ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

เนื้อสัตว์และการเสื่อมเสียด้วยเชื้อจุลินทรีย์

เนื้อสัตว์เป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่าย (perishable food) ชนิดหนึ่ง เนื่องจากเนื้อสัตว์มีความชื้นสูงถึงร้อยละ 50-75 มีค่า water activity (A_w) มากกว่า 0.99 มี pH 5.4-5.6 และมีธาตุอาหารพวกไนโตรเจน แร่ธาตุและไวตามินที่อุดมสมบูรณ์ อีกทั้งยังมีลักษณะทางกายภาพเหมาะสมคือลักษณะโดยทั่วไปของเนื้อมีช่องว่างและโพรงอากาศมากมายที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถแทรกอยู่ได้ คุณลักษณะเหล่านี้เหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ และส่งผลให้เกิดการเสื่อมเสียอันเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยง่าย (Marshall and Bal'a, 2001) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้กระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจำเป็นต้องมีการควบคุมความสะอาดในทุกขั้นตอนตั้งแต่ วัตถุดิบ กระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ การบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ และการเก็บรักษาในระหว่างการวางจำหน่ายจนถึงมือผู้บริโภค ลักษณะของการเสื่อมเสียเนื่องมาจากจุลินทรีย์ เกิดได้หลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ และสามารถแยกได้เป็นลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (Vernam and Sutherland, 1995)

1. เกิดการเหม็นหืน (rancidity) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไขมันได้

(lipolytic bacteria) ได้แก่ "เอนไซม์ออกซิเดส" จะเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดไขมันที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ "เอนไซม์ไลเปส" จะไฮโดรลิซิส (hydrolysis) โมเลกุลของไขมัน เป็นต้น ทำให้เกิดเป็นสารประกอบต่าง ๆ ได้แก่ กรดไขมันอิสระ กลีเซอรอล อัลดีไฮด์ คีโตน แอลกอฮอล์ เปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ ทำให้อาหารมีกลิ่นรสผิดปกติไป แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไขมันได้ ได้แก่ *Pseudomonas spp.*, *Achromobactor spp.*

โดยทั่วไปจุลินทรีย์เป็นสาเหตุใหญ่ประการหนึ่งที่ทำให้เกิดการเหม็นหืน แต่ไม่ค่อยสำคัญมากในเนื้อ เพราะสารประกอบต่างๆ ที่ได้จากการย่อยสลายของไขมัน จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะสารพวกเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ที่เกิดขึ้นระหว่างการออกซิเดชันของกรดไขมัน จะเป็นพิษอย่างยิ่งต่อจุลินทรีย์ และนอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักอีกด้วย และพบว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียสามารถย่อยโปรตีนได้ดีกว่า ดังนั้นกลิ่นและรสต่าง ๆ ที่เกิดจากการย่อยโปรตีนหรือกลิ่นเหม็นเน่า จึงบดบังกลิ่นและรสที่เกิดการกระบวนการเติมออกซิเจนหรือกลิ่นเหม็นหืนจนหมด แต่ถ้าเป็นเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ซึ่งไม่เหมาะกับกระบวนการย่อยโปรตีน กลิ่นและรสที่เกิดจากการเติมออกซิเจนจะเด่นชัดขึ้น

2. เกิดการเหม็นเน่า (putrefaction) เกิดจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ (proteolytic bacteria) เช่น *Proteus sp., Clostridium perfringens, Pseudomonas sp.*จะไปย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนหรือสายเปปไทด์หรือกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็น

องค์ประกอบสำคัญในเนื้อสัตว์ ทำให้เกิดเป็นสารที่ระเหยได้ ได้แก่ พวกไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide) เมอร์แคปแตน (mercaptans) อินโดล (indoles) แอมโมเนีย(ammonia) เอมีน(amines)และอื่น ๆ เกิดเป็นกลิ่นเหม็นเน่าขึ้นมา เช่น การเกิด bone-taint หรือ bone-souring ซึ่งมักเกิดกับบริเวณใกล้ ๆ กระดูก ซึ่งได้รับความเย็นไม่เพียงพอ

$$\text{histidine} \xrightarrow{\text{histidine decarboxylase}} \text{histamine}$$

3. การเกิดก๊าซและรสเปรี้ยว (gassing and souring) เกิดจากแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการอา-

(anaerobic bacteria) เช่น พวก lactic acid bacteria ชนิดต่าง ๆ, *Streptococcus faecium*, *Streptpcoccus faecalis, Microbacterium thermosphactum* ไปย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ เช่น แป้ง น้ำตาล ทำให้เกิดสารประกอบพวกกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น กรดอะซิติก ทำให้เนื้อมีค่า pH ลดลง และเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับแอลกอฮอล์ขึ้นมาในเวลาเดียวกัน มักพบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกขนาดใหญ่ หรือในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุแบบสุญญากาศ เช่น พบในแฮมและเบคอนที่นำมาหั่นบาง ๆ บรรจุพลาสติกแบบสุญญากาศ

4. การเกิดเมือกที่ผิวหน้า (slime surface) เมือกเป็นสารพวก polysaccharides ที่จุลินทรีย์ ผลิตขึ้นมาและสะสมอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเราสามารถมองเห็นโคโลนีของจุลินทรีย์ด้วยตาเปล่าได้ ก็จะมองเห็นเป็นเมือกเกิดขึ้น อาจมีสีขาวหรือสีเหลืองเกิดขึ้นบนผิวหน้าของชิ้นเนื้อและมีกลิ่นเหม็น มักเกิดภายใต้สภาวะมีอากาศ มักเกิดจากแบคทีเรียพวก *Pseudomonas sp., Achromobactor sp.* ในเนื้อสัตว์ที่แขวนไว้ในห้องเย็นที่มีความชื้นสูง แต่ถ้ามีความชื้นต่ำในห้องเย็นจะพบพวก micrococcus เช่น *Microbacterium thermosphactum* หรือ *Streptococcus sp.* หรือยีสต์ปะปน เช่น ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกสุกพวกแฟรงค์เฟอร์เตอร์และโบโลญ่า

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่บรรจุแบบสุญญากาศมักไม่ค่อยพบการเน่าเสียในลักษณะนี้ เพราะการปนเปื้อนของ anaerobic bacteria ในธรรมชาติมีน้อยกว่าพวก aerobic bacteria และพวก aerobic bacteria โดยปรกติจะผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียเหล่านี้จะมีผลยับยั้งการเจริญของพวก anerobic bacteria ด้วย แต่ถ้าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาสภาพสุญญากาศ มีการปนเปื้อนจาก anaerobic bacteria ขึ้น และเก็บรักษาไว้ในชั่วระยะเวลาหนึ่ง ก็อาจเกิดการเน่าเสียที่สังเกตได้ เป็นเมือกสีขาวคล้ายน้ำนม (whitish liquid) ในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุธรรมดา เมือกของแบคทีเรียจะปรากฏเห็นเป็นรูปลูกปัดเล็ก ๆ ละเอียด แตะดูจะเป็นยางเหนียว และมีกลิ่นเหม็น (off odor) บางครั้งมองเห็นคล้ายยีสต์

5. การเกิดสีต่าง ๆ บนผิวหน้า (discoloration) ของชิ้นเนื้อ เกิดเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่เจริญเติบโตแล้วสร้างเม็ดสีขึ้นมา ทำให้มองเห็นเป็นจุดสีต่าง ๆ เช่น จุดสีแดงจาก

Serratia marcescens จุดสีฟ้าจาก *Pseudomonas syncyanea* จุดสีน้ำเงินแกมเขียวหรือดำแกมน้ำตาลจาก *Chromobacterium lividum* เป็นต้น

6. การเปลี่ยนแปลงสีของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก จุลินทรีย์ตัวที่มีบทบาทสำคัญคือ *Lactobacillus viridescens* หรืออาจเป็นพวก *Leuconostoc sp.* ที่ปนเปื้อนเข้ามาในส่วนผสมของเนื้อในขณะเตรียมการ ในการอบและการรมควันผลิตภัณฑ์ใช้ความร้อนไม่เพียงพอต่อการทำลายแบคทีเรียที่ปนเปื้อนได้หมด แบคทีเรียที่เหลือรอดอยู่จะเจริญเติบโตและสามารถสร้างสารพวกเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลเฟอรัสในโครงสร้างวงแหวนพอไพรินของเม็ดสีไมโอโกลบิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไนโตรโซฮีไมโครม ไปเป็น cholemyoglobin ซึ่งอยู่ในรูปของ verdoheme ทำให้เกิดเป็นสีเขียว (greening) ขึ้นในไส้กรอก ลักษณะการเกิดสีเขียวส่วนใหญ่มี 3 ลักษณะคือ

6.1 การเกิดสีเขียวบริเวณแกน (core greening) การเกิดจุดสีเขียวเล็ก ๆ ขึ้นที่กึ่งกลางของชิ้นไส้กรอกและจะขยายวงกว้างจากจุดนี้ไปรอบ ๆ มักพบในไส้กรอกขนาดใหญ่ เช่น โบโลญ่า ที่ถูกตัดและผิวหน้าถูกปล่อยทิ้งไว้สัมผัสกับอากาศ

6.2 การเกิดสีเขียวบริเวณผิวหน้า (surface greening) พบมาก คือการเกิดเป็นสีเขียวเทา ๆ ที่ผิวหน้าไส้กรอก มักเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการเกิดเมือก สาเหตุเพราะสุขลักษณะในการผลิตไม่ดี เกิดการปนเปื้อนที่ผิวหน้าหลังจากการทำให้สุก โดยเฉพาะในช่วงของการลอกไส้และการบรรจุ หรือเกิดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์หลังการผลิตเสร็จใหม่ ๆ กับการปนเปื้อนข้าม (cross contamination)

6.3 การเกิดวงแหวนสีเขียว (green ring) คือ การเกิดวงแหวนสีเขียวขึ้นภายในไส้กรอกที่ช่วงความลึก 2-3 มิลลิเมตร จากผิวหน้าของไส้กรอก ปกติแล้วไม่ค่อยพบ สาเหตุที่ทำให้เกิดยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่ามักเกิดกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้วัตถุดิบ ซึ่งมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์มาก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายในระหว่างการอบและรมควัน แต่สิ่งที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์ยังคงอยู่ ได้แก่ เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้น และสามารถออกซิไดซ์เม็ดสีได้ จะเกิดมีปฏิกิริยาต่อไปได้ ประกอบกับสภาพต่าง ๆ เหมาะสม ทำให้ hemochrome เปลี่ยนแปลงไปเป็น verdoheme ทำให้เกิดเป็นวงแหวนสีเขียวขึ้น โดยปกติการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นภายใน 1-2 วัน หลังจากทำไส้กรอกเสร็จ ซึ่งไม่สามารถสังเกตเห็นได้ จนกระทั่งทำการผ่าหรือตัดออกดูภายใน นอกจากนี้ยังอาจเกิดการซีดจางของสี (color degradation) ได้ เนื่องจากการเก็บที่อุณหภูมิสูงและการที่สุขลักษณะในการผลิตไม่ดี ทำให้มีแบคทีเรียเริ่มต้นสูง และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงแบคทีเรียก็ยิ่งเจริญเติบโตได้ดี และผลิตสารประกอบที่สามารถทำลายเม็ดสีได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus viridescens, Leuconostoc spp.* เป็นต้น

7. การเกิดเชื้อราที่ผิวหน้า โดยทั่วไปเป็นเชื้อราพวก *Cladosporium* ทำให้เกิดจุดสีดำ *Thamnidium, Muco* , หรือ *Rhizopus* ทำให้เกิด " whisker " ที่ผิวหน้าของเนื้อวัว *Penicillium* ทำให้เกิด green patch และ *Sporotrichum* ทำให้เกิดจุดสีขาว มักพบในเนื้อที่ตัดแบ่งครึ่งหรือแบ่งสี่ที่เก็บรักษาในห้องเย็น ที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียส เพื่อการบ่มเนื้อให้นุ่ม

(aging) วัตถุประสงค์ของการบ่มเนื้อเพื่อให้เนื้อมีความนุ่มตามต้องการและมีการผลิตกลิ่นรสเฉพาะขึ้นเรียกว่า “aged flavor” ซึ่งยังไม่มีการสำรวจหรือตรวจหาจุลินทรีย์พวกนี้ในเนื้อว่าทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น หรือมีกลิ่นของเนื้อเพิ่มมากขึ้นอย่างไร แต่การขึ้นราในเนื้อเป็นผลให้ต้องตัดแต่งเนื้อทิ้งไป เมื่อจะนำไปทำผลิตภัณฑ์อื่นต่อไป

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เน่าเสีย

ผลิตภัณฑ์	จุลินทรีย์	ชนิดของการเน่าเสีย
เนื้อสด	*Pseudomonas* *Achromobactor* *Flavobacterium* ..... *Lactobacillus* *Microbacterium* *Micrococcus*	มีเมือกเปลี่ยนเป็นสีเขียว มีรงควัตถุที่เรืองแสง มีจุดสีขาว หรือจุดสี ซึ่งเป็นโคโลนีของแบคทีเรีย ..... เกิดเมือกหรือลักษณะเหนียว รสเปรี้ยว หรือเน่าเสีย
----------	----------	----------
	Achromobacter *Pseudomonas* *Bacillus* *Lactobacillus*	รสเปรี้ยว
	.....	.....
เนื้อที่ผ่านการแปรรูป แฮมที่ผ่านการหมักเกลือ	*Streptococcus* *Clostridium*	เกิดก๊าซ ชิ้นเนื้อมีอาการบวม เปลี่ยนเป็นสีเขียว
	.....	.....
	Micrococcus *Microbacterium* *Yeasts*	มีเมือกตรงผิวหน้า
	----------	----------
----------	*Streptococcus* *Molds*	เกิดเมือก มีจุดสีขาวหรือจุดสี
	.....	.....
เบคอน	*Lactobacillus* *Micrococcus* *Streptococcus*	มีรสเปรี้ยวเล็กน้อยในเบคอนที่บรรจุโดยระบบสุญญากาศ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

	Micrococcus	มีเมือกตรงผิวหน้า
	Yeasts	
	.....	.....
----------	*Lactobacillus*	ผลิตก๊าซในไส้กรอกแฟรงค์เฟอร์เตอร์ที่บรรจุโดยระบบสุญญากาศ
	Leuconostoc	สีซีดบริเวณผิว
ไส้กรอกที่ผ่านการหมักเกลือ	*Micrococcus*	
	.....	.....
	Lactobacillus	สีเปลี่ยนเป็นสีเขียว
	----------	----------

	ราและยีสต์	มีเมือกและเปลี่ยนสี
ไส้กรอกเปรี้ยว	----------	----------
----------	*Lactobacillus*	น้ำหมักมีลักษณะขุ่น
ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการหมักโดยเติมน้ำส้มสายชู	----------	----------
----------	*สปอร์ของ Bacillus*	จุลินทรีย์พวก thermophillic เจริญเติบโตเนื่องมาจากการทำให้เย็นไม่เพียงพอ และจำนวนจุลินทรีย์ที่เริ่มต้นมีมากเกินไป
ผลิตภัณฑ์เนื้อกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อชนิด commercially sterilization	*สปอร์ของ Clostridium*	
	----------	----------
	Streptococcus	มีรสเปรี้ยวและเปลี่ยนสี
----------	.....	.....
ผลิตภัณฑ์เนื้อกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อชนิด semi-preserved หรือ pasteurization	*Bacillus* *Clostridium*	ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 10^{0}C จะผลิตก๊าซ มีเจลาตินเยิ้มออกมา และมีการเน่าจากการสลายตัวของโปรตีน

สำหรับการเกิดโรคในจากอาหารเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ มักเกิดมาจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคพวกนี้ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อทั้งก่อนและระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งอาจปนเปื้อนมาจากฝุ่นดินและผู้ปรุงประกอบอาหาร ซึ่งบางชนิดสามารถทนความร้อนสูงและเจริญเติบโตเพิ่ม

จำนวนเซลล์มากขึ้น พร้อมกับผลิตสารพิษ (Kotula, Berry and Emswiler-Rose, 1987; Vernam and Sutherland, 1995) ซึ่งได้แก่

1. Clostridium botulinum เกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเป็นพิษชนิดอื่น ๆ พบประมาณ 10-30 ราย/ปี แต่ก็ถือว่ามีความสำคัญเพราะเป็นชนิดของอาหารเป็นพิษที่รุนแรงที่สุด เพราะสารพิษอาจทำให้ตายได้แม้จะได้รับในปริมาณเล็กน้อย สารพิษถูกสร้างขึ้นและขับออกจากเซลล์มาอยู่ในอาหารเป็นพวก exotoxin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 ถึง 900,000 ดาลตัน ถูกทำลายได้ง่าย โดยการนำไปต้มในน้ำเดือด (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) นาน 15-20 นาที

มักเกิดจากการบริโภคอาหารกระป๋องที่ผลิตในครัวเรือน(home-canned food) ที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอที่จะทำลายสปอร์ของเชื้อนี้ และไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนอีกครั้งก่อนรับประทาน เพื่อทำลายสารพิษในไส้กรอก ผลิตภัณฑ์เนื้ออื่นๆ ได้แก่ ลันเชียนมีท แฮม แต่ไม่พบบ่อยนักในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีการเติมไนเตรตเพราะสารนี้จะยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อนี้ได้ ความเป็นพิษของ botulism พบว่าเกิดภายหลังจากบริโภคสารนี้เพียงเล็กน้อย ไม่กี่นาโนกรัม ก็ทำให้เกิดอาการเป็นพิษได้ภายใน 18-48 ชั่วโมง อาการจะเป็นดังนี้คือ กล้ามเนื้ออ่อนเพลีย ไม่มีแรง สูญเสียความสามารถในการสั่งงานของสมองส่วนกลาง ตาพร่า กลืนน้ำลายลำบาก อาเจียน ท้องเดิน และตามด้วยท้องผูก ถ้าบริโภคมากอาจตายได้ ชนิดของ botulism มี 7 ชนิดคือ A,B,C,D,E,F และ G แต่ที่สำคัญคือชนิด E เซลล์ของ *Cl. botulinum* มีลักษณะเป็นแท่ง กรัมบวก (gram-positive) สามารถสร้างสปอร์ได้ สปอร์ทนความร้อนได้ดี เจริญเติบโตได้ดีในที่ที่ไม่มีอากาศ พบอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นในดิน น้ำและอาหารชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอาหารประเภทโปรตีน

2. Staphylococcus aureus (Staphyloenterotoxicosis หรือ Staphyloenterotoxemia) เซลล์มีลักษณะกลม อาจอยู่ในลักษณะเป็น pairs, short chains หรือ bunched, grape-like clusters ก็ได้ gram-positive ไม่สร้างสปอร์ สามารถสร้างสารพิษที่ทนความร้อนเป็น enterotoxin ซึ่งสร้างภายในเซลล์ และเมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ในจำนวนมากพอ ก็จะเกิดอาการอาหารเป็นพิษขึ้นมาได้ สารพิษเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตัน ทนความร้อนที่น้ำเดือดได้นานถึง 60 นาที ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จึงทำลายสารพิษนี้ได้

อาการเป็นพิษจะเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน พบว่าภายใน 2-6 ชั่วโมง ภายหลังจากได้รับสารพิษ ผู้ป่วยจะเกิดการบวมพองของผนังลำไส้และกระเพาะ (gastroenteritis หรือ gastrointestinal upset) ขึ้นอยู่กับภูมิต้านทานของร่างกาย ปริมาณของเชื้อที่ร่างกายได้รับโดยทั่วไปต้องมากกว่า 100,000 โคโลนีต่อกรัม และปริมาณสารพิษ ซึ่งโดยทั่วไปเพียง 1.0 ไมโครกรัม ก็จะทำให้เกิดอาการได้ นอกจากนี้เชื้อนี้ยังสามาถเป็นผลร้ายต่อระบบประสาทได้เช่นเดียวกับกรณีของ botulism ด้วย มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลีย ถ้าเป็นมากก็จะปวดศีรษะ ปวดตามกล้ามเนื้อ และเกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตและอัตราการเต้นของชีพจรชั่วคราว ส่วนการตายอันเนื่องมาจากอาหารเป็นพิษแบบนี้นั้น มีเป็นจำนวนน้อย

มักจะหายได้ภายใน 2-3 วัน แต่ถ้าเป็นมากก็จะใช้เวลานานกว่านี้ และที่ตายไปนั้นส่วนใหญ่จะมีผลมาจากมีอาการหรือโรคอื่นแทรกอยู่แล้วมากกว่า มักเป็นกับเด็กเล็กหรือผู้สูงอายุ ซึ่งมีความต้านทานต่ำและสุขภาพอ่อนแออยู่ก่อนแล้ว

มักพบในผลิตภัณฑ์นม ไก่และแฮม รวมทั้งอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ปิ้ง ย่าง รมควัน และเนื้อสด ซึ่งผ่านการให้ความร้อนในช่วงแรกไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ของเชื้อชนิดนี้ได้ ควรให้ความร้อนสูงถึง 60 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า ไม่เช่นนั้นความร้อนที่จะใช้เป็นตัวกระตุ้นให้แบคทีเรียที่มีอยู่เจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ในช่วงที่ทำให้เย็นลงอย่างช้า ๆ และตั้งรอเวลาไว้ 8-12 ชั่วโมง ก่อนนำมารับประทาน โดยไม่ได้เก็บในที่เย็นพอ (7.2 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า)

เกิดจากโรงงานมีการสุขาภิบาลที่ไม่ดีพอ โดยเฉพาะมีสุขวิทยาส่วนบุคคลของคนงานไม่ดี มักพบเชื้อนี้ปนเปื้อนมาจากคนงานที่มีโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ หรือมีบาดแผล ฝีหนองต่าง ๆ

3. *Clostridium perfringens* พบในเนื้อสัตว์หลายชนิด ได้แก่ เนื้อโค สุกร แกะและไก่ ทั้งในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์ เช่น roast beef, luncheon meat, แฮม, corned beef ส่วนใหญ่จะพบในเนื้อที่ผ่านการทำให้สุก และทิ้งไว้ให้เย็นอย่างช้า ๆ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องและไม่ได้อุ่นซ้ำอีกครั้งก่อนรับประทาน ผู้บริโภคจะมีอาการปวดท้องและท้องเสีย ภายหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณมากกว่า 108 โคโลนีของเซลล์ปกติต่อกรัม เป็นเวลา 8-22 ชั่วโมง หรืออาจจะเกิดเนื่องจากรับประทานอาหารที่มีสปอร์ของเชื้อนี้อยู่ แล้วเกิดการงอกของสปอร์ในอวัยวะที่เกี่ยวกับการย่อยอาหาร (digestive tract) และสร้างสารพิษขึ้นมา ดังนั้น *Cl. perfringens* จึงอาจจัดเป็น foodborne infection ได้ด้วย การหุงต้มโดยปกติจะสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียพวกนี้ได้ และถ้าต้องการทำลายสปอร์ต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้น *Cl.perfringens* จัดเป็นแบคทีเรียประเภทไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เป็นพวก gram-positive ลักษณะเป็นแท่งและผลิตสารพิษได้หลายชนิดด้วยกัน ตั้งแต่ type A ถึง F สารพิษเป็นพวก enterotoxin นอกจากนั้นแบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถผลิตก๊าซออกมาได้ด้วย

การป้องกันอาหารเป็นพิษแบบนี้สามารถทำได้โดยการ ทำให้เนื้อที่ผ่านการทำให้สุกแล้วนั้นเย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส อย่างมิดชิด หรือถ้าเป็นอาหารที่เหลือก็ควรนำมาอุ่นใหม่ให้ความร้อนจนเดือดหรือร้อนจัด เพื่อสามารถทำลายสารพิษที่อาจจะมีอยู่ได้

4. *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อหรืออาหารเป็นพิษ (foodborne infection)

แบคทีเรียนี้สามารถเจริญได้ในร่างกายของผู้บริโภคแล้วผลิตสารพิษ endotoxin ขึ้นภายในเซลล์ ทำให้ผู้ติดเชื้อมีอาการเวียนศีรษะ อาเจียนและท้องเดิน ระยะเวลาของการฟักตัวหรือช่วงเวลาหลังรับเชื้อเข้าไป ถึงปรากฏอาการออกมาจะกินเวลานานกว่า 6 ชั่วโมง มีรายงานว่าการที่จะปรากฏอาการออกมาได้นั้น ผู้ป่วยต้องได้รับเชื้อในปริมาณมากถึงประมาณ 1 ล้านตัว และอาจ

ทำให้ถึงตายได้ถ้าผู้ป่วยเป็นเด็กหรือผู้สูงอายุที่มีสุขภาพอ่อนแอมาก่อนแล้วหรือเป็นโรคอย่างอื่นมาก่อนแล้ว

แบคทีเรียเหล่านี้มักจะพบในเนื้อเยื่อและลำไส้ของสัตว์โดยทั่ว ๆ ไปอยู่แล้ว โดยที่ไม่เป็นอันตรายแต่อย่างใดต่อสัตว์เหล่านั้นเลย การปนเปื้อนมักเกิดกับซากที่ทำการฆ่าแบบสกปรก โดยเฉพาะแบบที่ปฏิบัติกันอยู่โดยทั่วไปในโรงฆ่าสัตว์ประเทศไทยในปัจจุบัน

5. *Yersinia* ที่สำคัญได้แก่ *Y.enterocolitica* และ *Y. peseudotuberculosis* ซึ่งทำให้เกิดโรค Yersiniosis มีอาการบวมพองของผนังลำไส้และกระเพาะ ท้องร่วง และ/หรือ อาเจียน และมีอาการที่เด่นชัดกว่าโรคอาหารเป็นพิษชนิดอื่นคือ จะมีอาการเป็นไข้และปวดท้อง ระยะเวลาแสดงอาการคือ 24-48 ชั่วโมง ลักษณะทั่วไปของเชื้อนี้คือ เป็นรูปแท่ง gram-negative มักพบในอาหารพวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อแกะ เป็นต้น ที่สุขาภิบาลไม่ดี และผ่านการฆ่าเชื้อไม่เพียงพอ รวมทั้งมีการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม

6. *Listeria monocytogenes* เป็นแบคทีเรียชนิด gram-positive มีแฟลกเจลลา (flagella) ช่วย
ให้สามารถเคลื่อนที่ได้ ทำให้เกิดโรค Listeriosis อาจทำให้สตรีมีครรภ์แท้งได้ และอาจมีผลต่อระบบทางเดินอาหารทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียนและท้องเดิน เนื่องจากเชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 3 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงมักจะก่อให้เกิดปัญหาในอาหารแช่เย็น มักพบในอาหารพวก raw milk, cheese, ไอศครีม, ผักสด, fermented raw-meat sausage, raw and cooked poultry, เนื้อสัตว์ทุกชนิด, raw hot dog, raw and smoked fish

7. *Escherichia coli* ที่สำคัญได้แก่ *E.Coli* 0157:H7 สามารถสร้างสารพิษได้ สารพิษมีชื่อว่า verotoxin อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกลุ่ม Enterohaemorrhagic *E.coli* (EHEC) จะไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส ไม่ทนความร้อน ทำให้เกิดอาการดังนี้ ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย อาจอาเจียนด้วย ตัวไม่ร้อน มักพบในอาหารพวก undercooked/raw hamburger (ground beef) dry-cured salami และ home cooked hamburger

จากการเสื่อมเสียได้ง่ายของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อย่างที่ได้กล่าวไปข้างต้น ทำให้ผู้ผลิตมีความจำเป็นในการใช้เทคนิควิธีต่าง ๆ เพื่อช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ให้ได้มากที่สุด วิธีหนึ่งที่ผู้ผลิตมักเลือกใช้คือ การเติมวัตถุกันเสียหรือสารกันบูดลงในผลิตภัณฑ์เพื่อให้ยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานขึ้น สำหรับชนิดวัตถุกันเสียที่สำคัญที่มีการใช้กันหมายรวมถึง ซอร์เบต เบนโซเอต ไนเตรตและไนไตรต์ โดยวัตถุกันเสียชนิดที่มีการใช้กันมากที่สุดและองค์การอาหารและยารับรองให้ใช้ คือสารประกอบไนเตรตและไนไตรท์ (ศิวาพร, 2535) สารนี้มักเติมลงในอาหารเนื้อสัตว์เพื่อให้เนื้อสัตว์มีสีชมพู/แดงที่คงที่ และเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium botulinum* ซึ่งสามารถผลิตสารพิษ botulinum toxin ที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต อาหารที่มักพบว่าใส่สารประกอบเหล่านี้ ได้แก่ เนื้อเค็ม เนื้อแดดเดียว ปลาแดดเดียว ไส้กรอก หมูแฮม เบคอน ซึ่งวัตถุกันเสียเหล่านี้ ได้มีงานวิจัยยืนยันว่า หากรับประทานไปเป็นระยะเวลายาวนาน อาจทำ

ให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพหรือทำให้เกิดโรคในระยะยาวได้ นอกจากนี้ผู้ผลิตบางรายยังมีการใช้วัตถุกันเสียแบบจงใจใช้ผิดประเภท โดยเติมวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหารลงในผลิตภัณฑ์ เช่น ใช้กรดซาลิไซลิคซึ่งห้ามใช้ในอาหารมาใช้เป็นสารกันบูดเพราะกรดซาลิไซลิคทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ หรือการใช้บอแรกซ์ซึ่งเป็นวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหารเช่นกัน บอแรกซ์หรือโซเดียมบอเรต หรือผงกรอบ น้ำประสานทอง หรือเพ่งแซ เป็นสารเคมีที่ไม่มีกลิ่น ผลึกละเอียด สีขาว ละลายน้ำได้ดี ใช้ในอุตสาหกรรมทำแก้วและเป็นสารประสานทองแต่ผู้ผลิตบางรายนำมาใช้เติมในอาหารพวกลูกชิ้น หมูยอ ทอดมัน ไส้กรอก เนื้อบดปรุงรสต่าง ๆ ไก่บด เนื้อปลาขูด ทำให้อาหารเหล่านี้มีความหยุ่น เหนียว กรอบ แต่สารนี้มีอันตรายทำให้กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ อักเสบ การทำงานของไตล้มเหลว อาจมีปัสสาวะออกน้อยหรือไม่ออก ปริมาณที่เป็นพิษในผู้ใหญ่ 5 - 10 กรัม ถ้าได้รับ 15 - 30 กรัมอาจตายได้ ภายใน 2-3 วัน ส่วนในเด็กนั้น ถ้าได้รับ 4.5-14 กรัม ทำให้เกิดอาการพิษและตายได้ หรือในผู้ผลิตบางรายอาจมีการใช้วัตถุกันเสียในปริมาณมากกว่าที่กฎหมายอนุญาต เช่น สารประกอบไนเตรต ไนไตรท์ ซึ่งกฎหมายอนุญาตให้ใช้ได้ ในรูปไนไตรท์ไม่เกิน 200 ส่วนในล้านส่วน (125 มก./กก.) และไนเตรต 500 ส่วนในล้านส่วน (500 มก./กก.) ถ้าใช้สองชนิดร่วมกันให้ใช้ได้ไม่เกิน 125 มก./กก. เป็นต้น ซึ่งการใช้ในปริมาณมากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้โดยที่ผู้บริโภครู้เท่ากันไม่การณ์ เพราะสารประกอบไนไตรต์และไนเตรตจะรวมตัวกับสารประกอบเอมีน (amine) ในอาหารและเกิดเป็นสารประกอบไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ทำให้เกิดเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (ศิวาพร, 2546) นอกจากนี้ยังพบการใช้วัตถุเจือปนอาหารที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐานเพราะมีราคาถูกกว่าอีกด้วย

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เครื่องเทศ หรือสมุนไพรในอาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

การใช้เครื่องเทศ สมุนไพร หรือสารสกัดจากเครื่องเทศหรือสมุนไพรในอาหารนั้น มีมาตั้งแต่ในอดีต เพราะนอกจากจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีกลิ่นรสดีขึ้นแล้ว ยังมีผลช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วย ส่วนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดของเครื่องเทศและสมุนไพรในการยับยั้งจุลินทรีย์ คือ ส่วนของน้ำมันหอมระเหย น้ำมันหอมระเหยนี้นอกจากจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิด (อาทิเช่น *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila, Salmonella typhimurium, Escherichia coli, Serratia marcescens* และ *Clostridium botulinum*) ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของเชื้อราบางชนิด (อาทิเช่น *Penicillium* และ *Aspergillus*) ได้อีกด้วย (ศิวาพร, 2546)

สำหรับการใช้เครื่องเทศ สมุนไพร หรือสารสกัดจากเครื่องเทศหรือสมุนไพรในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปนั้นมีการใช้กันมาตั้งแต่ในอดีต แต่มักใช้เพื่อเหตุผลในการสร้างหรือเพิ่มกลิ่นรสเฉพาะตัวให้กับผลิตภัณฑ์ มิได้ใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันมีงานวิจัยหลายงาน ที่ได้ให้ความสนใจและศึกษาผลของสารสกัดจากธรรมชาติดังกล่าวในผลิตภัณฑ์

อาหารประเภทต่าง ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ผลิตและผู้บริโภคที่สนใจอาหารเพื่อสุขภาพที่จะหลีกเลี่ยงการเติมวัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมี จากบทความของ Devlieghere, Vermeiren และ Debevere (2004) ก็ได้กล่าวเช่นกันว่า การใช้วัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมีจะเปลี่ยนเป็นการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น น้ำมันหอมระเหย (essential oil) ไคโตซาน (chitosan) ไนซิน (Nisin) และไลโซไซม์ (Lysozyme) เป็นต้น นอกจากนี้ สารสกัดจำพวกแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ที่สกัดหรือได้มาจากกระบวนการต่าง ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น Lactic acid bacteria เป็นต้น ก็ได้รับความสนใจจากงานวิจัยหลายงานด้วยกัน เนื่องมาจากมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Hugas, Garroga and Aymerich, 2003) สำหรับสารจำพวกนี้ที่ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน ตัวอย่างเช่น ไนซิน ไลโซไซม์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide) ซาคาซิน (Sakacin P หรือ K) เคอร์วาซิน (Curvacin A) คาร์โนแบคเทอริโอซิน (Carnobacteriocin A) เพดิโอซิน (Pediocin) ลิวโคซิน (Leucosin) มีเซ็นเทอริซิน (Mesentericin) เอนเทอร์โรซิน (Enterocin A หรือ B หรือ P) เป็นต้น (Työppönen, Petäjä and Mattila-Sandholm, 2003)

จากรายงานของ Shibasaki (1982) ได้เสนอว่า สารเจือปนในอาหารเพื่อต้านทานเชื้อจุลินทรีย์มีได้ทั้งสารที่เป็นสารเคมีและสารที่มาจากธรรมชาติ โดยสารที่ได้รับการยอมรับในญี่ปุ่นได้แก่ กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ไกลซีน (glycine) และ โมโนไกลซีน (monoglycine) กรดไขมันบางชนิด เช่น formic acid, acetic acid, diacetic acid, propionic acid, sorbic acid และ caprylic acid เป็นต้น สารฟีนอลิกต่าง ๆ ที่ได้มาจากกระบวนการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) เช่น catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol และ methylhydroquinone เป็นต้น นอกจากนี้ในรายงานยังกล่าวอีกว่า สารสกัดจากโกโก้เข้มข้น 5% มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Salmonella typhimurium* และสารคาเฟอีน (caffeine) หรือ สาร theophylline มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus parasitious* ได้อีกด้วย

Shelef (1983) ได้นำเสนอบทความที่กล่าวถึงผลในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของเครื่องเทศต่าง ๆ ทั้งในรูปผงแห้ง สารสกัดด้วยน้ำ สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำมันหอมระเหย ในบทความได้กล่าวว่า เครื่องเทศหลายชนิด เช่น กระเทียม หอมหัวใหญ่ อบเชย ใบโคลฟ (clove) ไทม์ (thyme) ออริกาโน (oregano) และเซจ (sage) เป็นต้น ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้อีกด้วย โดยเชื้อราจะมีความไวต่อสารยับยั้งเชื้อจากเครื่องเทศมากที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรีย แต่เครื่องเทศมีผลน้อยมากต่อสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ และผลในการยับยั้งจะดีได้ ก็ต่อเมื่อใช้เครื่องเทศดังกล่าวในปริมาณที่สูง สารออกฤทธิ์ในเครื่องเทศทุกชนิดจะเป็นสารจำพวกฟีนอล (phenol compounds) ที่มีหมูไฮดรอกซิลในโมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 150-160 เช่น สาร eugenol, carvanol และ thymol ในใบโคลฟ อบเชย เซจ และออริกาโน ในบทความยังได้เสนออีกว่า เครื่องเทศจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในทุก ๆ สภาวะ ทำให้ lag phase ยาวนานขึ้น ทำให้อัตราการเติบโตและแบ่งตัวในช่วง log phase ต่ำลง และทำให้จำนวนเซลล์โดยรวมลดลงได้

การศึกษาของ Grohs และ Kunz (2000) ถึงผลของการใช้สมุนไพรหลายชนิดผสมกันเพื่อช่วยในการเก็บรักษาและเพิ่มความคงตัวของเนื้อหมูสด ได้พบว่าเครื่องเทศชนิดต่าง ๆ ให้ผลในการลดการเสื่อมเสียทางด้านสีและกลิ่นได้ดี และยังช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และยับยั้งไม่ให้มีการเจริญเพิ่มขึ้นได้อีกด้วย

Nattress, Yost และ Baker (2001) ได้ทำการศึกษาความสามารถของไนซินและไลโซไซม์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเนื้อสัตว์ 2 ชนิด ได้แก่ *Brochothrix thermosphacta* B2 และ *Carnobacterium* sp. 845 และพบว่าการใช้ไนซินหรือ ไลโซไซม์ หรือใช้ทั้งสองชนิดร่วมกัน ในปริมาณ 250 μg/ml of APT broth จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *Brochothrix thermosphacta* B2 ได้เป็นเวลา 10 วัน ที่ 2 องศาเซลเซียส แต่สำหรับการยับยั้งเชื้อ *Carnobacterium* sp. 845 ในเนื้อหมูไร้มัน (lean pork) พบว่า ไลโซไซม์เพียงชนิดเดียวไม่สามารถยับยั้งได้ ต้องใช้ร่วมกับไนซิน หรือไนซินเพียงชนิดเดียวก็ให้ผลในการยังยั้งได้เช่นกัน

Lemay และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาผลของ Microgard™ 100, Microgard™ 300, nisin, Alta™ 2002, Perlac™ 1902, sodium lactate และน้ำมันหอมระเหยจากมัสตาด (essential oil of mustard) ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกจากเนื้อไก่ mechanically deboned และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากมัสตาดเพียงชนิดเดียว ทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียจำพวก aerobic mesophilic และ lactic acid bacteria ลดลงได้

Fernández-López และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากโรสแมรี่ (rosemary) ส้ม และมะนาว ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นแบบสวีเดน (Swedish-style meat-balls) และพบว่าสารสกัดจากโรสแมรี่ทั้งที่สกัดด้วยน้ำและน้ำมันให้ผลในการลดความหืนได้ดีที่สุด อีกทั้งยังให้ในการต้านเชื้อจำพวก lactic acid bacteria และ *Listeria* อีกด้วย สำหรับผลในด้านประสาทสัมผัส สารสกัดจากโรสแมรี่และสารสกัดจากส้มให้ผลที่ดีเป็นที่ยอมรับ

การศึกษาของ Oussalah และคณะ ในปี 2006 ได้ทำการศึกษาถึงผลของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) จากพืชสมุนไพรต่าง ๆ จำนวน 60 ชนิด ที่มีต่อการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ที่พบในเนื้อหมูสด โดยทำการแปรความเข้มข้นเป็นระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.003 – 0.8% (w/v) จากการทดลองได้พบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก *Corydothymus capitatus* ให้ผลที่ดีที่สุด เมื่อใช้ในปริมาณต่ำสุดคือ 0.025 สำหรับน้ำมันหอมระเหยอื่น ๆ อีก 7 ชนิด ได้แก่ *Cinnamomum cassia, Origanum compactum, Origanum heracleoticum, Satureja hortensis, Satureja montana, Thymus vulgaris carvacroliferum* และ *Thymus vulgaris thymoliferum* ก็ให้ผลที่ดีในการยับยั้งการเจริญของ *P. putida* เช่นกัน แต่ต้องใช้ในความเข้มข้นที่มากกว่าคือ 0.05% สำหรับน้ำมันหอมระเหยอื่น ๆ อีก 10 ชนิด ได้แก่ *Cinnamomum verum (leaf and bark), Eugenia caryophyllus, Cymbopogon martinii var. motia, Cymbopogon nardus, Melaleuca linariifolia, Origanum majorana, Pimenta dioica,*

Thymus satureoides, Thymus serpyllum ก็ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวเช่นกัน แต่ต้องใช้ในปริมาณมากขึ้นเป็นระหว่าง 0.1% และ 0.4%

การศึกษาของ Theivendran, Hettiarachchy และ Johnson (2006) ได้ศึกษาผลในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ผสมสารสกัดสองชนิดคือ ไนซินกับสารสกัดจากเม็ดองุ่น หรือ ไนซินกับสารสกัดจากชาเขียว พบว่า เมื่อทดลองเคลือบฟิล์มทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวลงบนผลิตภัณฑ์ไส้กรอกไก่งวงจะให้ผลที่ดีมากต่อการยับยั้งเชื้อดังกล่าว เมื่อใช้ไนซินเข้มข้น 10,000 IU ร่วมกับสารสกัดจากเม็ดองุ่นหรือสารสกัดชาเขียวเข้มข้น 1% โดยมีผลทำให้จำนวนเชื้อลดลงจากเชื้อตั้งต้นถึง 2 log cycle หลังการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 28 วัน

จากงานวิจัยของ Sofia และคณะ (2007) ได้พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรที่มีในประเทศอินเดีย 6 ชนิด ได้แก่ โคลฟ อบเชย มัสตาด กระเทียม ขิง และ สะระแหน่ มีแนวโน้มในการเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์เป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยจากการทดลองได้พบว่าสารสกัดจากโคลฟ อบเชยและมัสตาดจะให้ผลที่ดีมากที่สุดในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ 3 ชนิดคือ *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* รองลงมาคือ สารสกัดจากกระเทียม เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1% และหากใช้ที่ความเข้มข้น 3% จะมีผลทำลายเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ทั้งหมดแต่สำหรับสารสกัดจากขิงและสะระแหน่ ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อดังกล่าว

งานวิจัยของ Busatta และคณะ (In press) ได้รายงานว่า น้ำมันสกัดจากพืชสมุนไพร *Origanum majorana* L. ให้ผลดีในการต้านทานเชื้อ *Escherichia coli* ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกดิบ นอกจากนี้ งานวิจัยของ Solomakos และคณะ (In press) ยังได้รายงานว่า น้ำมันหอมระเหยจาก thyme ในปริมาณ 0.3, 0.6 และ 0.9% หรือ ไนซินในปริมาณ 500 และ 1000 IU หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบดที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิต่ำ มีผลช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes* แต่ผลที่ได้ก็ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ และสารทั้งสองชนิดให้ฤทธิ์ที่เสริมกัน ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ดีขึ้น การยับยั้งที่ดีที่สุดพบในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบดที่ผสมน้ำมันหอมระเหย 0.6% ร่วมกับ ไนซิน 1000 IU/g โดยให้ผลยับยั้ง *L. monocytogenes* ทำให้มีจำนวนเชื้อน้อยกว่า 2 log CFU/g เมื่อเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

การใช้สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

เป็นที่ทราบกันดีว่า กระเทียม (*Allium sativum* L.) เป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี ดังนั้นจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มาตั้งแต่ในอดีต และมีการพัฒนาต่อเนื่องมาจนทราบว่า สารออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดที่มีอยู่ในกระเทียมสดคืออัลลิซิน (allicin) โดยอัลลิซินนี้เป็นสารที่เกิดมาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารอัลลิอิน (alliin) ซึ่งมีอยู่ในกระเทียมสด ด้วยเอนไซม์ อัลลินิเอส (alliniase) หลังผ่านการทุบ ปอกเปลือก หรือมีการสัมผัสอากาศแล้ว ซึ่งมีงานวิจัยหลายงาน ได้

ศึกษาถึงความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของอัลลิซิน และผลของอัลลิซินต่ออายุการเก็บรักษา ความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์และผลต่อคุณลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และในบางงานวิจัยยังได้ศึกษาผลของอัลลิซินในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารอีกด้วย

Yin และ Cheng (2003) ได้ศึกษาผลของสารอนุพันธุ์จำพวก organosulfer ที่สกัดจากกระเทียม 4 ชนิด ได้แก่ diallyl sulfide, diallyl disulfide, *s*-ethyl cysteine และ *n*-acetyl cysteine ต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบด ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า สาร อนุพันธุ์ทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว ให้ผลดีในด้านการชะลอการเปลี่ยนแปลงของสีของเนื้อวัว และช่วยชะลอการเกิดกลิ่นหืนของไขมันในเนื้อวัวได้ดี แต่ในด้านผลของการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ สาร diallyl sulfide และ diallyl disulfide เพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่ให้ผลในการลดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ($p<0.05$) ได้แก่ *Salmonella typhimurium, Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* และ*Campyrobactor jejuni*

งานวิจัยของ Kim และ Kyung ในปี 2003 ได้พบว่า การหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลลินิเอสไม่ให้เปลี่ยนอัลลิอินเป็นอัลลิซิน โดยการให้ความกระเทียมสดที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที มีผลทำให้กระเทียมดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ดีกว่าอย่างอื่น และเป็นลักษณะพิเศษซึ่งอัลลิซินไม่สามารถยับยั้งได้ ดังนั้นสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่มากในกระเทียมรูปแบบนี้ คือ สารอัลลิอิน นั่นเอง

จากงานวิจัยของ Sallam, Ishioroshi และ Samejima ในปี 2004 ได้พบว่า การใช้กระเทียมทั้งในรูปของกระเทียมสด ผลกระเทียมแห้งและน้ำมันสกัดกระเทียม ให้ผลดีในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชั่น (oxidation) ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกไก่ดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส แต่ผลที่ได้นั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่นำมาใช้ โดยผลที่ดีที่สุดจะพบในตัวอย่างที่มีกระทียมสด 30 g/kg หรือผงกระเทียม 9 g/kg ซึ่งจะให้ผลที่ดีทั้งทางด้านการเป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระ จึงเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นถึง 21 วัน และได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคกล่าวคือ มีกลิ่นกระเทียมไม่มากจนเกินไป

การใช้ไคโตซานจากเปลือกกุ้งในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ไคโตซานเป็นสารประเภทโพลีเมอร์ธรรมชาติ (biopolymer) ของคาร์โบไฮเดรต ที่ได้มาจากการกำจัดหมู่อะเซททิล (acetyl group or $-CH_3$) ออกจากสายโมเลกุลของสารไคติน ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่พบอยู่ในธรรมชาติมากเป็นอันดับสอง รองจากเซลลูโลส โดยแหล่งใหญ่ของไคตินที่สามารถนำมาผลิตเป็นไคโตซาน ได้แก่ เปลือกกุ้งชนิดต่าง ๆ และกระดองปู จากบทความของ No และคณะ (2007) ได้กล่าวว่า ไคโตซานเป็นโพลีเมอร์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างมาก เพราะไคโตซานมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี อีกทั้งยังให้ผลในการยับยั้งเนื้องอก และมีการพัฒนาไคโตซานเป็นยาที่ช่วยลดปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือดได้อีกด้วย ในบทความนี้ยังได้ทำการแจกแจงและสำรวจ

การประยุกต์ใช้ไคโตซานในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ และผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ที่มีการตีพิมพ์ไว้ในวารสารนานาชาติ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยจากผลการสำรวจของ No และคณะ ทำให้ทราบว่า ไคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่มีความสามารถสูงในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้ง แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในอาหารหลายประเภท อาทิเช่น น้ำผลไม้ ผักและผลไม้ อาหารทะเล ขนมปัง นม เนื้อสัตว์สดและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก เป็นต้น ดังนั้นไคโตซานจึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะนำมาพัฒนาให้เป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ทดแทนวัตถุกันเสียจากสารเคมี และมีข้อดี คือเป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ จึงทำให้มีความปลอดภัยในอาหารต่อผู้บริโภคมากกว่าการใช้สารเคมี

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้ไคโตซานเพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ

Microorganism		Foods	References
Bacteria	*Aeromonas hydrophila*	Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	Bacillus cereus	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Meat	Rao and others (2005)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	Bacillus licheniformis	Bread	Lee and others (2002b)
	Bacillus subtilis	Bread	Lee and others (2002b)
		Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
	Bifidobacterium bifidum	Milk	Lee and Lee (2000b)
	Brochothrix thermosphacta	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Meat	Lee and others (2003)
	Clostridium historyticum	Sausage	Youn and others (2001b)
	Clostridium perfringens	Sausage	Youn and others (2001b)
	Coliform	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994b)
		Soybean sprouts	Choi and others (2000)
	Enterobacter aeromonas	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	Enterococcus faecalis	Bread	Lee and Lee (1997)
	Escherichia coli	Bread	Lee and Lee (1997)
		Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Lee and others (2003), Rao and others (2005)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000, 2001b)
		Seafoods	Cho and others (1998a), Tsai and others (2002)
		Soybean curd	Chun and others (1997, 1999)
	Lactobacillus curvatus	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Meat	Lee and others (2003)
	Lactobacillus fructivorans	Mayonnaise	Roller and Covill (2000)
	Lactobacillus plantarum	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Kimchi	Lee and Cho (1998), Lee and Jo (1998), Son and others (1996), Yoo and others (1998)
		Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Lee and others (2003)
	Lactobacillus sakei	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	Lactobacillus viridescens	Meat	Sagoo and others (2002)
		Sausage	Youn and others (2001b)
	Lactobacillus sp.	Kimchi	Jang and Jeong (2005)
	Leuconostoc mesenteroides	Kimchi	Yoo and others (1998)
	Leuconostoc sp.	Kimchi	Lee and Cho (1998), Lee and Jo (1998), Son and others (1996)
	Listeria innocua	Meat	Lee and others (2003), Sagoo and others (2002)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
	Listeria monocytogenes	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Meat	Lee and others (2003)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	Micrococci	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994b)
	Micrococcus varians	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a)
	Pediococcus acidilactici	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	Pediococcus pentosaceus	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Lee and others (2003)
	Photobacterium phosphoreum	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	Pseudomonas aeruginosa	Meat	Lee and others (2003)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	Pseudomonas fluorescens	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Milk	Ha and Lee (2001)
	Pseudomonas fragi	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Lee and others (2003)
	Pseudomonades	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994b)
	Pseudomonas sp.	Meat	Rao and others (2005)
		Seafoods	López-Caballero and others (2005)
	Salmonella Enteritidis	Mayonnaise	Roller and Covill (2000)
		Meat	Lee and others (2003)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000, 2001b)
	Salmonella Typhimurium	Bread	Lee and Lee (1997)
		Meat	Lee and others (2003)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000, 2001b)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	Serratia liquefaciens	Meat	Lee and others (2003)
	Serratia marcescens	Bread	Lee and others (2002b)
	Shigella dysenteriae	Seafoods	Tsai and others (2002)
	Staphylococcus aureus	Bread	Lee and Lee (1997)
		Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Rao and others (2005)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
		Seafoods	Tsai and others (2002)

(continued on next page)

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้ไคโตซานเพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ (ต่อ)

Microorganism		Foods	References
	Staphylococci	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994b)
	Vibrio cholerae	Seafoods	Tsai and others (2002)
	Vibrio parahaemolyticus	Seafoods	Tsai and others (2002)
Yeast	*Candida albicans*	Seafoods	Tsai and others (2002)
	Candida lambica	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	Cryptococcus humiculus	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	Saccharomyces cerevisiae	Bread	Lee and Lee (1997), Lee and others (2002b)
		Juice	Roller and Covill (1999)
		Milk	Ha and Lee (2001)
	Saccharomyces exiguus	Juice	Roller and Covill (1999)
	Saccharomycodes ludwigii	Juice	Roller and Covill (1999)
		Meat	Sagoo and others (2002)
	Schizosaccharomyces pombe	Juice	Roller and Covill (1999)
	Zygosaccharomyces bailii	Juice	Roller and Covill (1999)
Mold	*Aspergillus fumigatus*	Seafoods	Tsai and others (2002)
	Aspergillus niger	Bread	Lee and Lee (1997), Lee and others (2002b)
	Aspergillus parasiticus	Seafoods	Tsai and others (2002)
	Botrydiplodia lecanidion	Fruits and vegetables	Chien and Chou (2006), Chien and others (2007a)
	Botrytis cinerea	Fruits and vegetables	Chien and Chou (2006), Chien and others (2007a), El Ghaouth and others (1992a)
	Cladosporium sp.	Fruits and vegetables	Park and others (2005)
	Fusarium oxysporum	Seafoods	Tsai and others (2002)
	Penicillium chrysogenum	Bread	Lee and Lee (1997)
	Penicillium digitatum	Fruits and vegetables	Chien and Chou (2006), Chien and others (2007a)
	Penicillium expansum	Bread	Lee and others (2002b)
	Penicillium italicum	Fruits and vegetables	Chien and Chou (2006), Chien and others (2007a)
	Penicillium notatum	Bread	Lee and Lee (1997)
	Rhizopus nigricans	Bread	Lee and Lee (1997)
	Rhizopus stolonifer	Fruits and vegetables	El Ghaouth and others (1992a)
	Rhizopus sp.	Fruits and vegetables	Park and others (2005)

ที่มา: No, Meyers, Prinyawiwatkul and Xu, 2007

อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้ไคโตซานเพื่อวัตถุประสงค์ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์นั้น ยังคงมีปัญหาหลักเกิดเนื่องมาจากคุณสมบัติในการละลายของไคโตซาน กล่าวคือ ไคโตซานเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์เท่านั้น เช่น กรดน้ำส้ม (acetic acid) หรือกรดแลคติก (lactic acid) เป็นต้น ดังนั้นการประยุกต์ใช้ลงในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีค่า pH เป็นกลางจึงเป็นไปได้ยาก และไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จะมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี แต่จะสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์เท่านั้น ไม่สามารถละลายในน้ำกลั่นได้ ดังนั้นจึงทำให้ไคโตซานมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาพัฒนาลักษณะโครงสร้างของไคโตซาน ความยาวสายโมเลกุล หรือการใช้ไคโตซานร่วมกันกับสารอื่น เพื่อทำให้ไคโตซานมีความสามารถในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวางขึ้น

วิธีหนึ่งที่ไคโตซานได้รับความสนใจในการศึกษาอย่างแพร่หลายคือ การนำไคโตซานมาผลิตเป็นฟิล์มบริโภค ซึ่งฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี แต่มักมีอายุการเก็บรักษาต่ำและมักเกิดสีเหลือง ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด ซึ่งในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ทำการศึกษาเรื่องฟิล์มของไคโตซาน

Outtara และคณะ (2000a) ได้พบว่าการแพร่ของกรดน้ำส้มและกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) จากฟิล์มไคโตซานที่ใช้กรดดังกล่าวเป็นตัวทำละลาย สามารถเกิดขึ้นได้ในอัตราการแพร่ที่แตกต่างกัน แต่หากนำฟิล์มดังกล่าวมาผสมกับ lauric acid ด้วยความเข้มข้น 1% w/w, cinnamaldehyde หรือ eugenol ด้วยความเข้มข้น 0.5% w/w จะสามารถยับยั้งการแพร่ของกรดดังกล่าวได้

Outtara และคณะ (2000b) ได้ศึกษาถึงผลของไคโตซานฟิล์มในการลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียที่ผิวของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เช่น โบโลญ่า แฮมและ พาสตรามี่ (pastrami) และพบว่าฟิล์มของไคโตซานที่ละลายในกรดโพรพิโอนิกให้ผลในการยับยั้งเชื้อ enterobateria และ *Serratia liquifaciens* ได้ดี และสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่ 4 องศาเซลเซียสได้ถึง 21 วัน

Pranoto, Rakshit และ Salokhe (2005) ได้ศึกษาถึงผลในการยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มจากไคโตซานเมื่อผสมน้ำมันกระเทียม หรือโพแทสเซียม ซอร์เบท (potassium sorbate) หรือไนซิน ซึ่งพบว่า ฟิล์มจากไคโตซานเมื่อผสมน้ำมันกระเทียมในปริมาณ 100µl/g หรือโพแทสเซียม ซอร์เบทในปริมาณ 100 mg/g หรือไนซินในปริมาณ 51,000 IU/g จะให้ผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ได้เป็นอย่างดี

Rao, Chander และ Sharma (2005) ได้ทำการศึกษาถึงการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่มีความชื้นปานกลาง โดยเพิ่มอายุการเก็บรักษาด้วยวิธีการหุ้มด้วยฟิล์มจากไคโตซานและการฉายรังสี โดยการศึกษานี้พบว่า ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไม่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ เมื่อนำไปผ่านการเคลือบด้วยฟิล์มไคโตซานและฉายรังสี (4 kGy)

Sebti และคณะ (2005) ศึกษาถึงการใช้ฟิล์มจากไคโตซานเพื่อลดหรือต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่เมื่อเกิดการปนเปื้อนลงในอาหารแล้วจะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ โดยการศึกษาพบว่าได้ผลการยับยั้งดีมาก ไม่มีจำนวนการสร้างสปอร์ของเชื้อดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการศึกษาและยังช่วยลดการเสียน้ำออกไปจากวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ถึง 30% ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงกล่าวว่า ไคโตซานมีความสามารถที่ดีในการนำมาทำเป็นฟิล์มเพื่อยับยั้งเชื้อชนิดดังกล่าว

Zivanovic, Chi และ Draughon (2005) ได้ทำการศึกษาถึงผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มจากไคโตซานผสมน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ anise, basil, coriander และ oregano ในปริมาณ 1% พบว่า ฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* O157:H7 ที่แตกต่างกัน โดยฟิล์มไคโตซานที่ผสมน้ำมันหอมระเหยจาก oregano จะให้ผลที่ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจาก coriander, basil และ anise ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Li และคณะ ในปี .2006 พบว่า ความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มจาก konjac glucomanan จะเพิ่มมากขึ้น และจะให้ผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ได้เป็นอย่างดี เมื่อมีการผสมไคโตซานลงในฟิล์มในอัตราส่วน 20% ของน้ำหนักฟิล์ม และมีการเติมไนซินลงในฟิล์มในปริมาณ 413 IU/disk film

ในงานวิจัยอื่น ๆ อีกหลายงาน ได้มีการศึกษาผลของการผสมไคโตซานในรูปแบบต่าง ๆ ต่อคุณลักษณะและความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ผลิตภัณฑ์อาหาร

การศึกษาของ Sagoo, Board และ Roller ในปี 2002 ได้กล่าวว่า การยับยั้งยีสต์ที่มักจะทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร (*Saccharomyces exiguous*, *Saccharomyces ludwigii* และ *Torulaspora delbrueckii*) จะได้ผลดีเมื่อมีการใช้ไคโตซานที่อยู่ในรูปของ chitosan glutamate ในปริมาณ 0.005% ร่วมกับ sodium benzoate ในปริมาณ 0.025%

การศึกษาของ Zheng และ Zhu ในปี 2003 พบว่า ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Eschericia coli* และ *Staphylococcus aureus* แตกต่างกัน โดยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 300 kDalton จะให้ผลดีในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Eschericia coli* ได้

López-Caballero และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้ไคโตซานเพื่อเติมลงในไส้กรอกปลาคอด (cod sausage) ในปริมาณ 1.5% พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณลักษณะทางคุณภาพที่ดีเมื่อใช้ร่วมกับการขึ้นรูปด้วยการอัดความดัน 350 MPa ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นอกจากนี้งานวิจัยยังพบว่า การเติมไคโตซานมีผลช่วยลดเชื้อจุลินทรีย์ ยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ และมีผลทำให้ไส้กรอกที่ได้มีเนื้อสัมผัสที่ยืดหยุ่นมากขึ้นและมีสีเหลืองขึ้นด้วย

Qin และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงวิธีการทำให้ไคโตซานละลายน้ำได้โดยการใช้การตัดสายโมเลกุลด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานที่ผลิตได้ ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า ไคโตซานที่ผลิตได้สามารถละลายได้ในน้ำแต่ไม่มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังทำให้เชื้อ *Candida albicans* เจริญเติบโตได้ดีขึ้นอีกด้วย ดังนั้นไคโตซานที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีควรมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า $5x10^4$ ขึ้นไป

Georgantelis และคณะ (2007b) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากโรสแมรี่ (rosemary extracts) ร่วมกับไคโตซาน หรือ α-tocopherol ในการเป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์และผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเลชั่นของไขมันในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกสดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และพบว่าทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ถึง 20 วัน และตัวอย่างที่เก็บได้นานที่สุด พบในผลิตภัณฑ์ที่ผสมไคโตซานร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่

จากการศึกษาของ Juneja และคณะ (2006) ได้พบว่า ไคโตซานสามารถควบคุมการสร้างสปอร์ของ *Clostridium perfringens* ในเนื้อวัวและเนื้อไก่งวงบด ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นได้ โดยปริมาณที่ให้ผลดีที่สุดคือ 3% โดยน้ำหนัก

การศึกษาของ Kok และ Park ในปี 2007 ได้พบว่า อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ set fish ball ที่ทำมาจากการขึ้นรูปซูริมิ (surimi) ด้วยความร้อนด้วยเครื่องเอ็กทรูดเดอร์ (extruder) จะยาวนานขึ้นเมื่อมีการเติมไคโตซาน พร้อมกับกรดน้ำส้มหรือ glucono deltalactone โดยการใช้ไคโตซานละลายในกรดน้ำส้มก่อนผสมลงในผลิตภัณฑ์ก่อนที่จะนำไป

ขึ้นรูป จะให้ผลในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ถึง 21 วัน โดยที่ยังคงมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์ น้อยว่า 1 log CFU/g

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากรรมวิธีการผลิตอัลลิซิน-ไคโตซานคอมเพล็กซ์ที่เหมาะสม รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีและทางด้านกายภาพของคอมเพล็กซ์ที่ผลิตได้

2. เพื่อศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และอัลลิซิน-ไคโตซานคอมเพล็กซ์ ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

3. เพื่อศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และอัลลิซิน-ไคโตซานคอมเพล็กซ์ ที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 อัลลิซิน: สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมได้มาจากการสกัดอัลลิซินจากกระเทียมสดในห้องปฏิบัติการเอง โดยอ้างอิงวิธีสกัดของ Curtis *et al.* (2004) ซึ่งสารสกัดที่ได้จะนำมาใช้ทดลองต่อทันที หรือหากในกรณีที่ไม่ได้ใช้ทันทีจะเก็บไว้ในภาชนะปิดที่ทึบแสงในอุณหภูมิ 4°C และใช้ทดลองภายใน 24 ชั่วโมง

1.2 ไคโตซาน: ไคโตซานที่จะใช้ในงานวิจัยนี้เตรียมได้จากเปลือกกุ้งที่แห้งและสะอาด ที่ซื้อมาจาก บริษัท ต้าหมิง เอนเตอร์ไพรส์ จำกัด (สมุทรสาคร) โดยอ้างอิงตามวิธีการเตรียมของ Tolaimate และคณะ (2003) และ Kachanechai และคณะ (2008) เพื่อให้ได้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10^6 Dalton และมีค่า Degree of deacetylation (%DD) 2 ระดับ คือ 70-85 และ 85-100% ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมแสดงได้ดังต่อไปนี้

สกัดโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งที่สะอาดและแห้ง
โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.5M เป็นเวลา 12 ชม.

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง

↓

สกัดเกลือแร่ออกจากเปลือกกุ้ง
โดยแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 1.5M เป็นเวลา 12 ชม.

↓

ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง

↓

สกัดรงควัตถุที่ให้สีออกจากเปลือกกุ้ง
โดยแช่ในเอทานอลเข้มข้น 75% นาน 1 ชม.

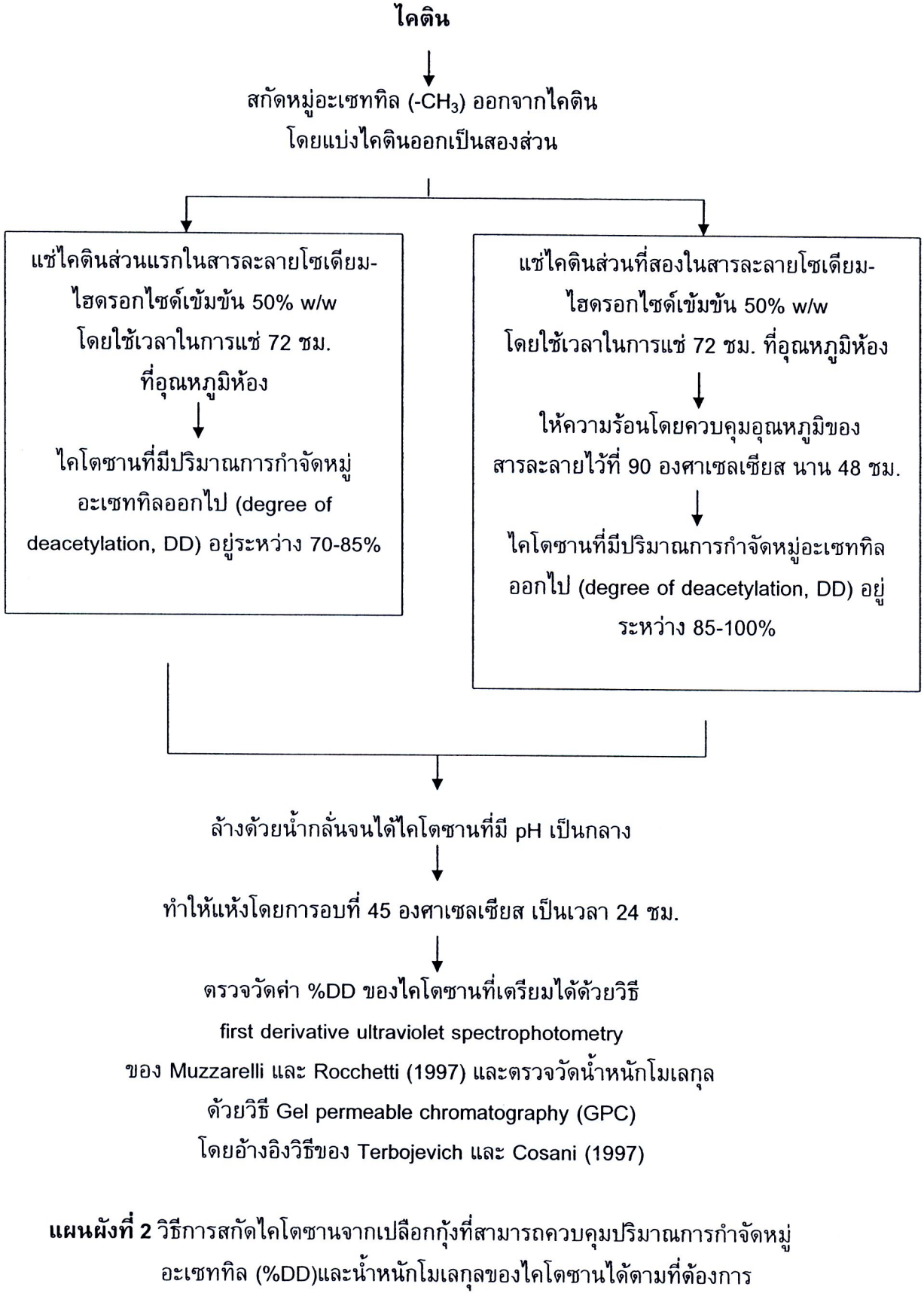
↓

ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด

↓

ไคติน

แผนผังที่ 1 วิธีการสกัดไคตินจากเปลือกกุ้ง



แผนผังที่ 2 วิธีการสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้งที่สามารถควบคุมปริมาณการกำจัดหมู่อะเซททิล (%DD)และน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานได้ตามที่ต้องการ

2. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

2.1.1 ศึกษาอัตราส่วนของไคโตซานต่ออัลลิซินที่เหมาะสม

วิธีเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานในงานวิจัยนี้ จะอ้างอิงตามวิธีของ Takeuchi และคณะ (2000) โดยแปรอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่ออัลลิซินเป็น 1:1 1:2 และ 1:3 และทำการศึกษาตัวอย่างไคโตซาน 2 ตัวอย่างที่มีค่า degree of deacetylation (%DD) แตกต่างกัน 2 ระดับ (ได้มาจากวิธีการเตรียมด้านบน) เป็น 70-85%DD (sample 1) และ 85-100%DD (sample 2) ทำให้มีตัวอย่างที่ทำการศึกษา (treatment) ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1: ตัวอย่างที่ทำการศึกษาในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของไคโตซานต่ออัลลิซิน

Treatment	**chitosan:allicin (weight ratio)**
Complex 1 (C1)	Sample 1:allicin = 1:1
Complex 2 (C2)	Sample 1:allicin = 1:2
Complex 3 (C3)	Sample 1:allicin = 1:3
Complex 4 (C4)	Sample 2:allicin = 1:1
Complex 5 (C5)	Sample 2:allicin = 1:2
Complex 6 (C6)	Sample 2:allicin = 1:3

ในการทดลองนี้ จะควบคุมให้สภาวะการเกิดคอมเพล็กซ์เป็นสภาวะที่อัลลิซินมีความคงตัวที่สุดคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทิ้งให้เกิดคอมเพล็กซ์อย่างสมบูรณ์ในภาชนะสีชาป้องกันแสงเป็นเวลา 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเครื่อง centrifuge และตรวจวัดปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นร้อยละผลผลิตที่ได้ และปริมาณอัลลิซินที่คงเหลือในสารละลายใสส่วนบน ด้วยวิธี Spectrophotometric Assay ด้วยปฏิกิริยาของ 4-mercaptopyridine กับ Thiosulfinates (Miron *et al.*, 2002) และเลือกอัตราส่วนของอัลลิซินต่อไคโตซานที่เหมาะสมที่สุดจากปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ และปริมาณอัลลิซินที่คงเหลือหลังจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

2.1.2 ศึกษาวิธีการทำแห้งสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เหมาะสม

นำตัวอย่างที่ได้ หลังจากการทิ้งไว้ให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนอย่างสมบูรณ์แล้วมาตรวจวัดค่า pH และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, ($^{\circ}$Brix)) จากนั้นนำมาทำแห้งโดยศึกษาวิธีการทำแห้งที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาวิธีการทำ

แห้งทั้งหมด 4 วิธี คือ การทำแห้งด้วยเครื่อง spray drier freeze drier vacuum drier และ tray drier โดยมีสภาวะในการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- เครื่อง spray drier (BUCHI 190 Mini Spray Dryer)
    - นำตัวอย่างที่ได้มาปรับให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 15-30%
    - นำตัวอย่าง feed เข้าเครื่อง spray drier ด้วยอัตราเร็ว 2ml/min และสภาวะของเครื่องที่ใช้มีดังต่อไปนี้
        - Inlet temperature 130 °C
        - Outlet temperature 100 °C
        - Flow indicator 600
- เครื่อง freeze drier (Dura-TOP ™μP/Dura-STOP MP/Dura Dry MP)
    - Pre-freeze ตัวอย่างด้วยเครื่อง freezer ที่อุณหภูมิ -18 องศงเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
    - นำถาดใส่ตัวอย่างเข้าเครื่อง freeze drier และทำแห้งด้วยการระเหิดน้ำแข็งที่อุณหภูมิภายใน -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่าง
- เครื่อง vacuum drier
    - นำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในถาดสแตนเลส เกลี่ยให้มีความหนาไม่เกิน 1 มิลลิเมตร
    - ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่าง
- เครื่อง tray drier
    - นำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในถาด เกลี่ยให้บาง ๆ
    - ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72-84 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่าง

ซึ่งวิธีในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เหมาะสมที่สุด ที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ดัดแปลงจากวิธีของ Takeuchi และคณะ (2000)) สามารถสรุปและแสดงได้ดังแผนผังด้านล่างดังต่อไปนี้

ชั่งน้ำหนักสารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมและสารละลายไคโตซานตามอัตราส่วน

↓

นำสารสกัดอัลลิซินที่อยู่ในบีกเกอร์มา homogize ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm นาน 10 วินาที

↓

ค่อย ๆ หยดสารละลายไคโตซานด้วยหลอดหยดลงในสารสกัดอัลลิซิน (ปั่นด้วยความเร็วรอบ 11,000 rpm ต่อเนื่องจนกระทั่งหยดสารละลายไคโตซานจนหมด (ประมาณ 10 นาที))

↓

ปั่นต่ออีก 30 วินาที

↓

นำสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้ใส่ลงในภาชนะปิด ทึบแสง

↓

เก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยสมบูรณ์

↓

นามาปั่นเหวี่ยงแยกสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

↓

เทแยกส่วนใสลงในภาชนะปิด ทึบแสงและเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อรอการตรวจวัดปริมาณอัลลิซินที่คงเหลืออยู่ด้วยวิธี Spectrophotometric Assay ด้วยปฏิกริยาของ 4-mercaptopyridine กับ Thiosulfinates (Miron *et al.*, 2002)

↓

นำของแข็งที่ได้ใส่ลงในถาดเตรียมตัวอย่างของเครื่อง freeze dry เพื่อนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

↓

ทำการทำแห้งตัวอย่างด้วยเครื่อง freeze drier

↓

ได้ผงแห้งของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

แผนผังที่ 3 วิธีการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เหมาะสม (optimum process)

ในการทดลองนี้ จะเลือกสภาวะการทำแห้งที่ให้ร้อยละผลผลิตที่ได้ (%yield) ที่สูงที่สุดเพื่อเตรียมตัวอย่างต่อไป โดยในงานวิจัยขั้นตอนนี้จะใช้การวางแผนการทดลองแบบ CRD และทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความ

แตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002)

2.2 ศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

นำสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมได้ทั้งหมด มาทำการตรวจวัดคุณลักษณะด้านต่าง ๆ สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมีต่าง ๆ ได้แก่

- สีของคอมเพล็กซ์ ด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994)
- รูปร่างของคอมเพล็กซ์โดยใช้วิธี Scanning electron microscopy (SEM) (Gómez-Guillén *et al.*, 2005)
- ลักษณะโครงสร้างของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) (Umemura and Kawai, 2007)
- ค่าความเป็นผลึก (crytallinity) ของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี X-ray Diffraction (XRD) (Wang, Du and Liu, 2004)
- ค่าความสามารถในการละลายน้ำ (Takeuchi *et al.*, 2000)

ในขั้นตอนนี้จะใช้การวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลการทดลองของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002) โดยใช้การวิเคราะห์ทางความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test

2.3 ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่ผลิตได้ทั้งหมด ต่อเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Esherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Streptococcus faecalis* และ *Salmonella typhimurium* โดยการทดสอบความไวของจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk diffusion test (Kirby-Bauer) ซึ่งวัดผลโดยการวัดขนาดของ clear zone หรือ zone of inhibition และศึกษาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ด้วยวิธี Broth dilution method

3. ศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

3.1 สูตรและวิธีการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมอัลลิซิน หรือไคโตซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

ทำการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำโดยอ้างอิงวิธีของ Georgantelis และคณะ (2007b) โดยมีสูตรและส่วนผสมดังตารางที่ปรากฏในตารางด้านล่างนี้ และแปรปริมาณอัลลิซิน ไคโตซาน และอัลลิซิน-ไคโตซานคอมเพล็กซ์ เป็น 2 ระดับคือ 0.5 และ 1% โดยน้ำหนัก (ตัวอย่างที่ศึกษาต่อน้ำหนักเนื้อแดง) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารดังกล่าว

ตารางที่ 2 สูตรของไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ส่วนผสม	**Control (g)**	**สูตรที่ 1 (g)**	**สูตรที่ 2 (g)**
เนื้อหมูแดงล้วน	200.00	200.00	200.00
ไขมันหมูแข็ง	18.39	18.39	18.39
น้ำแข็ง	10.00	10.00	10.00
เกลือ	4.60	4.60	4.60
สารอัลลิซิน หรือ ไคโตซาน หรือ สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน	-	0.50	1.00

3.2 ศึกษาผลของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ทำการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำตามสูตรด้านบน ทำการศึกษาเบื้องต้นกับตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานทั้งหมดที่ผลิตได้ จำนวน 6 ตัวอย่าง (C1-C6) ที่ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน 0.5 และ 1% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารประกอบเชิงซ้อน โดยทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และตรวจวัดปริมาณเชื้อราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ โดยอ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007) ในการทดลองนี้จะเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่วัดได้ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 ศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ในขั้นตอนนี้จะทำการศึกษาผลของการใช้สารอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู

ไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2 และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารใด ๆ ซึ่งคุณลักษณะทางคุณภาพต่าง ๆ ที่ตรวจวัดมีดังต่อไปนี้

3.3.1 ตรวจวัดคุณลักษณะทางเคมีของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

- ความชื้น (Moisture content) โดยใช้วิธีมาตรฐานของ AOAC (1995)

3.3.2 ตรวจวัดคุณลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

- สีของตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994)
- เนื้อสัมผัส ด้วยเครื่อง texture analyzer (Barbut, 2006)
- ค่าความอุ้มน้ำ (water holding capacity, WHC) (Honikel and Hamm, 1994)

3.3.3 ศึกษาคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ศึกษาคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำโดยใช้แบบสอบถามความชอบแบบ 9-point hedonic scale ทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ โดยทำการทดสอบกับกลุ่มผู้บริโภคที่มีความชอบในการรับประทานไส้กรอกจำนวน 30 คน และทำการทดสอบเพื่อดูอายุการเก็บรักษาทุก ๆ 7 วัน จนกว่าตัวอย่างไส้กรอกจะเสื่อมเสีย โดยดูจากลักษณะปรากฏและคะแนนความชอบโดยรวม ที่ผู้ทดสอบให้

3.3.4 ศึกษาและประเมินอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และ ตรวจวัดปริมาณเชื้อราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ โดยอ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007) โดยทำการตรวจเชื้อทุก ๆ 5 วัน จนกว่าตัวอย่างไส้กรอกจะเสื่อมเสีย

ในการทดลองข้อ 3 นี้จะใช้การวางแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002) โดยใช้การวิเคราะห์ทางความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test