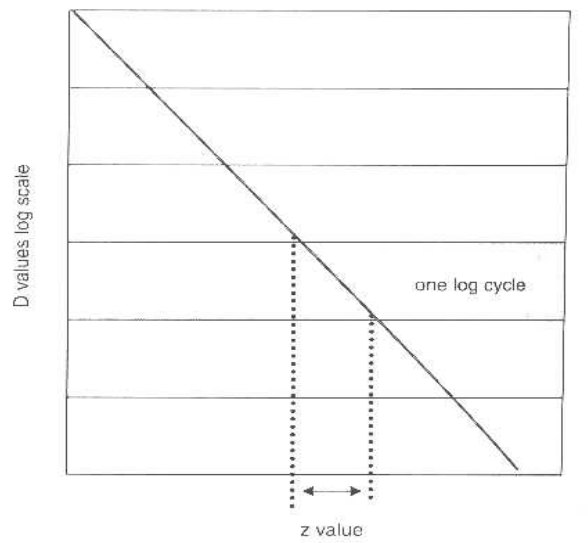


ภาพที่ 34 กราฟการรอดชีวิตของเชื้อที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ

ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 34 จะเห็นว่าความชันของเส้นกราฟที่ใช้อุณหภูมิสูงกว่ามีค่ามากกว่าเส้นกราฟที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า ซึ่งหมายความว่า การทนต่อความร้อนของจุลินทรีย์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และจากภาพดังกล่าว จะเห็นว่าทำให้ได้ค่า D จำนวน 3 ค่า ถ้านำค่า D ดังกล่าวมาสร้างกราฟโดยให้แกน y เป็นค่า $\log D$ และแกน x เป็นอุณหภูมิ จะทำให้ได้เส้นตรงที่มีความชันลดลงแสดงดังภาพที่ 35

เมื่อสร้างกราฟบนกระดาษเซมิล็อกจะทำให้ได้เส้นกราฟเรียกว่า thermal death time curve ซึ่งเมื่อเส้นกราฟผ่าน 1 วงจรล็อก จะทำให้ได้ค่า z หรือจำนวนองศาเซลเซียสหรืออุณหภูมิที่ทำให้ค่า D เปลี่ยนแปลงไป 10 เท่า โดยทั่วไปเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียมีค่า z อยู่ระหว่าง $5 - 8^{\circ}\text{C}$ ส่วนสปอร์ของแบคทีเรียอยู่ระหว่าง $6 - 16^{\circ}\text{C}$ ค่า z นี้สามารถนำมาใช้ในการคำนวณหาค่า D ที่อุณหภูมิต่างๆ ตัวอย่างเช่น จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งมีค่า z เท่ากับ 10°C และค่า D_{121} เท่ากับ 5 นาที ดังนั้น ค่า D_{131} และ D_{111} จะเท่ากับ 0.5 และ 50 นาที ตามลำดับ ความสัมพันธ์ของค่า D และ z เป็นดังสมการ



ภาพที่ 35 กราฟ thermal death time

ที่มา : Garbutt (1997)

$$D_1 / D_2 = 10^{(T_2 - T_1)/z}$$

ตัวอย่างเช่น *Listeria monocytogenes* มีค่า D_{60} เท่ากับ 8.3 นาทีและค่า z เท่ากับ 5°C
 ค่า D ที่ 71.7°C จะเป็นเท่าใด

$$\begin{aligned} \text{จาก } D_1 / D_2 &= 10^{(T_2 - T_1)/z} \\ \text{แทนค่า } 8.3 / D_2 &= 10^{(71.7 - 60)/5.0} \\ D_2 &= 0.0379 \text{ นาที} \end{aligned}$$

การถนอมรักษาอาหารด้วยความร้อน

การใช้ความร้อนในการถนอมรักษาอาหาร ในบางครั้งไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เช่น การทำให้สุก (cooking) หรือการลวก (blanching) เพื่อทำลายเอนไซม์ แต่ก็ยังมีผลทำ

ให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลง วิธี Appertization และการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) เป็นวิธีที่สำคัญในการให้ความร้อนแก่อาหาร เพื่อให้อาหารมีความปลอดภัยจากเชื้อโรค รวมทั้งทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย

Appertization เป็นการให้ความร้อนที่สูงกว่า 100°C แก่อาหาร เช่น ในกระบวนการผลิตอาหารบรรจุกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ (pH สูงกว่า 4.5) เช่น การผลิตนํ้านม UHT อาจก่อให้เกิดอันตรายอย่างรุนแรงถ้าสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* สามารถรอดชีวิตจากกระบวนการฆ่าเชื้อโดยสามารถเจริญได้ในที่ไร้ออกซิเจน และสร้างสารพิษที่เป็นอันตราย ระดับความร้อนต่ำสุดที่ทำให้แก่อาหารบรรจุกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำในระดับที่ปลอดภัย เป็นระดับที่ทำให้สปอร์ของ *C. botulinum* ลดลงมา 10^{12} เท่า (botulinum cook) ค่า D_{121} ของเชื้อนี้คือ 0.21 นาที ดังนั้นเวลาน้อยที่สุดในการฆ่าเชื้อนี้คือ $12 \times 0.21 = 2.52$ นาที ซึ่งหมายความว่า ถ้ามีอาหารบรรจุกระป๋องที่มีสปอร์ของเชื้อนี้ 1 สปอร์ จำนวน 10^{12} กระป๋อง หลังจากให้ความร้อนที่ 121°C เป็นเวลา 2.52 นาที จะพบสปอร์ที่รอดชีวิตเพียง 1 กระป๋องเท่านั้น วิธีการฆ่าเชื้ออาหารกระป๋องวิธีนี้บางครั้งเรียกว่าการฆ่าเชื้อทางการค้า (commercial sterile) ในการฆ่าเชื้ออาหารบรรจุกระป๋องนั้นเวลาในการฆ่าเชื้อจะต้องคำนวณจากจุดที่ร้อนช้าที่สุดภายในกระป๋อง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารและขนาดของภาชนะบรรจุ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่กำหนดไว้ในการให้ความร้อนไม่ได้เพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับที่กำหนดไว้อย่างรวดเร็วหรือทันที

จุลินทรีย์บางชนิดที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารบรรจุกระป๋องเสื่อมเสียบางชนิด สามารถทนต่อความร้อนสูงกว่า *C. botulinum* เช่น *C. sporogenes* ซึ่งเป็นมิโซไฟล์ โดยในบางสายพันธุ์มีค่า D เท่ากับ 1.5 นาที หรือ *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งเป็นเทอร์โมไฟล์มีค่า D สูงถึง 5.0 นาที ซึ่งระดับความร้อนที่ใช้ฆ่าเชื้อแบบ botulinum cook อาจไม่เพียงพอ ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงมักเพิ่มเวลาหรืออุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ แต่จะต้องนำปัจจัยอื่นๆ มาพิจารณาด้วย เช่น ต้นทุนที่สูงขึ้น รวมทั้งคุณภาพของอาหารหลังจากผ่านกระบวนการให้ความร้อน โดยทั่วไปการฆ่าเชื้อเพื่อลดปริมาณของเชื้อที่ทำให้อาหารบรรจุกระป๋องเสื่อมเสียลงประมาณ $10^5 - 10^6$ เท่าถือว่าเพียงพอ ซึ่งหมายความว่าถ้าตรวจพบอาหารบรรจุกระป๋องจำนวนไม่เกิน 1 กระป๋องที่มีสปอร์ 1 สปอร์ จากทั้งหมด 10^5 หรือ 10^6 กระป๋องจะถือว่าปลอดภัย ส่วนกรณีของ *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งจะไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 35°C อาจทำให้อาหารบรรจุกระป๋องที่เก็บที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงเกิด

การเสื่อมเสียขึ้นได้ แต่สามารถเติมไนซิน (nisin) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะลงไปในอาหาร โดยจะช่วยป้องกันการงอกของสปอร์ของเชื้อนี้ได้ ในกระบวนการ UHT ของนํ้านมจะใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงประมาณ $138-142^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2-3 นาที ตามด้วยการบรรจุแบบไร้เชื้อ (aseptic packaging) แม้ว่าในส่วน of วัสดุที่ใช้เป็นภาชนะบรรจุจะมีการปนเปื้อนแต่จะต้องนำมาฆ่าเชื้อก่อนโดยใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์หรือใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อป้องกันผลิตภัณฑ์เสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์

การพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization)

การพาสเจอร์ไรส์ เป็นกระบวนการใช้ความร้อนในระดับต่ำกว่าจุดเดือดของน้ำ ระหว่าง $60 - 80^{\circ}\text{C}$ ในส่วนของไข่เหลว (liquid egg) จะใช้ความร้อนที่ 64.4°C เวลาไม่ต่ำกว่า 2.5 นาที เพื่อทำลายเชื้อ *Salmonella* สายพันธุ์ที่ทนต่อความร้อน เช่น *S. senftenberg* 775W และไอศกรีมจะพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 65.6°C เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 30 นาที หรือ 71.1°C เป็นเวลา 10 นาที หรือ 79.4°C เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 15 วินาที และการพาสเจอร์ไรส์นํ้านม (โดยวิธี high temperature short time, HTST) ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 71.7°C เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 15 วินาที

การพาสเจอร์ไรส์นํ้านมเป็นการทำลายเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* รวมทั้งเชื้อโรคอื่นๆ ได้แก่ *Salmonella* และ *Shigella* และเมื่อนํ้านมเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่เย็นจะให้นํ้านมมีอายุการเก็บที่ยาวนานขึ้น เนื่องจากความเย็นมีผลต่อพวกจุลินทรีย์พวกแกรมลบ

การควบคุมจุลินทรีย์โดยใช้สารเคมี

การตายของจุลินทรีย์เนื่องมาจากสารเคมี เมื่อนํ้าข้อมูลระหว่างปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตเมื่อได้ระดับความเข้มข้นของสารเคมีหนึ่งๆและเวลามาสร้างกราฟบนกระดาษเซมิล็อก จะทำให้ได้กราฟที่มีลักษณะเช่นเดียวกับการตายของจุลินทรีย์เนื่องมาจากความร้อน

โดยเวลาที่สารเคมีสัมผัสกับจุลินทรีย์นั้นเรียกว่า contact time เมื่อเส้นกราฟผ่าน 1 วงจรลอก จะทำให้ได้ค่า D ของสารเคมีชนิดหนึ่งๆ ซึ่งหมายถึงเวลาที่สารเคมีสัมผัสกับจุลินทรีย์และทำให้จุลินทรีย์นั้นลดจำนวนลงร้อยละ 90 กลุ่มของสารเคมีประเภทต่างๆ ที่ใช้ทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ได้แก่

- ฟีนอล (phenols) และสารประกอบฟีนอล (phenolic compounds)
- โลหะหนักและเกลือของโลหะหนัก
- ฮาโลเจน (halogens)
- แอลกอฮอล์ (alcohols)
- อัลดีไฮด์ (aldehydes)
- ดีเทอร์เจนต์ชนิดแอนไอออนิก (anionic detergents)
- สารประกอบควอเตอร์นารีแอมโมเนียม (quaternary ammonium compounds)
- alkylating gases
- เพอร์ออกไซด์ (peroxides)
- กรดอินทรีย์ (organic acids)
- ด่าง (alkalis)
- กรดอนินทรีย์ (inorganic acids)
- โอโซน (ozone)
- สารปฏิชีวนะ (antibiotics)
- ยาต้านจุลชีพสังเคราะห์ (synthetic antimicrobial drugs)

เนื่องจากสารเคมีต่างๆ ที่กล่าวมามีความเป็นพิษ (toxicity) ต่อมนุษย์แตกต่างกัน จึงไม่สามารถนำมาใช้ในอาหารหรืออุตสาหกรรมอาหารได้ทั้งหมด สารเคมีที่นำมาใช้กับอาหารนั้นจะต้องไม่เป็นพิษในปริมาณที่ใช้ได้ รวมทั้งไม่ทำให้เกิดกลิ่นผิดปกติเนื่องมาจากตัวสารเคมีเอง หรือเมื่อทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของอาหาร เช่นคลอรีนที่ทำปฏิกิริยากับแทนนินในเบียร์ทำให้เกิดกลิ่นของฟีนอลที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ

คำศัพท์ที่ใช้สำหรับสารเคมีที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

Disinfectants และ sanitizer เป็นสารเคมีที่ใช้ทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์โดยใช้กับสิ่งที่ไม่มีชีวิตเช่น พื้น ผนัง พื้นผิวที่เกี่ยวข้องกับการผลิต รวมทั้งอุปกรณ์การผลิตต่างๆ เนื่องจากอาจมีอันตรายต่อเนื้อเยื่อของมนุษย์ เช่น ผิวหนัง หรือ เยื่อเมือก (mucous membrane) และเป็นอันตรายต่อระบบทางเดินอาหาร

คำว่า sanitizer มักใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร หมายถึงสารที่ใช้ลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ส่วน disinfectant นั้น ความหมายดั้งเดิมคือสารเคมีที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ในบางครั้ง disinfectant อาจใช้เติมในสิ่งที่มนุษย์รับประทานได้ เช่น การเติมคลอรีนลงในน้ำดื่มเพื่อฆ่าเชื้อโรค เป็นต้น

Antiseptic เป็นสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บนผิวหนังหรือเยื่อเมือก แต่ไม่เหมาะสมที่จะใช้กับอาหารที่นำมาใช้รับประทาน

Chemotherapeutic agents เป็นสารเคมีที่ใช้ควบคุมเชื้อโรคในมนุษย์ สัตว์และพืช ซึ่งรวมถึงสารปฏิชีวนะ (antibiotics) และยาซัลฟา (sulpha drugs) ที่ใช้ในการแพทย์และปศุสัตว์ เพื่อยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์

Preservatives เป็นสารเคมีที่ใช้เติมในอาหารหรือสารเคมีที่ได้จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ (เช่นจากการหมัก) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาโดยสามารถฆ่าหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียและที่ทำให้เกิดโรคได้

คำศัพท์ที่ใช้อธิบายประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์

ในบางครั้งจะพบคำศัพท์ที่อธิบายประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม เช่น คำศัพท์ที่ลงท้ายด้วย cidal หมายความว่า เป็นสารที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ และที่ลงท้ายด้วย static เป็นสารที่ยับยั้งจุลินทรีย์เท่านั้น ตัวอย่างเช่น germicide เป็นสารที่ฆ่าเชื้อทั่วๆ ไป bacteriocide เป็น

สารที่ใช้ฆ่าแบคทีเรีย sporicide ใช้ฆ่าสปอร์ของแบคทีเรีย fungicide ใช้ฆ่าเชื้อรา algicide ใช้ฆ่าพวกสาหร่าย (algae) viricide ใช้ฆ่าไวรัส และ fungistat เป็นสารเคมีที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ไม่มีผลทำลาย

สารเคมีแต่ละชนิดอาจมีผลต่อเชื้อเฉพาะกลุ่ม โดยอาจขึ้นอยู่กับความเข้มข้น เช่น สารประกอบคลอรีน ซึ่งสามารถฆ่าแบคทีเรียที่ความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ แต่ถ้าต้องการทำลายสปอร์ของแบคทีเรียจะต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น นอกจากนั้นสารเคมียังอาจมีผลยับยั้งการเจริญเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นต่ำและสามารถฆ่าเชื้อได้เมื่อได้ใช้ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น เช่น สารซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์ที่ความเข้มข้นต่ำ แต่จะสามารถทำลายเชื้อยีสต์ได้เมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้น

คุณสมบัติของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ยับยั้งจุลินทรีย์

สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) และสารอนุพันธ์ที่ประกอบด้วยธาตุฮาโลเจน หมู่อัลคิล (alkyl) และไฮดรอกซิล (hydroxyl group) มีความเป็นพิษอย่างมากต่อจุลินทรีย์ โดยจะทำให้โปรตีนของเซลล์เสียสภาพธรรมชาติและทำลายเซลล์เมมเบรน ฟีนอลเป็นอันตรายต่อมนุษย์ ยกเว้นสารอนุพันธ์บางชนิด เช่น chloroxylenol ที่ใช้ทำความสะอาดผนังหรือพื้นผิว และไม่นำมาเติมลงในอาหารโดยตรงเนื่องจากมีกลิ่นที่รุนแรง

โลหะหนักและเกลือของโลหะหนัก เช่น ปรอท ตะกั่ว เงินและทองแดง เกลือของโลหะเหล่านี้เป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปจึงไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้กับอาหาร โดยโลหะหนักจะรวมตัวกับกลุ่มซัลไฟไฮดริล (sulphydryl group) ในโปรตีนทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติ

ธาตุฮาโลเจน (halogens) เช่น คลอรีน โบรมีน ฟลูออรีน และไอโอดีน เป็นตัวออกซิไดส์ (oxidizing agents) ที่รุนแรง ซึ่งมีความเป็นพิษอย่างมากต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต ธาตุโบรมีนและฟลูออรีนไม่นำมาใช้กับอาหารโดยตรงเนื่องจากมีความเป็นพิษสูงมาก ส่วนคลอรีนใช้เป็นสาร disinfectant หรือ sanitizer โดยสามารถทำลายแบคทีเรียและสปอร์ ไวรัส เชื้อราและยีสต์ได้ ลำดับ

การทนต่อคลอรีนของเชื้อจากมากไปน้อยคือ สปอร์แบคทีเรีย ไวรัส เชื้อราและยีสต์ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ

รูปของคลอรีนที่มีประสิทธิภาพทำลายเชื้อคือกรดไฮโปคลอรัสที่ไม่แตกตัว (undissociated hypochlorous acid) เมื่อคลอรีนละลายในน้ำ จะแทรกซึมผ่านเซลล์เมมเบรนโดยการออกซิไดส์พันธะคู่ของกรดไขมัน ทำให้เซลล์เมมเบรนถูกทำลาย รวมทั้งไปออกซิไดส์หมู่ซัลโฟไฮดริลในโปรตีนทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม นอกจากนั้นคลอรีนยังสามารถทำลายเชื้อหุ้มสปอร์ได้ ความเข้มข้นของคลอรีนที่ใช้ในน้ำและอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ เช่น ในการผลิตน้ำประปาที่ใช้ดื่มได้ ใช้ความเข้มข้นของคลอรีนคิดเป็นคลอรีนที่คงเหลืออยู่ (residual chlorine) ปริมาณ 0.4 ส่วนในล้านส่วน น้ำหล่อเย็นในกระบวนการผลิตอาหารกระป๋องใช้ที่ความเข้มข้น 5.0 ส่วนในล้านส่วน ในอุตสาหกรรมแปรรูปน้ำมันในการทำความสะอาดถังและท่อใช้ความเข้มข้น 100.0 - 300.0 ส่วนในล้านส่วน และในการทำลายสปอร์ของแบคทีเรียใช้ในรูปไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10.0

ในส่วนของไอโอดีนใช้เป็น disinfectant ในอุตสาหกรรมอาหารร่วมกับพวก surfactant ชนิด nonionic ในรูปของไอโอโดฟอรั (iodophores) ซึ่งจะมีประสิทธิภาพที่ดีสภาวะเป็นกรด โดยนำมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ของกรดฟอสฟอริกเพื่อให้มีค่า pH อยู่ระหว่าง 4.0 - 5.0 และรูปที่เป็นสารออกซิไดส์ที่รุนแรงคือกรดไฮโปไอโอดัส (hypoiodous acid) โดยสามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงกับกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ

แอลกอฮอล์ (alcohols) เช่น เอทานอล (ethanol) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) และเบนซิลแอลกอฮอล์ (benzyl alcohol) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 - 70 สามารถใช้ในการขัดยั้งหรือทำลายเซลล์ปกติของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่มีผลต่อสปอร์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจากแอลกอฮอล์จะไปทำให้โปรตีนและเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ ทำลายเซลล์เมมเบรนและผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบโดยการละลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบของโครงสร้างเหล่านั้น

ในอาหารที่มีแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบเช่น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ รวมทั้งอาหารหมักบางชนิดจะช่วยทำให้มีอายุการเก็บรักษานานขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้แอลกอฮอล์เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์บนผิวหนังของมนุษย์ รวมทั้งมือและแขนของพนักงานในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารและการใช้เอทานอลในห้องปฏิบัติการในการทำมาสะอาดพื้นผิวบริเวณทำงาน

อัลดีไฮด์ (aldehydes) มีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยทำลายโปรตีนและ DNA ของเซลล์ด้วยการเติมหมู่เอธิลและเมธิล อัลดีไฮด์เป็นอันตรายต่อมนุษย์ จึงไม่นำมาใช้ในอาหารและอัลดีไฮด์ที่พบในควันจากการเผาไหม้ พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ จะมีส่วนช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้

ดีเทอร์เจนต์ (detergents) ชนิด anionic และ amphoteric ใช้ในการทำมาสะอาด โดยใช้กำจัดไขมันออกจากพื้นผิวในอุตสาหกรรมอาหาร ดีเทอร์เจนต์ชนิด anionic ยังมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะพวกแกรมลบ โดยส่วนที่เป็นประจุลบในโครงสร้างของโมเลกุลจะทำลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนทำให้เซลล์สูญเสียสภาพเปลือกผ่านและตายในที่สุด

สารประกอบควอเตอร์นารีแอมโมเนียม (quarternary ammonium compounds) เป็นดีเทอร์เจนต์ชนิด cationic โดยนิยมนำมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เช่นเบนซิลโคเนียมคลอไรด์ (benzylkonium chloride) ซึ่งสามารถทำลายและยับยั้งแบคทีเรียได้ แต่ไม่ค่อยมีผลต่อยีสต์และเชื้อรา รวมทั้งสปอร์ของแบคทีเรีย นอกจากนั้นพวกแกรมลบบางชนิด เช่น *Pseudomonas* spp. อาจต้านทานสารชนิดนี้ได้ ผลการทำลายของสารนี้ เนื่องจากการที่ประจุบวกในโมเลกุลไปจับกับประจุลบในฟอสโฟไลปิดที่บริเวณพื้นผิวของเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้เมมเบรนถูกทำลาย ถ้าใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ จะทำให้เอนไซม์โปรตีนรั่วไหลออกมาภายนอกเซลล์ แต่ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้โปรตีนภายในเซลล์สูญเสียสภาพธรรมชาติ

ไบกวานิด (biguanides) ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถทำลายพวกแกรมลบและบวก็ได้ ส่วนที่ความเข้มข้นสูงจะทำลายยีสต์และเชื้อรา แต่ไม่ค่อยมีประสิทธิภาพในการทำลายสปอร์แบคทีเรีย

แก๊สอัลคิลเลตติ้ง (alkylating gases) มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายจุลินทรีย์ทุกชนิด รวมทั้งสปอร์ของแบคทีเรีย โดยจะไปจับกับหมู่คาร์บอกซิล อะมิโน ซัลโฟไฮดริล และไฮดรอกซิล ทำให้ขาดความเมตาโบลิซึม เช่น แก๊สเอทิลีนออกไซด์ (ethylene oxide) ใช้รมสมุนไพรเพื่อทำลาย จุลินทรีย์ต่างๆ โดยเฉพาะสปอร์แต่ปัจจุบันไม่นิยมใช้ เนื่องจากอาจตกค้างในผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

เพอร์ออกไซด์ (peroxides) เป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงและมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายจุลินทรีย์รวมทั้งสปอร์แบคทีเรีย ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ใช้ในการฆ่าเชื้อภาชนะบรรจุ สำหรับอาหาร เช่น กล่องนม UHT โดยถ้าใช้ร่วมกับแสงอัลตราไวโอเล็ตจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายสปอร์เพิ่มสูงขึ้น โดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะจับกับเมมเบรนไซโทพลาสติกและทำลายเอ็นไซม์โดยการออกซิไดส์หมู่ซัลโฟไฮดริลและหมู่อะมิโน

กรดเพอร์อะซิติก (peracetic acid) เป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงและใช้เป็น disinfectant ได้ โดยมีกลไกการทำลายเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

กรดอินทรีย์ (organic acids) นิยมใช้เป็นสารกันเสียในอาหารประเภทต่าง ๆ

ด่าง (alkalis) ด่างเข้มข้นมีฤทธิ์ในการทำลายและยับยั้งจุลินทรีย์ โดยมักใช้ในการทำความสะอาดในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ในการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น ร้อยละ 5 จะให้ผลเช่นเดียวกับการใช้คลอรีนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

กรดอนินทรีย์ (inorganic acids) เช่น กรดไฮโดรคลอริก ซัลฟูริก ไนตริก และฟอสฟอริก สามารถนำมาใช้เป็นตัวทำความสะอาดและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ กรดฟอสฟอริกและเกลือของกรดซัลฟูริกและไนตริก นำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร

โอโซน (ozone) เป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงและสามารถนำมาใช้แทนคลอรีนเพื่อฆ่าเชื้อ จุลินทรีย์ในน้ำ

สารปฏิชีวนะ (antibiotics) เป็นสารที่ได้จากเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์บางชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่เนื่องจากปัญหาการต้านยาของเชื้อจุลินทรีย์ ความ เป็นพิษของสารปฏิชีวนะและการเกิดสายพันธุ์ใหม่ที่ต้านยาปฏิชีวนะ จึงไม่นิยมนำมาใช้ในอาหาร เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ ยกเว้นสารบางชนิดที่จัดว่าเป็นสารปฏิชีวนะแต่ไม่ถูกนำมาใช้ในการรักษาโรค เช่น ไนซิน (nisin) และไพมาริซิน (pymaricin) ซึ่งจะนำมาใช้เป็นสารกันเสียสำหรับอาหารได้

การใช้สารเคมีที่ยับยั้งจุลินทรีย์ในการทำมาสะอาดและการสุขาภิบาลอุตสาหกรรม อาหาร

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ sanitizer ได้แก่

1. ความเข้มข้นของสารเคมี โดยทั่วไปพบว่าที่สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงกว่าจะมี ประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ได้ดีกว่าและประสิทธิภาพของสารเคมีจะมีความ แตกต่างกันไปตามกลุ่มของจุลินทรีย์ เช่น คลอรีนจะมีผลในการยับยั้งหรือทำลายไวรัสและสปอร์ ของแบคทีเรียเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงเท่านั้น
2. เวลาที่สารเคมีสัมผัสกับจุลินทรีย์ (contact time) เมื่อปล่อยให้เวลาที่สารเคมี สัมผัสกับจุลินทรีย์นานขึ้น จะทำให้จุลินทรีย์ถูกยับยั้งหรือทำลายมากขึ้นไปด้วย
3. ค่า pH ของ sanitizer ของสภาพแวดล้อมจะมีผลต่อประสิทธิภาพของ sanitizer เช่นประสิทธิภาพของไฮโปคลอไรต์ (hypochlorites) จะขึ้นอยู่กับปริมาณของสัดส่วนในรูปที่เป็น กรดไฮโปคลอรัส (hypochlorous) ที่ไม่แตกตัวในสารละลาย ซึ่งจะขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลาย กรดไฮโปคลอรัสในรูปที่ไม่แตกตัวจะเข้าสู่ภายในเซลล์ทำลายเมตาโบลิซึมของเซลล์ โดยการ ออกซิไดส์สารต่างๆ ถ้าความเป็นกรด (acidity) ของสารละลายเพิ่มขึ้น ปริมาณของกรดรูปที่ไม่ แตกตัวจะสูงขึ้นไปด้วย ตัวอย่างเช่น ค่า D ของสปอร์ *Bacillus cereus* ในสารละลายคลอรีน ความเข้มข้น 25 ส่วนในล้านส่วน คือ 2.5 นาที ที่ pH 6.0 แต่จะเพิ่มขึ้นเป็น 20 นาทีที่ pH 9.0 เป็น ต้น
4. ความกระด้างของน้ำ (hardness of water) มีผลต่อ sanitizer บางชนิด เนื่องจาก ผลของไอออนของแคลเซียมและแมกนีเซียม อาจช่วยป้องกันไม่ให้สารประกอบควอเตอร์นารี แอมโมเนียมไปทำลายเซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย เป็นต้น

5. ปริมาณของจุลินทรีย์ ถ้ามีปริมาณจุลินทรีย์มากจะทำให้การฆ่าเชื้อยากขึ้น ถ้าใช้ sanitizer ที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่า ถ้ามีจุลินทรีย์มากกว่าจะใช้เวลาในการสัมผัสจุลินทรีย์ เพื่อทำลายเชื้อนานกว่า

6. ชนิดของจุลินทรีย์ ความทนต่อ sanitizer ของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จะแตกต่างกัน เช่น สารประกอบควอเตอร์นารีแอมโมเนียม ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่มีผลทำลายสปอร์แบคทีเรีย ส่วนคลอรีนมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียและสปอร์ ยีสต์ เชื้อราและไวรัส โดยจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้

7. ปริมาณของสารอินทรีย์ที่มีอยู่ ซึ่งอาจมีผลปกป้องจุลินทรีย์จาก sanitizer สารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงจะสามารถทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ได้หลายชนิดและมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง ตัวอย่างเช่น คลอรีน ซึ่งสามารถออกซิไดส์สารอินทรีย์ต่างๆ ในน้ำได้ แต่ปริมาณที่เติมลงไปนั้นจะต้องมีการคำนวณเพื่อให้มีปริมาณของคลอรีนในรูปคลอรีนที่เหลืออยู่ (residual chlorine) ที่สามารถให้ผลในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้

8. อุณหภูมิขณะที่ใช้สาร sanitizer จากการที่อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น sanitizer (ที่มีประสิทธิภาพเฉพาะในช่วงอุณหภูมิหนึ่งๆ) จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์

สารกันเสีย (preservatives) เป็นสารเคมีที่ใช้เติมลงในอาหาร หรือได้มาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ (เช่นการหมัก) ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารได้ โดยมีผลทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและพวกที่ก่อให้เกิดโรค นอกจากนั้นการเติมสารกันเสียจะทำให้สามารถลดการใช้ความร้อนในการทำลายเชื้อให้ต่ำลง ทำให้อาหารมีคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่ดีขึ้น รวมทั้งอาจช่วยลดปริมาณการใช้เกลือหรือน้ำตาลในการลดค่า a_w ของอาหาร ทำให้ผู้บริโภคมีการยอมรับเพิ่มขึ้น สารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียได้แก่ กรดอินทรีย์ และเอสเทอร์ เช่น กรดซิตริก ทาร์ตาริก มาลิก แล็กติก อะซิติก โพรพิโอนิก ซอร์บิก เบนโซอิก พารา-ไฮดรอกซีเบนโซเอต (พาราเบน) กรดแร่ (mineral acids) เช่น กรดฟอสฟอริก สารเคมีอนินทรีย์ชนิดประจุลบเช่น ซัลไฟด์และไนไตรท์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โซเดียมคลอไรด์ สารปฏิชีวนะต่างๆ เช่นไนซินและไพมาริซิน (pimaricin หรือ natamycin) และควัน (smoke) เป็นต้น ในส่วนของกรดอินทรีย์บางชนิดมักจะใช้ในรูปแบบเกลือของกรด เช่น โพแทสเซียมซอร์เบต ส่วนสารเคมีที่ใช้เคลือบผิวผลไม้เพื่อ

ป้องกันการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์เช่น โซเดียมออร์ทิลเฟนิลเฟเนต (sodium orthyl phenyl phenate) ไม่จัดว่าเป็นสารกันเสีย

กลไกการทำลายจุลินทรีย์ของสารกันเสีย

กรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ ในส่วนของกรดอินทรีย์เช่น กรดมาลิก ซิตริก และทาร์ทาริก มักพบในผลไม้ตามธรรมชาติ และสามารถยับยั้งแบคทีเรียส่วนใหญ่ รวมทั้งกรดแลกติก และอะซิติกที่สร้างจากจุลินทรีย์บางชนิดจะให้ผลเช่นเดียวกัน กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) สร้างโดย *Propionibacterium* spp. ที่มีในเนยแข็ง และกรดเบนโซอิก (benzoic acid) พบในแครนเบอรี่ (cranberries) จุลินทรีย์ต่าง ๆ จะดูดซึมกรดเหล่านี้เข้าไปในเซลล์ในรูปของกรดที่ไม่แตกตัว ตารางที่ 24 แสดงปริมาณการแตกตัวของกรดชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นสารกันเสีย

ตารางที่ 24 การแตกตัวของกรดอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

ร้อยละของกรดที่ไม่แตกตัว	pH		
	เบนโซอิก	โพรพิโอนิก	ซอร์บิก
99	2.19	2.87	2.75
50	4.19	4.87	4.75
1	6.19	7.17	7.05

ที่มา : Garbutt (1997)

จากตารางที่ 24 จะเห็นว่าปริมาณการแตกตัวของกรดชนิดต่างๆ จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น ดังนั้นกรดต่างๆ ดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรด ซึ่งจะมีปริมาณกรดที่ไม่แตกตัวอยู่มาก กรดอินทรีย์เหล่านี้มักใช้ในการควบคุมยีสต์และเชื้อรา เช่น กรดโพรพิโอนิก ใช้สำหรับป้องกันการเกิดเมือก(ropiness) ในขนมปังที่เกิดจากเชื้อ *Bacillus subtilis*

ความสามารถในการละลายของกรดอินทรีย์ในน้ำมันและไขมัน อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การใช้สารกันเสียไม่ได้ผลเท่าที่ควร เนื่องจากกรดอินทรีย์ในรูปที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันและน้ำ ในขณะที่จุลินทรีย์ต่างๆ เจริญได้ในส่วนที่เป็นน้ำ ดังนั้นสารกันเสียที่ละลายในส่วนที่เป็นไขมันจึงไม่มีผลต่อจุลินทรีย์ และการที่มีโซเดียมคลอไรด์ในส่วนที่เป็นน้ำ จะมีผลต่อการละลายของสารกันเสียเช่น กรดซอร์บิก โดยจะมีความสามารถละลายในน้ำได้น้อยลง ทำให้สัดส่วนของสารกันเสียที่ละลายในไขมันเพิ่มสูงขึ้น ในบางครั้งการเติมสารกันเสียมากกว่าหนึ่งชนิดลงในอาหาร อาจให้ผลเสริมฤทธิ์กันมากกว่าการเติมสารกันเสียเพียงชนิดเดียว ซึ่งทำให้ปริมาณการใช้สารกันเสียแต่ละชนิดลดต่ำลง เช่น ในการใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ร่วมกับกรดเบนโซอิกในการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำผลไม้ เป็นต้น

กรดแร่ (mineral acids) มีผลต่อเซลล์จุลินทรีย์ โดยทำให้เกิดออสโมไลต์และมิสเซลทำลายเยื่อเมมเบรนรวมทั้งบริเวณพื้นผิวของเซลล์

ประจุลบของสารอนินทรีย์ (inorganic anions) เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และเมตาไบซัลไฟต์ (metabisulphite) จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดในสภาวะที่เป็นกรด โดยเซลล์จะดูดซึมเข้าไปในรูปของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ทำให้เกิดออสโมไลต์ (sulphite ions) ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์และสามารถทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ รวมทั้งออกซิเจน ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) ในส่วนของออสโมไลต์มีผลต่อเซลล์ในลักษณะต่างๆ ได้แก่ทำลายระบบการสร้างพลังงาน เมตาไบซัลไฟต์ของเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีน การสร้าง DNA รวมทั้งมีผลทำลายเซลล์เยื่อเมมเบรน สารซัลเฟอร์ไดออกไซด์และเมตาไบซัลไฟต์ใช้ในการยับยั้งยีสต์และเชื้อราในอาหารที่เป็นกรด รวมทั้งเครื่องดื่มน้ำผลไม้ชนิดที่ไม่มีแอลกอฮอล์ รวมทั้งใช้ในไวน์เพื่อทำลายยีสต์ที่ปนเปื้อนมาในน้ำองุ่นและใช้ยับยั้งพวก lactobacilli ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 450 ส่วนในล้านส่วน ใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียตระกูล Enterobacteriaceae ในผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดต่ำ เช่น ไข่กบวัก เป็นต้น

ไนเตรท (nitrate) และไนไตรท์ (nitrite) นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จำพวก cured meat เพื่อคงสีแดง รวมทั้งทำให้เกิดกลิ่นรสที่เฉพาะ นอกจากนั้นยังช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษและที่ทำให้เสื่อมเสีย วิธีการผลิต cured meat ดังเดิมจะใช้ไนเตรท (หรือ saltpetre) ทาลง

บนพื้นผิวของเนื้อสัตว์ ซึ่งไนเตรทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไนไตรท์ โดยจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติโดยเฉพาะ *Micrococcus* spp. แต่ปัจจุบันนิยมใช้ในไนไตรท์โดยตรงโดยการผสมลงใน curing salts และฉีด (inject) เข้าไปภายในเนื้อสัตว์ ไนไตรท์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ได้แก่ *Clostridium* spp. (โดยเฉพาะ *Clostridium botulinum*) *Bacillus* spp. และ *Staphylococcus aureus* แต่ไม่ค่อยมีผลต่อพวก lactobacilli หรือแบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae รวมทั้งพวก *Salmonella* ผลของไนไตรท์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ ปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ ค่า pH และปริมาณออกซิเจนในสภาวะแวดล้อม โดยจะมีความสามารถยับยั้งได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์และโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้นและในสภาวะที่เป็นกรดและปราศจากออกซิเจน ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก (fermented meats) จะใช้โซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน เพื่อยับยั้ง *Staph. aureus* ส่วนการยับยั้งการเจริญของการสร้างสารพิษของ *C. botulinum* ชนิดที่ย่อยสลายโปรตีนได้จะใช้โซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน ที่ pH 6.2 และมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 5.0 ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีน (non-proteolytic strains) จะใช้ที่ความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วนที่ pH 6.2 และมีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3.0 และในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* จะใช้โซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วนและปริมาณโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3.0

กลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไนไตรท์ มีรายงานว่าเกิดจากการที่เซลล์ของจุลินทรีย์จะดูดซึมกรดไนตริก (nitrous acid) หรือไนตรัสออกไซด์ (nitrous oxide) ในรูปที่ไม่แตกตัว ซึ่งเป็นตัวรีดิวซ์ที่รุนแรงและทำลายเมตาโบลิซึมของเซลล์ นอกจากนั้นไนไตรท์ อาจช่วยยับยั้งการออกของสปอร์ที่รอดจากการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน โดยจะให้ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีขึ้นในสภาวะที่เป็นกรดสูง ซึ่งในสภาวะดังกล่าวไนไตรท์จะอยู่ในรูปของกรดไนตรัสออกไซด์ที่ไม่แตกตัว และผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ง่าย

คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) จะถูกสร้างขึ้นในภาชนะบรรจุสุญญากาศ หรือใช้เพื่อดัดแปลงสภาพบรรยากาศ (modified atmosphere) โดยสามารถใช้ยับยั้งพวกแกรมลบ เช่น pseudomonads และเชีอรา ที่ทำให้อาหารจำพวกเนื้อสัตว์ ปลา และเนื้อสัตว์ปีกเกิดการเสื่อมเสีย

ทั้งนี้ เนื่องมาจากคาร์บอนไดออกไซด์ทำให้ pH ภายในเซลล์จุลินทรีย์ลดลงเป็นผลให้เซลล์ถูกทำลาย รวมทั้งยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ การสร้างเอนไซม์และทำลายเซลล์เมมเบรน

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ให้ผลยับยั้งจุลินทรีย์เนื่องมาจากผลของค่า a_w รวมทั้งอาจเนื่องจากมาจากอิออนโซเดียมซึ่งรบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์

ควัน (smoke) โดยเฉพาะควันจากไม้ประกอบด้วยสารชนิดต่างๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ เป็นองค์ประกอบมากมายหลายชนิด สารที่สำคัญคือฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) รวมทั้งฟีนอล (phenols) และเมทานอล (methanol)

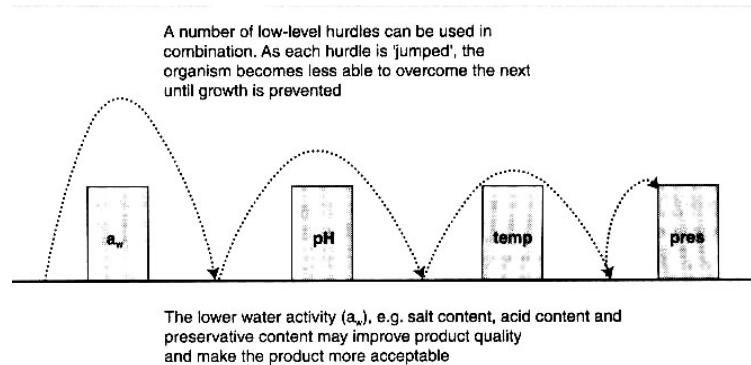
สารปฏิชีวนะ (antibiotics) ที่สำคัญ ได้แก่ นิสิน (nisin) ที่สร้างโดย *Lactococcus lactis* ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกรวมทั้ง *Clostridium botulinum* และ *Listeria* spp. *Bacillus* spp. และ *Staphylococcus aureus* โดยส่วนใหญ่นำมาใช้ในอาหารบรรจุกระป๋องเพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์ *Clostridium* spp. และ *Bacillus* spp. ส่วนไพมาริซินที่สร้างโดย *Streptomyces natalensis* นำมาใช้กับเนยแข็งรวมทั้งผิวหน้าของไส้กรอกชนิดแห้ง เพื่อป้องกันเชื้อรา ซึ่งสารปฏิชีวนะชนิดนี้มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ของเชื้อรา แต่ไม่มีผลยับยั้งแบคทีเรีย

ผลของเฮอร์เดิล (hurdle) และการถนอมรักษาอาหาร

ในการถนอมรักษาอาหารนั้น อาจทำได้โดยใช้วิธีการต่างๆ เพียงวิธีเดียว เช่น การใช้สารกันเสีย เช่น เกลือหรือน้ำตาล ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง การทำแห้ง การปรับความเป็นกรดให้สูงขึ้น หรือแม้กระทั่งการใช้ความร้อนหรือการแช่เยือกแข็ง แต่กระบวนการต่างๆ ที่กล่าวมาจะมีผลต่อรสชาติรวมทั้งลักษณะ โครงสร้างของอาหารและทำให้การยอมรับของผู้บริโภคลดน้อยลง ในขณะที่ปัจจุบันความต้องการผลิตภัณฑ์ที่สดหรือใกล้เคียงธรรมชาติมีมากขึ้น โดยไม่มีการเติมแต่งสารเคมีต่างๆ รวมทั้งลดปริมาณการใช้สารเคมีให้น้อยลง

เทคโนโลยีเฮอร์เดิล (Hurdle technology) เป็นเทคโนโลยีที่มีมานานแล้ว โดยใช้วิธีการต่างๆ มากกว่าหนึ่งวิธีในการถนอมรักษาอาหารหรือยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร โดยผลจากการใช้

วิธีต่างๆ ร่วมกันจะทำให้สภาวะการเจริญของจุลินทรีย์ไม่เหมาะสม ซึ่งดีกว่าการใช้วิธีการถนอมอาหารเพียงวิธีเดียวที่อาจไม่เพียงพอหรือมีผลในการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ได้น้อยกว่า ดังตัวอย่างแสดงในภาพที่ 36



ภาพที่ 36 การใช้ฮาร์ดเดิลในการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์

ที่มา : Garbutt (1997)

การประเมินอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร (Storage-life (shelf-life) testing)

การประเมินอายุการเก็บรักษาของอาหารกระทำได้โดยเก็บรักษาอาหารไว้ที่สภาวะการเก็บรักษาอุดมคติ (ideal) หรือสภาวะที่ยอมรับได้ (acceptable) และสุ่มตัวอย่างมาวัดหรือวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงเป็นระยะๆ จนกระทั่งอาหารเสื่อมเสียหรือเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเช่นการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรส รสชาติ หรือลักษณะปรากฏ หรือนำไปวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์หรืออื่น ๆ หรืออาจทำได้โดยเปลี่ยนแปลงสภาวะการเก็บรักษา เช่น เพิ่มอุณหภูมิการเก็บให้สูงขึ้น ซึ่งจะทำให้การเสื่อมเสียของอาหารเกิดได้รวดเร็วยิ่งขึ้น และนำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงต่างๆ มาวิเคราะห์เพื่อทำนายอายุการเก็บรักษาอาหารได้

Challenge Testing เป็นวิธีการเติมจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย หรือเชื้อโรคและเชื้อที่ใช้เป็นดัชนีลงไปในการ และทดสอบหรือวิเคราะห์โดยการวัดปริมาณของเชื้อดังกล่าว ซึ่งวิธี

นี้เหมาะต่อการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่ หรืออาหารชนิดเดิมที่นำมาปรับเปลี่ยนสูตรใหม่รวมทั้งอาหารที่ได้จากการปรับเปลี่ยนพารามิเตอร์ของกระบวนการผลิต เช่น การให้ความร้อนใหม่ เป็นต้น

Predictive modelling เป็นการประเมินอายุการเก็บรักษาอาหารโดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์ ซึ่งทำโดยรวบรวมข้อมูลจากการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ หรือระบบอาหารที่ไม่ซับซ้อน ตัวอย่างเช่น การใช้เนื้อสุกรบดเหลว (pork slurry) ที่จำลองสภาวะการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งทำได้ง่ายกว่าและใช้ค่าใช้จ่ายต่ำกว่า ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ เช่น อุณหภูมิ ค่า pH และ a_w รวมทั้งสารยับยั้ง (inhibitors) ต่อการเจริญในระยะต่างๆ ของจุลินทรีย์จะนำมาใช้สร้างกราฟลักษณะการเจริญ (growth curve) และผลจากปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากนี้ เช่น ปริมาณเกลือ ค่า pH และอุณหภูมิต่อการทนความร้อนและการรอดชีวิตของเชื้อ จะนำมาสร้างสมการและหาความสัมพันธ์เพื่อทำนายอายุการเก็บรักษาอาหารได้

ผลของการฉายรังสีต่อจุลินทรีย์

รังสีที่นำมาใช้อาศัยอยู่ในช่วงคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic spectrum) โดยมีความแตกต่างกันตามความยาวคลื่น (wave length) ซึ่งมีหน่วยนาโนเมตร (nanometer) หรือความถี่ (frequency) มีหน่วยเฮิร์ตซ์ (Hertz) การทำลายจุลินทรีย์ของรังสีเกิดขึ้นเนื่องจากผลทางอ้อม เมื่อใช้คลื่นไมโครเวฟ โดยรังสีชนิดอื่นๆ จะให้ผลโดยตรงต่อจุลินทรีย์และทำลายจุลินทรีย์ได้ดีขึ้นเมื่อความยาวคลื่นลดลง

คลื่นไมโครเวฟ (microwaves) ทำให้เกิดความร้อนขึ้นในสภาวะแวดล้อม (ในน้ำ) ที่มีจุลินทรีย์อาศัยหรือเจริญอยู่ โดยโมเลกุลของน้ำจะเกิดการสั่นแกว่ง (oscillate) เมื่อได้รับคลื่นความถี่ต่ำ ทำให้อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วและถ่ายเทความร้อนไปสู่จุลินทรีย์ในที่สุด

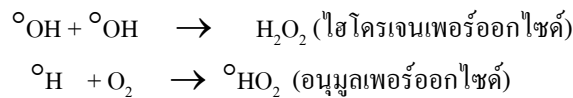
คลื่นแสง (visible light) ที่มีความเข้ม (intensity) สูงพอสามารถทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์บาดเจ็บและตายได้ องค์ประกอบบางชนิดของเซลล์จะสามารถดูดซับคลื่นแสงได้ เช่น ไซโทโครม

(cytochrome) และฟลาวิน (flavins) ทำให้ส่งถ่ายพลังงานไปยังองค์ประกอบอื่นๆ และทำให้เซลล์ขาดเสบียง

แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet light) ที่ช่วงคลื่นเฉพาะ จะสามารถทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากองค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์จะดูดซับคลื่นดังกล่าวได้ดี เช่น เบสพิวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) ใน RNA และ DNA จะดูดซับคลื่นอัลตราไวโอเล็ตสูงสุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และกรดอะมิโนชนิดที่มีหมู่อะโรมาติก เช่น ทริปโตเฟน (tryptophan) ไทโรซีน (tyrosine) และฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) จะดูดซับคลื่นอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร การที่ DNA ดูดซับคลื่นอัลตราไวโอเล็ตดังกล่าวทำให้เบสไทมิน (thymine) ที่อยู่ติดกันในสาย DNA สร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมต่อกันเป็นผลให้การจำลองตัวของ DNA ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ และการทำงานของยีนส์ผิดปกติ ในกรณีนี้ที่เซลล์ยังสามารถจำลอง DNA ต่อไปได้ ลักษณะดังกล่าวจะถูกถ่ายทอดไปยังเซลล์รุ่นต่อไป ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutant) ขึ้นได้ อย่างไรก็ตามถ้าเกิดความเสียหายไม่มาก พบว่าเซลล์จุลินทรีย์จะสามารถซ่อมแซมตัวเองได้โดยการสร้างเอนไซม์ชนิดพิเศษขึ้นมา รวมทั้งสร้างนิวคลีโอไทด์ใหม่แทนที่ส่วนเก่า การทนต่ออัลตราไวโอเล็ตของจุลินทรีย์เรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ ไวรัส สปอร์เชื้อรา สปอร์แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบตามลำดับ การที่สปอร์ของเชื้อราทนต่อแสงอัลตราไวโอเล็ตมากกว่าแบคทีเรีย เนื่องมาจากเชื้อเห็ดสปอร์เชื้อรามีสารเมลานิน (melanins) ซึ่งดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตไว้และช่วยป้องกันเซลล์ถูกทำลาย

รังสีไอออไนซ์ (ionizing radiation) สร้างได้จากเครื่องเอ็กซเรย์ หรือจากการสลายตัวของโคบอลต์-60 (Cobalt -60) และมีผลต่อจุลินทรีย์โดยทำลายโครงสร้างของเซลล์โดยตรง รวมทั้งทำให้โมเลกุลน้ำภายในและภายนอกเซลล์แตกตัว ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการแตกตัวของน้ำจะไปรวมตัวกันเอง หรือรวมตัวกับโมเลกุลออกซิเจน ทำให้ได้สารออกซิไดส์ที่รุนแรงและทำอันตรายต่อองค์ประกอบของเซลล์ ดังสมการ



ผลของรังสีไอออนไนส์ที่รุนแรงที่สุด คือ การทำให้โมเลกุล DNA ถูกทำลาย เนื่องจากสูญเสียอะตอมไฮโดรเจน การตายหรือลักษณะการรอดชีวิตของจุลินทรีย์เนื่องจากรังสีไอออนไนส์มีลักษณะเช่นเดียวกับการตายเนื่องมาจากความร้อนหรือสารเคมี ทำให้กราฟการรอดชีวิตของจุลินทรีย์จากการฉายรังสีมีลักษณะเช่นเดียวกัน

ปริมาณรังสีนั้นจะวัดจากพลังงานที่ถูกดูดซับโดยวัตถุที่นำมาฉายรังสี ในปัจจุบันหน่วยของปริมาณรังสีที่ใช้คือ เกรย์ (Gray, Gy) โดย 1 Gy หมายถึง พลังงานที่ถูกดูดซับ 1 จูล (joule) ต่อวัตถุ 1 กิโลกรัม และ 1 kiloGy = 1,000 Gy ส่วนหน่วยเดิมที่ใช้คือ rad โดย 1 Gy = 100 rads

การทนของจุลินทรีย์ต่อรังสีเรียงลำดับจากมากไปน้อย คือ ไวรัส สปอร์แบคทีเรีย สปอร์เชื้อรา ยีสต์และเชื้อรา แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนจุลินทรีย์ที่ได้รับปริมาณรังสีที่ไม่มาก จะสามารถซ่อมแซมตนเองและรอดชีวิตใหม่ขึ้นมาได้อีก เชื้อที่ทนต่อรังสีไอออนไนส์สูงมากกว่าชนิดอื่น ๆ คือ *Deinococcus radiadurans* โดยมีค่า D ประมาณ 5 kGy

การฉายรังสีไอออนไนส์ในการถนอมรักษาอาหาร พบว่าให้ผลดีเนื่องจากสามารถทะลุทะลวงผ่านภาชนะบรรจุได้ ดังนั้น จึงสามารถบรรจุอาหารก่อนแล้วนำมาผ่านการฉายรังสีเพื่อทำลายจุลินทรีย์ แต่มีปัญหาเกิดขึ้นหลายประการ เนื่องจากการใช้รังสีในปริมาณที่สูงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีขึ้นได้ ทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงเช่น รสชาติและกลิ่นรส โดยเฉพาะอาหารที่มีไขมันสูงจะทำให้เกิดการหืน วิตามินบางชนิดอาจถูกทำลาย และอาจเกิดสารพิษบางชนิด นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต รวมทั้งผู้บริโภคยังไม่ยอมรับอาหารฉายรังสีเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามธาตุกัมมันตรังสีที่นำมาใช้เป็นแหล่งของรังสีแกมมา เช่น โคบอลต์-60 และซีเซียม-137 พบว่าไม่ทำให้เกิดพลังงานสูงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดกัมมันตภาพรังสีในอาหารได้

ในการฆ่าอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำในทางการค้า (commercial sterile) จะต้องใช้ปริมาณรังสีที่ทำให้เชื้อ *Clostridium botulinum* ลดปริมาณลง 10^{12} เท่า และ ค่า D ของเชื้อนี้เท่ากับ

3.5 kGy ดังนั้นปริมาณรังสีที่ต้องใช้เพื่อการดังกล่าวจะเท่ากับ $12 \times 3.5 = 42 \text{ kGy}$ วิธีการนี้บางครั้งเรียกว่า radappertization แต่เนื่องจากการใช้ปริมาณรังสีที่สูงมากทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง วิธีการฉายรังสีดังกล่าวจึงไม่นิยมใช้เพื่อการยืดอายุการเก็บรักษาของอาหาร

การฉายรังสีโดยใช้ปริมาณรังสีต่ำ เช่น การทำลายเชื้อ *Salmonella* ในอาหารหรืออาหารสัตว์ อาจใช้รังสีประมาณ 3 - 10 กิโลเกรย์ ส่วนการยืดอายุการเก็บของผลไม้ เช่น สตรอเบอรี่ มะม่วง และมะละกอ ใช้รังสีในช่วง 2 - 5 กิโลเกรย์ การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในเครื่องเทศที่ส่วนใหญ่มีสปอร์ของแบคทีเรียและเชื้อราใช้รังสีประมาณ 10 กิโลเกรย์ ในบางครั้งอาจพบคำว่า radicidation ซึ่งหมายถึงการฉายรังสีเพื่อทำลายเชื้อโรคที่ไม่สร้างสปอร์ เช่น *Salmonella* และคำว่า radurization (คล้ายกับ pasteurization ในกระบวนการให้ความร้อน) เป็นการฉายรังสีในระดับต่ำเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการฉายรังสี เช่น ค่า a_w เช่น ในอาหารที่มีค่า a_w ต่ำกว่า พบว่ารังสีจะให้ผลทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ต่ำกว่า จุลินทรีย์ที่พบในอาหารแห้งหรืออาหารแช่เยือกแข็งจะทนต่อรังสีมากกว่าอาหารที่มีค่า a_w สูงกว่า เช่น *Salmonella typhimurium* ในเนื้อไก่มีค่า D เท่ากับ 0.5 กิโลเกรย์ ในขณะที่ในไก่แช่เย็นแช่เย็นนี้มีค่า D เพิ่มขึ้นเป็น 1.7 กิโลเกรย์ ในทางตรงกันข้ามการยับยั้งอาจให้ผลที่ตรงกันข้ามเช่น *Clostridium botulinum* ในแฮม มีค่า D เท่ากับ 1.6 กิโลเกรย์ ส่วนในเนื้อสุกรพบว่าเชื้อมีค่า D เท่ากับ 3.5 กิโลเกรย์

การใช้ความดันสูง (high pressure) ในการถนอมรักษาอาหาร

ผลของความดันสูงจะทำให้โปรตีนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์สูญเสียสภาพธรรมชาติและมีผลต่อเซลล์เมมเบรน ในการใช้ความดันที่ 400 เมกาปาสคาล เป็นเวลา 5 นาที พบว่าสามารถทำลายเซลล์ปกติของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราให้มีปริมาณลดลง 1 วงจรลอก ในขณะที่ต้องใช้ความดันสูงถึง 1,200 เมกาปาสคาล เพื่อทำลายสปอร์ของแบคทีเรีย แต่ในปัจจุบันเทคโนโลยีการใช้ความดันสูงยังคงนำมาใช้เฉพาะในอาหารที่มีความเป็นกรด เนื่องจากไม่มีปัญหาเกี่ยวกับสปอร์ของแบคทีเรีย นอกจากนั้นอาหารที่ผ่านการใช้ความดันจะยังคงรสชาติเดิมและมีความสด รวมทั้งเป็นที่ยอมรับมากกว่าอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อน

บทที่ 8

การเสื่อมเสียของอาหาร

อาหารที่เสื่อมเสียไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะด้านต่างๆ ได้แก่ กลิ่น รสชาติ ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส หรือการมีสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้น ทั้งนี้สาเหตุที่สำคัญดังกล่าวเนื่องมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี เช่น การหืน (rancidity) การเกิดสีน้ำตาลเนื่องจากเอนไซม์ในผักหรือผลไม้ การสูญเสียลักษณะปรากฏเนื่องจากแรงกลภายนอกหรือเกิดจากกระบวนการแปรรูปที่ไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของตัวอาหารเอง การสุก (ripening) และการปนเปื้อนจากวัตถุต่าง ๆ เช่น เศษแก้ว โลหะ และสารเคมีชนิดต่างๆ อย่างไรก็ตามการพิจารณาหรือตัดสินว่าอาหารชนิดหนึ่งเกิดการเสื่อมเสียหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ความชอบของแต่ละเชื้อชาติ เผ่าพันธุ์และภูมิหลังของแต่ละครอบครัว เป็นต้น

การเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์

กระบวนการเสื่อมเสียของอาหารเป็นจุดเริ่มของกระบวนการเสื่อมสลายในสภาวะธรรมชาติ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของธาตุต่างๆ ที่ปรากฏในเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ตามธรรมชาติ เช่น ธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน และอื่นๆ จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียมักจะเจริญได้ดีในซากพืชหรือสัตว์ โดยการใช้สารประกอบขนาดเล็กที่มีในอาหาร ในบางครั้งอาหารที่เสื่อมเสียจากจุลินทรีย์อาจปลอดภัยต่อการบริโภค เช่น โยเกิร์ตที่มียีสต์ (เช่น Bulgarian yoghurt บางชนิด) จะมีคุณค่าทางอาหารมากกว่าโยเกิร์ตชนิดธรรมดา เนื่องจากมีวิตามินบีสูงกว่า ในขณะที่ขบวนการอาหารที่เสื่อมเสียบางชนิดเป็นอันตรายต่อมนุษย์อย่างมาก เช่น อาหารที่มีสารพิษของเชื้อราปนเปื้อนอยู่หรือสารพิษจาก *Clostridium botulinum* เป็นต้น

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในพืชและสัตว์

ในเซลล์ปกติของพืชและสัตว์ที่มีสุขภาพดี มักปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ในพืชจะพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนบนพื้นผิวตามธรรมชาติ เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอกและผล กลไกป้องกันตนเองตามธรรมชาติของพืชจากจุลินทรีย์ได้แก่ ชั้นอีพิดERMิส (epidermis) ที่มีชั้นไขเคลือบหุ้มภายนอก รวมทั้งชั้นคอร์ก (corky layers) สารที่เป็นองค์ประกอบภายในที่มีผลต่อต้านหรือยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น แทนนิน กรดอินทรีย์ และน้ำมันหอมระเหย ชั้นผนังเซลล์ที่ทนต่อการแทรกตัวของจุลินทรีย์ รวมทั้งเซลล์ปกติซึ่งมีชั้นเมมเบรนหุ้มหลังจากที่พืชถูกเก็บเกี่ยวแล้ว กิจกรรมภายในยังคงดำเนินต่อไปตราบใดที่เซลล์ยังคงปิดหรือไม่ถูกทำลาย ก็จะสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นระยะเวลานาน

ในส่วนของสัตว์ที่มีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติบนผิวหนัง ระบบย่อยอาหารและตามช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก เป็นต้น นอกจากนั้นอาจพบจุลินทรีย์ที่ค่อนน้ำเหลืองและที่ดัดกลไกป้องกันตนเองของสัตว์ เช่น ชั้นผิวหนังอีพิเธลิยม (epithelium) และมิวโคสาภายในลำไส้ (intestinal mucosa) ระบบภูมิคุ้มกัน เช่น เม็ดเลือดขาวและแอนติบอดี เซลล์ปกติที่มีชั้นเมมเบรนสารต่อต้านจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ เช่น ไลโซไซม์ (lysozyme) ในน้ำลายและในไข่ขาว รวมทั้งกลไกตอบสนองเช่น การอาเจียน (vomiting) เป็นต้น ทันทิที่เซลล์พืชหรือสัตว์ตาย กลไกต่างๆ ที่กล่าวมาจะหมดสภาพโดยเซลล์เมมเบรนจะไม่ทำหน้าที่ เป็นผลให้เซลล์มีสารรั่วไหลออกภายนอกกลายเป็นอาหารของจุลินทรีย์

แหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอาหาร

แหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนลงในอาหารมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหาร ตัวอย่างเช่น เนื้อปลาแช่ที่เก็บรักษาด้วยน้ำแข็ง พบว่าแหล่งของจุลินทรีย์ได้แก่จุลินทรีย์ธรรมชาติที่เกาะบนผิวลำตัวปลาและภายในกระเพาะอาหาร แหล่งน้ำหรือตะกอนตามพื้นที่องน้ำ ตาข่ายจับปลาที่สัมผัสกับปลา แมลงหรือมูลของนกทะเล ดินในบริเวณที่มีการขนส่งและลำเลียงปลาสด รวมทั้งอากาศบริเวณที่แล่ชิ้นปลา เป็นต้น

จุลินทรีย์ธรรมชาติที่ปนเปื้อนในอาหาร มีความหลากหลายชนิดและแตกต่างกันอย่างมาก ตัวอย่างเช่น ในเนื้อสัตว์พบว่าแบคทีเรียประมาณ 30 จินัส แบ่งตามกลุ่มได้แก่

1. แกรมลบรูปแท่งและ coccobacilli เช่น *Acinetobacter Aeromonas Alcaligenes Citrobacter Enterobacter Escherichia Flavobacterium Moraxella Proteus Pseudomonas Salmonella Shewanella* และ *Yersinia*
2. แกรมบวกรูปแท่ง ได้แก่ *Bacillus Brochothrix Clostridium Corynebacterium Lactobacillus* และ *Listeria*
3. แกรมบวกรูปร่างกลม ได้แก่ *Enterococcus Lactococcus Micrococcus Pediococcus* และ *Staphylococcus*

นอกจากนี้ยังพบเชื้อราอีกส่วนหนึ่ง เช่น *Mucor Rhizopus* และ *Thamnidium* และพวก imperfect fungi เช่น *Cladosporium Geotrichum* และ *Sporotrichum* และพวกยีสต์เช่น *Candida* spp. เป็นต้น

ปัจจัยที่กำหนดชนิดจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย

อาหารที่เสื่อมเสียในสภาวะหนึ่ง ๆ จะพบว่ามีจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดหรือมีเพียงชนิดเดียวที่เจริญโดดเด่นกว่าชนิดอื่นๆ เนื่องจากจุลินทรีย์มีการแข่งขันในการเจริญเพื่อแย่งสารอาหารที่มีอยู่ โดยชนิดที่เจริญได้รวดเร็วที่สุดจะเป็นชนิดที่แสดงอาการเสื่อมเสียของอาหาร ปัจจัยที่กำหนดชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียเป็นอันตรกิริยาที่ซับซ้อนระหว่างชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน สภาวะแวดล้อมในการเก็บรักษาอาหารรวมทั้งในลักษณะทางเคมีกายภาพของอาหาร จากที่กล่าวมาสามารถแบ่งได้เป็น 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยภายใน (intrinsic factors) และปัจจัยภายนอก (extrinsic factors)

ปัจจัยภายใน ได้แก่ ปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ สารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ ค่า pH ของอาหารและคุณสมบัติในการต้านการเปลี่ยนแปลงของ pH (buffering capacity) ออกซิเดชัน-รีดักชันโพเทนเชียลของอาหารและความสามารถในการต้านการเปลี่ยนแปลงของรีดอกซ์ (poising capacity) ค่า a_w ของอาหารรวมทั้งกลไกการต้านทานจุลินทรีย์ ส่วนปัจจัยภายนอก ได้แก่ อุณหภูมิ

ที่เก็บรักษาอาหาร สภาพบรรยากาศที่ล้อมรอบอาหาร ความชื้นสัมพัทธ์และเวลา โดยปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นตัวกำหนดกลุ่มหรือชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสีย ตัวอย่างเช่น อาหารที่มีค่า a_w สูง และค่า pH สูงกว่า 5.0 มักจะเสื่อมเสียโดยแบคทีเรีย เนื่องจากสภาพดังกล่าวแบคทีเรียสามารถเจริญได้รวดเร็วกว่า ส่วนอาหารที่มีค่า pH ต่ำกว่า 4.2 มักจะเสื่อมเสียจากยีสต์และเชื้อราถึงแม้ว่าอาหารจะมีค่า a_w สูงก็ตาม

อันตรกิริยาระหว่างกลุ่มของจุลินทรีย์แต่ละชนิด พบว่าเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ ขณะที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งเจริญขึ้นมาในอาหาร ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในตัวของอาหารเองและสภาวะแวดล้อม โดยทำให้เกิดสภาวะหรือสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่ปนเปื้อนรวมอยู่ด้วย เรียกลักษณะนี้ว่า succession ตัวอย่างเช่น เมื่อตั้งแก้วที่บรรจุนมไว้ที่อุณหภูมิสูง (สูงกว่า 25°C) ในนมซึ่งมีค่า a_w ค่า pH ปริมาณสารอาหารและค่ารีดอกซ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์พวก aerobes facultative anaerobes และ lactobacilli ซึ่งเจริญได้ดีกว่าเชื้ออื่นๆ ในขณะเริ่มต้น แต่หลังจากนั้น streptococci จะเจริญขึ้นมาได้รวดเร็วกว่า โดยใช้แลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เกิดกรดแลกติก เมื่อค่า pH ของนมลดลง เชื้อพวก lactobacilli และยีสต์บางชนิดจะเจริญได้ดีขึ้นมาแทนที่จนค่า pH ลดลงไปที่ 3.8 และที่ผิวหน้าของนมที่สัมผัสกับอากาศ ทำให้เชื้อราสามารถเจริญได้และราที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนจะใช้โปรตีนในนมที่ตกตะกอนเป็นแหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจน ทำให้เกิดแอมโมเนียและนมมีค่า pH สูงขึ้นประมาณ 7.0 หรือสูงกว่าและเมื่อเชื้อราที่เจริญบนผิวหน้านมปิดคลุมจนอากาศไม่สามารถเข้ามาได้ ทำให้จุลินทรีย์พวก putrefactive anaerobes เจริญขึ้นมาและย่อยสลายโปรตีนต่อจนเกิดการเน่าเสียในลักษณะที่เรียกว่า putrefaction ทำให้มีกลิ่นเหม็นเน่าจากสารเคมีที่เชื้อนี้สร้างขึ้น

การเสื่อมเสียของอาหารบางครั้งอาจพบจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียในปริมาณที่ต่ำกว่าจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นๆ ตัวอย่างเช่น ในพลาสติกที่จับได้เขตนํ้าอุ่นและทะเลอาร์กติก ซึ่งพบว่า *Shewanella putrefaciens* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสีย โดยเจริญและสร้างสารประกอบกำมะถันชนิดต่างๆ แต่พบเชื้อนี้ขณะที่อาหารเสื่อมเสียเพียงร้อยละ 20 ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั้งหมดเท่านั้น การพิจารณาว่าจุลินทรีย์ชนิดใดเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารอาจทำได้โดยอาศัยหลักของ Koch (Koch's postulates) ดังนี้

1. แยกเชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่สงสัยว่าจะเป็นสาเหตุมาเพาะเลี้ยงและพิสูจน์เอกลักษณ์ในห้องปฏิบัติการ
2. นำเชื้อบริสุทธิ์ดังกล่าวเติมลงไปในการ
3. การเจริญของเชื้อที่เติมลงไป จะทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเช่นเดียวกันกับการเสื่อมเสียที่เคยเกิดขึ้น

ปัญหาที่พบในการใช้สมมติฐานดังกล่าว ได้แก่ การที่อาหารอาจถูกปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่นก่อนการเติมเชื้อต้องสงสัยลงไป จึงควรนำเชื้อที่มีอยู่ในอาหารดังกล่าวให้หมดเสียก่อน แต่การใช้ความร้อนหรือการฉายรังสี อาจทำให้สารเคมีต่างๆ ในอาหารนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลง และมีผลกระทบต่อกระบวนการเสื่อมเสีย ดังนั้น ในอาหารที่เป็นของแข็งอาจใช้วิธีการฆ่าเชื้อที่พื้นผิวโดยใช้สารเคมีที่เหมาะสม เช่น เอทานอลหรือไฮโปคลอไรต์ เป็นต้น

การเปลี่ยนแปลงของอาหารจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี เนื้อสัมผัส กลิ่น หรือรสชาติ หรือทั้งหมดที่กล่าวมา ในด้านลักษณะปรากฏโดยทั่วไปพบว่ามี 2 ลักษณะ ได้แก่ การที่มีเชื้อราเจริญปกคลุม และการเกิดเมือกหรือน้ำเยิ้มบนผิวหน้าอาหารโดยแบคทีเรีย ในส่วนของการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร เช่น สีของสเปร์หรือเส้นใยของเชื้อรา ส่วนใหญ่ได้แก่ สีเขียว ดำ หรือ แดง แบคทีเรียอาจเจริญและทำให้อาหารมีสีเปลี่ยนไป เช่น สีแดง ในเซลล์ของ *Halobacterium salinarum* ซึ่งทำให้ปลาเค็มเสื่อมเสีย และแบคทีเรียบางชนิดอาจสร้างสารสีที่ละลายน้ำได้และทำให้อาหารเปลี่ยนแปลง เช่น *Pseudomonas fluorescens* ที่สร้างสารสีเขียวบนเนื้อสัตว์ปีก เป็นต้น ลักษณะของสีที่เกิดขึ้นในอาหารอาจนำมาใช้เป็นลักษณะของการเสื่อมเสียที่เฉพาะ เช่น การเกิดสีเขียวในไข่ (green rot) จาก *Pseudomonas fluorescens* และการเกิดจุดดำในเนื้อสัตว์แช่แข็งโดย *Rhizopus* spp.

จุลินทรีย์บางชนิดทำให้สารประกอบต่างๆ ในอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้อาหารเกิดสีที่เปลี่ยนไป เช่น การเกิดสีดำในไข่เนื่องจากการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์โดย *Proteus* spp. การเกิดสีเขียวในผลิตภัณฑ์เนื้อแปรรูปจากปฏิกิริยาเคมีเนื่องจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์หรือไฮโดรเจนซัลไฟด์และฮีโมโกลบินโดยพวก *Lactobacilli* และจุลินทรีย์อื่นๆ นอกจากนั้นเชื้อราบาง

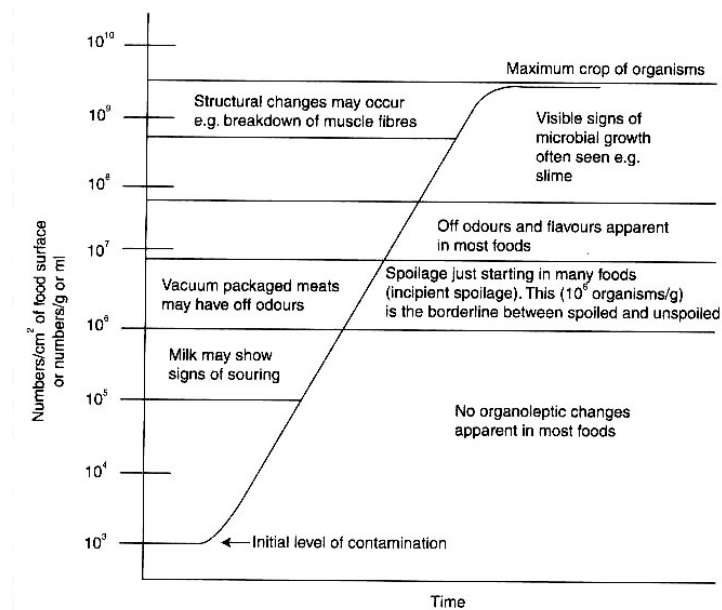
ชนิด เช่น *Sclerotinia fructigena* สร้างเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) และทำให้เนื้อเยื่อพืช เช่น แอปเปิ้ลเกิดสีน้ำตาลขึ้นได้

การเจริญของจุลินทรีย์ที่มีผลทำให้เนื้อสัมผัสอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืช เช่น การสร้างเอนไซม์เพคตินเนส (pectinase) ซึ่งย่อยสลายแคลเซียมเพคเตท (calcium pectate) ที่เชื่อมเซลล์พารენไคมา (parenchyma cells) เข้าด้วยกันในเนื้อเยื่อพืช ทำให้อ่อนนุ่มและละลายในที่สุด ส่วนในมันฝรั่งเกิดจาก *Erwinia carotovora* และในผลไม้ตระกูลส้มโดย *Penicillium citrinum* ส่วนแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อสัตว์นุ่มและในระหว่างการเสื่อมเสียได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* ที่สร้างเอนไซม์โปรตีนเอส

กลิ่นและรสชาติของอาหารที่เปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ที่เจริญและสร้างสารเคมีชนิดต่างๆ จากเมตาโบลิซึม ทำให้อาหารไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เช่น การย่อยสลายกรดอะมิโนและโปรตีนทำให้ได้สารเอมีน (amines) แอมโมเนีย ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และสารประกอบซัลเฟอร์อื่นๆ อินโดล (indole) รวมทั้งกรดไขมัน เป็นต้น

การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์ทำให้เกิดกรดชนิดต่างๆ เช่นกรดแลกติก อัลดีไฮด์ เอทานอล เอสเทอร์ ไดอะเซทิล (diacetyl) และคาร์บอนไดออกไซด์

การย่อยสลายไขมันโดยจุลินทรีย์ ทำให้ได้กรดไขมันและอาหารเกิดการหืน (microbial rancidity) นอกจากนั้นเซลล์ของจุลินทรีย์ที่แตกตัวทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ดังกล่าวทำการย่อยสลายสารอาหารและเกิดกลิ่นและเนื้อสัมผัสเฉพาะที่เป็นที่ต้องการในอาหารบางชนิดเช่น เนยแข็ง และในส่วนของผู้ที่สร้างคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดความรู้สึกซ่าที่บริเวณลิ้น เช่น ที่เกิดในโยเกิร์ต เป็นต้น ปริมาณของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร แสดงดังภาพที่ 37



ภาพที่ 37 ปริมาณการเจริญของจุลินทรีย์ที่สัมพันธ์กับการเสื่อมเสียของอาหารชนิดต่างๆ
ที่มา : Garbutt (1997)

จากภาพที่ 37 จะเห็นว่าปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียอยู่ที่ประมาณ 10^9 เซลล์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรหรือตารางเซนติเมตร (ของผิวหน้าอาหาร) โดยลักษณะการเสื่อมเสียที่เกิดขึ้นก่อนที่จุลินทรีย์มีปริมาณสูงระดับนี้คือ การเกิดกลิ่นและรสชาติที่ผิดปกติ (off odour/flavor) ซึ่งเกิดขณะที่จุลินทรีย์มีปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตรหรือตารางเซนติเมตร และโดยทั่วไปใช้ปริมาณจุลินทรีย์ที่ระดับนี้เป็นจุดตัดสินว่าอาหารเกิดการเสื่อมเสียขึ้น

ผลของกระบวนการแปรรูปอาหารต่ออัตราการเสื่อมเสียและประเภทการเสื่อมเสียของอาหาร

การเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร อาจเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ จากสิ่งแวดล้อมในการผลิตรวมทั้งการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสียที่ปนเปื้อนอยู่เดิมหรือทั้งสองกรณีร่วมกัน โดยมีสาเหตุจากการประกอบอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะและขาดกระบวนการควบคุมการผลิตที่ดี

ตัวอย่างเช่น ในกระบวนการผลิตเนื้อบด (minced beef) ซึ่งเดิมซากสัตว์จะถูกป่นเปื้อน โดย จุลินทรีย์พวกไซโครไฟล์จากดิน น้ำและมูลสัตว์ นอกจากนั้นอาจมีที่มาจากภาชนะที่ใช้ในการผลิต เช่น ตู้แช่เย็น หรืออุปกรณ์ที่ใช้ตัดแต่งรวมทั้งจากอากาศ จึงต้องมีการควบคุมอุณหภูมิขณะตัดแต่งซาก หรือขณะแช่เย็นให้คงที่และต่ำ ซึ่งจะมีผลอย่างมากต่ออายุการเก็บรักษาของเนื้อสัตว์

กระบวนการแปรรูปอาหารทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ หลังจากการแปรรูปอาหารแล้ว การปนเปื้อนภายหลังอาจเกิดขึ้นได้อีกทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร ตัวอย่างเช่น ในน้ำมันพาสเจอร์ไรส์ที่ใช้อุณหภูมิที่ไม่สูงมากในการทำลายพวกไซโครไฟล์ชนิดแกรมลบที่ทำให้น้ำมันแช่เย็นเสื่อมเสียที่อุณหภูมิแช่เย็น โดยจุลินทรีย์ประเภทนี้อาจปนเปื้อนเข้ามาได้อีกภายหลังจากการให้ความร้อน เช่น ผิดมากับขวดกับภาชนะบรรจุ หรือในส่วนของน้ำมัน UHT ที่อาจเกิดการปนเปื้อนขณะบรรจุ โดยเชื้อที่ปนเปื้อนภายหลังอาจมีความแตกต่างจากเชื้อเดิมซึ่งปนเปื้อนก่อนการให้ความร้อนเช่นจาก *Micrococcus* spp. ที่มีอยู่ในอากาศจะสามารถปนเปื้อนลงไปนมในขั้นตอนการบรรจุ และจะย่อยสลายโปรตีนนมทำให้เนื้อสัมผัสและกลิ่นรสผิดปกติ

การเปลี่ยนแปลงของปัจจัยภายในและนอกของอาหาร ในระหว่างกระบวนการแปรรูปมีผลทำให้ประเภทการเสื่อมเสียและชนิดของจุลินทรีย์แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การหมักน้ำมันในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต ทำให้น้ำมันมีค่า pH ลดลงจากเดิม 6.8 เหลือ 3.8 - 4.2 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ดังกล่าว ทำให้โยเกิร์ตมีโอกาสที่จะเสื่อมเสียจากยีสต์และเชื้อรามากกว่าแบคทีเรียและมีรูปแบบที่แตกต่างออกไป

ในเนื้อสัตว์ที่บรรจุในสภาพดัดแปลงบรรยากาศของไนโตรเจน ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์และเก็บรักษาโดยการแช่เย็น พบว่าจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์นี้เสื่อมเสียได้แก่ พวกแบคทีเรียแลคติกซึ่งทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติเปรี้ยว ในขณะที่เนื้อสัตว์ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องจะเสื่อมเสียจากพวกแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งและทำให้เกิดกลิ่นเหม็น (putrid)

การเสื่อมเสียของอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ

เนื้อสัตว์

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์มีแหล่งที่มาจากผิวหนังสัตว์และทางเดินอาหาร ซึ่งมีทั้งจุลินทรีย์ปกติที่อาศัยและที่ปนเปื้อนมาจากสิ่งแวดล้อมได้แก่ มูลสัตว์ ดิน และอาหารสัตว์ ในระหว่างกระบวนการแปรรูปจะมีการปนเปื้อนเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะขั้นตอนการลอกหนังและการควักไส้ แหล่งปนเปื้อนอื่น ๆ ที่สำคัญได้แก่ จากโรงฆ่าสัตว์ และอุปกรณ์หรือเครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการแปรรูป

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เนื้อสัตว์เสื่อมเสียได้แก่ pseudomonads แบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae รวมทั้ง lactobacilli *Brochothrix thermosphacta* และ *Shewanella putrefaciens*

ปัจจัยภายในและภายนอกที่มีผลต่อการเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ ได้แก่ ปริมาณสารอาหาร ค่า a_w ค่า pH ค่ารีดอกซ์และอุณหภูมิที่เก็บรักษา ในส่วนของปริมาณสารอาหารนั้นเนื้อสัตว์จัดว่าเป็นแหล่งอาหารที่ค่อนข้างสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ เนื้อสัตว์มีของแข็งที่ละลายได้ประมาณร้อยละ 3.5 โดยน้ำหนัก ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสร้อยละ 0.01 กรดอะมิโนร้อยละ 0.35 นิวคลีโอไทด์ วิตามินและเกลืออนินทรีย์ รวมทั้งแร่ธาตุปริมาณเล็กน้อย ส่วนโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำและไขมันมีประมาณร้อยละ 18.0 และ 3.0 ตามลำดับ

เนื้อสัตว์มีค่า a_w ค่อนข้างสูงประมาณ 0.99 ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ ส่วนค่า pH ของเนื้อสัตว์มีค่าประมาณ 7.0 หลังจากการฆ่าพบว่าเนื้อสัตว์มีค่า pH ลดลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีจากไกลโคเจน ทำให้เกิดกรดแลกติกสะสมอยู่ในเนื้อสัตว์

ปริมาณของกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นจนกว่าไกลโคเจนจะถูกนำมาใช้หมด ค่า pH สุดท้ายของเนื้อสัตว์จะขึ้นกับปริมาณของไกลโคเจนที่มีอยู่ภายหลังสัตว์ถูกฆ่า เนื้อสัตว์ปกติที่มีคุณภาพดีจะมีค่า pH สุดท้ายระหว่าง 5.4 - 5.6 แต่ถ้าสัตว์เครียด ออกแรงมากก่อนถูกฆ่า ทำให้ไกลโคเจนที่สำรองถูกใช้หมด เป็นผลให้เกิดกรดแลกติกในปริมาณต่ำ เนื้อสัตว์ที่ได้จะมีคุณภาพไม่ดีโดยจะมีสีคล้ำและมีค่า pH สุดท้าย สูงกว่า 6.0

การรีดอกซ์ที่ผิวหนังของเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ห่อหุ้มหรือห่อหุ้มด้วยฟิล์มที่ยอมให้ออกซิเจนซึมผ่าน (oxygen permeable film) มีค่าประมาณ +200 มิลลิโวลต์ ซึ่งจะสนับสนุนการเจริญของทั้งจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการอากาศ (obligate aerobes) และพวกที่เจริญได้ในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) ส่วนอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาเนื้อสัตว์ พบว่าที่อุณหภูมิห้อง เนื้อสัตว์จะเสื่อมเสียอย่างรวดเร็ว ขณะที่การแช่เย็นจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ให้นานยิ่งขึ้นและอุณหภูมิแช่เย็นที่สูงสุดที่ใช้เก็บรักษาเนื้อสัตว์โดยไม่แช่แข็งคือที่ -1.5°C

การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ที่เก็บรักษาโดยการแช่เย็น

ที่อุณหภูมิแช่เย็นนั้น จุลินทรีย์พวกไซโครไฟล์จะเจริญได้ดีกว่าพวกอื่นๆ ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas* spp. โดยเฉพาะ *Ps. fluorescens* และ *Ps. fragii* การเสื่อมเสียที่เกิดขึ้นคือกลิ่นและรสชาติที่ผิดปกติ หลังจากที่ถูกโคสซึ่งแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ถูกใช้หมดลง จุลินทรีย์จะเปลี่ยนมาใช้กรดอะมิโนแทน ทำให้เกิดลักษณะที่ผิดปกติดังกล่าว ซึ่งสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นได้แก่ ไดเมทิลซัลไฟด์ (dimethyl sulfide) มีเทนไธออล (methane thiol) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ รวมทั้งแอมโมเนีย เอมีนและอินโดล จะทำให้ค่า pH สูงขึ้นประมาณ 8.0 และเมื่อปริมาณของเชื้อมีมากขึ้นจนถึงประมาณ 10^8 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรหรือกรัม พบว่าเนื้อสัตว์จะเกิดเมือกที่พื้นผิวหน้าในส่วน of เนื้อสัตว์ที่มีค่า pH ที่สูงกว่า และมีปริมาณกลูโคสต่ำกว่าพบว่าจุลินทรีย์เจริญได้ดีกว่าและปริมาณของจุลินทรีย์ที่ผิวหนัง พบว่าเมื่อจุลินทรีย์หันมาใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งคาร์บอน จะมีปริมาณต่ำกว่าในเนื้อสัตว์ที่มีคุณภาพดี (ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตรหรือกรัม) ทำให้เกิดลักษณะการเสื่อมเสียได้รวดเร็วกว่าหรือมีอายุการเก็บรักษาที่สั้นกว่า

ในเนื้อสัตว์ที่เก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิแช่เย็น ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสียเจริญได้ดีขึ้น เนื้อสัตว์ปกติที่อุณหภูมิประมาณ 20-30°C มีอายุการเก็บรักษานาน 1 วัน โดยพวกไซโครไฟล์จะเจริญได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่นๆ จนถึงระดับอุณหภูมิประมาณ 25°C แต่ที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่านี้จะพบพวกมีโซไฟล์ ตระกูล Enterobacteriaceae และ *Acinetobacter*

การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์แช่เย็นที่บรรจุในสภาพดัดแปลงบรรยากาศและในสภาพสุญญากาศ

จุลินทรีย์ปกติที่ทำให้เนื้อสัตว์เสื่อมเสียโดยทั่วไปถูกยับยั้งในบรรยากาศที่มีการบั่นไดออกไซด์ในปริมาณสูงและในสภาพไร้ออกซิเจนโดยการบรรจุแบบสุญญากาศ ลักษณะของการเสื่อมเสียจะขึ้นอยู่กับสัญลักษณ์การผลิตก่อนบรรจุ รวมทั้งค่า pH ของเนื้อสัตว์ ในเนื้อสัตว์ที่มีคุณภาพดีและมีค่า pH ต่ำพบว่าพวก lactobacilli จะเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ ทำให้เกิดกลิ่นรสเปรี้ยว ในเนื้อสัตว์ที่มีค่า pH สูงและบรรจุแบบสุญญากาศ พบว่ามีอายุการเก็บรักษาที่สั้นกว่ามาก โดยมีลักษณะกลิ่นเหม็นเน่ารุนแรงเนื่องจากไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่สร้างโดย *Shewanella putrefaciens* และพวกไซโครโทรปตระกูล Enterobacteriaceae

การเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ที่เก็บรักษาในสภาวะดัดแปลงบรรยากาศ พบว่าขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของแก๊สที่ใช้ โดยเฉพาะความเข้มข้นของการบั่นไดออกไซด์ ที่ความเข้มข้นของการบั่นไดออกไซด์สูงกว่าร้อยละ 50.0 พบว่าพวก lactobacilli จะเจริญได้ดีขณะที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้พบว่า *Brochothrix thermosphacta* จะเจริญได้ดี และกรณีที่เนื้อสัตว์มีค่า pH สูง พบว่าเชื้อ *Shewanella* และไซโครโทรปตระกูล Enterobacteriaceae จะเจริญได้ดีกว่าพวกอื่นๆ

การเสื่อมเสียของ cured meat

การเสื่อมเสียของ cured meat ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ ค่า pH ของเนื้อสัตว์ก่อนนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ ค่า a_w ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของเกลือที่ใช้และระดับของการทำแห้ง สารไนไตรท์ที่ใช้ การรมควัน เชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้น สภาพบรรยากาศที่เก็บรักษาและการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ

ผลิตภัณฑ์ cured meats ที่มีการใช้ hurdles หลายอย่างทำให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน และทนต่อการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ เช่น เบคอนที่บรรจุสภาพสุญญากาศและเก็บรักษาโดยการแช่เย็น ผลิตภัณฑ์ที่มีค่า a_w ต่ำ เช่น country cured ham อาจเสื่อมเสียจากเชื้อราเจริญบนผิวหน้า ส่วนเบคอนและแฮมที่ใช้ปริมาณเกลือต่ำและเก็บที่อุณหภูมิแช่เย็นทั้งชนิดรมควันและไม่รมควัน มักเสื่อมเสียจาก lactobacilli และที่อุณหภูมิห้องจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้เสื่อมเสียได้แก่ micrococci lactobacilli pediococci หรือ leuconostocs โดยทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติเปรี้ยว

นํ้านม

นํ้านมดิบมีจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหลายชนิด ได้แก่ micrococci streptococci และ corynebacteria โดยมีที่มาจากตัวแม่โคเอง รวมทั้งจากแหล่งอื่นๆ เช่น ดิน นํ้า อาหารสัตว์ และมูลสัตว์ จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากแหล่งต่างๆ เหล่านี้แบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่

1. พวกแกรมลบรูปแท่ง เช่น *Pseudomonas* *Alcaligenes* *Acinetobacter* และ *Flavobacterium*
2. จุลินทรีย์ตระกูล Enterobacteriaceae
3. แบคทีเรียแตกคอก เช่น *Streptococcus* *Lactococcus* และ *Leuconostoc*
4. ยีสต์และเชื้อรา

ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในนํ้านมจะขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงโค (ตัวอย่างเช่น นํ้านมที่ได้จากแม่โคที่เลี้ยงด้วยไซเลจ (silage) พบว่านํ้านมมีการปนเปื้อนของ *Clostridium* ในปริมาณที่สูง) สถานที่เลี้ยงแม่โค รวมทั้งวิธีการและสภาวะในการรีदनํ้านม ในระบบรีदनํ้านมที่ทันสมัยนั้นจะเป็นระบบปิดและแหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนคืออุปกรณ์ที่ใช้รีदनํ้านม ในนํ้านมที่มีคุณภาพดีจะมีปริมาณจุลินทรีย์ประมาณ 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ในสภาวะที่ไม่ถูกสุขลักษณะนํ้านมอาจปนเปื้อนจากจุลินทรีย์สูงถึง 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ปัจจัยภายในและภายนอกที่มีผลต่อการเสื่อมเสียของนํ้านม ได้แก่ ปริมาณสารอาหารในนํ้านมซึ่งมีปริมาณของกรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ วิตามิน กลีโกลินทรีย์และแร่ธาตุต่างๆ ที่

สมบูรณ์เช่นเดียวกับเนื้อสัตว์ อย่างไรก็ตามกลูโคสที่มีอยู่ปริมาณเล็กน้อย รวมทั้งน้ำตาลแลกโตส นั้นมีเพียงจุลินทรีย์บางชนิดที่นำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้

น้ำนมมีค่า a_w สูงประมาณ 0.98 จึงเหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ นอกจากนั้นน้ำนมมีค่า pH ประมาณ 6.6 และค่ารีดอกซ์ประมาณ +200 มิลลิโวลต์ และมีระบบต่อต้าน จุลินทรีย์เช่น ระบบ lactoperoxidase/thiocyanate/hydrogen peroxide ซึ่งสร้างได้โดยการเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ปริมาณเล็กน้อยลงไปในน้ำนม เพื่อกระตุ้นระบบดังกล่าวและการเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นวิธีที่ช่วยลดจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียที่ให้ผลดี

ในส่วนของอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาน้ำนม พบว่า การแช่เย็นจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมได้ดี การควบคุมอุณหภูมิน้ำนมให้ต่ำประมาณ 7°C และคงที่ตลอดเวลาระหว่างการขนส่งจนถึงโรงงานแปรรูป จะช่วยรักษาคูณภาพน้ำนมไว้ได้ ส่วนผลิตภัณฑ์นมควรเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 - 4 °C

การเสื่อมเสียของน้ำนมดิบ

น้ำนมดิบที่เก็บรักษาโดยการแช่เย็นมักเสื่อมเสียจากไซโครไฟล์ เช่น *Pseudomonas* โดยเฉพาะ *Pseudomonas fluorescens* โดยทำให้เกิดกลิ่นรสและรสชาติที่ผิดปกติ เช่น กลิ่นคล้ายโลหะ (metallic) กลิ่นไม่สะอาด (unclean) รสขม และเกิดการเน่าเสียเนื่องจากการย่อยสลายกรดอะมิโน และเมื่อ *Pseudomonas* เพิ่มปริมาณจนถึง 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรหรือสูงกว่านี้ จะสร้างเอนไซม์ไลเปสและโปรตีนสที่ทนต่อความร้อนและทำให้มีผลต่อผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ใช้น้ำนมนี้ในการผลิต เช่น การเกิดกลิ่นหืนในเนยแข็งเชดดาร์ที่เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 2 - 4 เดือน การเกิดเจลและย่อยสลายเคซีนในน้ำนม UHT รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงเวลาในการตกตะกอนและความแข็งของเนยแข็ง ซึ่งทำให้ลดปริมาณผลผลิตลง กรณีที่เก็บน้ำนมไว้ที่อุณหภูมิสูงประมาณ 25°C พบว่าพวกมีซิโอฟิลจะเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว พวกที่หมักแลกโตสได้ เช่น streptococci lactobacilli และ Enterobacteriaceae จะสร้างกรดแลกติกจากแลกโตส ทำให้น้ำนมเปรี้ยวและตกตะกอนโดยการแยกชั้นของตะกอนน้ำนม (curd) และเวย์ (whey)

การเสื่อมเสียของนํ้านมพาสเจอไรส์

กระบวนการพาสเจอไรส์เป็นการทำลายจุลินทรีย์แกรมลบที่เป็นสาเหตุทำให้นํ้านมดิบเสื่อมเสีย แต่การปนเปื้อนภายหลังของจุลินทรีย์แกรมลบรูปแท่งระหว่างขั้นตอนการบรรจุเป็นสาเหตุให้นํ้านมที่ผ่านการพาสเจอไรส์และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิแช่เย็นเกิดการเสื่อมเสีย นํ้านมพาสเจอไรส์ที่ค้างทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องมักเกิดการเปรี้ยว เนื่องจากพวกมิโซไฟล์ที่รอดชีวิตจากกระบวนการให้ความร้อนหรือจากการปนเปื้อน เช่น *Streptococcus thermophilus* ส่วนนํ้านมพาสเจอไรส์ที่บรรจุในสภาพไร้เชื้ออาจเสื่อมเสียจาก *Bacillus* spp. ที่รอดชีวิตจากการให้ความร้อน เช่น *Bacillus circulans* และ *Bacillus sphaericus* ซึ่งทำให้เกิดนํ้านมมีรสขมและโปรตีนตกตะกอนเนื่องจากเอนไซม์ที่สร้างขึ้น

การเสื่อมเสียของผลไม้และผัก

ผลไม้และผักที่นำมาบริโภคมักเสื่อมเสียเนื่องจากโรคที่เกิดจากไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา ทำให้ผลผลิตลดลงอย่างมาก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักเป็นพวกพาราไอซ์ต์ที่ต้องอาศัยอยู่กับเซลล์ของผักและผลไม้หรือโฮสต์ และพร้อมที่จะเข้าทำลายเนื้อเยื่อปกติ นอกจากนั้นจุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถเจริญต่อได้ภายหลังจากการเก็บเกี่ยวและทำให้ผลิตผลเสียหายได้ เช่นพวกที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเพกติน เช่นเพกตินเอส (pectinase) ทำให้ผลไม้และผักอ่อนนุ่มและเน่าละในที่สุด โดยเรียกการเสื่อมเสียประเภทนี้ว่า rots ในส่วนของผักที่มีค่า pH ระหว่าง 5.0 และ 6.5 จะง่ายต่อการเสื่อมเสียเนื่องจากแบคทีเรียและเชื้อรา และสำหรับผลไม้ซึ่งส่วนใหญ่มีค่า pH ที่ต่ำกว่า มักจะเสื่อมเสียเนื่องจากเชื้อรา

การเสื่อมเสียภายหลังการเก็บเกี่ยว

ในผัก ยกตัวอย่างเช่น มันฝรั่ง ที่เสื่อมเสียจาก *Erwinia* โดยภายในเซลล์ของมันฝรั่งที่ปกติจะมีชั้นเพอริเดิร์มชั้นนอก (outer periderm) หรือชั้นคอร์ก (cork layer) ซึ่งป้องกันจุลินทรีย์และป้องกันการสูญเสียของน้ำออกสู่ภายนอก โดยมีสารกันน้ำ (water proof substance) เรียกว่า ซูเบอร์ิน (suberin)

มันฝรั่งที่เก็บเกี่ยวจากไร่ จะถูกปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ รวมทั้ง *Erwinia carotovora* ที่ทำให้เกิด soft rot โดยเชื่อกันว่าจะแทรกตัวผ่านพื้นผิวที่ถูกตัดและสร้างเอนไซม์ เพคตินเอสซึ่งทำให้เนื้อเยื่อของมันฝรั่งอ่อนนุ่มและเละ นอกจากนั้นสารละลายที่รั่วไหลออกมาจาก ส่วนที่เน่าเสียซึ่งมีปริมาณเชื้อนี้มาก จะสามารถปนเปื้อนไปยังมันฝรั่งหัวอื่นๆ และทำให้เสื่อมเสีย เกิดต่อเนื่องไปอีกได้ อุณหภูมิที่สูงจะเร่งกระบวนการเสื่อมเสียให้เกิดได้ดีขึ้น การเสื่อมเสียของ หัวมันฝรั่งจะสามารถป้องกันได้โดย

1. ระวังไม่ให้หัวมันฝรั่งเกิดบาดแผล ซึ่งจะเพิ่มโอกาสการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ให้สูงขึ้น
2. ต้องมั่นใจว่าหัวมันฝรั่งแห้งสนิทหลังจากล้างก่อนนำไปเก็บรักษา
3. เก็บรักษามันฝรั่งที่อุณหภูมิระหว่าง 3.3 - 12.8 °ซ
4. เก็บรักษามันฝรั่งภายใต้สภาวะที่มีการถ่ายเทและป้องกันการกลั่นตัวเป็นหยดน้ำ
5. บรรจุมันฝรั่งในถุงกระดาษหรือถุงพลาสติกโพลีธิน (polythene) เจาะรู เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้นบริเวณผิวหน้าของหัวมันฝรั่ง

ผลไม้

ตัวอย่างการเสื่อมเสียของผลไม้บางชนิดแสดงดังตารางที่ 25 และการป้องกันการเสื่อมเสียของผลไม้ภายหลังการเก็บเกี่ยวทำได้โดย

1. เก็บเกี่ยวผลไม้ที่ระยะการแก่ที่เหมาะสม
2. คัดแยกผลไม้ที่มีเชื้อราหรือมีบาดแผลออกจากส่วนที่ดี
3. ใช้วิธีการเก็บเกี่ยวที่ไม่รุนแรงและทำให้ผลไม้ไม่เกิดการเสียหาย
4. ใช้สารฆ่าเชื้อรา (fungicides) เช่น เบนโนมิล (benomyl) ที่ใช้เคลือบผลไม้หรือไบเฟนิล (biphenyl) ที่ผสมรวมกับกระดาษที่ใช้ห่อหุ้มหรือแคปแทน (captan) ที่ใช้สเปรย์ก่อนการเก็บเกี่ยว
5. ลดอุณหภูมิและเก็บรักษาในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณที่เหมาะสมกับชนิดของผลไม้

ตารางที่ 25 เชื้อราที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของผลไม้บางชนิด

ผลไม้	เชื้อรา	ลักษณะการเสื่อมเสีย
แอปเปิ้ล	<i>Monilia fructigena</i> (<i>Sclerotinia fructigena</i>)	brown rot
ผลไม้ตระกูลส้ม	<i>Penicillium expansum</i>	blue mould rot
	<i>Penicillium italicum</i>	blue mould rot
	<i>Penicillium digitatum</i>	green mould rot
สตอเบอรี่	<i>Botrytis cinerea</i>	grey mould rot
มะเขือเทศ	<i>Alternaria tenuis</i>	Black rot

ที่มา : คัดแปลงจาก Garbutt (1997)

การเสื่อมเสียของอาหารบรรจุกระป๋อง

สาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารบรรจุกระป๋องอาจเกิดจากการให้ความร้อนที่ไม่เหมาะสม การรอดชีวิตของแบคทีเรียพวกเทอร์โมไฟล์และการรั่วของกระป๋องหรือภาชนะบรรจุ

ในกระบวนการผลิตอาหารกระป๋องปัจจุบัน พบว่ามีการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากสาเหตุการให้ความร้อนไม่เพียงพอที่มีโอกาสเกิดขึ้นน้อย เนื่องจากความร้อนในระดับไม่สูงมากจะสามารถทำลายเซลล์ปกติของแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เป็นต้นเหตุของการเสื่อมเสียเนื่องจากสาเหตุนี้คือพวกมีโซไฟล์ชนิดที่สร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อน เช่น *Clostridium sporogenes* โดยลักษณะการเสื่อมเสียที่เกิดขึ้น เช่น ทำให้อาหารมีกลิ่นเน่าเหม็น และสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ทำให้กระป๋องบวมหรือระเบิดขึ้นได้ ในอาหารที่มีความเป็นกรดเช่น มะเขือเทศบรรจุกระป๋อง อาจเสื่อมเสียจาก *Bacillus coagulans* ซึ่งทำให้อาหารมีกลิ่นรสเปรี้ยวแต่กระป๋องไม่เกิดการบวม ในผลไม้บางชนิด เช่น แอปเปิ้ล (pear) อาจเสื่อมเสียจากเชื้อรา *Byssoschlamys fulva* เนื่องจากสปอร์ของเชือรอดชีวิตจากการฆ่าเชื้อ เมื่อก่อเป็นเซลล์ปกติจะสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเพคตินทำให้เนื้อผลไม้อ่อนนุ่มและเน่าเละในที่สุด

การรอดชีวิตของแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์

ในอาหารบรรจุกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ เช่น ถั่วพี (peas) อาจเสื่อมเสียจากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ เช่น *Bacillus stearothermophilus* ที่รอดชีวิตจากการให้ความร้อน โดยทำให้อาหารมีกลิ่นรสเปรี้ยว เนื่องจากกรดแลกติกที่สร้างขึ้นแต่ไม่สร้างแก๊ส เชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37°C ดังนั้น อาหารบรรจุกระป๋องอาจเสื่อมเสียจากเชื้อนี้ได้ ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานาน หรือเกิดขณะที่ให้อาหารบรรจุกระป๋องเย็นลงหลังจากผ่านการให้ความร้อน ดังนั้นในกระบวนการฆ่าเชื้อจะต้องทำให้กระป๋องเย็นลงทันทีหลังจากฆ่าเชื้อแล้ว การป้องกันการเจริญของเชื้อดังกล่าวอาจทำได้โดยการสารเติมไนซิน (nicin) ที่ยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อนี้ได้

การเสื่อมเสียของอาหารบรรจุกระป๋องเนื่องจากการรั่วของภาชนะบรรจุ เป็นสาเหตุที่พบโดยทั่วไป หลังจากอาหารบรรจุกระป๋องผ่านกระบวนการให้ความร้อนมาแล้วและทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว จะทำให้เกิดสภาวะสุญญากาศภายในกระป๋องขึ้น และอาจดูน้ำที่ซึมเข้ามาภายในตัวกระป๋องได้โดยผ่านตรงรูวาล์วบริเวณรอยต่อหรือตะเข็บของกระป๋อง ในกรณีที่น้ำหล่อเย็นมีการปนเปื้อนของเชื้อ จะทำให้อาหารบรรจุกระป๋องดังกล่าวเสื่อมเสียขึ้นได้จากการปนเปื้อนภายหลังจากให้ความร้อนแก่อาหาร ซึ่งสามารถพบจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียได้หลากหลายชนิด โดยทั่วไปลักษณะเสื่อมเสียที่พบคือกระป๋องเกิดการบวมเนื่องจากการสร้างแก๊ส รวมทั้งอาหารมีกลิ่นเหม็น

ระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำที่หล่อเย็นอาหารบรรจุกระป๋องภายหลังจากการฆ่าเชื้อเป็นจุดที่สำคัญจุดหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง การเติมคลอรีนในน้ำดังกล่าวให้มีปริมาณคลอรีนที่เหลืออยู่ที่ความเข้มข้น 5 ส่วนในล้านส่วน จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนดังกล่าวได้ ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการเสื่อมเสียเนื่องจากการรั่วของกระป๋องที่ใช้บรรจุได้แก่

1. การบรรจุอาหารน้อยเกินไป ทำให้เพิ่มพื้นที่บริเวณผิวหน้าของอาหารภายในกระป๋องให้มากขึ้น เกิดความเป็นสุญญากาศเพิ่มขึ้นและโอกาสที่น้ำจะเข้าไปภายในกระป๋องจึงมีมากขึ้นไปด้วย
2. ประสิทธิภาพของการปิดผนึก
3. ของเหลวที่อยู่ตรงบริเวณตะเข็บสองชั้น ซึ่งจุลินทรีย์จะสามารถผ่านเข้าภายใน

กระป๋องโดยผ่านสารนี้ได้ ดังนั้นจึงต้องทำให้กระป๋องทั่วทุกส่วนแห้งสนิทก่อน

4. การขนส่ง โดยเฉพาะการขนส่งที่มีการกระแทกอย่างรุนแรง อาจทำให้ตะเข็บเกิดการรั่วและเป็นทางเข้าของจุลินทรีย์ได้

5. สุขลักษณะของระบบการขนส่งอาหารบรรจุกระป๋อง โดยระบบการขนส่งอาหารบรรจุกระป๋องที่ไม่ถูกสุขลักษณะจะเพิ่มโอกาสการปนเปื้อนจุลินทรีย์ให้มากขึ้น

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนภายหลัง อาจเกิดจากเชื้อต่าง ๆ เช่น *Clostridium botulinum* type E ในปลาแชลมอนบรรจุกระป๋อง *Salmonella typhi* ในคอร์นบีฟบรรจุกระป๋อง และ *Staphylococcus aureus* ในถั่วพื้บรรจุกระป๋อง เป็นต้น

บทที่ 9

โรคอาหารเป็นพิษและความเป็นพิษของอาหาร

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์

คำจำกัดความของการเกิดโรคคือ การเปลี่ยนแปลงที่ทำให้เนื้อเยื่อและ/หรือเมตาโบลิซึมของพืช สัตว์ หรือมนุษย์เกิดอันตราย โดยเกิดอาการลักษณะต่างๆ หรือการเจ็บป่วยขึ้น จุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อรา ไวรัส และโปรโตซัว ที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ เรียกว่า เชื้อโรค (pathogens)

โดยทั่วไปจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เกาะติดหรืออาศัยอยู่บนผิวหนังหรือช่องเปิดของอวัยวะต่างๆ ของมนุษย์โดยเฉพาะแบคทีเรียและยีสต์บางชนิด ซึ่งรวมเรียกว่า ไมโครฟลอรา (microflora) จุลินทรีย์เหล่านี้จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่มนุษย์และบางครั้งบางชนิดอาจเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของร่างกาย ตัวอย่างเช่น ไมโครฟลอราจะช่วยทำลายเชื้อโรคโดยการแย่งพื้นที่การเจริญและสารอาหารรวมทั้งอาจสร้างสารปฏิชีวนะ เช่น ภายในลำไส้ที่พบ *Escherichia coli* หลายสายพันธุ์ที่ช่วยป้องกันการเจริญของพวก *Salmonella* spp. ได้ นอกจากนั้นแบคทีเรียบางชนิดที่อาศัยอยู่ในลำไส้ อาจช่วยสังเคราะห์วิตามินเคที่ร่างกายมนุษย์นำไปใช้ประโยชน์ได้

โดยปกติร่างกายของมนุษย์จะถูกปกป้องจากจุลินทรีย์อื่น ๆ นอกเหนือจากจุลินทรีย์ที่อาศัยประจำบนร่างกาย แต่ส่วนใหญ่จุลินทรีย์ดังกล่าวไม่ใช่เชื้อโรค ในขณะที่เชื้อโรคต่าง ๆ ที่ผ่านเข้าไปภายในเซลล์ของร่างกายอาจเจริญและสร้างสารพิษ (toxins) ขึ้น ซึ่งสารพิษดังกล่าวเป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อและสรีระของมนุษย์ สารพิษส่วนใหญ่เป็นโปรตีน บางครั้งถูกสร้างขึ้นและปลดปล่อยออกภายนอกเซลล์ เช่น เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่สร้างโดย *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์และทำให้เกิดอาการของโรคขึ้นได้โดยไม่ต้องมีเชื้อดังกล่าว

โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรคส่วนใหญ่สร้างสารพิษที่ทำให้เกิดอาการของโรค สารพิษของแบคทีเรียแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ เอ็กโซทอกซิน (exotoxin) และเ็นโดทอกซิน (endotoxin) เอ็กโซทอกซิน มีคุณสมบัติดังนี้

1. มักเป็นโปรตีนที่สร้างโดยกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย
2. สร้างโดยพวกแกรมบวกหรือลบ
3. ไม่ได้เป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของโครงสร้างของเซลล์
4. ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์

ส่วนคุณสมบัติของเ็นโดทอกซิน ได้แก่

1. เป็นไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharides)
2. เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ตาย
3. สร้างโดยพวกแกรมลบ

สารพิษชนิดเ็นโดทอกซินนั้นมีผลต่อร่างกายมนุษย์กว้างกว่าเอ็กโซทอกซิน โดยทำให้เกิดอันตรายอย่างรุนแรง และทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะอย่างถาวรทำให้ตายในที่สุด ผลของเ็นโดทอกซิน ได้แก่

1. เป็นสารพิษที่อันตรายต่อกระเพาะอาหาร ทำให้เกิดอาการท้องเสียและปวดท้อง
2. ทำให้เกิดอาการไข้ โดยการกระตุ้นการหลั่งไพโรเจน (pyrogens) ที่ทำให้ร่างกายมีอุณหภูมิสูง
3. ทำให้เกิดผื่นขึ้นบนผิวหนัง
4. ทำให้เกิดการช็อก (shock) โดยทำให้เกิดความดันต่ำและการสะสมของเลือดภายในอวัยวะต่างๆเป็นผลให้ของเสียต่างๆไม่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ เป็นผลทำให้เซลล์ขาดออกซิเจนและสารอาหารในที่สุด

โรคที่เกิดจากไวรัส

ไวรัสจะทำลายโฮสต์โดยการฝังตัวเข้าไปภายในเซลล์และเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างสารสำหรับการเจริญของไวรัสขึ้นมาใหม่ อาการของโรคเป็นผลมาจากการที่เซลล์โฮสต์ถูกทำลาย

ความรุนแรงของเชื้อโรค

ความรุนแรงหรืออันตรายของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ขึ้นอยู่กับกลไกป้องกันตนเองของโฮสต์และระดับความรุนแรงของเชื้อโรค เช่น ความสามารถในการต่อสู้เอาชนะกลไกป้องกันตนเองเป็นต้น กลไกของเชื้อโรคเองที่ต่อต้านกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในร่างกายของมนุษย์ ยังไม่เป็นที่แน่ชัด เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นเช่น *Staphylococcus aureus* ซึ่งมีอย่างน้อยร้อยละ 30 ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในร่างกาย พบว่าไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อโฮสต์ แต่ถ้าเชื้อนี้ผ่านเข้าไปในเซลล์ปกติ เช่น ระหว่างการผ่าตัด จะทำให้บาดแผลเกิดการอักเสบขึ้นได้ นอกจากนี้ในกรณีที่ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายถูกทำลายจะทำให้จุลินทรีย์ปกติที่ไม่ได้เป็นเชื้อโรค กลายเป็นเชื้อโรคได้ ตัวอย่างเช่น ไวรัสเอดส์ เป็นต้น

โรคอาหารเป็นพิษ

โรคอาหารเป็นพิษเกิดจากการที่มนุษย์รับประทานหรือบริโภคอาหารที่มีสารอันตรายหรือจุลินทรีย์เข้าไปทำให้เกิดอาการต่างๆ ขึ้น สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่

1. จุลินทรีย์
2. พาราไซด์
3. สารเคมี
4. สารพิษที่มีอยู่ในพืชตามธรรมชาติ
5. สารพิษที่พบในปลาตามธรรมชาติ
6. ระบบเมตาโบลิซึมที่ผิดปกติ
7. อาหารที่ทำให้เกิดอาการแพ้

8. สารกัมมันตรังสี

โดยทั่วไปโรคอาหารเป็นพิษมักเกิดจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะโรคระบาดที่เกิดขึ้น ส่วนไวรัสและโปรโตซัวนั้นเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษรองลงมาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนา เชื้อราบางชนิดอาจสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และสำหรับบางชนิดอาจทำให้โรคขึ้นได้โดยติดมากับสัตว์ทะเล ส่วนยีสต์มักไม่ทำให้เกิดโรคในอาหารของมนุษย์ และ ไพรออน (prions) ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคระบบประสาท เช่น โรคที่เกิดในโคและกระบือ (bovine spongiform encephalopathy ; BSE) อาจติดต่อมาถึงมนุษย์ได้

อาหารเป็นพิษเป็นโรคที่เกิดขึ้นฉับพลัน (acute) ในระบบทางเดินอาหาร เนื่องจากการบริโภคอาหารเข้าไป โรคระบบทางเดินอาหารดังกล่าวอาจมีอาการหลายลักษณะ ได้แก่ ปวดท้อง ท้องเสีย (diarrhoea) หรือมีอาการอาเจียนหรือไม่อาเจียนและอาจมีไข้ เป็นต้น โรคนี้ไม่รวมถึงโรคที่เกิดจากเชื้อที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ เช่น *Clostridium botulinum* และ *Listeria monocytogenes* ซึ่งไม่ทำให้เกิดอาการที่กล่าวมาข้างต้น นอกจากนั้นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ อาจมีลักษณะต่างๆ ได้แก่ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหาร และต้องมีปริมาณสูงถึงระดับหนึ่งที่จะทำให้เกิดการเจ็บป่วยขึ้นได้ ยกเว้นเชื้อ *Salmonella* บางสายพันธุ์ ที่ทำให้เกิดโรคแม้มีปริมาณไม่สูงมาก นอกจากนั้น เชื้อดังกล่าวมักมีที่มาจากสัตว์หรือสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรคของสัตว์ อาจติดต่อมาสู่มนุษย์ได้ เช่น *Campylobacter* และ *Salmonella* บางสายพันธุ์ อย่างไรก็ตามจำกัดความของอาหารเป็นพิษอาจแตกต่างกันไปโดยอาจรวมไปถึงความเจ็บป่วยที่เกิดจาก

Staphylococcus aureus *Clostridium perfringens* *Clostridium botulinum* และ *Bacillus cereus*

โรคอาหารเป็นพิษอาจเกิดจากการรับประทานหรือบริโภคอาหารที่มีสารพิษของจุลินทรีย์เรียกว่าอินทอกซิเคชัน (intoxications) โดยสารพิษจะทำให้เกิดลักษณะอาการที่แสดงออกของโรค (syndrome) ที่แตกต่างกัน สารพิษของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรครายในลำไส้เรียกว่า เอ็นเทอโรทอกซิน (enterotoxins) หรือที่ทำให้เกิดโรคที่ระบบประสาทเรียกว่านิวโรทอกซิน (neurotoxins) ส่วนไมโคทอกซิโคซิส (mycotoxicoses) หมายถึงโรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อรา โดยทั่วไป intoxication มักจะมีระยะเวลาระหว่างภายหลังจากรับสารพิษจนกระทั่งแสดงอาการของโรคหรือระยะฟักตัว (incubation periods) ที่สั้น

ส่วนอาหารเป็นพิษที่เกิดจากการได้รับเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปและจุลินทรีย์นั้นเข้าไปเจริญเติบโตภายในลำไส้และทำให้เกิดอาการของโรคขึ้นเรียกว่าอินเฟกชัน (infections) เช่น *Salmonella* spp. ที่ก่อให้เกิดโรคซาลโมเนลโลซิส (Salmonellosis) อาการที่เกิดขึ้น เนื่องจากเชือดังกล่าวสร้างเอ็กโซทอกซิน เอ็นโดทอกซินที่ทำให้เกิดอาการเช่นเดียวกับเอ็นเทอโรทอกซินในโรคอาหารเป็นพิษบางชนิด เช่นจาก *Clostridium perfringens* นั้น หลังจากเชือดังกล่าวผ่านเข้าไปในลำไส้มนุษย์แล้ว แต่ยังไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เซลล์ปกติจะสร้างสปอร์ขึ้นและเมื่อเซลล์ที่สร้างสปอร์แตกออกมานั้นจะปลดปล่อยสารพิษเอ็นเทอโรทอกซินออกมาด้วย นอกจากนั้นจุลินทรีย์บางชนิดอาจผ่านเข้าไปในมิวโคซา (mucosa) และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตและเข้าสู่อวัยวะหรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Mycobacterium tuberculosis*

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรียที่เข้าไปภายในลำไส้มนุษย์และก่อให้เกิดอาการของโรคได้แก่

1. *Campylobacter jejuni* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่งโค้ง หรือเป็นเกลียวก่อให้เกิดโรค Campylobacteriosis จากการรับประทานอาหารที่มีเชื้ออยู่ในปริมาณสูง โดยมีระยะฟักตัวประมาณ 1-10 วัน (ปกติ 3-5 วัน) โดยทำให้เกิดอาการท้องเสีย ปวดท้อง เป็นไข้และวิงเวียน เป็นระยะเวลาประมาณตั้งแต่ 1 วันจนถึงหลายสัปดาห์ แต่มักไม่ทำให้เสียชีวิต

เชื้อ *Campylobacter jejuni* พบในลำไส้ของสัตว์ป่าหรือสัตว์เลี้ยง เช่น นกป่า โค กระบือ สุกร แพะ ไก่ ไก่วง เป็ด แมวและสุนัข อาหารที่ปนเปื้อนและทำให้เกิดการระบาดของโรค เช่น นำนมดิบหรือนำนมพาสเจอร์ไรส์ที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอ เนื้อสัตว์ปีกที่ดิบหรือไม่ทำให้สุกและผักสลัดที่ปนเปื้อนเชื้อนี้

2. ซาลโมเนลลา (*Salmonella*) แบ่งเป็นกลุ่มตามถิ่นที่อยู่อาศัยและชนิดของโรคที่เชื้อนี้ทำให้เกิดขึ้น เช่น

- พวกที่ปรับตัวให้เข้ากับมนุษย์และก่อให้เกิดโรคเฉพาะในมนุษย์เท่านั้น เช่น

S. typhi และ *S. paratyphi* A B และ C

- พวกที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์บางชนิด เช่น *S. gallinarum*
- พวกที่มีสัตว์บางชนิดเป็นพาหะนำโรคและติดต่อมาสู่มนุษย์ เช่น *S. dublin*

ที่มาจากโคหรือกระบือ

- พวกที่มีสัตว์หลายชนิดเป็นพาหะนำโรคและติดต่อมาสู่มนุษย์ โดยเชื้อ *Salmonella* ในกลุ่มนี้พบมากที่สุด

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ก่อให้เกิดโรค Salmonellosis โดยเชื้อจะแทรกตัวผ่านเซลล์อีพิเทลิยม (epithelial cells) ของวิลไล (villi) ที่อยู่บริเวณช่วงท้ายของลำไส้เล็กและผ่านไปยังเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) โดยจะอาศัยและเจริญอยู่บริเวณนี้จนกระทั่งสร้างสารพิษเอ็นโดทอกซิน ทำให้แสดงอาการของโรค โดยมีระยะฟักตัวประมาณ 5 - 72 ชั่วโมง (ปกติ 12 - 36 ชั่วโมง) อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อนี้ได้แก่ ท้องเสีย อาเจียน เป็นไข้และปวดศีรษะ ในบางรายอาจสูญเสียน้ำมากและทำให้เสียชีวิตได้ *Salmonella typhi* และ *S. paratyphi* จะทำให้เกิดไข้เฉียบพลันเนื่องจากผ่านเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตและลุกลามไปยังอวัยวะอื่น ๆ ภายในร่างกายได้ ช่วงเวลาที่ *Salmonella* ก่อให้เกิดโรคอยู่ระหว่าง 1 - 4 วัน แต่โดยทั่วไปมักไม่ทำให้เสียชีวิตในผู้ป่วยที่มีสุขภาพดียกเว้นในทารก และปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคประมาณ $10^6 - 10^8$ เซลล์ ซึ่งแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ สภาพของโฮสต์ ระดับความรุนแรงของเชื้อนี้ในแต่ละสายพันธุ์และชนิดของอาหารที่ผู้ป่วยรับประทาน เช่น อาหารที่มีไขมันสูง อาจช่วยให้เชื้อรอดชีวิตจากสภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้

โดยทั่วไปสามารถพบ *Salmonella* ในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่าเช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ รวมทั้งแมลง *Salmonella* บางชนิดมักพบในสัตว์ฟันแทะ เช่น *S. typhimurium* นอกจากนั้นอาจพบในน้ำเสีย ดินและแหล่งน้ำ จากการปนเปื้อนของมูลสัตว์ที่กล่าวมาแล้ว ส่วนในอาหารพบว่าเชื้อมีปนเปื้อนทั้งในอาหารดิบและอาหารที่ผ่านการทำให้สุกแล้ว โดยเฉพาะเนื้อสัตว์ชนิดต่าง ๆ เช่น เนื้อสุกร เนื้อวัว เนื้อแกะ และเนื้อสัตว์ป่ารวมทั้งเนื้อสัตว์ปีกชนิดต่างๆ ไข่ นมดิบ มะพร้าว ผักสลัด นมผง ช็อกโกแลต แป้งเค้กสำเร็จรูป น้ำสลัดและไอศกรีม

3. *Shigella* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ ทำให้เกิดโรค Shigellosis โดยอาจไม่ปรากฏอาการหรือทำให้ท้องเสีย เป็นไข้ ปวดท้องและอาเจียน ในรายที่มีอาการรุนแรงเนื่องจากเชื้อนี้แทรกตัวในกระเพาะอาหารทำให้เป็นแผลและมีโลหิตออกมาทางอุจจาระ เชื้อ *Shigella dysenteriae* จะมีความรุนแรงกว่า *Shigella sonnei* และ *Shigella flexneri* ปริมาณของเชื้อที่ทำให้โรคแสดงอาการคือ 10 เซลล์ สำหรับ *Shigella dysenteriae* และ $10^2 - 10^4$ เซลล์ สำหรับ *Shigella sonnei* และ *Shigella flexneri*

แหล่งที่มาของเชื้อ *Shigella* คือ ปนเปื้อนมากับอุจจาระของสัตว์พาหะรวมทั้งจากแหล่งน้ำ อาหารที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของโรคได้แก่ น้ามดดิบ สัตว์น้ำที่จับมาจากแหล่งน้ำที่มีเชื้อปนเปื้อน รวมทั้งผักและผลไม้และเนื้อไก่ เป็นต้น

4. *Listeria monocytogenes* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเกาะกันเป็นสาย แต่บางครั้งอาจมีรูปร่างเปลี่ยนไปขึ้นอยู่กับสภาวะที่เจริญ เชื้อนี้มักก่อให้เกิดโรค Listeriosis ในผู้สูงอายุมีครรภ์ ทารก และผู้ใหญ่ที่มีระบบภูมิคุ้มกันไม่ดี โดยการรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้เข้าไปและอาจทำให้เกิดการแท้งได้ เชื้อนี้มีระยะฟักตัว 1 - 70 วัน ทำให้เกิดอาการคล้ายไข้หวัดใหญ่ ไข้สมองอักเสบ ติดเชื้อในระบบหมุนเวียนโลหิตและปอดบวม โดยมีระยะที่เกิดอาการไม่แน่นอน ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอาจต่ำประมาณ 10^2 เซลล์ ในขณะที่ผู้ที่มีสุขภาพดีอาจไม่แสดงอาการถึงแม้จะได้รับเชื้อสูงถึง 10^7 เซลล์ อย่างไรก็ตามเชื้อนี้เจริญได้ไม่ดี ถ้ามีเชื้อชนิดอื่น ๆ เจริญร่วมอยู่ด้วย

Listeria พบโดยทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในฝุ่น ดิน แหล่งน้ำจืด น้ำทะเล ผักที่เน่าเสีย สัตว์เลี้ยงและอาหารสัตว์ รวมทั้งไข่สด และของเสียจากโรงงานฆ่าสัตว์และน้ำเสีย เป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถพบได้จากอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ ผัก ผลไม้สด น้ามดดิบ เนยแข็ง เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์เนื้อปลา เนื้อสัตว์ปีก และข้าวผัด เป็นต้น

5. *Yersinia enterocolitica* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ทำให้เกิดโรค Yersiniosis โดยการรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ โดยมีระยะฟักตัวของโรค 24 - 36 ชั่วโมง และอาจนานถึง 11 วัน และทำให้เกิดอาการท้องเสีย เป็นไข้ คลื่นไส้ อาเจียน และปวดศีรษะ รวมทั้งทำให้ปวดท้องคล้ายกับโรคไส้ติ่งอักเสบ ระยะเวลาที่ทำให้เกิดอาการตั้งแต่ 5-14 วัน หรืออาจเป็นเดือน แต่มักไม่ทำให้เสียชีวิต

Yersinia enterocolitica พบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนสารอินทรีย์ต่าง ๆ เนื้อสุกร สัตว์ปีก สัตว์ฟันแทะ สัตว์เลี้ยง หอยนางรม กุ้ง น้ำนมพาสเจอร์ไรส์ และเนื้อสัตว์ที่บรรจุแบบสุญญากาศ สายพันธุ์ของ *Yersinia* ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์มักมาจากเนื้อสุกรหรือแหล่งที่ปนเปื้อนมูลของสุกร

6. *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง โดยปกติมักไม่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ โดยเป็นไมโครฟลอราในลำไส้ของสัตว์เลื้อยคลานทั่วไป กลุ่มของ *E. coli* ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้แก่

- Enteropathogenic *E. coli* (EPEC)
- Enteroinvasive *E. coli* (EIEC)
- Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)
- Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ verocytotoxic *E. coli* (VTEC)

ความแตกต่างของ *E. coli* แต่ละกลุ่มอยู่ที่ชนิดของสารพิษที่สร้างขึ้น กลไกการทำให้เกิดโรคและอาการของโรคที่แสดงออกมา กลุ่ม EPEC EIEC และ ETEC มีความสำคัญและก่อให้เกิดโรคในทารกและเด็ก โดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา โดย ETEC มักปนเปื้อนมากับน้ำดื่มและอาหารที่ล้างด้วยน้ำที่ปนเปื้อนเชื่อดังกล่าว ส่วน enterohaemorrhagic *E. coli* O157 : H7 นั้น ทำให้เกิดโรคโดยมีระยะฟักตัว 3 - 4 วัน อาการที่เกิดได้แก่ ลำไส้อักเสบ ท้องเสีย และปวดท้อง มีเลือดออกในกระเพาะอาหาร และอาจทำให้เลือดแข็งตัวในท่อไตและเลือดออกตามอวัยวะภายใน เนื่องจากขาดเกล็ดเลือดเป็นผลให้สมองถูกทำลาย โรคที่เกิดเป็นอันตรายอย่างมากในเด็กและอาจทำให้ไตพิการถาวร ช่วงเวลาที่ทำให้เกิดอาการอยู่ระหว่าง 2 - 9 วัน และปริมาณเชื้อ

ที่ทำให้เกิดอาการอาจต่ำถึง 10 - 100 เซลล์ นอกจากนั้นเชือนี้ยังสามารถเจริญได้สัณฐานที่มีเชื้ออื่น
เจริญอยู่ด้วย *E. coli* O157 : H7 มักพบในลำไส้ของโคและกระบือหรือสัตว์ที่ให้น้ำนม

7. *Vibrio parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ ทำให้เกิดโรคโดยการ
รับประทานอาหารที่มีเชืชนิดนี้เข้าไป โดยมีระยะฟักตัว 12 - 24 ชั่วโมง อาการที่เกิดได้แก่
ท้องเสียและปวดท้องรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียน เป็นไข้และปวดศีรษะ ระยะเวลาที่เกิดอาการ
ประมาณ 2 - 3 วัน แต่มักไม่ทำให้เสียชีวิต ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดอาการอยู่ระหว่าง 10^5 - 10^7 เซลล์

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลและพบทั่วไปตามแถบ
ชายฝั่งในแถบอบอุ่น รวมทั้งในตะกอนพื้นน้ำและในแพลงก์ตอน โดยทั่วไปจะปนเปื้อนในปลา
หรือสัตว์ทะเลที่จับได้ประมาณ 10^3 - 10^4 เซลล์ต่อกรัม อาหารที่เป็นแหล่งของเชื้อได้แก่ ปลาดิบ
หรือผักดองเค็มที่ปนเปื้อนปลาสดดังกล่าว

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Vibrio cholerae* ซีโรวาร์
0:1 ทำให้เกิดโรคอหิวาต์ โดยปนเปื้อนมากับน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อนน้ำที่มีเชืดังกล่าว และ
Vibrio vulnificus ซึ่งทำให้เกิดโรครุนแรงและมีอัตราการทำให้เสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 40 และมัก
พบในหอยนางรมดิบเป็นส่วนใหญ่

8. *Aeromonas hydrophila* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ ทำให้เกิดอาการท้องเสีย
และยังไม่มีรายงานของปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดอาการ โดยพบเชือนี้ในแหล่งน้ำและในอาหารทะเล
เนื้อสัตว์ เนื้อสัตว์ปีก และผลิตภัณฑ์จากน้ำนม

9. *Plesiomonas shigelloides* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับ
ทางเดินอาหารหรืออาจคล้ายโรคอหิวาต์ มีระยะฟักตัวประมาณ 48 ชั่วโมง โดยทำให้เกิดอาการ
ท้องเสียและปวดท้องเล็กน้อย และยังไม่มีรายงานปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดอาการของโรค มัก
พบเชืตามผิวหนังของแหล่งน้ำและในดินโดยเฉพาะในแถบอบอุ่น นอกจากนั้นยังพบในกบ งู
ปลาแม่น้ำและสัตว์เลื้อย อาหารที่ปนเปื้อนเชืและทำให้เกิดการระบาดได้แก่ ปู กุ้ง ปลาหมึก
หอยนางรมและเนื้อไก่

10. *Mycobacterium bovis* เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ทำให้เกิดโรควัณโรค (Tuberculosis) ในสัตว์พวกโคและกระบือ และพบเชื้อมีในน้ำนมจากสัตว์ดังกล่าวทำให้ติดต่อมายังมนุษย์ได้ โดยทำให้เกิดอาการติดเชื้ออย่างรุนแรง เชื้อนี้จะแทรกตัวเข้าไปยังมิวโคซา (mucosa) ที่ลำไส้และแพร่กระจายไปยังกระดูก ข้อต่อ อวัยวะภายในช่องท้อง และไขสันหลัง ทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย พิการและอาจเสียชีวิตได้

11. *Brucella* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ โดย *Brucella abortus* ในโคและกระบือ และ *Brucella melitensis* ในแพะและแกะ จะสามารถติดต่อมายังมนุษย์และทำให้เกิดโรค Brucellosis ได้ โดยโรคนี้นักเกิดกับคนที่มียาชีพที่เกี่ยวข้องกับการทำฟาร์มเลี้ยงสัตว์ เชื้อที่เข้าสู่ร่างกายจะแพร่กระจายไปยังหลอดลมและท่อน้ำนมรวมทั้งตามกระดูก ข้อต่อ กระแสประสาทสมองและอวัยวะอื่นๆ ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงโดยมีอาการต่างๆ ได้แก่ เป็นไข้ตลอดเวลา ปวดศีรษะ และสลดหดหู่ โดยผู้ป่วยอาจทำอุบัติเหตุเนื่องจากผลของอาการที่เกิดขึ้น เชื้อดังกล่าวปนเปื้อนในน้ำนมดิบจากโค แพะหรือแกะ รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากน้ำนมดังกล่าว เช่น เนยแข็งที่ผลิตด้วยน้ำนมที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์

แบคทีเรียที่สร้างสารพิษในอาหารและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

1. *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม แกรมบวก เกาะกันเป็นกลุ่ม สร้างสารพิษเอ็นเทอโรทอกซินและปล่อยลงสู่อาหาร มีระยะฟักตัวตั้งแต่ 30 นาทีถึง 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารพิษที่ได้รับและความต้านทานของแต่ละบุคคล โดยทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย และปวดท้อง ในรายที่มีอาการรุนแรงจะทำให้สูญเสียน้ำมาก ช่วงระยะเวลาที่เกิดอาการตั้งแต่ 2-3 ชั่วโมงจนถึง 3 วัน แต่มักไม่ทำให้เสียชีวิต และปริมาณของเชื้อในอาหารต้องมีสูงถึง 5×10^6 เซลล์ต่อกรัม หรือสูงกว่าจึงจะสร้างสารพิษในระดับที่ทำให้เกิดอาการของโรคได้และปริมาณของสารพิษที่ทำให้เกิดโรคต้องมีอย่างน้อย 1 นาโนกรัมต่อกรัมอาหาร

โดยทั่วไปพบ *Staph. aureus* ประมาณร้อยละ 30 - 50 ของจุลินทรีย์ทั้งหมดในจมูกและคอของมนุษย์ รวมทั้งที่ผิวหนังโดยเฉพาะมือ นอกจากนั้นยังพบเชื้อมีในอุจจาระของมนุษย์ ผุน และตามเสื้อผ้า รวมทั้งสัตว์เลี้ยงต่างๆ อาหารที่เป็นแหล่งของเชื้อได้แก่ เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

เช่น แสม ถั่วลิสง พายแช่เย็นและไส้กรอกดิบ รวมทั้งอาหารที่มีน้ำมันเป็นส่วนผสม เช่น ซอส เค้ก คัสตาร์ดและเนยแข็ง เนื้อสัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเนื้อสัตว์ปรุงสุกเช่น ปลาหรืออาหารทะเล อาหารบรรจุกระป๋องและพาสต้า

2. *Clostridium botulinum* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ สร้างสปอร์ซีโรวาร์ A B C และ F ทำให้เกิดโรค Botulism ในมนุษย์ เชื้อนี้แบ่งเป็น 2 ชนิด คือชนิดที่ย่อยสลายโปรตีนได้แก่ type A ทุกสายพันธุ์ (strains) และบางสายพันธุ์ของ type B และ F และชนิดที่ไม่ย่อยสลายโปรตีนได้แก่ type E ทุกสายพันธุ์และบางสายพันธุ์ใน type B และ F อาการของโรคเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีนิวโรทอกซิน (neurotoxin) ของเชื้อนี้เข้าไป โรค Botulism ที่เกิดในทารก เกิดจากการที่สปอร์ของเชื้อนี้เจริญและสร้างสารพิษดังกล่าวในกระเพาะอาหารและสปอร์ดังกล่าวมาจากน้ำผึ้งที่ปนเปื้อนเชื้อ โรคนี้มีระยะฟักตัว 12 - 36 ชั่วโมง หรืออาจอยู่ระหว่าง 2 ชั่วโมงจนถึง 8 วัน โดยทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน เบลอและมองเห็นภาพซ้อน กลืนอาหารยาก ปากแห้ง พูดลำบาก แขนขาและระบบการหายใจเป็นอัมพาตและทำให้เสียชีวิตได้ อาการของโรคประมาณ 1 - 10 วันหรือมากกว่า และมีอัตราการเสียชีวิตสูงถึงร้อยละ 60 สารพิษจากเชื้อนี้เป็นสารพิษที่อันตรายต่อมนุษย์มากที่สุดชนิดหนึ่ง โดยปริมาณที่ทำให้เสียชีวิตร้อยละ 50 คือที่ 1 นาโนกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

โดยทั่วไปเชื้อนี้เจริญแข่งขันกับเชื้อที่ปนเปื้อนอื่นๆ ได้ไม่ดี จึงอาจจะไม่เจริญและสร้างสารพิษขึ้นถ้ามีเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ปริมาณมาก แต่ในบางกรณีที่เชื้อนี้เจริญร่วมกับ *Lactobacilli* อาจช่วยให้เชื้อนี้เจริญได้ดีขึ้นเนื่องจากทำให้สภาพกรดลดลง และยีสต์ที่ช่วยสร้างสารอาหารสนับสนุนการเจริญของ *Clostridium botulinum*

แหล่งของสปอร์ *Clostridium botulinum* ได้แก่ ในดิน แหล่งน้ำ และตะกอนจากทะเลทั่วโลก แต่โดยทั่วไปพบในซากสัตว์ที่กำลังเน่าเสีย รวมทั้งในเหงือกและลำไส้ของปูและสัตว์กระดอง ลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา ผักและผลไม้สด เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ น้ำผึ้ง และคอร์นไซรป์

อาหารที่เป็นแหล่งของโรคระบาดจากเชื้อนี้ได้แก่ อาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (pH สูงกว่า 4.6) อาหารที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอหรือไม่ผ่านการให้ความร้อน อาหารที่ปนเปื้อนภายหลังจากการฆ่าเชื้อ อาหารที่มี a_w สูงกว่า 0.93 อาหารที่มีวัตถุดิบเสียในปริมาณที่ไม่สูงพอ และอาหารที่เก็บไว้ในที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อดังกล่าว

3. *Clostridium perfringens* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวก สร้างสปอร์ มี 5 type คือ A B C D และ E โดยแต่ละ type จะสร้างสารพิษที่มีความแตกต่างกัน ชนิด type A มักทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษระบาด ซึ่งเกิดจากเอ็นเทอโรทอกซินที่ปล่อยสู่ลำไส้ ขณะที่เซลล์แม่ปล่อยสปอร์ออกมา สาเหตุเนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีเซลล์ปกติของเชื้อนี้เข้าไป ทำให้เชื้อนี้สร้างสปอร์ขึ้น โดยมีระยะฟักตัว 6 - 24 ชั่วโมง และทำให้เกิดอาการท้องเสียและปวดท้องรุนแรง เป็นไข้ คลื่นไส้ และอาเจียน โดยมีเวลาที่ทำให้เกิดอาการ 12 - 24 ชั่วโมง และมักไม่ทำให้เสียชีวิต ปริมาณของเซลล์ที่ปนเปื้อนในอาหารต้องมีไม่ต่ำกว่า 7×10^5 เซลล์ต่อกรัม เชื้อจึงจะสร้างสารพิษในระดับที่ทำให้เกิดอาการของโรคได้

โดยทั่วไปสามารถพบ *Clostridium perfringens* ในดินและโคลนรวมทั้งฝุ่น และพบสปอร์ปนเปื้อนในอาหารหลายประเภทโดยเฉพาะซากสัตว์ เครื่องเทศ ในลำไส้มนุษย์และสัตว์อื่นๆ ทั่วไป อาหารที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของโรคได้แก่ เนื้อสัตว์ที่ผ่านการต้มหรือทำให้สุก และเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง เช่น เนื้อบด น้ำเกรวี่ ไก่ต้ม และแกงเนื้อหรือไก่ เป็นต้น

4. *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมบวก สร้างสปอร์ สามารถทำให้เกิดอาการได้ 2 ลักษณะ คือ ท้องเสีย โดยสายพันธุ์ที่สร้างเอ็นเทอโรทอกซินที่ไม่ทนต่อความร้อน และคลื่นไส้อาเจียนโดยสายพันธุ์ที่สร้างเอ็นเทอโรทอกซินที่ทนต่อความร้อน โดยมีระยะฟักตัวอยู่ระหว่าง 8 - 16 และ 1 - 5 ชั่วโมงตามลำดับ และไม่ทำให้เสียชีวิต อาการที่เกิดขึ้นสำหรับลักษณะแรก ได้แก่ ท้องเสีย ปวดท้อง อาจมีคลื่นไส้และอาเจียน ส่วนลักษณะที่สองจะทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน และอาจตามด้วยอาการท้องเสีย แต่ทั้งสองลักษณะมักไม่ทำให้เสียชีวิต ปริมาณเซลล์ที่ทำให้เกิดอาการเนื่องจากสารพิษที่สร้างขึ้นทั้งสองลักษณะต้องมีไม่ต่ำกว่า $10^5 - 10^8$ และ $10^3 - 10^{10}$ เซลล์ต่อกรัม ตามลำดับ แต่เชื้อนี้เจริญได้ดีถ้ามีเชื้ออื่นๆ เจริญร่วมด้วย

โดยทั่วไปจะพบ *Bacillus cereus* ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน ฝุ่น และในอาหารต่าง ๆ เช่น นํ้านม รัชชาติ ข้าว ผัก นมผง และอาหารทำแห้ง เช่น เครื่องเทศ สมุนไพร และผิวหน้าของเนื้อสัตว์และสัตว์ปีก อาหารที่เป็นแหล่งของโรคระบาด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ชุป ซอส ข้าวสุก และพาสต้า เป็นต้น

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *Bacillus* ชนิดอื่น ๆ เช่น *B. subtilis* *B. licheniformis* และ *B. pumilis* นั้น มีรายงานว่าก่อให้เกิดโรคระบาดเช่นเดียวกัน โดยปริมาณของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคต้องมีค่อนข้างสูง อาหารที่เกี่ยวข้องกับการระบาดพบว่ามีแตกต่างกัน แต่อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อเหล่านี้ไม่รุนแรงนัก โดยมักทำให้ท้องเสียและอาเจียน

โรคอาหารเป็นพิษจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบอาหารโดยจุลินทรีย์ (scombrotoxic food poisoning)

โรคอาหารเป็นพิษชนิดนี้ ไม่ได้มีสาเหตุจากจุลินทรีย์โดยตรง แต่เกิดจากการที่จุลินทรีย์เจริญในอาหารและเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของอาหารให้กลายเป็นสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ *Morganella* spp. *Proteus* spp. *Hafnia alvei* และ *Klebsiella pneumoniae* โรคที่เกิดขึ้นเนื่องจากการรับประทานอาหารสดหรืออาหารแปรรูปที่มีสารฮิสตามีน (histamine) หรือแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮิสติดีนดีคาร์บอกซิเลส (histidine decarboxylase) ซึ่งเปลี่ยนกรดอะมิโนฮิสติดีนไปเป็นฮิสตามีน โดยโรคนี้อาจมีระยะฟักตัวตั้งแต่เป็นนาทิจนถึง 3 ชั่วโมง อาการที่เกิดได้แก่ ปวดแสบร้อนภายในปาก ท้องเสีย อาเจียน ปวดศีรษะ และอาการแพ้ต่างๆ เช่น เกิดผื่นคันที่ผิวหนังเป็นตุ่ม และหัวใจเต้นเร็ว ช่วงระยะเวลาอาการของโรคประมาณ 1 - 8 วัน แต่มักไม่ทำให้เสียชีวิต ปริมาณของฮิสตามีนที่ทำให้เกิดอาการของโรคถ้ามีสูงกว่า 5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 กรัม ถือว่าไม่ปลอดภัยและถ้ามีปริมาณสูงเกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 กรัม ถือว่าเป็นพิษ

ระดับอุณหภูมิที่ต่ำสุดของจุลินทรีย์ในการสร้างสารพิษฮิสตามีน ได้แก่ *Hafnia alvei* ที่ -30°C *Morganella* spp. ที่ -15°C และ *Klebsiella pneumoniae* ที่ -7°C และอาหารที่เกี่ยวข้อง

กับโรคระบาดได้แก่ ปลาทูน่า แมคเคอเรล โบนิโต (bonito) และแอนโชวี (anchovies) ซึ่งมีสารฮิสติดีนค่อนข้างสูงในกล้ามเนื้อ นอกจากนั้นได้แก่ ปลาซาร์ดีนและแฮร์ริง รวมทั้งเนยแข็ง

ไวรัส

โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากไวรัส มีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารที่มีไวรัสปนเปื้อนอยู่ และไวรัสชนิดต่าง ๆ มากกว่า 100 ชนิด สามารถติดต่อมายังมนุษย์โดยผ่านทาง การถ่ายเทของเสียและการรับประทานอาหาร โดยส่วนใหญ่ไวรัสก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารโดยการเข้าทำลาย มีไวรัส Hepatitis A (HAV) ก่อให้เกิดโรคตับอักเสบ (Hepatitis) ในมนุษย์ และสามารถพบไวรัสจำนวนมากในอุจจาระของผู้ที่เป็นโรคนี้หรือผู้ที่เป็นพาหะของโรค โรคที่เกิดโดยไวรัสส่วนใหญ่มีระยะฟักตัวประมาณ 15 - 50 ชั่วโมง และไวรัส HAV มีระยะฟักตัว 3 - 6 สัปดาห์ อาการของโรคที่เกิดได้แก่ ท้องเสีย อาเจียน เป็นไข้ ลำตัวเหลืองซีด เนื่องจากตับถูกทำลาย เป็นผลให้เม็ดสีของน้ำดีในโลหิตทำให้มองเห็นผิวหนังกลายเป็นสีเหลือง แต่มักไม่ทำให้เสียชีวิต

โดยทั่วไปไวรัสมักจะจำเพาะเจาะจงกับมนุษย์และพบมากในอุจจาระของผู้ที่เป็นพาหะของเชื้อหรือผู้ที่ติดเชื้อ ดังนั้นอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อไวรัสจากแหล่งดังกล่าวจะสามารถติดต่อมายังมนุษย์ได้ นอกจากนี้อาจพบไวรัสดังกล่าวปนเปื้อนในน้ำเสียหรือแหล่งน้ำต่าง ๆ อาหารที่เกี่ยวข้องกับการระบาดของไวรัสได้แก่ สัตว์กระดองที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่มีไวรัสนี้ปนเปื้อน เช่น หอยนางรม หอยสองฝา สัตว์ทะเล รวมทั้งผักสลัด ผลไม้ มันฝรั่งและเค้ก เป็นต้น

เชื้อรา

เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษโดยการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ชนิดต่างๆ นั้น มีหลากหลายชนิด สารพิษที่เชื้อราเหล่านี้สร้างขึ้นเรียกว่า ไมโคทอกซิน (mycotoxins)

เห็ด (mushrooms) ในตระกูล Basidiomycetes มีสารพิษเป็นองค์ประกอบและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษในมนุษย์ ส่วนตระกูล Ascomycetes เช่น *Claviceps purpurea* มีสารพิษ

อัลคาลอยด์ (alkaloid) และ *Byssochlamys fulva* ที่สร้างสารพิษ byssochlamic acid ที่ทนต่อความร้อน ส่วนพวก imperfect fungi พบว่ามีประมาณ 15 จินัส ที่สร้างสารพิษและมีรายงานว่าชนิดที่สำคัญที่สุด คือ *Aspergillus* อย่างน้อย 20 สปีชีส์ *Penicillium* 15 สปีชีส์ และ *Fusarium* 6 สปีชีส์ ที่สร้างสารพิษโดยความเป็นพิษและชนิดของสารพิษที่เชื้อราเหล่านี้สร้างขึ้นมีความหลากหลายและแตกต่างกัน

โรคที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีสารพิษของเชื้อราเรียกว่า mycotoxicoses แต่อาจเรียกชื่อเฉพาะเช่น ergotism จากเชื้อ *Claviceps purpurea* ที่เจริญและสร้างสารพิษในข้าวไรย์หรือพืชตระกูลหญ้า อาการของโรคที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันตามชนิดของสารพิษ เช่น

- สารพิษจากเห็ดพิษต่างๆ อาจทำให้ประสาทหลอน เช่น สารจาก *Psilocybe cubensis* หรือเห็ดมหัศจรรย์ (magic mushroom) ที่สร้างสาร psilocybin หรือสารจาก *Amanita phalloids* ที่สร้างสารพิษทำลายตับและไตและทำให้เสียชีวิตในที่สุด
- สารพิษจาก *Claviceps purpurea* ทำให้จำกัดการไหลของโลหิตไปยังแขนและเท้า อาจทำให้เนื้อตาย จิตหลอนและชักอย่างรุนแรงและอาจทำให้เสียชีวิตได้
- สารพิษจากเชื้อรา เช่น *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งสร้างอฟลาทอกซิน (aflatoxin) ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ โดยเฉพาะชนิด B₁ ที่ทำลายตับและเป็นสารก่อมะเร็ง *Aspergillus ochraceus* สร้าง ochratoxin ทำให้เป็นโรคไต *Penicillium expansum* สร้าง patulin ซึ่งเป็นพิษต่อโค กระบือรวมทั้งมนุษย์ และ *Fusarium* บางสปีชีส์สร้างสารในกลุ่ม trichothecenes เช่น T2 ที่ทำลายมีวักสเมมเบรน (mucous membrane) เช่น ปาก คอ กระเพาะและลำไส้ ทำให้เลือดออก อาเจียนและท้องเสีย ถ้าได้รับสารนี้ในปริมาณที่สูงขึ้น จะทำให้ไขสันหลังและระบบภูมิคุ้มกันถูกทำลายและเสียชีวิตในที่สุด สภาวะที่เชื้อราต่างๆ สามารถสร้างสารพิษจะมีความแตกต่างกันตามชนิดและอาจไม่ใช่สภาวะที่เจริญได้ดีที่สุด อาหารที่เกี่ยวข้องได้แก่ ธัญชาติ เมล็ดพืชน้ำมัน (oil seeds) ขนมอบต่าง ๆ กาแฟ โกโก้ ถั่ว เครื่องเทศ ผลไม้แห้ง พาสต้า ปลาแห้ง น้ำมัน และไวน์ โดยพบว่าอฟลาทอกซินชนิด B₁ ปนเปื้อน ส่วน ochratoxin พบในเมล็ดกาแฟ กาแฟผงสำเร็จรูป ถั่ว และน้ำผลไม้จำพวกน้ำส้ม สาร patulin พบในขนมอบที่มีเชื้อราชนิดนี้เจริญ ไข่กรอก ผลไม้ น้ำแอปเปิ้ลและไซเดอร์ ส่วนสารพิษจาก *Fusarium* พบในธัญชาติเป็นส่วนใหญ่

โปรโตซัว (protozoa)

โปรโตซัวที่เป็นเชื้อโรคมียประมาณ 20 สปีชีส์ ที่ติดต่อมายังมนุษย์ได้โดยผ่านทางอาหาร และน้ำดื่ม ชนิดที่สำคัญได้แก่ *Giardia lamblia* และ *Cryptosporidium* โดยทั่วไปโปรโตซัวมักทำให้เกิดโรคในเขตที่มีอากาศอบอุ่น โดย *G. lamblia* ทำให้เกิดโรคติดเชื้อทางเดินอาหาร แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดและ *Cryptosporidium* ทำให้เกิดโรค *Cryptosporidiosis* โดยเชื้อจะเข้าทำลายมิวโคซานในลำไส้เล็กตอนล่าง และทำลายวิลไล (villi) อาการของโรคที่เกิดจาก *Giardia* ได้แก่ท้องเสีย ปวดเกร็งท้องและคลื่นไส้ ส่วน *Cryptosporidium* ทำให้ท้องเสีย ปวดท้อง คลื่นไส้ สูญเสียน้ำและน้ำหนักลด โรคที่เกิดจากเชื้อที่กล่าวมาแล้วมักไม่ทำให้เสียชีวิตและยังไม่ทราบปริมาณของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอย่างแน่ชัด

สาหร่าย (algae)

สาหร่ายน้ำจืดและสาหร่ายทะเลบางชนิดสร้างสารพิษที่ติดต่อมายังมนุษย์ โดยผ่านทางเนื้อปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษขึ้นได้ ตัวอย่างที่สำคัญได้แก่ สารพิษจาก *Gonyaulax catanella* *G. tamarensis* และ *G. acatenella* ซึ่งเป็นไดโนแฟลกเจลเลท (dinoflagellates) ในแพลงตอนทะเล

Gonyaulax เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วถ้ามีแสง อุณหภูมิ และสารอาหารที่พอเพียง โดยอาศัยอยู่ในแพลงตอนและทำให้เกิด algae bloom หรือที่เรียกว่า red tide เซลล์ของ *Gonyaulax* นี้มีสารพิษ และเมื่ออาศัยในสัตว์ทะเลเช่น หอย สารพิษจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น แต่ไม่ทำลายหอยที่เซลล์อาศัยอยู่ เมื่อมนุษย์นำหอยดังกล่าวมาบริโภคจะทำให้เกิดโรคอัมพาต (paralytic shellfish poisoning) ขึ้นได้ โดยมีระยะฟักตัวตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 30 นาทีจนถึง 2 ชั่วโมง อาการที่เกิดขึ้นได้แก่ ประสาทชาและหมดสติและหรือเป็นอัมพาต และอาจทำให้เสียชีวิตได้ อาหารที่เกี่ยวข้องได้แก่ หอยสองฝาชนิดต่าง ๆ และหอยนางรม เป็นต้น

Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)

สาเหตุของโรคดังกล่าวเกิดจากโปรตีนที่ผิดปกติเรียกว่า 'ไพรอน (prion protein) ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยในสมองของสัตว์และมนุษย์ โปรตีนดังกล่าวเปลี่ยนแปลงมาจากโปรตีนที่พบบนพื้นผิวของเซลล์สมองปกติ ซึ่งทำให้โปรตีนปกติเปลี่ยนแปลงไปเป็นไพรอนได้และเกิดเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งทำลายการทำงานของเซลล์สมองและทำให้เกิดแวกิวโอล (vacuole) ซึ่งทำให้สมองมีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำ โรคที่เกิดขึ้นเรียกรวมว่าเป็นกลุ่มของโรค transmissible degenerative encephalopathies (TDE) ซึ่งทำให้มีอาการน้ำหนักรีด เคนผิดปกติ ตัวสั่นมือสั่น จนถึงขั้นโคม่าและทำให้เสียชีวิตในที่สุด โดยมีระยะเวลาฟักตัวค่อนข้างนานอาจถึงหลายปี และระยะเวลาที่เกิดโรคประมาณ 6 - 12 เดือน ในปัจจุบันยังไม่พบวิธีรักษา ไพรอนที่พบมีรายงานว่าทนต่อความร้อน การฉายรังสี รวมทั้งสารเคมีค่อนข้างสูง

บทที่ 10

อาหารหมัก

การหมัก (fermentation)

การหมักในแง่ของชีวเคมีหมายถึงกระบวนการที่สารประกอบอินทรีย์ (โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรต) ถูกย่อยสลายเพื่อให้ได้พลังงาน โดยที่ไม่เกี่ยวข้องกับตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย เช่นออกซิเจน ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นบางส่วนทำให้ได้พลังงานจาก ATP เพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานที่ได้จากปฏิกิริยาที่มีตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเข้ามาเกี่ยวข้อง สารประกอบต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นจากจุลินทรีย์มีความแตกต่างกันอย่างมาก ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์แต่ละชนิดและเกิดจากปฏิกิริยาที่แตกต่างกันภายในเซลล์ของจุลินทรีย์

การหมักในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้จุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน เพื่อทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ จะเรียกว่า industrial fermentations โดยมีเฉพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาดใหญ่ในโรงงาน โดยส่วนใหญ่เป็นการหมักแบบใช้ออกซิเจน (aerobic processes) โดยจุลินทรีย์จะนำออกซิเจนไปใช้ในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตอย่างสมบูรณ์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักระดับอุตสาหกรรมได้แก่

- 1) สารอินทรีย์ต่างๆ เช่นเชื้อเพลิง วัตถุเจือปนอาหาร (food additives) สารปฏิชีวนะ (antibiotics) และเอนไซม์ (enzymes) ซึ่งสามารถนำไปใช้กับอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ และตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ได้แก่ น้ำส้มสายชู (vinegar) เป็นต้น
- 2) เซลล์ของจุลินทรีย์ที่ถูกเพาะเลี้ยง ซึ่งจะถูกนำไปสกัดโปรตีน เช่นโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein) ที่มนุษย์สามารถนำมาใช้บริโภคได้ ตัวอย่างเช่น Quorn ซึ่งเป็นโปรตีนเซลล์เดียวจากเชื้อรา *Fusarium graminearum* โดยโปรตีนดังกล่าวสามารถใช้เป็นอาหารสำหรับผู้รับประทานเจ (vegetarians) หรือใช้ประกอบอาหารอื่นๆ
- 3) เซลล์ยีสต์ ซึ่งนำไปใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ

- 4) อาหารที่ผลิตขึ้นจากปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ เช่นเนยแข็ง (cheese) โยเกิร์ต (yoghurt) และขนมปัง (bread)
- 5) การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (alcoholic beverages)
- 6) สารสกัดจากเซลล์ ซึ่งนำมาใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร เช่นยีสต์สกัด (yeast extract) ซึ่งอาจสกัดจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการใช้ประโยชน์มาแล้วจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์
- 7) การผลิตเห็ด (mushrooms) ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

ในส่วนของการหมักในระดับอุตสาหกรรม ในปัจจุบันจัดอยู่ภายใต้หัวข้อเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ใช้เซลล์ของสิ่งมีชีวิตหรือผลิตผลจากเซลล์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ในระดับอุตสาหกรรม

อาหารหมัก

อาหารหมักหมายถึงผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตโดยใช้วัตถุดิบจากพืชหรือสัตว์และใช้กิจกรรมของจุลินทรีย์ซึ่งได้แก่แบคทีเรีย ยีสต์หรือเชื้อรา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความแตกต่างกันทางด้านรสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัสและอายุการเก็บรักษาหรือความคงตัว (stability) การผลิตอาหารหมักหลายชนิดเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการหมักทางชีวเคมี เช่นแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) ซึ่งหมักคาร์โบไฮเดรตทำให้ได้กรดแลคติก ยีสต์ซึ่งหมักคาร์โบไฮเดรตได้เอทานอลและสารอินทรีย์อื่นๆ หรือเชื้อราชนิดที่ไม่หมักคาร์โบไฮเดรต แต่อาจมีบทบาทสำคัญเช่นในการผลิตบลูชีส (blue cheese) และซอสถั่วเหลือง (soy sauce) อาหารหมักที่พบเห็นกันโดยทั่วไปได้แก่เนยแข็ง โยเกิร์ต ซอสถั่วเหลือง และเนื้อสัตว์หมักเช่นซาลามิ (salami) เปปเปอร์โรนี (peperoni) และเทมเป้ (tempeh)

ในส่วน of เครื่องดื่มหมักประเภทแอลกอฮอล์ ซึ่งมีแคลอรีสูงแต่โดยคุณค่าทางโภชนาการโดยทั่วไปค่อนข้างต่ำ ถ้าบริโภคมากเกินไปอาจจะทำให้ร่างกายมนุษย์เกิดภาวะทุพโภชนาการ เช่นการขาดวิตามินบี ดังนั้นเครื่องดื่มหมักดังกล่าวจึงอาจไม่เข้าข่ายที่จะจัดว่าเป็นอาหาร อย่างไรก็ตามเครื่องดื่มหมักแอลกอฮอล์ในพื้นที่บางแห่ง จะช่วยเพิ่มสารอาหารให้แก่ชนกลุ่มนั้นๆ ในกรณีที่น่าเครื่องดื่มหมักดังกล่าว มาบริโภคขณะที่กระบวนการหมักยังไม่เสร็จสิ้น ซึ่ง

จะทำให้ได้คุณค่าจากสารอาหารที่สำคัญจากยีสต์ที่ใช้ในการหมัก ตัวอย่างเช่นเบียร์ Kaffir ซึ่งเป็นอาหารสำคัญในเผ่าบันตู (Bantus) ในประเทศแอฟริกาใต้ ซึ่งพบว่าเบียร์ดังกล่าวมีสารอาหารที่สำคัญและมีประโยชน์เช่น ไรโบฟลาวินและกรดนิโคตินิก

ความเป็นมาของอาหารหมัก

กระบวนการหมักอาหาร เป็นวิธีการถนอมรักษาอาหารที่มีมาตั้งแต่สมัยโบราณ ในช่วงก่อนปี ค.ศ. 200 พบว่ามีการหมักน้ำนมเพื่อผลิตโยเกิร์ต ในส่วนของการผลิตขนมปังพบว่าเริ่มในสมัย 2,500 ปีก่อนคริสตศักราช โดยชาวอียิปต์ การหมักถั่วเหลืองเริ่มในประเทศจีนเมื่อประมาณ 1,000 ปีก่อนคริสตศักราช และการหมักเนื้อสัตว์พบว่าเริ่มทำมาตั้งแต่สมัยโรมัน

กระบวนการหมักอาหารในสมัยก่อน อาจเกิดเนื่องมาจากเหตุบังเอิญที่จุลินทรีย์ชนิดที่สร้างกรดได้ปนเปื้อนลงในอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่เสื่อมเสียได้ง่ายเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำให้อาหารที่มีจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานกว่า และมีกลิ่นรสที่เฉพาะ แตกต่างจากอาหารเดิมก่อนหมัก เช่นการเปลี่ยนแปลงของน้ำนมที่ปนเปื้อนจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ทำให้เกิดเคิร์ด (curd) ที่มีเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสที่เป็นที่ต้องการและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมให้ยาวนานขึ้น กระบวนการหมัก โดยใช้จุลินทรีย์จากธรรมชาติ สามารถนำจุลินทรีย์ที่หมักแล้วให้ผลเป็นที่ต้องการในการหมักครั้งก่อน มาเติมในวัตถุดิบ เพื่อผลิตอาหารหมักขึ้นมาใหม่ โดยให้ผลเช่นเดิม เรียกว่า back slopping กระบวนการหมักในปัจจุบัน เป็นวิธีที่ทำให้อาหารมีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นและทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายมากขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้หมักอาหารประเภทต่างๆ จะถูกแยกและจำแนกชนิด และนำมาศึกษาปฏิกิริยาการหมักทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสม่ำเสมอ เรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่าสตาร์ทเตอร์ (starter culture หรือ starter) ซึ่งในปัจจุบันกระบวนการหมักโดยใช้สตาร์ทเตอร์ มักกระทำในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ที่มีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการหมัก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณที่สูงและมีคุณภาพสม่ำเสมอ รวมทั้งการนำจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดแต่งยีนส์ (genes) ที่มีคุณสมบัติพิเศษมาใช้ในการผลิตอาหารหมัก

วิธีการหมักอาหารโดยใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติ มีข้อเสียตรงที่ผลิตผลที่ได้ อาจเกิดการเสื่อมเสียและมีโอกาสปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอันตราย รวมทั้งทำให้อาหารหมักธรรมชาติมีคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอ ในขณะที่สตาาร์ทเตอร์ในระบบการหมักปัจจุบัน พบว่าผลิตผลที่ได้มีโอกาสดูแลน้อยกว่า และมีความปลอดภัยสูงกว่า ข้อดีที่สำคัญประการหนึ่งของการหมักวิธีดั้งเดิมหรือการใช้จุลินทรีย์ตามธรรมชาติคือการทำให้อาหารหมักที่มีกลิ่นรสที่เฉพาะตัว และยากต่อการเลียนแบบโดยใช้เทคนิคหรือวิธีการสมัยใหม่

ข้อดีหรือประโยชน์ของอาหารหมักต่อผู้บริโภค มีหลายประการได้แก่

1. เพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้บริโภคทำให้ได้อาหารที่มีกลิ่นรสเฉพาะและคุณค่าทางโภชนาการ เช่น เนยแข็งซึ่งมีมากกว่า 1,000 ชนิดทั่วโลก
2. ใช้เป็นส่วนผสมของอาหารอื่นๆ เช่น เพนเพอโรนินในพิซซ่า โยเกิร์ตในเคอร์รี่ เนยแข็งที่ใช้เติมในอาหารหลายชนิด และซอสถั่วเหลืองในอาหารของชาวตะวันออก
3. ช่วยปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการ กระบวนการหมักอาหาร อาจช่วยปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตอาหารหมักหลายชนิดเช่น เทมเป้ จะมีปริมาณวิตามินบีสิบสอง เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 30 (จากถั่วเหลืองซึ่งเดิมมีประมาณ 0.15 ไมโครกรัมต่อกรัม เพิ่มขึ้นเป็น 5 ไมโครกรัมต่อกรัม) และในการหมัก Tape จะทำให้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าจากเดิมที่มีอยู่ในมันสำปะหลัง และยังช่วยเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด ส่วนฮีสต์ในอาหารหมักบางชนิดจะช่วยเพิ่มปริมาณวิตามินบี นอกจากนั้น สารที่ทำลายคุณค่าทางโภชนาการเช่น ไฟเตท (phytate) กลูโคซิโนเลต (glucosinolates) และเลคติน (lectins) อาจถูกทำลายระหว่างกระบวนการหมักอาหาร รวมทั้งความสามารถของร่างกายในการนำแร่ธาตุไปใช้จะเพิ่มมากขึ้น
4. ช่วยถนอมรักษาอาหาร โดยทั่วไปกระบวนการหมักอาหารจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาวัตถุดิบให้นานขึ้น และช่วยเพิ่มความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น ในน้ำมันดิบ ซึ่งมีอายุการเก็บประมาณ 2-3 วันที่อุณหภูมิแช่เย็น แต่โยเกิร์ตมีอายุการเก็บนานหลายสัปดาห์
5. มีประโยชน์ต่อร่างกาย มีรายงานว่าอาหารหมักบางประเภท ทำให้ร่างกายมีสุขภาพที่แข็งแรง เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก อาทิโยเกิร์ต จะช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลและป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ได้
6. ช่วยปรับปรุงความสามารถในการย่อยอาหาร อาหารหมักบางชนิดจะถูกย่อยในร่างกาย

ได้ง่ายกว่าวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิต เช่น ในกรณีที่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตส (lactose intolerance) จะสามารถบริโภคผลิตภัณฑ์จากนมหมักได้เช่นโยเกิร์ต ซึ่งแลคโตสจะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นแลคเตท (lactate) ทำให้สามารถถูกย่อยสลายและร่างกายนำไปใช้ได้ ในพืชตระกูลถั่ว เช่นถั่วเหลือง มีโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) เป็นองค์ประกอบเช่น สตาชิโอส (stachyose) ซึ่งจะถูกหมักในลำไส้ เป็นผลให้เกิดแก๊สและคลื่นเหิมน แต่ถ้านำไปผ่านการหมักโดยเชื้อรา โอลิโกแซคคาไรด์จะถูกย่อยสลายเป็นโมโนและไดแซคคาไรด์ (mono-, disaccharides) ทำให้สามารถย่อยสลายได้และไม่เกิดปัญหาดังกล่าว

7. ช่วยลดความเป็นพิษของวัตถุดิบ กระบวนการหมักอาจช่วยทำลายสารพิษที่มีอยู่ในวัตถุดิบ เช่นในกระบวนการหมักมันสำปะหลัง จะช่วยกำจัดสารพิษไซยาไนด์ให้หมดไปได้

ประเภทของกระบวนการหมักอาหาร

กระบวนการหมักอาหาร สามารถแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้ดังนี้

1. กระบวนการหมักอาหารที่เป็นกรด (acid food fermentations) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นํ้านมหมัก เช่นเนยแข็ง เนยเหลว โยเกิร์ต และคีเฟอร์ (kefir) ผลิตภัณฑ์ผักหมักเช่น กระหล่ำปลีหมัก (sauerkraut) มะกอกและผักดองอื่นๆ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักเช่น เนื้อหมักกึ่งแห้ง ได้แก่ cerevilat และเนื้อหมักชนิดแห้งเช่นซาลามีและเพบเพอโรนี รวมทั้งผลิตภัณฑ์ขนมอบเช่นขนมปังเปรี้ยว (sourdough breads) เป็นต้น

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดที่เป็นกรดนี้ส่วนใหญ่ผลิตโดยใช้แบคทีเรียแลคติกใน ปัจจุบันการผลิตส่วนใหญ่ใช้สแตรต์เตอร์ ยกเว้นการผลิตกระหล่ำปลีหมัก ซึ่งกระบวนการดังกล่าวยังใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนจากธรรมชาติบนใบของกระหล่ำปลี ในบางครั้งการหมักประเภทนี้ต้องเติมนํ้าตาลลงไปเพื่อปรับให้มีปริมาณที่พอเหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะในวัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำ นอกจากนั้นยังอาจเติมเกลือ เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั่วไปที่ทำให้กระหล่ำปลีหมักเสื่อมเสียและทำให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีขึ้น ในส่วนของวัตถุดิบ อาจนำไปพาสเจอร์ไรส์เพื่อทำลายเชื้อโรค และลดเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติเริ่มต้น ซึ่งสามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นสแตรต์เตอร์ได้

2. กระบวนการหมักโดยยีสต์ (yeast fermentations) ยีสต์มีความสำคัญในกระบวนการหมัก เนื่องจากสามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล สำหรับคาร์บอนไดออกไซด์นั้นเป็นผลิตภัณฑ์จากเมตาโบลิซึมที่สำคัญและใช้ในการผลิตขนมอบทำให้ขึ้นฟู ส่วนเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตเบียร์ ไวน์และสุรา ทั้งคาร์บอนไดออกไซด์รวมทั้งตัวเซลล์ยีสต์เองเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (byproducts) ที่สำคัญในการผลิตเบียร์

3. กระบวนการหมักในสถานะของแข็ง (solid state fermentations) กระบวนการหมักประเภทนี้เกี่ยวข้องกับการใช้วัตถุดิบเริ่มต้นที่เป็นของแข็งมาใช้ในการหมัก แล้วจึงเติมจุลินทรีย์เข้าไป โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้คือเชื้อรา ตัวอย่างเช่นในกระบวนการผลิตโคจิ และในขั้นตอนที่สองของกระบวนการหมักเทมเป้

4. กระบวนการหมักอาหารวิธีดั้งเดิมและอาหารหมักของชาวตะวันตก อาหารหมักในกลุ่มนี้มีมากมายหลายชนิดแตกต่างกันไปตามพื้นที่หรือประเทศ โดยเฉพาะในแถบทวีปเอเชียและแอฟริกา ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มักไม่เป็นที่รู้จักในประเทศตะวันตก ในกระบวนการหมักอาหารดังกล่าวมีการใช้แบคทีเรียแลคติกบ้าง แต่มักใช้ยีสต์และเชื้อราเป็นส่วนใหญ่ รวมทั้งเป็นกระบวนการหมักในสถานะของแข็ง ระดับการผลิตของผลิตภัณฑ์หมัก มักจะทำการผลิตในระดับครัวเรือน แต่มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพียงเล็กน้อย ผลิตภัณฑ์อาหารในกลุ่มนี้แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ดังตารางที่ 26

จุลชีววิทยาของกระบวนการหมักอาหารที่เป็นกรด

การผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่เป็นกรด ขึ้นอยู่กับความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการหมักคาร์โบไฮเดรตทำให้ได้กรดแลคติก แบคทีเรียแลคติกชนิดมีโซไฟล์ (mesophiles) ที่นำมาใช้ได้แก่ *Lactococcus* *Leuconostoc* *Lactobacillus* และ *Pediococcus* โดยอุณหภูมิที่ใช้หมัก อยู่ระหว่าง 20 – 30°C เช่นการหมักเนยแข็งส่วนใหญ่ เนื้อสัตว์หมัก ขนมหั้วเปรี้ยวและการหมักผักดอง ส่วนแบคทีเรียแลคติกชนิดเทอร์โมไฟล์ (thermophiles) เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Streptococcus* spp. จะใช้หมักที่อุณหภูมิสูง เช่นที่ 45°C ในการหมักโยเกิร์ต เป็นต้น

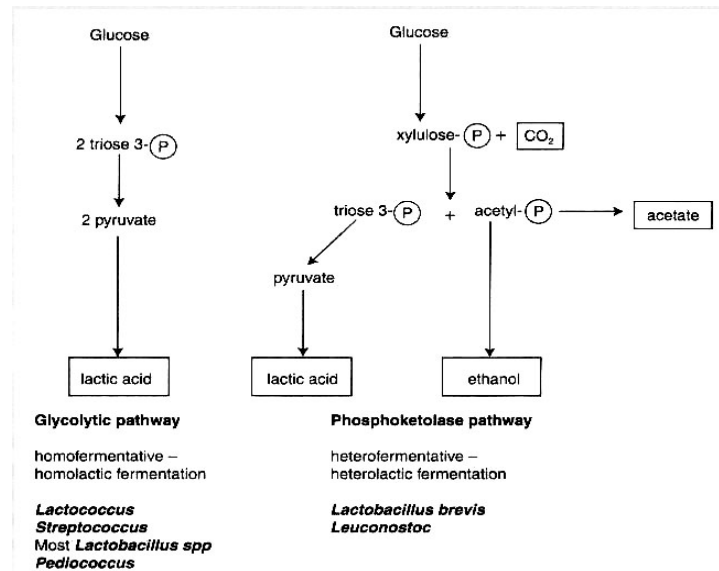
ตารางที่ 26 ชนิดและตัวอย่างอาหารหมักโดยวิธีดั้งเดิมและอาหารหมักของชาวตะวันออก

ชนิดอาหาร	ตัวอย่าง	ประเทศที่ผลิต
1) อาหารที่หมักด้วยเชื้อราและมีการเติมน้ำเกลือ	ซอสถั่วเหลือง เต้าหู้	ประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
2) อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวกลั่นเนื้อที่ผลิตโดยการหมักด้วยแบคทีเรีย	นัตโต (natto)	ญี่ปุ่น จีน และไทย
3) อาหารหมักจากพืชตระกูลถั่ว โดยการหมักด้วยแบคทีเรียหรือเชื้อในกรด ตามด้วยการหมักด้วยเชื้อรา	เทมเป้ (tempeh)	อินโดนีเซีย
4) การหมักโคด้วยแบคทีเรียแลคติก	idli	อินเดีย
5) อาหารหมักแอลกอฮอล์ที่ผลิตโดยยีสต์หรือเชื้อราอื่นๆ	tape	อินโดนีเซีย

ที่มา : ดัดแปลงจาก Garbutt (1997)

เมตาโบลิซึมของแบคทีเรียแลคติก

โดยทั่วไปสามารถแบ่งประเภทของแบคทีเรียแลคติกตามวิถีเมตาโบลิซึมที่ใช้ในการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรตและปลดปล่อยพลังงานทำให้ได้ผลิตภัณฑ์หมักเป็นผลพลอยได้ออกเป็น 2 ประเภทคือแบคทีเรียโฮโมแลคติก (homolactic bacteria) ซึ่งสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และแบคทีเรียเฮเทอโรแลคติก (heterolactic bacteria) ซึ่งสร้างสารอื่นๆนอกเหนือจากกรดแลคติก เช่นกรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล วิถีเมตาโบลิซึมของแบคทีเรียแลคติกทั้งสองประเภทแสดงดังภาพที่ 38



ภาพที่ 38 วิถีเมตาโบลิซึมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักกรดแลคติก

ที่มา : Garbutt (1997)

แบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญต่อการสร้างสารอินทรีย์อื่นๆ ที่ทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของผลิตภัณฑ์หมัก นอกเหนือจากกลิ่นรสของกรดแลคติก แม้ว่าสารชนิดอื่นๆ ที่แบคทีเรียนี้สร้างขึ้นอาจมีปริมาณน้อย แต่เมื่อผสมรวมกันแล้วทำให้เกิดกลิ่นรสที่เฉพาะ เช่นการใช้ *Lactococcus* var. *diacetylactis* และ *Leuconostoc* spp. ซึ่งจะสามารถเปลี่ยนซิเตรท (citrate) ไปเป็นไดอะเซทิล (diacetyl) ซึ่งเป็นกลิ่นรสหลักของเนยแข็งคottage (cottage cheese) ควาร์ก (quark) และเนยบัตเตอร์ (butter) หรือกลิ่นรสของโยเกิร์ต ที่เกิดจากการสร้างอะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดย *Lactobacillus delbreukii* subsp. *bulgaricus* เป็นต้น แบคทีเรียที่ใช้เป็นสตาร์ทเตอร์ในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ให้รสชาติและกลิ่นรสที่เฉพาะ เรียกว่า aroma bacteria นอกจากนั้นแบคทีเรียแลคติกบางชนิดจะสร้างสารโพลิเมอร์ (polymers) หรือสารเมือก (slime) ซึ่งจะทำให้ได้ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

อาหารหมักบางชนิดและจุลินทรีย์ของอาหารหมัก

ผลิตภัณฑ์นํ้านมหมัก

ผลิตภัณฑ์นํ้านมหมักที่สำคัญได้แก่โยเกิร์ต เนยแข็งและเนยบัตเตอร์ ซึ่งบริโภคมากในแถบประเทศตะวันตก การผลิตผลิตภัณฑ์นํ้านมหมัก ทำโดยการเติมแบคทีเรียแลคติกลงไปในนํ้านมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้ว วิธีดั้งเดิมจะใช้เชื้อที่เป็นสตาร์ทเตอร์จากผลิตภัณฑ์ที่ผลิตครั้งก่อนในรูปของเหลว โดยเติมในอัตราส่วนที่พอเหมาะและทำให้เกิดการหมักขึ้นอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบันมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ทางการค้าในรูปผง ที่ผ่านการทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง (freeze dried) หรือแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว โดยอาจเติมลงในนํ้านมโดยตรงหรือนำมาเตรียมเป็นสตาร์ทเตอร์ก่อนเติม จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์นํ้านมหมักแสดงดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นํ้านมหมัก

ผลิตภัณฑ์	สตาร์ทเตอร์แบคทีเรียแลคติก
เนยบัตเตอร์	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis/cremoris</i>
โยเกิร์ต	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
ไบโอโยเกิร์ต เอบี	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
ไบโอโยเกิร์ต เอบีที	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>thermophilus</i>
เนยแข็งเชดดาร์	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (+ <i>lactis</i>)
เนยแข็งคอทเทจ	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis/cremoris</i>
กีเฟอร์	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis/cremoris</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus kefir</i>
	<i>Lactobacillus kefirianofaciens</i> <i>Lactobacillus casei</i>

ที่มา : ดัดแปลงจาก Garbutt (1997)

นอกเหนือจากกลั่นรสเฉพาะที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นในผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดแล้ว แบคทีเรียแลกติกยังมีบทบาทสำคัญในช่วงของการบ่ม (ripening) เนยแข็ง เช่น เนยแข็งเชดดาร์ (cheddar cheese) เมื่อบ่มทิ้งไว้จนได้ที่ พบว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนจากแบคทีเรียแลกติก จะทำการย่อยสลายเคซีน (casein) ทำให้เกิดกลิ่นรสและลักษณะเนื้อสัมผัสที่เฉพาะของเนยแข็งชนิดนี้

ปัญหาที่เกิดขึ้นในการใช้สตาร์ทเตอร์ คือการสร้างกรดที่มากเกินไป ซึ่งอาจทำให้กระบวนการหมักล้มเหลวหรือทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพต่ำ อาจก่อให้เกิดปัญหาการเสื่อมเสียง่ายหรือปัญหาจากจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เช่นจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* ชนิดที่สร้างสารพิษเอ็นเทอโรทอกซิน หรือจาก *Salmonella* spp. ปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้ อาจมีสาเหตุมาจากหลายประการ ได้แก่

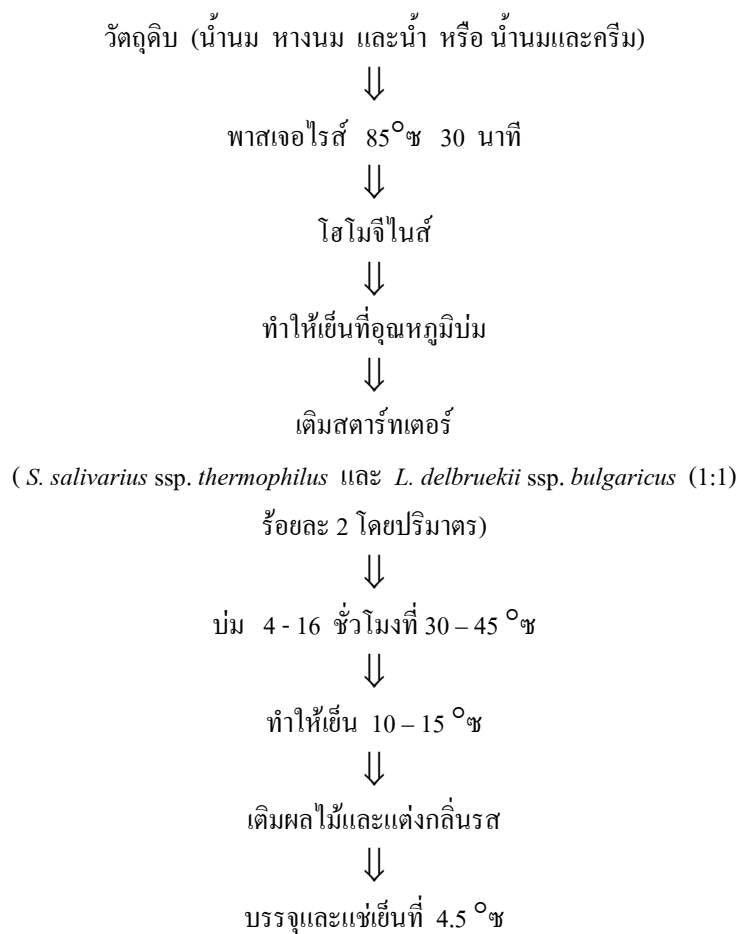
- 1) ไวรัสแบคทีริโอเฟจ (bacteriophage viruses) ซึ่งทำลายเชื้อที่ใช้เป็นสตาร์ทเตอร์ โดยมีที่มาจากน้ำนมดิบ
- 2) สารปฏิชีวนะที่ตกค้างในน้ำนม เป็นผลให้เกิดการทำลายยับยั้งหรือเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสตาร์ทเตอร์
- 3) การทำความสะอาดอุปกรณ์หรือเครื่องมือไม่เพียงพอ ทำให้สารเคมีเช่นสารทำความสะอาดหรือสารที่ใช้ฆ่าเชื้อตกค้าง ในอุปกรณ์และปนเปื้อนสู่ น้ำนมและมีผลต่อสตาร์ทเตอร์โดยตรง
- 4) ปริมาณของแอกกลูตินิน (agglutinins) แอ็กกลูตินินเป็นแอนติบอดี (antibody) ที่มีอยู่ในน้ำนมตามธรรมชาติ ซึ่งจะทำให้เซลล์แบคทีเรียเกาะติดกันเป็นก้อน (clump) และอาจทำให้สตาร์ทเตอร์สร้างกรดแลกติกได้ช้าลง
- 5) ความไม่คงตัวของพลาสมิด (plasmid) ของแบคทีเรียแลกติก โดยพลาสมิดดังกล่าวมีผลต่อคุณสมบัติที่สำคัญของเซลล์แบคทีเรียแลกติก เช่นเมตาโบลิซึมของแลกโตส การสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน การทนต่อไวรัสเฟจ และการสร้างสารโพลีเมอร์ เป็นต้น พลาสมิดดังกล่าวอาจสูญเสียในระหว่างการถ่ายเทเชื้อในขั้นตอนการเตรียมสตาร์ทเตอร์ ทำให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นช้า

ในการผลิตผลิตภัณฑ์นมหมัก นอกเหนือจากการใช้แบคทีเรียแลคติกแล้ว ยังมีการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความแตกต่างกันออกไป และได้กลิ่นรสที่มีลักษณะเฉพาะ เช่นลิเฟอร์ ที่ใช้ยีสต์ชนิดที่หมักน้ำตาลแลกโตส และได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ ทำให้มีลักษณะซ่าและมีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย ในไบโอโยเกิร์ต (Bio yoghurt) มี *Bifidobacterium bifidum* ซึ่งสร้างกรดอะซิติกและช่วยในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ ในเนยแข็งชนิดที่มีรูอากาศเช่นเนยแข็งเอ็มเมนทาล (emmental) ที่ผลิตโดยเชื้อ *Propionibacterium* spp. ซึ่งเปลี่ยนน้ำตาลแลกโตสไปเป็นกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดช่องอากาศขึ้น ในช่วงของการบ่มเนยแข็งบางชนิด อาจมีเชื้อราเจริญที่ผิวนอกหรือภายในของชิ้นเนยแข็ง โดยการเติมสปอร์เชื้อราในระหว่างขั้นตอนการผลิตหรือใช้เชื้อราที่ได้จากธรรมชาติ เช่น *Penicillium camembertii* *P. caseicolum* *P. candidum* *P. roquefortii* *P. glaucum* *Geotrichum candidum* และ *Brevibacterium linens* เป็นต้น

นมหมัก

ผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีการผลิตมาเป็นระยะเวลานาน ได้แก่บัตเตอร์มิลค์ (buttermilk) ลิเฟอร์ อะซิโดฟิลัสมิลค์ (acidophilus milk) และโยเกิร์ต โดยโยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในปัจจุบันและมีมากมายหลายชนิด กระบวนการผลิตโยเกิร์ต แสดงดังภาพที่ 39

ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อผสม 2 ชนิด พบว่า *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* จะเริ่มการหมักโดยสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และกรดฟอรั่มิก ช่วยลด pH และกระตุ้นการเจริญของ *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* ซึ่งจะเจริญและสร้างเปปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนจากเอนไซม์โปรตีนเอส ซึ่งจะช่วยกระตุ้นการเจริญของ *S. salivarius* ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นดังกล่าวทำให้แบคทีเรียทั้งสองเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว เป็นผลให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นเร็ว โดยจะเกิดกรดแลคติกและสารให้กลิ่นรสมากกว่าที่จะใช้เชื้อแบคทีเรียเพียงชนิดเดียว โยเกิร์ตที่ได้มีค่า pH สุดท้าย 3.7 – 4.3 ปริมาณกรดแลคติกร้อยละ 0.8 – 1.8 อะซิติลดีไฮด์ (สารให้กลิ่นรสหลัก) 20 – 40 ส่วนในล้านส่วน รวมทั้งได้ไคอะเซทิลและกรดอะซิติกปริมาณเล็กน้อย



ภาพที่ 39 กระบวนการผลิตโยเกิร์ต

ที่มา : คัดแปลงจาก Garbutt (1997)

การผลิตโยเกิร์ตชนิดใหม่โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* (โยเกิร์ตเอบี) หรือ *L. acidophilus* *B. bifidum* *S. salivarius* ssp. *thermophilus* (โยเกิร์ตเอบีที) เป็นสตาร์ทเตอร์ โดยมีรายงานว่าโยเกิร์ตชนิดนี้มีคุณสมบัติทำให้ร่างกายมีสุขภาพที่แข็งแรง การผลิตทำโดยเติมเชื้อสตาร์ทเตอร์นี้ลงในถังหมักขนาดใหญ่ บ่มที่ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มี pH สุดท้าย 4.2 – 4.4 และมีกลิ่นรสของครีมน้อยกว่า

การผลิตโยเกิร์ตมักไม่พบปัญหาในกระบวนการผลิต เนื่องจากนํ้านมที่ใช้เป็นวัตถุดิบผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้ว รวมทั้งค่า pH สุดท้ายของผลิตภัณฑ์ประมาณ 4.4 โดยมีความเข้มข้นของกรดแลกติกค่อนข้างสูง ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจากเชื้อโรค แต่ถ้าโยเกิร์ตมีค่า pH ที่สูงกว่านี้ หรือการเติมสารให้กลิ่นรสที่ไม่ได้มาเชื้ออย่างเพียงพอ อาจทำให้ผู้บริโภคเกิดอันตรายได้ ในส่วนการเตรียมสตาร์ทเตอร์อาจพบว่าล้นเหลว เนื่องจากสารปฏิชีวนะที่ตกค้างในนํ้านม ปัญหาที่สำคัญของโยเกิร์ตคือการเสื่อมเสียจากยีสต์และเชื้อราที่ปนเปื้อน โดยยีสต์จะหมักน้ำตาลในโยเกิร์ตทำให้ได้คาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล เป็นผลให้ภาชนะบรรจุระเบิด เนื้อสัมผัสเปลี่ยนแปลงและมีกลิ่นรสยีสต์ ส่วนเชื้อราสามารถเจริญบนผิวหน้าของโยเกิร์ตได้ โยเกิร์ตที่ผสมผลไม้ มีโอกาสเสื่อมเสียจากยีสต์และเชื้อราได้ง่ายกว่าโยเกิร์ตธรรมดา เนื่องจากการเพิ่มปริมาณน้ำตาล (กลูโคสและซูโครส) และเพิ่มโอกาสในการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย วิธีการควบคุมยีสต์และเชื้อราอาจทำได้โดยฆ่าเชื้ออุปกรณ์ที่ใช้บรรจุ รมัควัสดุในการเก็บรักษาภาชนะบรรจุ ติดตั้งเครื่องกรองอากาศในห้องที่ใช้บรรจุ การใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในบริเวณที่บรรจุ การรมควันฆ่าเชื้อในห้องบรรจุเป็นระยะ การทำความสะอาดพื้นห้องบรรจุ ใช้ผลไม้หรือไซรัปผลไม้ที่เหมาะสม การใช้สารซัลไฟต์ในผลไม้ การให้ความร้อนหรือการใช้วัตถุกันเสียแก่ผลิตภัณฑ์สุดท้าย

เนยแข็ง

เนยแข็งมีมากมายหลายชนิดแตกต่างกันออกไป โดยส่วนใหญ่ผลิตในระดับครัวเรือน โดยใช้วิธีการผลิตดั้งเดิม ยกเว้นเนยแข็งบางชนิดเช่นเชดดาร์ ที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ โดยใช้ระบบการผลิตกึ่งอัตโนมัติและทันสมัย ขั้นตอนการผลิตเนยแข็งโดยทั่วไปมีดังนี้

- 1) ใช้สตาร์ทเตอร์เพื่อผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลแลคโตส
- 2) ตกตะกอน (coagulation) เกล็นในนํ้านมโดยใช้เอนไซม์เรนเน็ต (rennet)
- 3) แยกเวย์ (whey)
- 4) เติมน้ำเกลือ (salting)

5) บ่ม (ripening)

กรดแลกติกที่เกิดขึ้นโดยสตาร์ทเตอร์ นอกจากทำให้เกิดกลิ่นรสแล้ว ยังช่วยทำให้เกิดเคิร์ด (curd) หรือตกตะกอนนมและแยกเวย์ออกจากตะกอนได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งทำลายหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและช่วยในการบ่มเนยแข็ง สตาร์ทเตอร์ยังทำให้เกิดกลิ่นรสจากสารผสมต่างๆ เช่นอะซิเตท (acetate) เอทานอล อะซิติกแอซิดและไดอะเซทิล และยังสร้างสารที่ช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และแบคทีริโอซิน (bacteriocins)

เนยแข็งสามารถแบ่งประเภทตามปริมาณความชื้น ได้แก่ชนิดแข็ง (ความชื้นร้อยละ 26 – 50) ชนิดกึ่งแข็ง (ความชื้นร้อยละ 42 – 52) และชนิดอ่อน (ความชื้นร้อยละ 48 – 80) หรืออาจแบ่งประเภทตามการบ่มเช่น ชนิดไม่บ่ม (unripened) ชนิดบ่มภายในโดยใช้เชื้อหรือไม่ใช้จุลินทรีย์ และชนิดบ่มที่ผิวหน้า (surface ripened)

ปัญหาที่พบในการผลิตเนยแข็ง คือการเข้าทำลายของไวรัสฝางในสตาร์ทเตอร์ ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างการเตรียมสตาร์ทเตอร์หรือระหว่างกระบวนการผลิต เป็นผลให้เกิดการหมักที่ช้าลง และมีโอกาสเสื่อมเสียได้ง่ายจากจุลินทรีย์อื่นๆ และจุลินทรีย์ก่อโรคอาจเจริญขึ้นได้ ทำให้คุณภาพของเนยแข็งด้อยลงและอาจเกิดอันตราย การควบคุมไวรัสฝาง ทำได้โดยป้องกันการปนเปื้อนในระหว่างเพาะเลี้ยงสตาร์ทเตอร์ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของฝาง เปลี่ยนระบบเพาะเลี้ยงสตาร์ทเตอร์เพื่อป้องกันการก่อตัวของฝาง เช่น หมุนเวียนการใช้สายพันธุ์ผสมของสตาร์ทเตอร์ ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อถังหมักระหว่างการผลิตเช่นการใช้คลอรีน (50 – 200 ส่วนในล้านส่วน) รวมทั้งไม่นำถังบรรจุที่รองรับเวย์ที่แยกออกมาใช้ได้นานนม เนื่องจากฝางสามารถปนเปื้อนในเวย์ในปริมาณสูง

การเสื่อมเสียของเนยแข็งอาจเกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการผลิตและระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์สุดท้าย การเสื่อมเสียของเนยแข็งส่วนใหญ่ ได้แก่การเกิดกลิ่นรสผิดปกติและเกิดแก๊สในเคิร์ดจากโคลิฟอร์ม ซึ่งแก้ไขโดยใช้น้ำมันพาสเจอร์ไรส์ในการผลิต รวมทั้งใช้สตาร์ทเตอร์ที่ยังแข็งแรง การเจริญของพวกคลอสทริเดียม (clostridia) ที่สร้างสปอร์ เช่น *Clostridium butyricum*

ในระหว่างการบ่ม เนื่องมาจากการใช้น้ำนมจากโคที่เลี้ยงด้วยไซเลจ (silage) ซึ่งมีคลอสทริเดียมปนเปื้อนในปริมาณที่สูง สามารถแก้ไขโดยการเติมไนซิน (nisin) การเจริญของเชื้อราบริเวณผิวหน้าของเนยแข็ง ซึ่งอาจป้องกันโดยการเก็บรักษาเนยแข็งในที่สะอาดและมีความชื้นต่ำ การเคลือบด้วยแว็กซ์ (wax) หรือใช้พลาสติกปิดที่ผิวหน้า รวมทั้งการเติมวัตถุกันเสียเช่นซอร์เบต (sorbate) หรือไพมาริซิน (pymaricin)

การเสื่อมเสียของเนยแข็งที่มีความชื้นและค่า pH สูงเช่นเนยแข็งคอตเทจ โดยเชื้อ *Pseudomonas* spp. และยีสต์สามารถป้องกันได้โดยการป้องกันการปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิตและใช้น้ำที่มีคุณภาพดีในการล้างเคิร์ด จุลินทรีย์ก่อโรคหรือสารพิษที่ปนเปื้อนในเนยแข็ง ได้แก่ *Salmonella* ที่มักปนเปื้อนทั้งในเนยแข็งชนิดแข็งและกึ่งแข็ง *E. coli* (enteropathogenic) และ *Listeria monocytogenes* ในเนยแข็งชนิดอ่อน และที่พบน้อยได้แก่ *Clostridium botulinum*

กระบวนการหมักผัก

การหมักผักมีการผลิตมานานหลายศตวรรษ โดยช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผักให้นานขึ้น และมีข้อดีว่าการแช่เยือกแข็ง การทำแห้งและการนำไปบรรจุกระป๋อง การหมักผักใช้เทคโนโลยีที่ไม่ซับซ้อน ใช้พลังงานน้อย ผลผลิตผักที่ได้มีรสชาติและเนื้อสัมผัสเฉพาะ สามารถนำไปดื่มหรือเป็นส่วนประกอบของอาหารอื่นๆได้ ผักหมักที่สำคัญทางตะวันตก ได้แก่ กระหล่ำปลีดอง แดงกวาดองและมะกอกดอง ในทางตะวันออกได้แก่กิมจิ เป็นต้น กระบวนการหมักผักนั้น เริ่มตั้งแต่การเก็บเกี่ยวผัก การกำจัดส่วนที่เสียหรือที่ติดโรคออก การเติมเกลือเพื่อสกัดน้ำในผักเช่นในกระหล่ำปลีดอง หรือการเติมน้ำเกลือในแดงกวาและมะกอก การเก็บรักษา การบรรจุและการจำหน่าย

การใช้เกลือมีจุดประสงค์ต่างๆดังนี้

- 1) ช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ของผักโดยวิธีออสโมซิสและทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสที่ดี
- 2) ทำให้เซลล์ของผักแตกออก ดังนั้นสารภายในเซลล์โดยเฉพาะน้ำตาลจะออกมาผสมกับเกลือ เป็นอาหารของแบคทีเรียแลคติกในขั้นตอนการหมัก
- 3) ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย เป็นผลให้แบคทีเรีย

แลกติกมีโอกาสเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

ในกระบวนการหมักผัก เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนน้ำตาลในน้ำเกลือไปเป็นกรดแลกติกซึ่งทำหน้าที่เป็นสารกันเสีย รวมทั้งสารอินทรีย์อื่นๆที่เกิดขึ้น เป็นองค์ประกอบของกลิ่นรสและรสชาติของผลิตภัณฑ์สุดท้าย แบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักผักได้แก่ *Leuconostoc mesenteroids*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. plantarum* และ *Pediococcus pentacaseus* โดยอัตราส่วนของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิของการหมัก กระบวนการหมักผักโดยทั่วไปจะขึ้นอยู่กับแบคทีเรียแลกติก ซึ่งมีอยู่ตามธรรมชาติในวัตถุดิบและมักไม่ใช้วิธีการเติมสารตัวเติม แต่ในบางครั้งอาจใช้ได้ เช่นการหมักแตงกวาดอง เพื่อหลีกเลี่ยงการเสื่อมเสียเนื่องมาจากแบคทีเรียชนิดเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative bacteria) โดยแบคทีเรียพวกนี้จะแทรกตัวเข้าไปในไส้แตงกวา และสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ขึ้น เป็นผลให้เกิดช่องว่างภายในผลแตงกวาดอง

จุลชีววิทยาของกระหล่ำปลีดอง

การหมักกระหล่ำปลีดองเป็นตัวอย่างของการหมักโดยใช้จุลินทรีย์หลายชนิดเจริญแทนที่ต่อเนื่องกัน (microbial succession) โดยกลุ่มจุลินทรีย์หรือจุลินทรีย์ชนิดแรกเจริญขึ้นแล้วเปลี่ยนสภาวะในอาหาร ทำให้เหมาะต่อการเจริญของจุลินทรีย์หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ชนิดที่สองที่เจริญขึ้นเป็นลำดับถัดมา กระบวนการหมักกระหล่ำปลีดองแบ่งได้เป็น 3 ระยะ ได้แก่

1) ระยะเริ่มต้น ในระยะนี้ *Leuconostoc mesenteroids* จะเจริญขึ้น โดยจะเปลี่ยนน้ำตาลที่ออกมาจากผักและละลายผสมในน้ำเกลือให้กลายเป็นกรดแลกติก กรดอะซิติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ บทบาทของเชื้อนี้ในการผลิตกระหล่ำปลีดอง มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับคุณภาพที่ดีของผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยสรุปได้แก่

- 1.1) ทำให้เกิดกรดแลกติกและอะซิติกอย่างรวดเร็วและลดค่า pH ในน้ำเกลือให้ต่ำกว่า 4.0 ภายใน 2 วันแรกของการหมัก ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้กระหล่ำปลีอ่อนตัวลง

- 1.2) การเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำเกลือลดลง เกิดสภาวะไร้อากาศเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นคาร์บอนไดออกไซด์ยังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิดและกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ
- 1.3) สภาวะไร้อากาศทำให้วิตามินซีในกระหล่ำปลีมีความคงตัวและปริมาณวิตามินต่างๆ จะยังคงอยู่
- 1.4) น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากการย่อยสลายซูโครสในน้ำเกลือ อาจทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดสีคล้ำ เนื่องจากไปรวมตัวกับกรดอะมิโนที่มีอยู่ (ปฏิกิริยาเมลลาร์ด) เชื้อ *Leuconostoc* จะยับยั้งปฏิกิริยานี้โดยเปลี่ยนน้ำตาลฟรุคโตสไปเป็นแมนนิทอล (mannitol) และเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเดกซ์แทรน (dextran) ซึ่งสารทั้งสองชนิดที่เกิดขึ้นใช้เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลคติกอื่นๆ
- 1.5) *Leuconostoc* อาจสร้างสารกระตุ้นการเจริญบางชนิด ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ เจริญได้ดีขึ้น
- 1.6) *Leuconostoc* ช่วยทำให้กลิ่นรสและรสชาติของผลิตภัณฑ์สุดท้ายดีขึ้น

ในช่วงระยะเวลา 15 ชั่วโมงแรกของการหมัก มักพบว่ามี การเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะโคลิฟอร์ม ซึ่งจะช่วยให้ปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในน้ำเกลือ แต่เชื้อเหล่านี้จะถูกทำลายภายในเวลา 1 - 2 วัน

2) ระยะที่สอง เมื่อมีการสะสมของกรดแลคติกมากขึ้นและค่า pH ลดลง *Lactobacillus brevis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียเฮเทอโรเฟอร์เมนเททิฟ และ *Lb. plantarum* ซึ่งเป็นโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ และทนกรดได้ดีกว่า เริ่มเจริญขึ้นและเพิ่มจำนวนมากขึ้น แบคทีเรียทั้งสองจะสร้างกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น โดยจะเจริญขึ้นมากภายในเวลา 6 – 8 วันจากเริ่มต้น

3) ระยะที่สาม หลังจากที่มีการหมักผ่านไป 16 – 18 วัน พบว่า *Lb. brevis* จะลดจำนวนลง ส่วน *Lb. plantarum* จะยังคงมีจำนวนเพิ่มขึ้น และทำให้การหมักดำเนินต่อไปจนกระทั่งน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก

ผลิตภัณฑ์กระท้ำปลีคองที่ได้มี pH ประมาณ 3.8 และมีปริมาณกรด (คำนวณเป็นกรด แลกติก) ร้อยละ 1.7 – 2.3 โดยมีอัตราส่วนระหว่างกรดอะซิดิกและแลกติกประมาณ 1 : 4 รวมทั้งพบสารอื่นๆ ได้แก่ โคอะเซทิล อะซิดล็คไฮด์และเอสเทอร์ ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นรสแก่ผลิตภัณฑ์

บทที่ 11

การควบคุมคุณภาพทางจุลินทรีย์และ ความปลอดภัยของอาหาร

วิธีการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และระดับของการปนเปื้อนจากสถานะการผลิต

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ต่างๆ ในอาหารที่ผ่านกระบวนการผลิต วัตถุดิบหรือในสถานะการผลิตนั้นเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการควบคุมคุณภาพในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ รวมทั้งห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับสุขอนามัยและสุขลักษณะของอาหาร โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ทั้งในวัตถุดิบ ตัวอย่างอาหารจากสายการผลิตและในผลิตภัณฑ์สุดท้าย เช่น การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ ระดับของเชื้อที่ใช้เป็นดัชนี ระดับหรือการรอดชีวิตของเชื้อโรคบางชนิด และในส่วนของสภาวะแวดล้อมของการผลิตอาหารอาจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์อากาศ ระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่พื้นผิวหน้าหรือคุณภาพทางจุลินทรีย์ของน้ำที่ใช้ในการผลิตเป็นต้น

เทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

วิธีการดั้งเดิม (traditional methods)

1. เพลทเคานต์ (Plate counts) ใช้วิเคราะห์ปริมาณของแบคทีเรียในอาหาร โดยอาศัยหลักที่ว่า เซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตหรือกลุ่มเซลล์ (clumps) จะเจริญและเพิ่มปริมาณภายในหรือบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและทำให้เห็นโคโลนีซึ่งสามารถนับจำนวนได้ วิธีการขั้นแรกทำโดยผสมตัวอย่างอาหารและเจือจางตามลำดับ จากนั้นถ่ายตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์ในแต่ละความเจือจางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มจนเพาะเชื้อและนับปริมาณโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณให้อยู่ในรูป colony forming units (cfu) วิธีนี้จะเห็นว่าใช้ cfu แทนปริมาณของแบคทีเรีย ซึ่งโดยทั่วไปจุลินทรีย์ในอาหารจะเจริญเป็นโคโลนีขนาดเล็ก (microcolonies) หรือ

เจริญกันอยู่เป็นกลุ่มที่มีขนาดแตกต่างกัน เมื่อตัวอย่างอาหารถูกนำมาบดผสมกับสารละลายที่ใช้เจือจางจะทำให้โคโลนีขนาดเล็กเหล่านี้แตกออก ดังนั้นโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถเจริญขึ้นมาจากเซลล์ของแบคทีเรียหนึ่งหรือหลายเซลล์ การรายงานผลเป็น cfu จึงช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว ในส่วนของการทำให้ตัวอย่างอาหารเจือจางก็เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี เนื่องจากเป็นช่วงที่อยู่ในระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 และค่าที่ต่ำกว่า 30 เป็นค่าที่ไม่ยอมรับในทางสถิติ

เทคนิคการวิเคราะห์จุลินทรีย์วิธีนี้ แบ่งได้เป็น 2 วิธีการ คือ pour plate และ spread plate และการเลือกสารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างอาหารมักใช้สารละลายเปปโตน (peptone solution) หรือสารละลายเปปโตนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (peptone phosphate buffer) ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 หรือสารละลายชนิดพิเศษเช่น ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการออกซิเจนจะใช้สารละลายที่มีคาร์บอกซ์ดำหรือการวิเคราะห์แบคทีเรียที่อาศัยในทะเลจะใช้ น้ำทะเลเทียม เป็นต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นับว่ามีความสำคัญมาก อาจใช้ชนิด selective หรือ selective และ differential หรือชนิด elective เพื่อวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์หรือกลุ่มของจุลินทรีย์เฉพาะชนิด และเทคนิคที่ใช้อาจเป็น spread plate ที่ทำให้แบคทีเรียเจริญที่ผิวหน้าหรือ pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิประมาณ 45°C เทผสมกับสารละลายตัวอย่างอาหารเจือจาง ซึ่งอาจทำลายจุลินทรีย์ชนิดไซโครโทรปหรือไซโครไฟล์ทำให้ปริมาณเกิดความคลาดเคลื่อนได้ อุณหภูมิระยะเวลาในการบ่มโคโลนีของเชื้อ รวมทั้งสภาวะบรรยากาศที่ใช้ในกรณีของมิโซไฟล์ นิยมบ่มที่ 37°C เทอร์โมไฟล์ที่ 50 - 55°C และไซโครไฟล์ที่ 18 - 25°C นอกจากนั้นวิธีบดผสมตัวอย่างอาหารเจือจางอาจมีผลต่อปริมาณของจุลินทรีย์ที่นับได้ เช่น การใช้เครื่องบดซึ่งใบมีดอาจทำให้จุลินทรีย์บาดเจ็บหรืออาจทำให้เกิดความร้อนขึ้นได้

เทคนิคที่วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในอาหารโดยทั่วไปเรียกว่า standard plate count (SPC) หรือ aerobic plate count (APC) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด general purpose เช่น tryptone dextrose yeast extract agar (plate count agar) ซึ่งหลังจากบ่มในที่มืดอากาศที่อุณหภูมิ 30°C เป็น

เวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมานับปริมาณโคโลนีที่เกิดขึ้น วิธีนี้อาจเรียกว่า total bacterial counts (TBCS) หรือ total viable count (TVC) ได้เช่นเดียวกัน

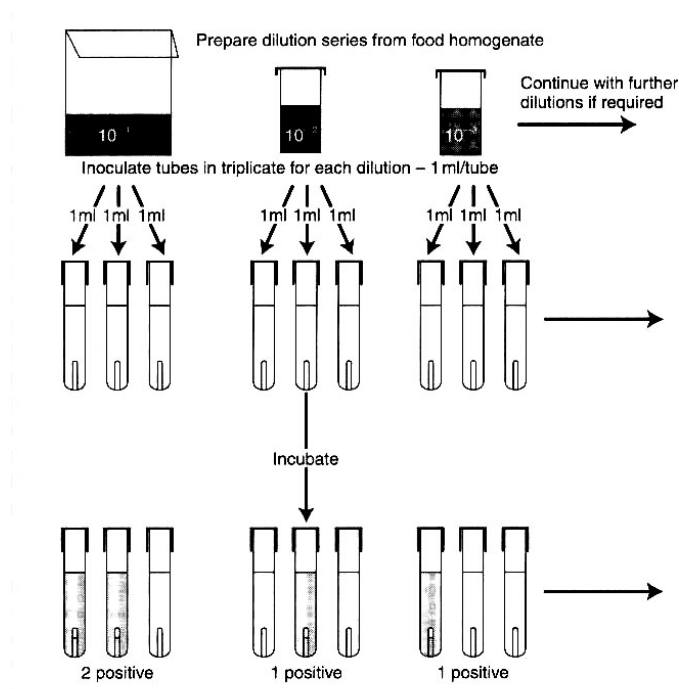
Standard plate count ใช้สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์สุดท้าย หรือใช้ควบคุมคุณภาพระหว่างการผลิตอาหาร นอกจากนั้นอาจใช้ในการประมาณอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์และใช้ควบคุมระดับการปนเปื้อนของสภาวะแวดล้อมการผลิตได้

2. เทคนิคการกรองโดยเมมเบรน (membrane filtration) โดยการกรองผ่านเมมเบรนที่ทำจากเซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate) ที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร ทำให้สามารถแยกแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราได้ เมื่อนำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการกรองแล้วมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วบ่ม สารอาหารจะถูกดูดซึมจากด้านล่างของเมมเบรนทำให้จุลินทรีย์สามารถเจริญบนผิวหน้าของเมมเบรนและเห็นเป็นโคโลนีที่สามารถนับจำนวนได้ นอกจากนั้นยังอาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด differential เพื่อวิเคราะห์เชื้อเฉพาะชนิดได้

เทคนิคการกรองโดยเมมเบรนนี้มีข้อจำกัดตรงที่อาหารที่นำมากรองต้องใสและไม่ควรมีชิ้นส่วนของเซลล์จุลินทรีย์หรือเศษอาหาร ซึ่งทำให้เมมเบรนเกิดการอุดตันและเทคนิคนี้สามารถใช้วิเคราะห์อาหารที่มีปริมาณมากแต่มีปริมาณจุลินทรีย์น้อย ๆ ได้ดี หรือใช้วิเคราะห์น้ำที่ผ่านการบำบัดมาแล้วเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์ม นอกจากนั้นอาจใช้ในการสเตอริไลซ์สารละลายหรือสารเคมีที่ไม่ทนต่อความร้อนในการฆ่าเชื้อได้และใช้แยกไวรัสที่เป็นแบคทีริโอฟาจออกจากแบคทีเรียได้

3. เทคนิค most probable number (MPN) หรือ multiple tube ใช้ในการประมาณจำนวนของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหาร ในกรณีที่ตัวอย่างอาหารมีจุลินทรีย์อยู่ในปริมาณน้อย เทคนิคนี้ใช้ได้ดีในการวิเคราะห์เชื้อที่เป็นค้ำชื้อ เช่น *E. coli* หรือเชื้อโรคบางชนิดที่มีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์โดยใช้วิธี plate count ได้ โดยทั่วไปการใช้วิธี MPN ในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหาร มักใช้หลอดที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 หลอดในแต่ละระดับความเจือจางและทำ 2 ซ้ำ จากนั้นเติมตัวอย่างอาหารลงไปหลอดละ 1 มิลลิลิตร บ่มและตรวจการ

เปลี่ยนแปลงของความขุ่นหรือสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งความสามารถในการสร้างแก๊สหรือกรดจากน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื่อนั้น ๆ เทคนิค MPN แสดงดังภาพที่ 40



ภาพที่ 40 เทคนิค most probable number แบบ 3 หลอด

ที่มา : Garbutt (1997)

เทคนิค MPN เป็นวิธีทางสถิติจากความน่าจะเป็นของการถ่ายเทเชื้อจากสารละลายตัวอย่างอาหารเริ่มต้น โดยใช้ตัวอย่างอาหารที่ความเจือจางต่างๆ ร่วมกับตารางสถิติ (MPN table) ซึ่งแสดงค่า MPN สำหรับหลอดที่ให้ผลบวกที่แตกต่างกันในแต่ละระดับความเจือจาง จากภาพที่ 37 จะเห็นว่าจำนวนหลอดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากบ่มไว้ในระดับความเจือจาง 10^{-1} 10^{-2} และ 10^{-3} คือ 2 1 และ 1 หลอด ตามลำดับ เมื่อนำค่าดังกล่าวไปหาค่า MPN ในตารางที่ 28 จะได้ค่า MPN เท่ากับ 20 ต่อกรัม

ตารางที่ 28 ตาราง MPN

จำนวนหลอดที่ให้ผลบวกในแต่ละความเจือจาง			MPN / กรัม
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
0	1	0	2
1	0	0	4
1	1	0	7
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
3	0	0	23
3	0	1	40
3	1	0	40
3	1	1	70
3	2	0	90
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	200
3	3	1	500
3	3	2	1100
3	3	3	>1100

ที่มา : Garbutt (1997)

ความสามารถในการตรวจวิเคราะห์โดยเทคนิค MPN แบบ 3 หลอด คือ ที่ 2 ต่อกรัม หรือมีสถิติของตัวอย่าง แต่จะสามารถเพิ่มระดับความสามารถในการตรวจวิเคราะห์โดยการเพิ่มปริมาณตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์และ/หรือปริมาณของหลอดที่ใช้ได้

4. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์โดยตรง (direct microscopic count) การวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารสามารถทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา โดยนำตัวอย่างประมาณ 0.01 มิลลิลิตร มาแผ่กระจายบนกระจกสไลด์ในพื้นที่ขนาด 1 ตารางเซนติเมตร จากนั้นทำให้แห้งแล้วย้อมสีที่เหมาะสมเช่น เมธิลีนบลู (methylene blue) แล้วใช้เลนส์ที่จุ่มน้ำมัน (oil immersion lens) ส่อง นับปริมาณของจุลินทรีย์โดยการสุ่มพื้นที่เป็นจำนวน 25 ครั้ง และคำนวณปริมาณของจุลินทรีย์ให้อยู่ในรูปต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตรของอาหาร วิธีนี้พบว่าค่อนข้างรวดเร็วแต่มีข้อเสียได้แก่ ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ตายแล้วและเซลล์ที่มีชีวิต และไม่เหมาะกับงานวิเคราะห์ที่มีปริมาณของตัวอย่างมาก นอกจากนี้ชิ้นส่วนของเซลล์จุลินทรีย์ทำให้ยากต่อการนับปริมาณและปริมาณสูงสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ไม่เกิน 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนเทคนิค Howard mould count นั้น ใช้วิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศ เช่น ซอสมะเขือเทศ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อราในวัตถุดิบ เทคนิคนี้ใช้การนับปริมาณของเส้นใยที่แตกหักของเชื้อราในผลิตภัณฑ์ที่ทราบปริมาตร

5. การทดสอบโดยใช้สีรีดอกซ์ (dye reduction tests) เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจคุณภาพของน้ำนม เช่น ใช้สีเมธิลีนบลูหรือรีซาซูริน (resazurin) เพื่อประมาณปริมาณของจุลินทรีย์ในน้ำนม ซึ่งใช้สารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ทำให้เกิดสารรีดิวซ์ที่สามารถรีดิวซ์สีรีดอกซ์ที่นำมาใช้ได้ โดยเวลาที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจะแสดงถึงปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในตัวอย่างของน้ำนม ทำให้ทราบคุณภาพของน้ำนมอย่างคร่าวๆ ได้

การทดสอบนี้จะใช้ได้ดีเมื่อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนส่วนใหญ่คือ พวกมิโซไฟล์และทำให้เกิดการหมักได้ดี เช่นพวก streptococci และโคลิฟอร์ม อย่างไรก็ตามระบบการเก็บรักษาน้ำนมได้ใช้ความเย็นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น จุลินทรีย์พวกที่เจริญได้ดีคือพวกไซโครโทรป ซึ่งไม่ค่อยให้ผลหรือให้ผลไม่ชัดเจนในการรีดิวซ์สีดังกล่าว ผลจึงอาจคลาดเคลื่อนได้

6. การใช้จุลินทรีย์อินดิเคเตอร์ (indicators) จากการที่เชื้อโรคชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่ปนเปื้อนมากับน้ำซึ่งรวมไปถึงทั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในอุจจาระ ดังนั้นจึงอาจใช้การวิเคราะห์จุลินทรีย์ดังกล่าวในน้ำหรืออาหารเพื่อแสดงถึงการปนเปื้อนจากเชื้อเหล่านี้ได้ โดยเฉพาะ *E. coli* ซึ่งอยู่ใน

กลุ่มของโคลิฟอร์ม จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส ทำให้เกิดกรดและแก๊สภายใน 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้สภาวะที่มีเกลือน้ำดี (bile salts) หรือ surfactant ได้ โคลิฟอร์ม ได้แก่ *E. coli* *Enterobacter* spp. *Klebsiella* spp. และ *Citrobacter* spp. โดยแหล่งที่อยู่อาศัยของ *E. coli* คือที่ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ

โดยทั่วไปโคลิฟอร์มสามารถใช้เป็นอินดิเคเตอร์ของสุขลักษณะในอาหารที่ผ่านการให้ความร้อน เนื่องจากเชื้อนี้ไม่ทนต่อความร้อน ดังนั้นจึงอาจบ่งชี้ได้ว่าการปรากฏของเชืดังกล่าวมาจากการปนเปื้อนภายหลังจากกระบวนการให้ความร้อนหรือในกรณีที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอ นอกจากนั้นปริมาณของโคลิฟอร์มที่พบอาจชี้ให้เห็นสุขลักษณะของกระบวนการผลิตหรืออุณหภูมิการเก็บรักษาที่ไม่สม่ำเสมอ

ในส่วนของฟีคอลโคลิฟอร์ม (faecal coliforms) หมายถึงจุลินทรีย์ที่หมักแลคโตสทำให้เกิดกรดแก๊สและในอาหารเลี้ยงเชื้อเปปโตนที่มีเกลือน้ำดีที่อุณหภูมิ 44 - 45.5°C ตัวอย่างเช่น *E. coli* และ *Klebsiella* *Enterobacter* บางสายพันธุ์ และในบางครั้งอาจมีการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียตระกูล Enterobacteriaceae ในอาหารมากกว่าที่จะตรวจโคลิฟอร์ม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันแต่เปลี่ยนน้ำตาลจากแลคโตสเป็นกลูโคสแทน การวิเคราะห์แบคทีเรียในตระกูลดังกล่าวเป็นการวิเคราะห์ทั้งสองชนิด โคลิฟอร์มและพวกที่ไม่สามารถหมักแลคโตสหรือหมักแลคโตสได้ช้า เช่น *E. coli* บางสายพันธุ์ รวมทั้งเชื้อโรคบางชนิดที่ไม่ใช่แลคโตส เช่น *Salmonella* และ *Shigella*

วิธีรวดเร็ว (Rapid methods) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

จากการที่วิธีการวิเคราะห์จุลินทรีย์แบบดั้งเดิมมีข้อเสียค่อนข้างมาก เช่น ใช้เวลานาน ซึ่งอาจทำให้วัตถุดิบบางประเภทที่ผ่านกระบวนการแปรรูปหรือผลิตภัณฑ์ที่เสื่อมเสียถึงมือผู้บริโภคก่อนที่ผลการทดสอบจะเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายอาจนำมาใช้ได้เพียงแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของคุณภาพอาหารที่ผลิตขึ้น แต่ไม่สามารถนำไปแก้ไขปัญหในแต่ละจุดได้อย่างทันทั่วทั้งก่อนที่วัตถุดิบจะกลายเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

วิธีรวดเร็ว หมายถึงเทคนิคในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ลดเวลาในการวิเคราะห์หรือการได้ผลการวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่าวิธีดั้งเดิม วิธีรวดเร็วที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่

1. ATP photometry โดยทั่วไปเซลล์ของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วย ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับกิจกรรมของเซลล์ เช่น การสังเคราะห์สารสำหรับเซลล์ใหม่ การรับสารเข้าสู่เซลล์ การเคลื่อนที่และการสร้างแสง (light) ระบบการสร้างแสงประกอบด้วยสาร luciferin ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) และเอนไซม์ luciferase โดยเมื่อสารตั้งต้นและเอนไซม์ ดังกล่าวทำปฏิกิริยากับ ATP จะทำให้เกิดแสง ดังสมการ



จากสมการจะเห็นว่า ปริมาณแสงที่ถูกสร้างขึ้นเป็นอัตราส่วนกับความเข้มข้นของ ATP (1 โฟตอน ต่อ ATP 1 โมเลกุล) ดังนั้นปฏิกิริยานี้จึงสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณ ATP ในเซลล์ที่มีชีวิตได้ (เมื่อเซลล์ตาย ATP จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วจากเอนไซม์ ATP) และแสงที่ถูกปล่อยออกมาจะสามารถวัดได้โดยใช้โฟโตมิเตอร์ (photometer)

เซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีปริมาณของ ATP แตกต่างกันไป ในแบคทีเรียพบว่า มี ATP ประมาณ 1 เฟมโตกรัม (fg) และในยีสต์มีประมาณ 100 fg (1 fg = 10^{-15} g) อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่เกิดขึ้นในการใช้วิธีนี้วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ได้แก่ การที่อาหารที่นำมาวิเคราะห์มี ATP เช่นเดียวกัน ซึ่งจะต้องกำจัด ATP ส่วนนี้ออกไปก่อน และเซลล์ที่บดเจือที่มีอยู่ในอาหารที่ผ่านการแปรรูปพบว่ามี ATP น้อยกว่าเซลล์ปกติ ทำให้การประมาณจำนวนจุลินทรีย์ผิดพลาด จึงต้องเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อให้เกิดการซ่อมแซมตนเองก่อนนำมาทำการวิเคราะห์ นอกจากนั้นอาจต้องใช้วิธีการกรองจุลินทรีย์ออกจากอาหารก่อนนำมาวิเคราะห์ เนื่องจากอาหารบางประเภทสามารถดูดกลืนแสงได้ และถ้าจุลินทรีย์ในอาหารมีทั้งยีสต์และแบคทีเรีย อาจจะทำให้การสรุปผลผิดพลาด เนื่องจากยีสต์มี ATP ในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์ของแบคทีเรียมาก

วิธี ATP photometry มักใช้ในการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเนื้อสัตว์และนํ้านม วิเคราะห์คุณภาพของสตาร์ทเตอร์และทดสอบการฆ่าเชื้อในนํ้านม UHT นอกจากนั้นยังใช้ตรวจ

ติดตามการปนเปื้อนบริเวณพื้นผิวของอุปกรณ์หรือเครื่องมือที่ใช้ผลิตอาหารและวิธีการทำความสะอาดต่างๆ เป็นต้น

2. เทคนิค direct epifluorescent filter เป็นเทคนิคที่ใช้ร่วมกันระหว่างการใช้กล้องจุลทรรศน์และการกรองโดยเมมเบรน เพื่อที่จะวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหาร วิธีการทำคือนำตัวอย่างอาหารเหลวที่ทราบปริมาตรมากรองผ่านเมมเบรน จากนั้นใช้สี อะคริดีนอเรนจ์ (acridine orange) เทลงบนเมมเบรนเพื่อย้อมจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนผิวหน้าของ เมมเบรน จากนั้นนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด epifluorescent โดยเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่ติดสีย้อมดังกล่าวจะสามารถนับเป็นจำนวนเซลล์ต่อปริมาตรที่นำมากรอง พื้นที่ของการกรองและพื้นที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งจำนวนพื้นที่ที่ใช้นับเซลล์

ในกล้องจุลทรรศน์ชนิด epifluorescent นั้น แสงมิได้ส่องผ่านวัตถุเช่นเดียวกับกล้องจุลทรรศน์ปกติ แต่แหล่งของแสงนี้มาจากหลอดไฟที่มีไอของปรอท ซึ่งให้แสงที่มีคลื่นเฉพาะสำหรับเซลล์ที่ติดสีอะคริดีนอเรนจ์ ทำให้เรืองแสงขึ้น โดยสีดังกล่าวจับตัวกับ RNA และ DNA ของเซลล์ทำให้เกิดสีส้มและเขียวตามลำดับ วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อนี้ไม่ต้องรอให้จุลินทรีย์เจริญ ดังนั้น จึงเป็นเทคนิคที่รวดเร็วกว่าวิธีการกรองด้วยเมมเบรน คือ ใช้เวลาประมาณ 45 นาที ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถนับจุลินทรีย์ที่มีในอาหารปริมาณน้อยๆ ได้ และสามารถนับเซลล์ที่ติดสีย้อมดังกล่าวได้ง่ายกว่ารวมทั้งการนับจำนวนจุลินทรีย์สามารถประยุกต์โดยใช้เครื่องมือนับอัตโนมัติได้ อย่างไรก็ตามในบางครั้งอาจต้องมียุทธวิธีเพื่อปรับเปลี่ยนสภาพของอาหารให้เหมาะสมกับการกรอง เช่น น้ำนมจะต้องผ่านการเติมสาร surfactant เพื่อให้ไขมันกระจายตัว รวมทั้งเติมเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน เช่น ทริปซิน (trypsin) เพื่อแยกเซลล์โซมาติก (somatic cells) เป็นต้น

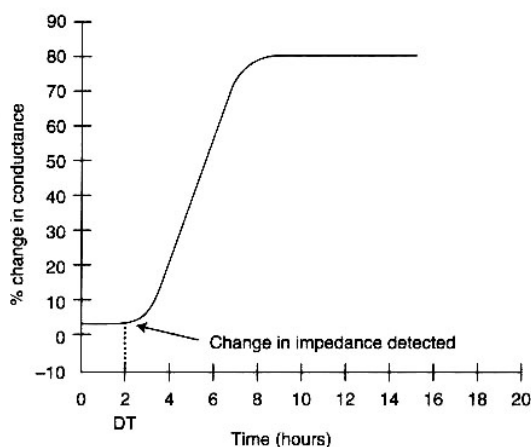
3. การวัด electrical impedance

Impedance หมายถึงความต้านทานต่อการไหลของไฟฟ้ากระแสสลับที่ผ่านสารตัวนำ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ impedance ประกอบด้วย 2 องค์ประกอบหลัก ได้แก่ capacitance ที่เกิดจากการสะสมของไอออนที่มีประจุที่บริเวณผิวหน้าระหว่างอิเล็กโทรด (electrode) และอาหารเลี้ยงเชื้อ และ conductance ที่เป็นส่วนกลับของความต้านทานต่อการไหลของกระแสที่ขึ้นอยู่กับการ

ปริมาณของอออนที่มีประจุในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี conductance สูงจะมีค่าความต้านทานที่ต่ำและกลับกันในทางตรงกันข้าม

การเปลี่ยนแปลงของ impedance ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ ที่ไม่มีประจุหรือสารขนาดใหญ่ที่มีประจุ เปลี่ยนเป็นสารขนาดเล็กที่มีประจุเพิ่มขึ้น และเคลื่อนที่ได้รวดเร็วขึ้นเนื่องมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น กรดอะมิโนถูกดึงหมุ่ อะมิโนทำให้ได้อออนแอมโมเนียม ทำให้ค่าความต้านทานต่อกระแสไฟฟ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง โดยทั่วไปการเจริญของแบคทีเรียมักทำให้ค่า conductivity เพิ่มขึ้น (หรือค่า impedance ลดลง)

ตัวอย่างเครื่องมือที่ใช้วัดค่า impedance ได้แก่ แบคโตมิเตอร์ (Bactometer) ซึ่งสามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่านี้ในขณะที่จุลินทรีย์กำลังเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อและสามารถนำค่ามาสร้างกราฟการเปลี่ยนแปลงของค่า impedance ต่อเวลา ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับกราฟการเจริญของแบคทีเรีย ดังภาพที่ 41

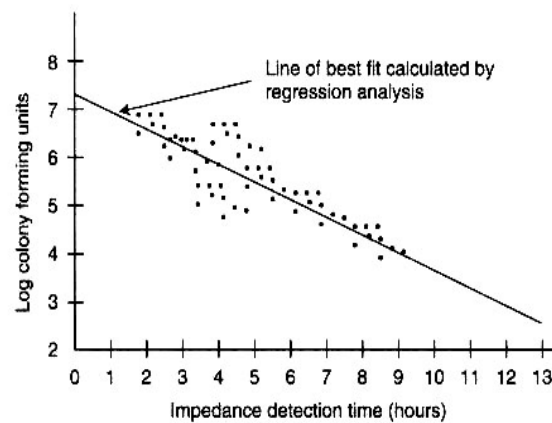


ภาพที่ 41 กราฟแสดงค่า impedance

ที่มา : Garbutt (1997)

จากกราฟ impedance นั้น จะพบว่าปริมาณของเซลล์ที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าวต้องมีสูงถึง 10^6 - 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เวลาที่ใช้ตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงจุดที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า impedance เรียกว่า detection time (DT) ซึ่งมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณของ จุลินทรีย์ที่มีในตัวอย่าง ถ้ามีปริมาณจุลินทรีย์น้อยจะทำให้ DT มีค่ามาก ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อค่า DT คืออุณหภูมิที่ใช้บ่ม ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดของจุลินทรีย์และความยาวของระยะ lag ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

ในการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารนั้น จำเป็นต้องประมาณค่าเป็น cfu ดังนั้น จึงต้องวัดค่า impedance ด้วยเครื่องแบคโตมิเตอร์ควบคู่ไปกับการทำ plate count แล้วจึงนำค่าที่ได้จากทั้งสองวิธีมาหาความสัมพันธ์ เพื่อกำหนดเป็นสมการ แสดงดังภาพที่ 42



ภาพที่ 42 กราฟระหว่าง log cfu และค่า impedance detection time
ที่มา : Garbutt (1997)

วิธีการรวดเร็วในการวิเคราะห์จุลินทรีย์อินดิเคเตอร์

วิธีการดั้งเดิมในการวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* ใช้เวลาถึง 5 วันจนสิ้นสุดกระบวนการและอาจใช้เวลามากกว่านี้ถ้าต้องตรวจยืนยันผล ดังนั้นจึงทำให้เกิดความคิดที่จะลดระยะเวลาการวิเคราะห์ดังกล่าวเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ออกมาเร็วที่สุด เช่น การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective differential ซึ่งทำให้ใช้การวิเคราะห์ MPN ลดลงเหลือเพียงขั้นตอนเดียว อย่างไรก็ตามยังมีสาเหตุอื่นๆ ที่ทำให้การวิเคราะห์ดังกล่าวเกิดการผิดพลาด เช่น องค์ประกอบของอาหารบางชนิด ได้แก่ เอนไซม์และน้ำตาลชนิดต่างๆ อาจทำให้เกิดผลบวกที่ผิดพลาด (false positives) และจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจาก *E. coli* อาจให้ผลบวกที่ผิดพลาดเช่นเดียวกัน นอกจากนั้น *E. coli* บางสายพันธุ์ที่ไม่ให้ผลบวกกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ อาจทำให้เกิดผลลบที่ผิดพลาด (false negatives)

การทดสอบเชื้อโรคที่ปนเปื้อนในอาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป มีความจำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์หรือวัตถุดิบ และในบางครั้งต้องตรวจจุลินทรีย์ที่ก่อโรคด้วย เนื่องจากอาจปนเปื้อนมาจากวัตถุดิบหรือเป็นอาหารที่มีความเสี่ยง รวมทั้งความจำเป็นและวิธีการที่เลือกใช้ โดยจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับนักจุลชีววิทยาทางอาหารแต่ละคน สำหรับจุลินทรีย์ก่อโรคพบว่าปริมาณของเชื้อดังกล่าวเพียงเล็กน้อยจะสามารถทำให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์ จุลินทรีย์ โดยทั่วไปเช่น plate count หรือ MPN จะมีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์ไม่เพียงพอที่จะตรวจพบจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ ขั้นตอนโดยทั่วไปที่นิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร ได้แก่ การช่วยให้เซลล์ที่บาดเจ็บ (injured cells) รอดชีวิต (resuscitation) จากนั้นจึงนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective enrichment เมื่อเซลล์ที่ต้องการเจริญเติบโตแล้วจึงนำมาแยกในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ selective differential ทำการเลือกโคโลนีที่ต้องสงสัย และนำมาทดสอบยืนยันด้วยปฏิกิริยาชีวเคมีหรือปฏิกิริยาทางซีรัมวิทยา (serology)

กระบวนการผลิตอาหารที่ทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บ เช่น การใช้ความร้อน การฉายรังสี การทำแห้ง การแช่เยือกแข็งและการแช่เย็น โดยเซลล์ที่บาดเจ็บอาจมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น สูญเสียลักษณะทางกายภาพหรือทางชีวเคมี ดังนั้นเซลล์เหล่านี้จึงต้องการสารอาหารพิเศษ

หรือ growth factors อื่น ๆ ที่เซลล์ในสภาพปกติไม่ต้องการ เซลล์บาดเจ็บเหล่านี้จะยังไม่สามารถขยายพันธุ์ได้จนกว่าจะกลับคืนสภาพเป็นเซลล์ปกติ ซึ่งทำให้ระยะ lag ยาวขึ้นกว่าปกติ แต่ถ้าเซลล์เหล่านี้ได้สัมผัสกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อไปอาจมีผลทำให้เซลล์ตายได้ การตายของเซลล์ที่บาดเจ็บเหล่านี้ อาจเนื่องจากสารเคมีที่ยับยั้งจุลินทรีย์เช่น สี (dyes) หรือ surfactants เกลือ ค่า pH ที่เข้าใกล้จุดต่ำสุดหรือสูงสุดสำหรับการเจริญ ระดับของอุณหภูมิที่เข้าใกล้จุดสูงสุดที่สามารถเจริญได้ รวมทั้งสภาวะออกซิเจนต่างๆ

ดังนั้นจะเห็นว่าเทคนิคในการวิเคราะห์เชื้อ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อให้เกิดโรคอาจมีผลทำให้เชื่อดังกล่าวเกิดการบาดเจ็บได้ ทำให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้ไม่น่าเชื่อถือหรือผิดพลาด นอกจากนั้นการที่อาหารมีองค์ประกอบต่าง ๆ ที่ซับซ้อน ในการตรวจวิเคราะห์เชื้อโรคจึงต้องรอให้จุลินทรีย์ได้ซ่อมแซมตนเองและขยายพันธุ์โดยใช้สภาวะการเจริญที่เหมาะสมที่สุด จึงจะทำให้ผลการวิเคราะห์มีความน่าเชื่อถือ กระบวนการช่วยให้จุลินทรีย์ที่บาดเจ็บฟื้นคืนชีวิตอาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า pre-enrichment และสามารถกระทำได้หลายวิธี เช่น การนำเชื่อดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด non-selective ก่อนที่จะถ่ายเชื้อไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective เช่นการวิเคราะห์ *Salmonella* ซึ่งใช้ lactose broth สำหรับ pre-enrichment หรือการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective ที่มีองค์ประกอบที่ไม่มีผลต่อการบาดเจ็บของเซลล์ เช่น การใช้ไพรูเวต (pyruvate) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker ในการแยกและนับปริมาณ *Staphylococcus aureus*

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด non-selective และถ่ายเชื้อไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective และ differential เช่น ในการวิเคราะห์โคลิฟอร์มในน้ำประปา หลังจากนำเมมเบรนที่ผ่านการกรองมาบ่มโดยวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone soya agar เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงถ่ายเชื้อไปสู่อาหารชนิด selective differential สำหรับโคลิฟอร์มต่อไป รวมทั้งการบ่มเชื้อในอาหารชนิด selective และ differential ในระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมและตามด้วยการบ่มที่อุณหภูมิใช้แยกความแตกต่าง (selective temperature) เช่น การวิเคราะห์ฟีคอลโคลิฟอร์มในหอย โดยการนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ก่อนในขั้นต้นแล้วจึงนำมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 44 - 45.5°C นอกจากนั้นอาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารเคมีเฉพาะในลักษณะที่เป็นสารอาหารและไม่ใช้สารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น วาแกมเมเบรนนอาหาร minerals modified glutamate สำหรับวิเคราะห์โคลิฟอร์ม

นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เกิดการซ่อมแซมตนเอง จากนั้นนำเมมเบรนไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptone bile agar และบ่มที่ 44°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจด้วยสารละลายโคแวกซ์ (Kovacs') เพื่อทดสอบอินโดล

ขั้นตอน selective enrichment เป็นขั้นตอนหนึ่งที่ใช้ในการแยกเชื้อที่ต้องการวิเคราะห์ ออกมาจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยอาจเติมสารเคมีเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและกระตุ้นการเจริญของเชื้อที่ต้องการวิเคราะห์ จากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่ต้องการวิเคราะห์มา 1 ลูป (loop) และสตรีค (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective differential โดยอาจทำซ้ำ (replicates) หรือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าหนึ่งชนิดเพื่อให้ได้โคโลนีเดียวที่ต้องสงสัยที่แยกออกมาจากเชื้อที่ปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ ได้ อย่างไรก็ตามโคโลนีที่เกิดขึ้นอาจมีความคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ จึงต้องนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบยืนยันอีกครั้งโดยใช้ปฏิกิริยาทางชีวเคมีและอาจทดสอบต่อด้วยปฏิกิริยาทางชีววิทยา

วิธีการรวดเร็วในการวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรค

วิธีการรวดเร็วหรือ rapid methods สำหรับวิเคราะห์จุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ นั้น จะต้องมีความเฉพาะเจาะจงสูง (highly specific) และสามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อในระดับปริมาณที่ต่ำได้ดี ตัวอย่างเช่น วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งนิยมใช้ในการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* และ *Listeria monocytogenes*

วิธี ELISA เป็นการใช้ปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงของแอนติบอดี (antibody) และแอนติเจน (antigen) โดยใช้เอนไซม์ (enzyme) เช่น เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) หรือ แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) เพื่อช่วยทำให้สังเกตสีที่เกิดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) ซึ่งแสดงปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีและความเข้มของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณของแอนติเจนที่ปรากฏในตัวอย่างอาหาร

โดยทั่วไปวิธี ELISA ใช้เวลาประมาณ 90 นาที แต่ยังคงมีขั้นตอน pre-enrichment และ enrichment เช่นเดียวกับการวิเคราะห์จุลินทรีย์วิธีดั้งเดิมเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากจนถึงระดับที่

ตรวจนับได้อย่างน่าเชื่อถือ (ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งทำให้ใช้เวลารวมทั้งสิ้นเร็วกว่าวิธีดั้งเดิมประมาณ 2 วัน นอกจากนั้นยังมีวิธีการอื่นๆ ในการวิเคราะห์เพื่อให้ได้ผลที่รวดเร็วมายิ่งขึ้นไปอีก เช่น ระบบที่ใช้วิธีจับยึดเซลล์ของ *Salmonella* ไว้บนแท่งสำหรับจุ่ม (dipstick) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด preenrichment จากนั้นถ่ายเชื้อลงสู่อาหารที่ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนจนสามารถนำมาวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี ELISA ได้ ซึ่งการใช้เทคนิคอุปกรณ์ดังกล่าวทำให้ร่นระยะเวลาที่ต้องใช้ลงได้อีกประมาณ 1 วัน

วิธี ELISA นั้น นอกจากสามารถวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์โดยตรงแล้ว ยังสามารถวิเคราะห์สารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เช่น เอ็นเทอโรทอกซินจาก *Staphylococcus aureus* รวมทั้งสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ด้วย

การทดสอบการปนเปื้อนภายหลังการให้ความร้อนในการฆ่าเชื้ออาหาร

โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านการให้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อทางการค้า (commercially sterile) นั้น จะมีการสุ่มตัวอย่างเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อโดยมักนำมาบ่มที่ 30°C เป็นเวลา 5 วัน และนำตัวอย่างมาส่งกล้องจุลทรรศน์หรือนำมาเชย (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งวิธีการทดสอบดังกล่าวอาจนำวิธีการรวดเร็วมาใช้แทนที่ วิธีการทดสอบดั้งเดิมได้ เช่น การใช้วิธีวัดค่า impedance เป็นต้น

การตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสภาวะแวดล้อมในการผลิต

คุณภาพทางจุลินทรีย์ของสภาพอากาศในกระบวนการผลิต

ในการสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของอากาศ อาจกระทำโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาวางเปิดฝาทิ้งไว้ในเวลาที่จำกัด จากนั้นนำมาบ่มเพาะเชื่อนับจำนวนและคำนวณเป็นโคโลนีต่อหน่วยพื้นที่ต่อเวลา โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกสามารถใช้บอกระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอากาศได้ ในกรณีที่ต้องการนับปริมาณจุลินทรีย์ในอากาศที่แน่นอนอาจ

ใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนขึ้น เช่น เครื่อง slit sampler ซึ่งสามารถวัดปริมาตรของอากาศได้และนำอากาศผ่านช่องขนาดเล็กที่เปิดใกล้กับผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้จุลินทรีย์ในอากาศสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มและนับจำนวนโคโลนีต่อปริมาตรของอากาศที่สูดมาได้

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์บนพื้นผิว

การทำความสะอาดและการฆ่าเชื้อในสภาวะแวดล้อมการผลิต เป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการผลิตและแปรรูปอาหาร โดยพื้นที่ผิวที่สัมผัสอาหารที่ดูเหมือนสะอาดแต่อาจปนเปื้อนจุลินทรีย์ค่อนข้างมาก ดังนั้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมและตรวจสอบประสิทธิภาพของการทำความสะอาดการฆ่าเชื้อ โดยทั่วไปนิยมใช้ 2 วิธี ได้แก่ contact plate และวิธี swabbing แต่ทั้งสองวิธีนี้ให้ผลที่ไม่สามารถยืนยันได้แน่นอน เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดเกาะยึดติดกับพื้นผิวอย่างแน่นหนา ดังนั้น จึงสามารถใช้เพียงให้เห็นแนวโน้มของการปนเปื้อนเท่านั้น

ข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาอาหาร

ข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาอาหารมีไว้เพื่อใช้เป็นเกณฑ์อ้างอิงสำหรับประกันคุณภาพทางจุลินทรีย์ของอาหาร ซึ่งใช้เป็นมาตรการในการคุ้มครองผู้บริโภคจากอันตรายของจุลินทรีย์หรือสารพิษจากจุลินทรีย์ และเพื่อให้อาหารมีอายุการเก็บรักษาที่พอเพียงจนกว่าจะถึงมือผู้บริโภค นอกจากนั้นยังบ่งถึงสุขลักษณะในการผลิตอาหารของผู้ผลิตอีกด้วย ในส่วนของผู้ผลิตเองนั้น จะใช้ ข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาของอาหารในกรณีเกิดข้อโต้แย้งจากการปฏิเสธสินค้าจากลูกค้าหรือจากบริษัทอื่นๆ รวมทั้งจากองค์การระดับชาติและสถานภาพทางการตลาดที่เกี่ยวข้องกับความเชื่อมั่นของสินค้าที่เกิดจากโรคระบาดเนื่องจากอาหารเป็นพิษ

ข้อกำหนดของอาหารเริ่มต้นใช้ตั้งแต่ประมาณปี ค.ศ. 1950 เพื่อใช้สำหรับการขายผลิตภัณฑ์สินค้าอาหารระหว่างประเทศหรือนานาชาติ ทำให้เกิดการกระจายของสินค้าที่มีคุณภาพดีมากยิ่งขึ้น โดยไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ซึ่งในช่วงแรกยังไม่มีข้อกำหนดรายละเอียดทางจุลชีววิทยาในแต่ละผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการสุ่มตัวอย่างและเทคนิคในการวิเคราะห์ที่มีความ

แตกต่างกันไปของแต่ละแห่ง ตัวอย่างข้อกำหนดมาตรฐานของกุ้งแช่เยือกแข็ง (standard for frozen prawns) ได้แก่

- TVC ต่ำกว่า 10^6 ต่อกรัม
- โคลิฟอร์ม ต่ำกว่า 10^2 ต่อกรัม
- *Staphylococcus aureus* ต่ำกว่า 10 ต่อกรัม
- ไม่พบ *Salmonella*

จากมาตรฐานดังกล่าวจะสังเกตว่ายังไม่มีการระบุเกี่ยวกับขนาดหรือปริมาณของตัวอย่างที่จะต้องนำมาใช้วิเคราะห์ ต่อมาในปี ค.ศ.1962 International Commission on the Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) ได้ก่อตั้งขึ้นและปี ค.ศ. 1974 และได้เสนอข้อกำหนดของอาหารที่ครอบคลุมอาหารและผลิตภัณฑ์ประเภทต่างๆ อย่างกว้างๆ รวมทั้งส่วนผสม (ingredients) ที่ใช้กับอาหาร และในปี ค.ศ. 1975 มีการก่อตั้งคณะกรรมการร่วม FAO/WHO เพื่อกำหนดมาตรฐานอาหารทางจุลชีววิทยา โดยข้อกำหนดมาตรฐานดังกล่าวนิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารรวมทั้งในองค์กรต่างๆ ระดับชาติและนานาชาติ

ข้อมูลที่ใช้ในการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานอาหาร

ในการกำหนดเกณฑ์มาตรฐานอาหารชนิดต่างๆ จะต้องนำข้อมูลต่างๆ มาพิจารณาเพื่อสร้างข้อกำหนด เช่น ข้อมูลทางระบาดวิทยา ระดับหรือปริมาณของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารและผลิตภัณฑ์เกิดการเสื่อมเสีย ระดับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ยอมรับได้ภายใต้สภาวะการผลิตตามหลักปฏิบัติที่ดีในการผลิต (good manufacturing practice) ระยะเวลาที่อาหารที่สนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์หรือการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ก่อโรคและการเจริญของจุลินทรีย์ขณะเก็บรักษาอาหาร ระหว่างการผลิต ขณะกระจายสินค้า หรือจำหน่ายสินค้า จุดและสาเหตุที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ระหว่างการผลิตอาหาร การกระจายสินค้าและขณะจำหน่าย ลักษณะการบริโภคอาหารของผู้บริโภค กลุ่มผู้บริโภคที่เป็นเป้าหมายของสินค้าและวิธีการ รวมทั้งความน่าเชื่อถือและความเที่ยงตรงของวิธีที่ใช้ตรวจวิเคราะห์อาหาร

ประเภทของข้อกำหนดของ ICMSF

ICMSF แบ่งประเภทของข้อกำหนดทางจุลินทรีย์เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

1. มาตรฐานอาหารทางจุลชีววิทยา โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้อาหารมีความปลอดภัยทั้งอาหารที่ผลิตภายในประเทศและอาหารที่ส่งออก
2. แนวปฏิบัติทางจุลชีววิทยา เพื่อให้ผู้ผลิตอาหารและอื่นๆ ได้ควบคุมและผลิตอาหารให้มีจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ต่ำเมื่อผลิตอาหาร โดยใช้หลักปฏิบัติที่ดีหรือเก็บรักษาอาหารในสภาวะที่เหมาะสม โดยแนวปฏิบัตินี้มีความแตกต่างกันไปตามแต่ละผู้ผลิตถึงแม้ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดเดียวกันและเป็นแนวทางที่ทำให้ระบบ HACCP ดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ
3. คุณลักษณะของอาหารทางจุลชีววิทยา ใช้ในการทำความเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างผู้ผลิตและผู้จำหน่าย รวมทั้งอาจเป็นข้อเสนอแนะจากองค์กรระดับชาติหรือนานาชาติ ซึ่งมักเป็นการยอมรับหรือปฏิเสธผลิตภัณฑ์ในแต่ละครั้งที่ผลิต ซึ่งกำหนดไว้ในข้อตกลงดังกล่าว

แผนการสุ่มตัวอย่าง (sampling plans) ของ ICMSF

แผนการสุ่มตัวอย่าง (sampling plans) ของ ICMSF แบ่งได้ดังนี้

1. Two-class plan เป็นแผนการสุ่มตัวอย่างที่แบ่งตัวอย่างไว้เป็น 2 กรณี คือ ยอมรับ (accept) หรือปฏิเสธ (reject) โดยพิจารณาจากการปรากฏของจุลินทรีย์หรือปริมาณของจุลินทรีย์ที่มีในตัวอย่าง แผนการสุ่มตัวอย่างวิธีนี้กำหนดดังนี้
 - n หมายถึง ปริมาณของหน่วยของตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ
 - m หมายถึง ปริมาณของหน่วยของตัวอย่างที่มีค่าสูงเกินจนไม่เป็นที่ยอมรับถ้าการยอมรับหรือปฏิเสธตัวอย่าง ตัดสินจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏของจุลินทรีย์ ดังนั้น $m = 0$
 - c หมายถึง ปริมาณสูงสุดของจำนวนตัวอย่างที่ยอมให้มีหรือตัวอย่างที่มีปริมาณสูงกว่าค่า m

ตัวอย่างเช่น ในเนื้อปูสุกแช่เยือกแข็ง กำหนดไว้ดังนี้

Staphylococcus aureus

$n = 5$, $c = 0$ และ $m = 10^3$ / กรัม

จากตัวอย่างที่สุ่มจำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณของ *S. aureus* ถ้าพบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณเชื้อดังกล่าวปริมาณ 10^3 / กรัม หรือน้อยกว่า จะถือว่าการผลิตในครั้งนี้ผ่านหรือยอมรับ แต่เนื่องจากค่า $c = 0$ ดังนั้น ถ้าตัวอย่างใดมีปริมาณของเชื้อมีสูงกว่า 10^3 /g จะถือว่าการผลิตนี้ไม่ผ่าน แม้ว่าค่า m ของตัวอย่างที่เหลือจะเท่ากับหรือน้อยกว่าค่าที่กำหนดไว้ก็ตาม

หรือ *Salmonella*

$n = 10$, $m = 0$ และ $c = 0$

จากตัวอย่างที่สุ่มมา 10 ตัวอย่างๆ ละ 25 กรัม นำมาวิเคราะห์เชื้อ *Salmonella* เนื่องจากค่า $c = 0$ ดังนั้น ถ้าตัวอย่างใดพบว่ามีเชื้อดังกล่าว การผลิตครั้งนี้จะถือว่าไม่ผ่านหรือไม่ยอมรับ

วิธี Two-class plan นี้มักใช้กับจุลินทรีย์ก่อโรคซึ่งแบ่งตามความอันตรายของเชื้อ ดังตารางที่ 29

2. Three-class plan เป็นแผนการสุ่มตัวอย่างที่แบ่งตัวอย่างไว้ 3 ระดับ ขึ้นอยู่กับปริมาณของจุลินทรีย์ที่ปรากฏในตัวอย่าง ดังนี้

0 ถึง m
 m ถึง M
 สูงกว่า M

M หมายถึง ปริมาณที่สูงกว่าค่าที่กำหนด ซึ่งการผลิตดังกล่าวจะไม่ได้รับการยอมรับ ส่วนค่า m เป็นค่าที่แยกระดับคุณภาพดีจากค่าคุณภาพที่ยอมรับได้ ผลิตภัณฑ์ที่มีค่าเท่ากับหรือสูงกว่าค่า M จะไม่ได้รับการยอมรับหรืออาจยอมรับได้ในบางครั้ง ส่วนค่าที่ยอมรับได้และที่อยู่ระหว่างค่า m และ M คือ ค่า c ดังแสดงในตัวอย่าง

ค่า aerobic plate count ของกึ่งสุกหุบแป้งทอด

$n = 5$, $c = 2$, $m = 5 \times 10^5$ และ $M = 10^7$

จากตัวอย่างเมื่อสุ่มอาหารดังกล่าวมาวิเคราะห์จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยนำมาหา aerobic plate count ได้ผลดังตารางที่ 30

ตารางที่ 29 ชนิดของจุลินทรีย์แบ่งตามระดับความรุนแรงในการก่อโรค

ระดับความรุนแรง	จุลินทรีย์
อันตราย	<i>Clostridium botulinum</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Salmonella paratyphi</i> <i>Salmonella cholerae suis</i> <i>Shigella dysenteriae</i> <i>Brucella melitensis</i> <i>Clostridium perfringens</i> type C <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (bovis) <i>Vibrio cholerae</i> Infections hepatitis virus A
อันตรายปานกลางและมีผลกระทบในวงกว้าง	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Salmonella</i> ทั่วไปอื่น ๆ <i>Shigella sonnei</i> และ <i>flexnerii</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Escherichia coli</i> (enteropathogenic) Beta hemolytic streptococcus
อันตรายปานกลางและระบาดในวงจำกัด	<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Campylobacter jejuni</i>

ที่มา : Garbutt (1997)

ตารางที่ 30 ผลการวิเคราะห์กึ่งสุกหุบแบ่งทอด

การผลิต	ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อ (cfu/g)	สรุปผล
1	1	4.0×10^4	ทุกตัวอย่างมีค่าต่ำกว่า m การผลิตนี้ได้รับการยอมรับ
	2	3.2×10^5	
	3	4.2×10^5	
	4	9.6×10^4	
	5	4.9×10^5	
2	1	6.3×10^6	มี 2 ตัวอย่างที่มีค่าอยู่ระหว่าง m และ M ส่วนตัวอย่างอื่นๆ มีค่าต่ำกว่า m แต่ค่า c = 2 ดังนั้น การผลิตนี้ได้รับการยอมรับ
	2	4.8×10^5	
	3	2.1×10^5	
	4	5.9×10^5	
	5	3.6×10^5	
3	1	3.2×10^5	มี 1 ตัวอย่างที่มีค่าสูงกว่า M ดังนั้น การผลิตนี้ไม่ได้รับการยอมรับ
	2	7.8×10^7	
	3	4.8×10^5	
	4	1.3×10^5	
	5	4.9×10^4	

ที่มา : Garbutt (1997)

แผนการสุ่มตัวอย่างแบบ Three class plan นี้ ใช้กับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียและปนเปื้อน จุลินทรีย์อันติเคเตอร์เช่น โคลิฟอร์ม หรือพวก Enterobacteriaceae และ *E. coli* จุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอันตรายปานกลางและระดับในวงจำกัดหรือไม่ระบาด เช่น *S. aureus* และ *Vibrio parahaemolyticus*

ปัญหาที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ข้อกำหนดทางจุลชีววิทยา

ในการใช้ข้อกำหนดทางจุลชีววิทยาจะต้องพิจารณาถึงปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ซึ่งอาจทำให้เกิดเป็นปัญหาได้ เช่น ต้นทุนในการวิเคราะห์ วิธีการสุ่มตัวอย่าง การทดสอบตัวอย่างแบบทำลาย (destructive analysis) ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุน เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างซึ่งได้แก่ เวลาบ่มเชื้อที่อาจใช้เวลานานหลายวันเป็นการเพิ่มต้นทุนในการเก็บรักษาสินค้า จีดจำกัดของห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ความยุ่งยากในการใช้ผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างความแปรปรวนของวิธีการวิเคราะห์ รวมทั้งความน่าเชื่อถือของวิธีการที่นำมาใช้วิเคราะห์

การวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis Critical Control Point : HACCP)

ก่อนปี ค.ศ. 1960 การควบคุมคุณภาพทางจุลินทรีย์และความปลอดภัยของอาหารที่ผลิตรวมทั้งวัตถุดิบ มักใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่ทั้งสองวิธีดังกล่าว ยังไม่ให้ผลที่แน่นอนและไม่สามารถใช้ประกันความปลอดภัยกับอาหารที่ผลิตขึ้นมาได้ จึงมีการคิดค้นระบบใหม่ที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยและคุณภาพเรียกว่า Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) ซึ่งต่อมาพบว่าระบบนี้มีศักยภาพสูงสำหรับการประกันความปลอดภัยและคุณภาพของอาหาร จากนั้นจึงเริ่มมีการใช้ระบบนี้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ

องค์ประกอบที่สำคัญของระบบ HACCP

องค์ประกอบที่สำคัญของระบบ HACCP ได้แก่

1. อันตราย ได้แก่ การปนเปื้อนในระดับที่ไม่ยอมรับของสารพิษจากจุลินทรีย์ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียในระดับที่ไม่ยอมรับ และปริมาณของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสีย โดยอันตรายดังกล่าวอาจเกิดขึ้นระหว่างการเตรียมวัตถุดิบในขณะผลิตอาหาร การแพร่กระจายสินค้า ขณะสินค้าวางตลาดหรือขณะบริโภค อันตรายอาจเป็นสารเคมี เช่น ยาฆ่าแมลงที่ตกค้าง (pesticide residues) หรืออันตรายทางกายภาพ เช่น เศษวัตถุแปลกปลอมต่างๆ

2. จุดวิกฤติที่ต้องควบคุม (critical control points : CCPS) เป็นขั้นตอนหรือวิธีการในการเตรียมวัตถุดิบ การผลิต การขนส่ง การกระจายสินค้าหรือขณะสินค้าวางจำหน่ายซึ่งเป็นจุดที่สามารถควบคุมได้ การหาจุดวิกฤติดังกล่าวเน้นตรงการป้องกันที่จำเพาะและการวัดระดับการควบคุม โดย ICMSF ได้กำหนด CCP 2 ระดับ คือ CCP1 เป็นจุดที่ควบคุมอันตรายที่จะเกิดขึ้นและ CCP2 เป็นจุดที่ลดอันตรายให้มากที่สุดแต่ไม่สามารถควบคุมได้อย่างแน่นอน
3. ความเสี่ยง (Risk) เป็นโอกาสของอันตรายที่จะเกิดขึ้น การประเมินความเสี่ยงที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อนข้างทำได้ยากและมักแบ่งเป็น 3 ระดับ ได้แก่ ความเสี่ยงต่ำ ปานกลาง และความเสี่ยงสูง
4. ระดับความรุนแรง (Severity) หมายถึง ระดับของอันตรายที่อาจเกิดขึ้นซึ่งมีตั้งแต่ระดับต่ำไปจนถึงระดับสูง
5. การติดตามควบคุม (Monitoring) เป็นการติดตามเพื่อให้จุดวิกฤติที่ต้องควบคุมอยู่ในระดับที่ปลอดภัย เช่น การตรวจวิเคราะห์โดยใช้สายตา (visual inspection) การดมกลิ่น (smell) การวิเคราะห์ทางเคมี ภายนอกภาพ หรือทางจุลินทรีย์ ซึ่งการควบคุมดังกล่าวจะต้องตรวจสอบและได้ผลอย่างรวดเร็วเพื่อทำให้เกิดการแก้ไข (corrective action) ได้ทันเวลาที่ก่อนที่ผลิตภัณฑ์จะไม่ได้รับการยอมรับ
6. การทวนสอบ (Verification) เป็นการทดสอบเพิ่มเติมนอกเหนือจากการควบคุมตามปกติ เพื่อให้ระบบ HACCP ดำเนินไปอย่างถูกต้อง เช่น การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของคลอรีนในน้ำหล่อเย็นของกระป๋องที่ผ่านการให้ความร้อน เพื่อประกันว่าการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อยู่ในระดับที่ควบคุมได้ หรือการบ่มอาหารบรรจุกระป๋องเพื่อประกันความปลอดภัยจากการปนเปื้อนภายหลังการฆ่าเชื้ออาหาร

เอกสารอ้างอิง

Adams, M. R. and M. O. Moss. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, England.

Frazier, W. C. and D. C. Westhoff. 1988. Food Microbiology. 4th ed. McGraw- Hill, Inc., USA.

Garbutt, J. 1997. Essentials of Food Microbiology. Arnold, London, England.

ICMSF. 2000. Microorganisms in Foods 6 : Microbial Ecology of Food Commodities. Aspen Publishers, Inc., Maryland, USA.

Jay, J. M. 1992. Modern Food Microbiology. 4th ed. Van Nostrand Reinhold, London, England.

Kraft, A. A. 1992. Psychrotrophic Bacteria in Foods : Disease and Spoilage. CRC Press, Inc., Florida, USA.

Montville, T. J. 1987. Food Microbiology. Vol 2. New and Emerging Technologies. CRC Press, Inc. Florida, USA.

Ray, B. 2001. Fundamental Food Microbiology. 2nd ed. CRC Press LLC, Florida, USA.