

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 องค์ประกอบของเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ส่วน ได้แก่ เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมัน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ และมีองค์ประกอบต่างจากเนื้อเยื่อไขมัน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เนื้อสัตว์โดยทั่วไปมักหมายถึงกล้ามเนื้อจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น เนื้อจากวัว สุกร ควาย แพะ แกะ และไก่ เป็นต้น ภายหลังจากสัตว์ตายแล้วกล้ามเนื้อและเนื้อสัตว์สามารถใช้แทนกันได้ โดยกรณีที่เกิดการเน่าของเนื้อสัตว์จะเป็นช่วงที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่ และมีบทบาทในการทำงานอยู่ในตัวสัตว์ แต่ถ้ากล่าวถึงเนื้อสัตว์จะหมายถึงกล้ามเนื้อที่ได้จากสัตว์ภายหลังจากสัตว์ตายแล้ว (บุษกร อุดรพิชาติ. 2545 ; Robinson. 1985)

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

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของสารอาหารต่างๆที่มีในกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่โตเต็มวัย ในระยะหลังการเกร็งตัวก่อนจะเข้าสู่ระยะ post mortem

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

ที่มา : Lawrie. 1974

เนื้อเยื่อไขมันประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์จำนวนมาก แต่มีวิตามินและแร่ธาตุอยู่เล็กน้อย และพบสารประกอบที่ละลายน้ำได้อยู่ที่ผิวหน้าของเนื้อเยื่อไขมัน และที่ผิวหน้าของเนื้อเยื่อไขมัน ยังมีความเข้มข้นของกรดแลกติกต่ำซึ่งแตกต่างจากผิวหน้าของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ ดังนั้นพีเอชของ

ผิวหนังเนื้อเยื่อไขมันจึงมีค่าใกล้เคียงกับค่าฟิเชอร์เป็นกลาง และถึงแม้ว่าจะมีกลูโคสและกรดอะมิโนอยู่ด้วยแต่ก็ไม่พบสารตัวกลางที่เกิดจากปฏิกิริยาไกลโคไลซิส เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีสารประกอบที่ละลายได้อยู่ที่ผิวหนังเนื้อเยื่อเช่นเดียวกับเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมัน และเป็นส่วนที่ช่วยให้จุลินทรีย์เจริญ (Robinson, 1985)

เนื่องจากเนื้อสัตว์ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และวิตามินต่างๆ รวมทั้งความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จึงมักพบจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่บริเวณผิวหนังและภายในเนื้อสัตว์

2.2 การปนเปื้อนจุลินทรีย์ของเนื้อสัตว์

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

2.2.1 แหล่งที่มาของจุลินทรีย์

2.2.1.1 การปนเปื้อนในขณะที่สัตว์ยังมีชีวิต

โดยธรรมชาติเนื้อที่ได้จากสัตว์ที่มีสุขภาพดีจะปราศจากเชื้อโรค ซึ่งไม่รวมถึงในต่อมน้ำเหลือง อย่างไรก็ตามบนผิวหนังของสัตว์ที่ใช้กินเนื้อทุกชนิดจะเป็นแหล่งที่อยู่ของจุลินทรีย์ต่างๆ จำนวนมาก นำไปสู่การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ผิวหนัง กีบเท้า เชื้อบนทางเดินอาหารและทางเดินหายใจ ตัวอย่างเช่นที่ผิวหนังมีจำนวนจุลินทรีย์สูงถึง 10^6 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร แบคทีเรียก่อโรคจะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับมูลสัตว์และปนเปื้อนอยู่ในคอก ซึ่งอาจจะถูกสัตว์นำเข้าปากรากและเกิดการติดเชื้ออีกครั้งหนึ่งได้ เป็นเหตุให้มีเชื้อประจำถิ่นอาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์ตั้งแต่ยังอายุน้อย (Zeothen และ Bøgh - Sørensen, 2003)

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

อาศัยอยู่ในดินและพืช และมีโอกาสน้อยมากที่จะพบบนเนื้อในจำนวนเกิน 10^2 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร (Robinson, 1985)

การใช้อาหารเลี้ยงสัตว์ที่มีการปนเปื้อนก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ การขนส่งสัตว์โดยใช้พาหนะที่ปราศจากเชื้อไม่เพียงพอและการที่สัตว์ต้องนอนอยู่ในโรงฆ่าสัตว์เป็นระยะเวลานานทำให้มีการปล่อยแบคทีเรียก่อโรคมานอก ความเครียดของสัตว์อาจจะทำให้จุลินทรีย์ถูกปล่อยออกมาในต่อน้ำเหลืองหรือเยื่อเมือกซึ่งทั้งสองบริเวณเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อข้าม (cross-infections) ไปยังตัวสัตว์ได้ (Smulders, 1995)

2.2.1.2 การปนเปื้อนจากเครื่องมือที่ใช้

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากเครื่องมือที่ใช้ เช่น มีด จะปนเปื้อนเข้าไปในตัวสัตว์ผ่านทางเส้นเลือด และแพร่เข้าสู่กระแสเลือดไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย แต่สารต้านจุลินทรีย์ที่อยู่ในเลือดจะช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้น อย่างไรก็ตามมีด เหล็ก และผ้ากันเปื้อนของคณงาน และตัวผู้ตรวจสอบคุณภาพเนื้ออาจเป็นแหล่งของการปนเปื้อนจุลินทรีย์ การสวมถุงมือจะช่วยป้องกันการปนเปื้อนเชื้อที่มาจากบาดแผลบนมือของคณงานแต่ละคนได้ และในพื้นที่ที่มีการตัดแต่งเนื้อถ้าไม่สะอาดอาจเป็นทางที่นำไปสู่การปนเปื้อนข้าม (cross - contamination) ของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่บริเวณนั้นไปยังเนื้อสัตว์ที่ตัดแต่งแล้ว (Zeothén และ Bøgh - Sørensen, 2003)

2.2.1.3 การปนเปื้อนจากการแปรรูป

การกำจัดเขาสัตว์ การกำจัดขน และการถลกหนังวัวควายในโรงฆ่าสัตว์ด้วยมนุษย์ ทำให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์บนผิวหนังเนื้อมากกว่าการกำจัดด้วยเครื่อง สำหรับหมูที่ผ่านการลวกในภาชนะขนาดใหญ่ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แต่ก็ยังพบว่ามีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่ที่ผิวหนัง ปอด และบาดแผล (Zeothén และ Bøgh - Sørensen, 2003) หลังจากการกำจัดขนที่ลำตัวออกจะทำให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลงเหลือน้อยกว่า 10^3 เซลล์ต่อตารางเซนติเมตร โดยจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตส่วนใหญ่เป็นพวกทนอุณหภูมิสูงได้ (Robinson, 1985) แต่กระบวนการในขั้นตอนต่อมาอาจจะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้อีก ได้แก่ การตัดอวัยวะภายในออกทั้งในสุกรและวัวควายโดยเฉพาะอย่างยิ่งการกำจัดทวารหนักและการเปิดช่องท้อง รวมทั้งการตัดต่อน้ำเหลืองและอวัยวะอื่นๆที่เป็นแหล่งของแบคทีเรีย การนำเนื้อสัตว์ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 2 องศาเซลเซียสจะช่วยป้องกันการไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคเจริญและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสีย การเก็บเนื้อสัตว์ไว้ในห้องเย็นโดยการใส่เข้าไปแบบไม่หนาแน่นจนเกินไป และมีการกำจัดน้ำออกโดยใช้ความดันต่ำซึ่งจะทำให้น้ำระเหยออกไปทำให้บริเวณผิวหนังเนื้อแห้งและมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อปนเปื้อน (Zeothén และ Bøgh - Sørensen, 2003)

ตารางที่ 2.2 จำนวนจุลินทรีย์เฉลี่ยที่ปนเปื้อนในขั้นตอนการบรรจุเนื้อวัวในโรงฆ่าสัตว์

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

ที่มา : Empey และ Scott. 1939

2.2.1.4 การปนเปื้อนจากคนงาน

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

การปนเปื้อนจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ อาจหลีกเลี่ยงได้ยากเนื่องจากเป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบบ่อยๆ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจะเจริญในเนื้อสัตว์และอาจทำให้เกิดการเน่าเสียได้

2.2.2 ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอยู่หลายชนิด แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทคือ

2.2.2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียพวกนี้อยู่ตามผิวหนังของเนื้อ ต้องการอากาศในการเจริญ สามารถใช้น้ำตาลได้โดยการออกซิไดซ์ทำให้ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้ามีปริมาณออกซิเจนจำกัดหรือถ้าการออกซิไดซ์ของน้ำตาลไม่สมบูรณ์จะทำให้เกิดกรดอินทรีย์เกิดขึ้น แบคทีเรียพวกนี้มีบทบาทสำคัญต่อผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ซึ่งแบ่งเป็น 4 ชนิดคือ

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

2. Heterofermentative lactic acid bacteria ได้แก่ *Leuconostoc* และ *Lactobacilli*

บางชนิด แบคทีเรียพวกนี้ในระหว่างการหมักจะสร้างกรดแลคติก เอทิลแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

3. *Bacillus* species แบคทีเรียพวกนี้จะพบเฉพาะในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่เค็มสารในเตรตเท่านั้น จะทำให้เกิดกรดแลคติก กรดแอซิดิก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

4. *Clostridium* species แบคทีเรียพวกนี้ในระหว่างการหมักจะมีการสร้างกรดแลคติก กรดแอซิดิก กรดบิวทิริก อะซิโตน บิวทิลแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และก๊าซไฮโดรเจน

2.2.2.2 แบคทีเรียที่สร้างสารพิษขึ้นในอาหารพวกเนื้อสัตว์

แบคทีเรียพวกนี้ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อ มาจากฝุ่น ดิน และคนงาน สามารถทนความร้อนสูง และเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นพร้อมกับผลิตสารพิษ แบคทีเรียเหล่านี้มีอยู่ 3 ชนิดคือ

1. *Clostridium botulinum* เป็นแบคทีเรียผลิตสารพิษที่มีชื่อว่า Botulism สารพิษนี้ถูกสร้างขึ้นและขับออกจากเซลล์แบคทีเรียที่อยู่ในอาหาร เป็นพวกเอ็กโซทอกซิน (exotoxin) ที่ถูกทำลายเมื่อนำไปต้มในน้ำเดือด (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) 15-20 นาที ความเป็นพิษของ Botulism พบว่าภายหลังจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษนี้อยู่ 24-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการกล้ามเนื้ออ่อนเพลีย ไม่มีแรง สูญเสียความสามารถในการสั่งการของสมองส่วนกลางและถ้ารับเข้าไปในปริมาณมาก อาจถึงตายได้ *C. botulinum* มี 3 แบบคือ A B และ E เซลล์มีลักษณะเป็นแท่ง (rod) เจริญได้ดีในที่มืด อากาศและทนความร้อนได้สูง พบอยู่ทั่วไปในดิน มักพบในอาหารประเภทโปรตีน อาหารกระป๋อง ที่มีพีเอชต่ำ เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อและผักบรรจุกระป๋อง แต่ไม่พบบ่อยนักในผลิตภัณฑ์ที่มีการเค็มสารในเตรต เพราะสารเหล่านี้ยับยั้งการเจริญของ *C. botulinum* ได้

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

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

2.2.2.3 แบคทีเรียจากเนื้อสัตว์ที่ทำให้เกิดโรค

แบคทีเรียจากเนื้อสัตว์ที่ทำให้เกิดโรค ได้แก่ *Salmonella* spp. ที่ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อสัตว์จำนวนมาก ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ในร่างกายของผู้บริโภค แล้วมีการสร้างสารพิษเอนโดทอกซิน (endotoxin) ขึ้นภายในเซลล์ ทำให้ผู้ติดเชื้อมีอาการเวียนศีรษะ อาเจียน และท้องเดิน ระยะเวลาของการฟักตัว หรือช่วงเวลาหลังรับเชื้อเข้าไปจนถึงปรากฏอาการออกมาจะใช้ระยะเวลามากกว่า 6 ชั่วโมง (เขวาลักษณ์ สุรพันธุ์พิสิษฐ์. 2534)

2.3 การเจริญของจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์

การเจริญของจุลินทรีย์ทั้งบนผิวหนังเนื้อและภายในเนื้ออาจทำให้เนื้อเน่าเสียได้ ซึ่งการเน่าเสียก็จะมีลักษณะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์และนำไปสู่การทำให้เนื้อเน่าเสียได้มีดังต่อไปนี้

2.3.1 ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนและการแพร่กระจายของเชื้อในเนื้อ

เมื่อเก็บเนื้อไว้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ เนื้อที่มีการปนเปื้อนเชื้อประจำถิ่นพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำเป็นจำนวนมากจะทำให้เนื้อเน่าเสียได้รวดเร็วกว่าเนื้อที่มีจุลินทรีย์พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำปนเปื้อนอยู่น้อย (Zeothien และ Bøgh- Sørensen. 2003)

2.3.2 คุณสมบัติทางกายภาพของเนื้อ

พื้นที่ผิวของผิวหนังเนื้อมีผลต่ออัตราการทำให้เน่าเสีย เพราะว่าบริเวณผิวหนังเป็นแหล่งที่พบจุลินทรีย์มากที่สุด เนื่องจากมีออกซิเจนปริมาณมากช่วยให้จุลินทรีย์พวกที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญเจริญได้ ดังนั้นเนื้อบดซึ่งมีพื้นที่ผิวหน้ามากจะช่วยให้จุลินทรีย์เจริญได้มากกว่า ไก้มันที่ผิวหนังอาจจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ได้ แต่ก็อาจทำให้เนื้อเน่าเสียได้เนื่องจากการย่อยสลายตัวเองของไขมัน (Zeothien และ Bøgh- Sørensen. 2003)

2.3.3 คุณสมบัติทางเคมีของเนื้อ

เนื้อสัตว์ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ มากมาย และมีปริมาณความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นเนื้อจึงเป็นแหล่งที่พบจุลินทรีย์ได้มากโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ผิวหนัง ซึ่งถ้าผิวหนังเนื้อไม่มีความชื้นก็อาจจะทำให้ไม่มีจุลินทรีย์เจริญ ถ้ามีปริมาณความชื้นเล็กน้อยทำให้ราและยีสต์เจริญได้ แต่ถ้าปริมาณความชื้นมากจะช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ ดังนั้นความชื้นสัมพัทธ์ของบรรยากาศในการเก็บรักษาจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื้อที่มีปริมาณโปรตีนสูงและมีคาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์ใช้หมักได้ในปริมาณต่ำหรือไม่มีเลยมีแนวโน้มจะพบการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่หมักมากกว่า ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนและผลิตภัณฑ์ของโปรตีนไปเป็นไนโตรเจน คาร์บอน และพลังงานได้ ค่าพีเอชของเนื้อสัตว์ดิบอาจจะแปรผันตั้งแต่ประมาณ 5.7 ถึงมากกว่า 7.2 ขึ้นอยู่กับปริมาณของ

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

2.3.4 ปริมาณออกซิเจน

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

2.3.5 อุณหภูมิ

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

2.4 การลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

วิธีที่เป็นไปได้ในการลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของเนื้อสด ได้แก่ (1) การประยุกต์ใช้สารเคมีรวมทั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรีย (2) การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การล้างน้ำ การฟ่นละอองอากาศ หรือการฉายรังสีบนผิวหนังเนื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต รังสีอินฟราเรด การใช้ความดันไอน้ำและความดันสูง เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีจะมีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนได้แตกต่างกันดังตารางที่ 2.3 ในปัจจุบันนี้มีเฉพาะวิธีในกลุ่มแรกเท่านั้นที่ยังคงนำมาใช้กันอยู่ ส่วนวิธีที่ใช้ลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อนั้นทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับกฎหมายที่รองรับ วิธีที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ การกำจัดน้ำออกโดยการทำแห้ง การให้ความร้อนโดยการฆ่าเชื้อหรือการทำให้ปลอดเชื้อ การเติมไนไตรต์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และโพลีฟอสเฟต (Polyphosphate) ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก การใช้กรดแลกติกและแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกร่วมกับการลดค่า a_w และการใช้ออกซิเจน เป็นต้น (Zeothen และ Bøgh- Sørensen, 2003)

สารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ กรดอินทรีย์ น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ และสารที่สร้างโดยจุลินทรีย์ เช่น แบคทีริโอซิน ไนซิน เพติโอซิน เป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่มีการนำมาใช้ในอาหารเพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป็นเวลานานแล้ว ซึ่งผลการทำลายหรือการยับยั้งจุลินทรีย์โดยมากขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ถ้าใช้ในปริมาณสูงจุลินทรีย์จะถูกทำลายได้มาก แต่การใช้กับอาหารมักถูกจำกัดให้ใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ (สุมนหา วัฒนสินธุ์. 2545) ปัจจุบันนี้ สารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติเหล่านี้กำลังได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก และมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้แทนวัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมี เช่น ไนไตรต์ ไนเตรต

ตารางที่ 2.3 ประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์โดยวิธีต่างๆ

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

ที่มา : Zeothen และ Bøgh – Sørensen, 2003

2.5 การควบคุมจุลินทรีย์โดยใช้กรดอินทรีย์

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

2.5.1 ผลของกรดอินทรีย์ต่อการรอดชีวิตและการตายของจุลินทรีย์

แม้ว่าในสภาวะที่เป็นกรดจุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ แต่สามารถรอดชีวิตได้เป็นระยะเวลาหนึ่ง ถ้าในกรณีที่เป็นเชื้อก่อโรคก็จะมีผลต่อความปลอดภัยของอาหาร ตัวอย่างเช่น การรอดชีวิตของ *Salmonella* spp. ในน้ำแอปเปิ้ลและในน้ำส้มคั้นที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ และ *E. coli* O157 ในน้ำแอปเปิ้ลที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์

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

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

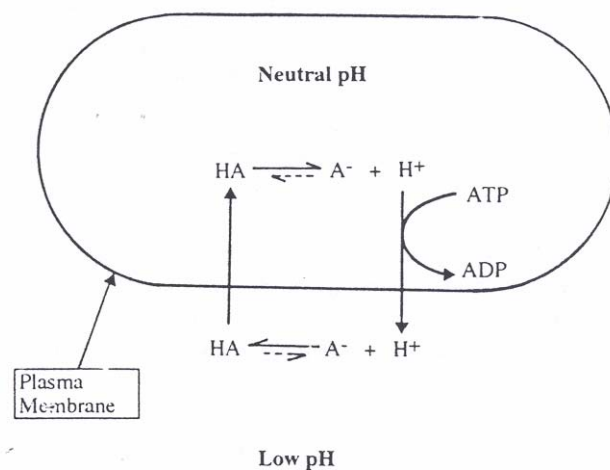
การรอดชีวิตของ *L. monocytogenes* ระยะ stationary phase ในสภาวะที่พีเอชลดต่ำลง เนื่องจากมีกรดแอสซิดิกหรือกรดแลคติก ความเข้มข้นของกรดแอสซิดิกทั้งหมด 5,000 - 10,000 มิลลิกรัมต่อลิตรที่พีเอช 3.5 จะเท่ากับ ความเข้มข้นของกรดแอสซิดิกที่ไม่แตกตัว 79-158 มิลลิโมลาร์ ทำให้อัตราการตายที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้น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

2.5.2 กลไกการยับยั้งของกรดอินทรีย์

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

กลไกการยับยั้งของกรดอินทรีย์มีผลต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ในโปรคาริโอต หรือไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและการเกิดเมตาบอลิซึมต่างๆอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเติมกรดอินทรีย์ลงในอาหาร (รูปที่ 2.1) ส่วนที่ไม่แตกตัวของกรดสามารถแทรกผ่านชั้นไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ง่ายมาก เนื่องจากกรดอินทรีย์เป็นกรดไขมันชนิดหนึ่งจึงสามารถละลายใน

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



รูปที่ 2.1 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์

ที่มา : Adams และ Moss. 1995

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของกรดอินทรีย์

2.5.3.1 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกรด

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

นอกจากนี้ความสามารถในการละลายน้ำของกรดอินทรีย์ก็มีผลสำคัญต่อการดูดซับอินทรีย์ กลีโกลของกรดอินทรีย์ เช่น อะซีเตต โพรพิโอเนต แลคเตต และซิเตตสามารถละลายในน้ำได้ดี ในขณะที่เบนโซเอต ซอร์เบต และพาราเบนละลายในน้ำได้น้อย ดังนั้นในสารละลายที่มีความเข้มข้นเดียวกัน กรดอินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีประสิทธิภาพต่างกัน การศึกษาประสิทธิภาพในการดูดซับอินทรีย์ของกรดเหล่านี้ส่วนมากได้มีการศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นในหน่วยร้อยละ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการดูดซับอินทรีย์จะแปรผันตามมวลโมเลกุล ดังนั้นที่ความเข้มข้นเดียวกันจะมีจำนวนโมเลกุลต่างกันและทำให้มีโมเลกุลที่ไม่แตกตัวเท่ากับไอออนที่แตกตัว เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์จะให้ผลที่ดีกว่า คุณสมบัติการเป็นโมเลกุลไม่มีขั้วของกรดอินทรีย์ทำให้มีประสิทธิภาพต่างกันด้วย กรดแอซิดิกและกรดโพรพิโอนิกมีโมเลกุลไม่มีขั้วมากกว่ากรดแลคติกและมีประสิทธิภาพในการดูดซับอินทรีย์มากกว่ากรดแลคติก ซิเตรตถูกขนส่งผ่านเยื่อหุ้มโดยกลไกการขนส่งแบบจำเพาะ (citrate permease) และมีประสิทธิภาพต่ำกว่ากรดที่ไม่มีขั้ว จุลินทรีย์จำนวนมากสามารถใช้ไอออนของกรดอ่อน เช่น อะซีเตต แลคเตต และซิเตตได้ การใช้เกลือของกรดอินทรีย์เหล่านี้อาจมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลดลงในที่พีเอชสูงขึ้น และเมื่อมีการใช้กรดร่วมกันในการยับยั้งพบว่ากรดบางชนิดแสดงผลเสริมฤทธิ์กันอย่างเหมาะสม (เช่น กรดแอซิดิกและแลคติก กรดโพรพิโอนิกและซอร์บิก) หรือการใช้กรดรวมกับการถนอมอาหารอื่นๆ (เช่น กรดเบนโซอิกกับไนซิน กรดโพรพิโอนิก กรดแอซิดิก หรือกรดแลคติกกับไนซิน หรือเบนโซเอตกับคาร์บอนไดออกไซด์) (Ray, 1996)

ตารางที่ 2.4 ผลของพีเอชต่อปริมาณไอออนที่ได้จากการแตกตัวของกรดอินทรีย์

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

ที่มา : Ray, 1996

2.5.3.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอาหาร

โดยทั่วไปอาหารต่าง ๆ มีค่าพีเอชหลากหลายตั้งแต่ช่วงที่เป็นกรด (พีเอช 3.0 เช่น น้ำมะนาว) ไปจนถึงช่วงที่เป็นด่าง (พีเอช 9.0 เช่น ไข่ขาว) พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีผลในการต้านจุลินทรีย์ ซึ่งในอาหารที่มีพีเอชต่ำกรดจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าในอาหารที่มีพีเอชสูงกว่าและที่พีเอชต่ำทำให้การรักษาค่าพีเอชของอาหารให้คงที่มีประสิทธิภาพลดลงด้วย แต่สารอาหารที่มีจะช่วยให้อุณหภูมิที่บาดเจ็บจากความเครียดของกรดซ่อมแซมตัวเองได้ง่ายขึ้น (Ray, 1996)

ตารางที่ 2.5 ช่วงพีเอชโดยประมาณของอาหารต่างๆ

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

ที่มา : Lund และ Eklund, 2000

2.5.3.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหารสามารถเจริญในอาหารที่มีพีเอชต่ำได้อย่างจำกัด เนื่องจากค่าพีเอชต่ำสุดที่เจริญได้ของจุลินทรีย์ต่างๆแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.6) โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบจะไวต่อกรดมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ยีสต์และเชื้อราไวต่อกรดน้อยที่สุด แบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญจะต้านทานต่อพีเอชต่ำๆได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน น่าจะเป็นเพราะว่าแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนนั้นสามารถต้านทานต่อค่าพีเอชภายนอกเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดีเช่นเดียวกับการต้านทานต่อพีเอชภายในเซลล์ที่ต่ำลงเล็กน้อย และเนื่องจากเหตุนี้ทำให้เชื้อราและยีสต์สามารถต้านทานต่อสภาพกรดได้

คุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ในอาหารเพิ่มขึ้นได้ โดยการใช้ความร้อน การลดค่า a_w การเติมสารกันเสียตัวอื่นๆลงในอาหาร และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

ประสิทธิภาพในการยับยั้งของกรดอินทรีย์จะลดลงเมื่อมีจุลินทรีย์จำนวนมาก และมีจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดซึ่งมีผลต่อการทำงานของกรด เช่น ถ้ามีสปีชีส์หนึ่งต้านทานต่อแลกเตดจะทำให้ความเข้มข้นของกรดมีผลในการยับยั้งลดลงและทำให้สปีชีส์อื่นๆที่ไวต่อแลกเตดกลายเป็นต้านทานได้ จุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหารบางตัว เช่น *Salmonella* บางสายพันธุ์อาจจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่ช่วยให้เจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นกรดสูง (หรือสภาวะที่มีพีเอชต่ำ) ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆในสปีชีส์เดียวกัน การทนต่อกรดนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (stress protein) จำนวนมากออกมา จุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีความไวต่อกรดอินทรีย์ต่างกัน ยีสต์และราบางส่วนไวต่อกรดโปรพิโอนิกและกรดซอร์บิก ขณะที่แบคทีเรียไวต่อกรดแอซิติกมาก ในสภาวะที่มีพีเอชต่ำจะทำให้สปอร์ของแบคทีเรียไวต่อความร้อนที่ใช้ และไม่มีการงอกและการเจริญของสปอร์ที่ค่า a_w ต่ำสุดของการเจริญ (minimal a_w) (Ray, 1996)

2.5.3.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีที่ใช้

ปัจจัยนี้ประกอบด้วยวิธีที่ใช้ ชนิดของกรด ความเข้มข้น อุณหภูมิของกรด และเวลาที่ผิวหน้าเนื้อสัมผัสกับกรด ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ที่นำมาใช้ในการล้างหรือใช้เป็นสารละลายสำหรับจุ่ม การฉีดพ่นเนื้อวุ้นด้วยกรดที่อุณหภูมิต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลของการใช้กรดที่อุณหภูมิสูงกว่าพบว่ากรดที่อุณหภูมิสูงมีแนวโน้มในการลดจำนวนจุลินทรีย์ได้ดีกว่า ซึ่งอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่มีประสิทธิภาพมาก (Ray, 1996)

2.5.4 การประยุกต์ใช้

การนำกรดอินทรีย์มาใช้กับอาหารเพื่อลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์นั้น อาจจะใช้วิธีการฉีดพ่นบนผิวหน้าหรือการจุ่มลงในสารละลายซึ่งส่วนใหญ่การฉีดพ่นจะทำด้วยมือหรืออาจใช้เครื่องมือที่มีหัวฉีดอยู่กับที่หรือเคลื่อนที่ไปตามเนื้อ การจุ่มเป็นเทคนิคที่ใช้กับชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็ก เช่น ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในโรงฆ่าสัตว์ และขั้นตอนการคัดในคอนแรก โดยทั่วไปกรดอินทรีย์จะอยู่

บริเวณผิวหนังและสามารถเข้าไปภายในส่วนของเนื้อเยื่อได้โดยเข้าทางเส้นเลือดหรือท่อน้ำดีในชั้นสารอินทรีย์ที่อยู่บนผิวหนังเนื้อจะถูกปล่อยลงไปถึงน้ำที่ขุ่นและจับกับไอออนลบของกรด ทำให้ความเข้มข้นของกรดลดลง ด้วยเหตุนี้ทำให้เทคนิคการจุ่มเหมาะสมสำหรับการทดลองมากกว่าการใช้ในทางการค้า (Zeothen และ Bøgh - Sørensen. 2003)

ตารางที่ 2.6 ช่วงพีเอชในการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญในอาหาร

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

ที่มา : Lund และ Eklund. 2000

ตารางที่ 2.7 ผลของการใช้กรดแลกติกและกรดแอซิดิกต่อคุณภาพของเนื้อ

ชนิดของกรด	วิธีการใช้	ความเข้มข้น (ร้อยละ)	ตัวอย่างเนื้อ	การเปลี่ยนแปลง
กรดแอซิดิก	ฉีดพ่น	2	เนื้อวัว	สีเปลี่ยน
กรดแลกติก	ฉีดพ่น	1	เนื้อวัว	สีเปลี่ยน
กรดแลกติก	ฉีดพ่น	1.25	เนื้อลูกวัว	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแลกติก	ฉีดพ่น	1	เนื้อหมู	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแลกติก	ฉีดพ่น	2.4	เนื้อหมู	สีเปลี่ยน
กรดแอซิดิก	ฉีดพ่น	2	เนื้อสัน	สีเปลี่ยน
กรดแอซิดิก กรดแลกติก	ฉีดพ่น	1	สเต็กเนื้อวัว	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแลกติก+กรดแอซิดิก				
กรดแอซิดิก กรดแลกติก	ฉีดพ่น	1	เนื้อวัวแผ่น	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแลกติก+กรดแอซิดิก				
กรดแลกติก+กรดแอซิดิก	ฉีดพ่น	2	เนื้อวัวแผ่น	ไม่มีการเปลี่ยนแปลง
กรดแอซิดิก	จุ่ม	1.2	เนื้อวัวก้อน	รสชาติและสีเปลี่ยน
กรดแอซิดิก กรดแลกติก	จุ่ม	1	หมูสับ	มีน้ำไหลซึมออกมา
กรดแลกติก+กรดแอซิดิก				และสีเปลี่ยน
กรดแลกติก+กรดแอซิดิก	จุ่ม	2	สเต็กเนื้อวัว	สีเปลี่ยน
กรดแลกติก	จุ่ม	3	เนื้อหมู	สีเปลี่ยน

ที่มา : Zeothen และ Bøgh – Sørensen, 2003

2.5.5 ผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสและคุณภาพการสัมผัสอื่นๆของเนื้อ

คุณภาพการสัมผัสของเนื้อที่เป็นผลมาจากกรดแลกติกและกรดแอซิดิก สามารถแบ่งอย่างง่ายได้เป็น 3 กลุ่มคือ สี กลิ่น หรือรสชาติ การสูญเสียน้ำเกิดจากการใช้กรดแลกติกและกรดแอซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 1-3 ในเนื้อสัตว์แต่ไม่มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของเนื้อที่ถูกตัด การเปลี่ยนสีของซากสัตว์สามารถสังเกตได้ซึ่งจะคืนสู่สภาพเดิมมากที่สุดภายใน 24 ชั่วโมง การรักษาเนื้อโดยจุ่มลงในสารละลายกรดอินทรีย์โดยตรงและไม่มีการฉีดพ่นมักจะทำให้สีและกลิ่นของเนื้อเปลี่ยนไป

การที่ค่าพีเอชภายในเซลล์ต่ำกว่าภายนอกเซลล์อาจเป็นผลให้มีไมโอไฟบริลสั้นลง ทำให้มีการสูญเสียของเหลวภายในเซลล์ซึ่งหมายถึงมีการสูญเสียน้ำเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อที่ตัดออกมาจากเนื้อที่สัมผัสกับกรด แสดงให้เห็นว่าไม่มีการละลายเพิ่มขึ้นและไม่มีการ

สูญเสียในขณะปรุงอาหาร (cook loss) หลังจากการเก็บแช่แข็งภายใต้สุญญากาศ การเสียด่างของโปรตีนไมโอไฟบริลาร์อาจจะเกิดขึ้นได้ แต่ไม่เพิ่มความแข็งแรงของแรงเฉือนที่พบ

2.5.6 การใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับวิธีการถนอมอาหารอื่นๆ

การเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารขึ้นอยู่กับปัจจัยสองทาง ได้แก่ ปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน ปัจจัยภายนอก ได้แก่ ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ บรรยากาศ และปัจจัยภายใน ได้แก่ คุณสมบัติของอาหารที่ใช้ เช่น ค่าพีเอช ค่า a_w ของอาหาร และปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวกับการแปรรูป (เช่น ในไตรต์ ความร้อน) หรือปัจจัยที่เกี่ยวกับคุณสมบัติของเชื้อประจำถิ่น สำหรับการยับยั้งหรือลดการเจริญของจุลินทรีย์อย่างน้อยที่สุดต้องทำให้ปัจจัยบางอย่างเหล่านี้ไม่เหมาะสม หรือทำให้แบคทีเรียตายได้ สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไป การใช้เพียงวิธีเดียวในการยับยั้งหรือลดการเจริญของจุลินทรีย์นั้นไม่เพียงพอ เนื่องจากผลในด้านของคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารและการจำกัดการใช้ในอนาคต การถนอมอาหารโดยการลดปริมาณน้ำเพียงอย่างเดียว (โดยการทำให้แห้งหรือใส่เกลือ) มีผลให้จำนวนจุลินทรีย์ในอาหารคงที่ แต่ในกรณีของอาหารพร้อมรับประทานมีเพียง 2-3 อย่างเท่านั้นที่สามารถยับยั้งได้ ดังนั้นการใช้หลายๆวิธีร่วมกันมีความเหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่า ซึ่งอาจจะมีการใช้กรดอินทรีย์ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ หรือการใช้กรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่อุณหภูมิสูง หรือการใช้กรดอินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกัน เป็นต้น (Zeothen และ Bøgh - Sørensen, 2003)

2.6 การใช้กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร

การใช้วัตถุกันเสียเป็นวัตถุเจือปนอาหารเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ เนื่องจากการเน่าเสียของอาหารส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง มีความชื้นและพีเอชพอเหมาะ ดังนั้นการใช้วัตถุกันเสียในอาหารจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารเหล่านั้นเพื่อช่วยให้สามารถเก็บอาหารได้นานขึ้น โดยสารที่เป็นวัตถุกันเสียจะไปมีผลต่อการสร้างสารพันธุกรรม การสังเคราะห์โปรตีน การทำงานของเอนไซม์ เยื่อหุ้มเซลล์ผนังเซลล์ และการขนส่งสารอาหาร (Lück และ Jager, 1995)

สำหรับวัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ กรดเบนโซอิก (benzoic acid) เกลือเบนโซเอต (benzoates) กรดซอร์บิก (sorbic acid) เกลือซอร์เบต (sorbates) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) เกลือโพรพิโอเนต (propionates) กรดอะซิติก (acetic acid) เกลืออะซิเตต (acetates) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (sulfur dioxide) เกลือซัลไฟต์ (sulfites) เกลือไนเตรตและไนไตรต์ (nitrate และ nitrite) เอสเทอร์ของพารา-ไฮดรอกซีเบนโซอิกแอซิด (esters of *p*-hydroxy benzoic acid) สารปฏิชีวนะ (antibiotics) และวัตถุกันเสียจากสารธรรมชาติ เป็นต้น (สิวพร สิ่วเวช, 2546)

กรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ที่นิยมใช้ในอาหาร ได้แก่ กรดแอซิดิกและอะซิเตต กรดแลกติกและแลกเตต กรดซอร์บิกและซอร์เบต เป็นต้น

2.6.1 กรดแอซิดิกและเกลืออะซิเตต

กรดแอซิดิก (CH_3COOH , $\text{pK}_a = 4.75$ น้ำหนักโมเลกุล 60.05) เป็นองค์ประกอบแรกของน้ำส้มสายชู และเกลือต่างๆของกรดแอซิดิก เช่น โซเดียม โพแทสเซียม และแคลเซียม โซเดียม ไดอะซิเตตและแคลเซียมไดอะซิเตต เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารที่เก่าแก่ที่สุดตัวหนึ่งและมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวาง กรดแอซิดิกมีประสิทธิภาพในการต้านยีสต์และแบคทีเรียมากกว่าเชื้อรา (Ingram และคณะ. 1956) มีแบคทีเรียบางส่วนที่สามารถทนต่อกรดแอซิดิกได้ ได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซิดิก แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก และแบคทีเรียที่ผลิตกรดบิวทิริก (Baid-Parker. 1980 ; Doores. 1983) แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งโดยกรดแอซิดิก ประกอบด้วย *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Campylobacter jejuni* และ *Pseudomonas* spp. ราและยีสต์สามารถต้านทานต่อกรดแอซิดิกได้มากกว่าแบคทีเรีย แต่ก็มีราและยีสต์บางส่วนที่ไวต่อกรดแอซิดิก เช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* spp. และ *Saccharomyces* บางสายพันธุ์ (Davidson. 2001)

กิจกรรมของกรดแอซิดิกขึ้นอยู่กับอาหาร สภาพแวดล้อม และชนิดของจุลินทรีย์ Woolford (1975) ได้ศึกษาบทบาทในการต้านจุลินทรีย์ของกรดแอซิดิกที่พีเอช 4, 5 และ 6 ในสภาพที่มีพีเอช 6 พบว่า *Bacillus*, *Clostridium* และแบคทีเรียแกรมลบ ถูกยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรียกรดแลกติก ยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เมื่อพีเอชลดลงถึงพีเอช 5.0 แบคทีเรียแกรมบวกถูกยับยั้งได้ดีกว่าแบคทีเรียกรดแลกติก ยีสต์ และเชื้อรา และที่พีเอช 4.0 พบว่าความเข้มข้นของกรดแอซิดิกที่ต้องใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง และมีนักวิจัยบางท่านได้ใช้ความเข้มข้นของกรดแอซิดิกที่ยับยั้งแบคทีเรียได้มาศึกษาการต้านจุลินทรีย์ต่างๆ พบว่า *Staphylococcus aureus* ถูกยับยั้งที่พีเอช 5.0 เชื้อ *B. cereus* และ *Salmonella* ถูกยับยั้งที่พีเอช 4.9 เชื้อ *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* ถูกยับยั้งที่พีเอช 4.1 และ 3.9 ตามลำดับ และมีผู้รายงานว่ากรดแอซิดิกยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ร้อยละ 90 และ 99 ภายในเวลา 12 ชั่วโมง ที่พีเอช 5.2 และ 5.0 ตามลำดับ และยังมีผู้รายงานว่ากรดแอซิดิกความเข้มข้นร้อยละ 1 สามารถยับยั้ง *Pseudomonas aeruginosa* ได้มากกว่าร้อยละ 99.9 ภายใน 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่ากรดแอซิดิกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดชนิดหนึ่งที่สามารถต้านการเจริญของ *Yersinia enterocolitica*

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

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

เกลือแคลเซียมและโซเดียมอะซิเตตคาดว่ามิกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับกรดแอซิดที่พีเอชเดียวกัน และมีการนำมาใช้ในอาหารต่างๆ ได้แก่ ไขมันพืชกรอบ เนยแข็ง ไขมันและน้ำมัน เจลาติน ลูกอม แยมและเยลลี่ เนื้อสัตว์ อาหารขบเคี้ยว ซุปผสม และซอสหวาน (Davidson. 2001) โซเดียมไดอะซิเตต (pKa เท่ากับ 4.75) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-2.0 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในเนยแข็ง นอกจากนี้พบว่าโซเดียมไดอะซิเตตยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง rope-forming bacteria (*Bacillus subtilis*) ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ และยังพบว่าโซเดียมไดอะซิเตตเพิ่มความเข้มข้นร้อยละ 0.1-0.5 สามารถยับยั้ง *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Penicillium expansum* และ *Mucor pusillus* ที่พีเอช 3.5-4.5 ได้ และที่ความเข้มข้น 32 มิลลิโมลาร์ (ร้อยละ 0.45) ในอาหารเหลว Brain Heart Infusion (BHI) (พีเอช 5.4) สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis

และ *Shewanella putrefaciens* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fragi*, *Enterococcus faecalis* หรือ *Lactobacillus fermentis* หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้สารละลายโซเดียมไดอะซีเตตความเข้มข้น 21-28 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อประจำถิ่นในเนื้อวัวดิบ หลังจากเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 8 วัน (Davidson และ Juneja. 1990)

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

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

2.6.2 กรดแลคติกและเกลือแลคเตต

กรดแลคติก ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$, $\text{pKa} = 3.79$ น้ำหนักโมเลกุล 90.08) ที่ได้จากธรรมชาติถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกในระหว่างการหมักอาหาร มีการใช้กรดแลคติกและ

เกลือของกรดแลกติกเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารมานานแล้ว โดยใช้เพื่อควบคุมฟิเชซ และกลีนิรส กรดแลกติกสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Yersinia enterocolitica* และแบคทีเรียสร้างสปอร์ มีรายงานวิจัยมากมายที่เกี่ยวกับการใช้กรดแลกติกในการทำมาสะอาดเนื้อสัตว์และสัตว์ปีก เพื่อลดหรือกำจัดเชื้อก่อโรค กรณีส่วนมากจะใช้กรดแลกติกความเข้มข้นร้อยละ 0.2-2.5 ในการฉีดพ่นหรือจุ่ม เพื่อลดการปนเปื้อนบนผิวหนังเนื้อวัว เนื้อหมู และเนื้อสัตว์ปีก และยังช่วยยืดอายุการเก็บได้ด้วย

2.6.2.1 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์

การศึกษาการทำงานแบบจำเพาะของแลกเตตต่อเซลล์จุลินทรีย์ถูกจำกัด มีเพียง 2 กลไกเท่านั้นที่เป็นไปได้และได้เคยมีผู้เสนอไว้คือ 1) ความสามารถในการละลายในไขมันของกรดอ่อน (ได้แก่ กรดแลกติก) ในการผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปที่ไม่แตกตัวแล้วไปแตกตัวภายในเซลล์และทำให้ภายในเซลล์มีสภาพเป็นกรด และ 2) ความสามารถจำเพาะของโซเดียมแลกเตตในการลดค่า a_w (Shelef, 1994)

1. การลดลงของฟิเชซภายในเซลล์

ในการผ่านเข้าเซลล์ของกรด โมเลกุลของกรดที่ละลายได้ไขมันสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างอิสระในรูปโปรตอน ตัวพาที่มีพลังงาน (energy-linked carriers) และศักย์ภาพของเยื่อหุ้มเซลล์อาจจะเกี่ยวข้องในการรับโมเลกุลของกรดเข้าสู่เซลล์ ถ้าฟิเชซภายนอกเซลล์ต่ำกว่าฟิเชซภายในเซลล์ กรดจะแตกตัวและปล่อยโปรตอนออกมาทำให้ไซโตพลาสซึมมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปเซลล์พยายามที่จะรักษาค่าฟิเชซภายในเซลล์ให้คงที่โดยการกำจัดโปรตอนออกไป และเมื่อพลังงานปริมาณมากของเซลล์ถูกใช้ไปเพื่อรักษาฟิเชซภายในเซลล์ให้คงที่ จึงทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ลดลง การที่โปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเข้าสู่เซลล์ทำให้เกิดความแตกต่างของโปรตอน (proton gradient) ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของเซลล์ เช่น การขนส่งกรดอะมิโน กลไกนี้ได้รับการสนับสนุนจากผลการทดลองที่พบว่าเมื่อฟิเชซลดลงหรือในสภาพที่มีกรดอินทรีย์ ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นมากกว่ากิจกรรมต้านจุลินทรีย์ที่ค่าฟิเชซใกล้เคียงเป็นกลาง โดยในสภาพที่มีกรดอินทรีย์จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์มากกว่ากรดอินทรีย์ (Shelef, 1994)

กรดแลกติกไม่สามารถออกฤทธิ์ต่อเซลล์จุลินทรีย์ได้โดยใช้กลไกเดียวกับกรดชนิดอื่นที่ได้จากการหมัก เช่น กรดแอซิดิก และโพรพิโอนิก และไม่กระทำตามที่ได้อาเดหมายจากพื้นฐานของค่าคงที่การแตกตัว (dissociation constant) *L. monocytogenes* ไวต่อกรดแลกติกและเกลือของกรดแลกติก จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าฟิเชซภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ในสภาพที่มีกรดแลกติกและกรดอินทรีย์อื่นๆ ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์รักษาความแตกต่างของฟิเชซที่ประมาณ 1.0 ถึง 1.5 หน่วยของฟิเชซ ถึงระดับฟิเชซ 3.5-6.5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อในการตอบสนองต่อกรดแลกติกภายนอกเซลล์ เซลล์จะยังคงรักษาระดับฟิเชซภายในเซลล์ให้อยู่ใกล้ 5.0 แม้ว่าระดับฟิเชซภายนอกเซลล์ลดลงถึง 3.5 ข้อเท็จจริงนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าการยับยั้ง *L. monocytogenes* ไม่

เกี่ยวข้องกับพีเอชภายในเซลล์ที่ลดลง กลีโธของกรดอินทรีย์ เช่น โซเดียมแลคเตตและโพแทสเซียมแลคเตตแตกตัวได้หมดในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายและที่พีเอชของผลิตภัณฑ์เนื้อที่ไม่ผ่านการหมักซึ่งปกติเท่ากับ 6.0-6.5 ความเข้มข้นของแลคเตตในรูปที่ไม่แตกตัวที่เติมลงไปต่ำ (Shelof. 1994)

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยกลีโธแลคเตตเกี่ยวข้องกับโปรตอนและแอนไอออน (Eklund. 1983) มีรายงานว่ากลีโธแลคเตตไอออนสามารถยับยั้งเชื้อ *C. botulinum* และ *Listeria* ได้ และแลคซีมแลคเตตช่วยเพิ่มกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของแอนไอออน มีผู้เสนอว่าการสะสมไอออนลบเป็นสาเหตุที่ทำให้กรดที่เกิดขึ้นจากการหมักเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ในสภาพที่มีค่าพีเอชต่ำ แต่ความสัมพันธ์ระหว่างความแตกต่างของพีเอชด้านนอกและด้านในเยื่อหุ้มเซลล์ การสะสมแอนไอออนและความเป็นพิษของกรดได้รับความสนใจน้อยและยังไม่มีการศึกษาถึงผลของแลคเตตแอนไอออนที่พีเอชใกล้เคียงสภาพเป็นกลาง (Shelof. 1994)

2. ผลของโซเดียมแลคเตตต่อค่า a_w

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

ตารางที่ 2.8 การใช้แลคเตตเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

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

ที่มา : Shelef. 1994

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

จากตาราง 2.9 และ 2.10 อาจจะสรุปได้ว่าถึงแม้ว่าโซเดียมแลกเตตจะลดค่า a_w ในเนื้อให้ต่ำลง แต่มีผลเล็กน้อยและไม่เพียงพอที่จะใช้อธิบายผลในการต้านจุลินทรีย์อย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 2.9 ผลของโซเดียมแลกเตตต่อค่า a_w และการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ผลิตภัณฑ์	การเก็บรักษา (วัน/องศา เซลเซียส)	ความเข้มข้นของ โซเดียมแลกเตต/ โซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)	ค่า a_w ของ ผลิตภัณฑ์ (ไม่เติมแลกเตต)	ค่า a_w วิกฤต	จุลินทรีย์
ตับหมู	42/6	2/2	0.959	0.940	จุลินทรีย์ทั้งหมด
แฮมสุก	60/5	1/2.2	0.970	0.965	จุลินทรีย์ที่ใช้ อากาศทั้งหมด
เนื้อวัวบด เนื้อ วัวสุก	7/20	4/0	0.986	0.964	<i>L. monocytogenes</i>
ไส้กรอกตับหมู	50/5	4/2 2/4 3/3	0.965	0.955 0.945 0.951	<i>L. monocytogenes</i>

ที่มา : Shelef. 1994

ตารางที่ 2.10 ผลของโซเดียมคลอไรด์หรือโซเดียมแลกเตตต่อค่า a_w ของเนื้อวัวบดสุก ซึ่งมีความชื้นร้อยละ 55

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

a_w ของชุดควบคุม เท่ากับ 0.986

ที่มา : Shelef. 1994

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

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

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

3. ผลกระทบด้านอื่นๆ

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

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

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

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

^b สายพันธุ์ Scott A และ Brie 1 ตามลำดับ

ที่มา : Shelef, 1994

เป็นที่ทราบกันดีว่ากรดไฮดรอกซีคาร์บอกซิลิก (กรดซิตริก กรดแลกติก กรดมาลิก และ กรดทาร์ทาริก) มีคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาคีเลชัน แลคเตตเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคที่นำมาใช้ในอาหารมากที่สุดเช่นเดียวกับซีเตรต โพโรฟอสเฟต และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ตัวอย่างเช่น ค่าคงที่ความเสถียรของ Fe (III) ในการทำปฏิกิริยากับกรดแลกติกคือ 6.4 ค่านี้ไม่สามารถทำนายประสิทธิภาพในการสร้างสารเชิงซ้อน iron-lactate ในอาหาร เช่น เนื้อ ซึ่งมีส่วนประกอบที่ขัดขวางจำนวนมาก และมีค่าต่ำกว่าการทำปฏิกิริยากับซีเตรต (11.85) การเกิดคีเลชันของเหล็กที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อสัตว์อาจทำให้แลคเตตยับยั้ง *Listeria* ได้ ข้อเสนอแนะนี้ได้รับการสนับสนุนโดยการพบว่าแลคเตตทำให้ไขมันและน้ำมันคงตัว น่าจะมีสาเหตุมาจากการ

เกิดกิเลสของเหล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าทำให้ความร้อนช่วยส่งเสริมการยับยั้ง *Listeria* โดยแลกเตตที่เติมในเนื้อสัตว์ซึ่งทำให้ *Listeria* ถูกยับยั้งได้มากขึ้น การเปรียบเทียบผลการต้าน *Listeria* ของโซเดียมแลกเตตในไส้กรอกคัปปูพบว่าความยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ในไส้กรอกที่ฆ่าเชื้อโดยการสเตอริไลส์ (15 นาที 121 องศาเซลเซียส) หลังจากการเติมโซเดียมแลกเตตดีกว่าในผลิตภัณฑ์ที่ให้ความร้อนโดยการแช่ใน water bath เพื่อให้อุณหภูมิภายในเนื้อสัตว์เท่ากับ 70 องศาเซลเซียส สภาวะในการแปรรูปก่อนหน้านี้จะช่วยทำให้ polyvalent cations เกิดกิเลสเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของ *Listeria* เป็นไปได้ว่าผลของแลกเตตต่อ *C. botulinum* ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดกิเลสของ polyvalent cations ด้วย เช่น เหล็ก (Shelef. 1994)

จากข้อสังเกตเกี่ยวกับการยับยั้ง *Listeria* ในเนื้อสัตว์เปรียบเทียบกับในอาหารเหลว จะเห็นได้ว่าถ้าหากปริมาณความเข้มข้นของกิจกรรมการยับยั้งจะเพิ่มขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสามารถหาได้จากความเข้มข้นของแลกเตตในน้ำ เพราะว่าการเติมโซเดียมแลกเตตความเข้มข้นร้อยละ 4 ในเนื้อสัตว์ที่มีความชื้นร้อยละ 55 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ดังนั้นความเข้มข้นของแลกเตตในน้ำที่อยู่ในเนื้อสัตว์จึงมากกว่าร้อยละ 7 ของแลกเตตทั้งหมดหรือแลกเตตส่วนใหญ่ที่อยู่ในน้ำ การอธิบายนี้สนับสนุนว่าความเข้มข้นของเกลือแลกเตตที่ใช้ในการยับยั้งในอาหารเหลวและในเนื้อสัตว์ต่างกัน (Shelef. 1994)

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

2.6.3 กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบต

กรดซอร์บิก ($\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CHCOOH}$, $\text{pK}_a = 4.75$) เป็นกรดที่ไม่แตกตัวและมักใช้ในรูปแบบของเกลือโซเดียมโพแทสเซียม หรือแคลเซียม ซึ่งในรูปแบบของเกลือโพแทสเซียมละลายในน้ำได้ดี (58.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้นของกรดซอร์บิกที่ใช้อยู่ระหว่าง 500-2000 ppm (ร้อยละ 0.05-0.2) ในอาหารต่างๆ ได้แก่ เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์บางชนิด ผักและผลไม้แปรรูป ขนมหวาน ลูกกวาด มายองเนส น้ำสลัด และมัสตาร์ด (Ray. 1996)

2.6.3.1 การต้านจุลินทรีย์

ได้มีรายงานว่าซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียจำนวนมากได้ ซอร์เบตสามารถต้านแบคทีเรียได้ดี อย่างไรก็ตามกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของซอร์เบตยังไม่เป็นที่เข้าใจดีเท่ากับการยับยั้งยีสต์และรา นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ากรดซอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ

ละ 0.1 ขยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่ผิวหน้าในระหว่างการหมักแดงกวาดอง โดยไม่มีการรบกวนการหมักกรดที่ต้องการ Costilow และคณะ (1955) ได้รายงานผลการทดลองที่เหมือนกันของทั้งยีสต์ที่สร้างฟิล์มและยีสต์ที่ผิวหน้า อย่างไรก็ตามมีผู้พบว่ากรดซอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ไม่เพียงแต่ยับยั้งการเจริญของ fermentative yeasts ในการหมักแดงกวาดองได้เท่านั้น แต่ยังยับยั้งการเจริญและการผลิตกรดโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดได้ และยังทำให้สีของแดงกวาดองที่ได้และคุณภาพการเก็บไม่ดี นอกจากนี้มีผู้วิจัยได้รายงานว่าการยับยั้งของกรดซอร์บิกต่อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกในการหมักแดงกวาดองขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำเกลือ ถ้าความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ยิ่งสูงมากขึ้นก็จะยับยั้งการหมักกรดแลกติกได้ดีมากขึ้น ผลการยับยั้งของกรดซอร์บิกต่อยีสต์ได้มีรายงานแล้วโดยนักวิจัยท่านอื่นจำนวนมาก

สำหรับประโยชน์ของกรดซอร์บิกที่ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อราในเนยแข็งได้มีการทดลองแล้วโดยนักวิจัยหลายท่าน และผลการยับยั้งเชื้อราโดยกรดซอร์บิกได้เคยมีรายงานแล้วในอาหารอื่นๆ และอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ (Sofos และ Busta. 1981)

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

จากการที่ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญ ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของซอร์เบตที่เหมาะสมซึ่งขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พิเอชของผลิตภัณฑ์ ส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ วัตถุเจือปนอาหารอื่นๆ ที่มีในผลิตภัณฑ์ การปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์ การแปรรูป การบรรจุ อุณหภูมิในการเก็บรักษา ระยะเวลาในการเก็บรักษา และสุลลัษณะ (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.2 ข้อดีของซอร์เบต

งานวิจัยจำนวนมากได้ทำการทดลองเกี่ยวกับความเป็นพิษ เมแทบอลิซึม ความคงตัว วิธีการตรวจวัด และความมีประสิทธิภาพของซอร์เบตในการเป็นวัตถุกันเสีย ในช่วงแรกที่มีการนำซอร์เบตมาใช้ ซอร์เบตถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสารที่ไม่เป็นพิษ มีรายงานว่าซอร์เบตสามารถถูกเมแทบอลิซึมโดยสิ่งมีชีวิตเหมือนกับการเมแทบอลิซึมกรดไขมันที่พบในธรรมชาติ ยังมีรายงานอีกว่าซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากกว่าเบนโซเอต และมีความเป็นพิษน้อยกว่าเบนโซเอต เบนโซเอตถูก

เมแทบอลิซึมต่างจากซอร์เบต เบนโซเอตต้องถูกกำจัดพิษในตับก่อนที่จะถูกขับถ่ายออกมา บางคนถือว่าซอร์เบตเป็นอาหารที่ใช้ถนอมอาหารอื่นๆ ค่า LD_{50} ของกรดซอร์บิกคือประมาณ 10 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สำหรับค่า LD_{50} ของเกลือ (NaCl) คือ 5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในบรรดาวัตถุกันเสียในอาหาร องค์การอนามัยโลกได้ระบุว่าซอร์เบตเป็นสารที่รับเข้ามาในแต่ละวันสูงที่สุด ซึ่งเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (Sofos และ Busta, 1981) ซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากกว่าเบนโซเอตอย่างน้อย 3 เท่าในการเป็นวัตถุกันเสียในเนยแข็ง ปลา และผลิตภัณฑ์พวกขนมอบ การกระจายของไขมันต่อน้ำของเกลือโพธิโอเนตดีกว่าของซอร์เบต แต่ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าโพธิโอเนต ซอร์เบตมีประสิทธิภาพดีกว่าเกลือโพธิโอเนตประมาณ 4 เท่าในการถนอมรักษานเนยแข็ง ปลา และผลิตภัณฑ์ขนมอบ เชื้อ *S. Typhimurium* ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตที่เติมลงในเนยแข็งแช่เย็นได้เร็วกว่าโพธิโอเนตมาก (Sofos และ Busta, 1981)

2.6.3.3 ผลของพีเอช

ประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของกรดไขมันที่มีอะตอมของคาร์บอน 1-14 อะตอมเกี่ยวข้องกับส่วนที่ไม่แตกตัวของกรด ไม่ใช่ส่วนที่เป็นไอออนลบของกรด ซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากที่สุดที่ค่าพีเอชใกล้เคียงกับค่าคงที่ในการแตกตัวของกรด (pK_a) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.75 ที่ค่าพีเอชนี้ร้อยละ 50 ของปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวซึ่งมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 2.12) ดังนั้นซอร์เบตจึงมีประสิทธิภาพมากในอาหารที่มีความเป็นกรดที่ระดับพีเอชสูงขึ้นประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบตมีมากกว่าเบนโซเอตและโพธิโอเนต อาจจะอธิบายได้ว่าโดยพิจารณาจากค่า pK_a ซอร์เบตมีพีเอชสูงสุดในการทำงานประมาณ 6.0-6.5 ขณะที่พีเอชสูงสุดในการทำงานของโพธิโอเนตและเบนโซเอตคือ 5.0-5.5 และ 4.0-4.5 ตามลำดับ ซอร์เบตสามารถนำมาใช้แทนเบนโซเอตได้บางส่วนหรือทั้งหมดในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง เพื่อหลีกเลี่ยงกลิ่นรสที่ไม่ดี และเพิ่มความหลากหลายของชนิดจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง (Sofos และ Busta, 1981)

2.6.3.4 การเกิดปฏิกิริยา

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

แอซิดิก อาจจะถูกใช้ร่วมกับซอร์เบตในการทำแต่งกวาแฉ่ำ เพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติก แบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซิดิก ซึ่งจะเจริญได้ดีจากการที่ซอร์เบตยับยั้งการเจริญของยีสต์ ในน้ำแอปเปิ้ลนั้นจะถูกยับยั้งโดยกรดแอสคอร์บิกในผลิตภัณฑ์ ปฏิบัติการเสริมฤทธิ์กันระหว่างซอร์เบตกับอุณหภูมิเคยมีรายงานแล้ว การใช้ความร้อนต่ำ (49 องศาเซลเซียส) และการเติมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.06-0.12 สามารถช่วยเพิ่มอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ผลไม้ได้นานขึ้นอย่างมาก (87) นอกจากนี้ซอร์เบตยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำองุ่นที่อุณหภูมิต่ำ (1.1 องศาเซลเซียส) และได้มีรายงานว่ากรดซอร์บิกยับยั้งกลไกการซ่อมแซมองค์ประกอบภายในของเซลล์ หลังจากการให้ความร้อนต่อ *E. coli* และ *Candida utilis* ดังนั้นซอร์เบตจึงช่วยเสริมผลของความร้อนในการทำลายเซลล์ (Sofos และ Busta, 1981)

ตารางที่ 2.12 ผลของพีเอชต่อการแตกตัวของกรดซอร์บิก

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

ที่มา : Sofos และ Busta, 1981

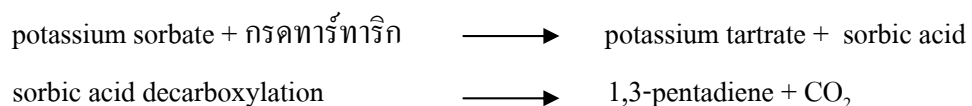
2.6.3.5 อนุพันธ์ต่างๆของกรดซอร์บิก

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

ทำงานในช่วงพีเอชที่กว้าง แต่การที่สารนี้ไม่ละลายในน้ำจึงนำมาใช้ประโยชน์ได้ไม่มาก (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.6 เมแทบอลิซึมและการต้านทาน

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



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

2.6.3.7 การยับยั้งแบบคัดเลือก

มีรายงานวิจัยส่วนหนึ่งได้เสนอว่ากรดซอร์บิกมีความจำเพาะในการต้านจุลินทรีย์ทุกชนิดที่สร้างเอนไซม์อะเซเตเลส ดังนั้นจึงอาจใช้เกลือซอร์เบตเป็นสารคัดเลือกสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สร้างเอนไซม์อะเซเตเลสรวมทั้งเชื้อ clostridia ด้วย อย่างไรก็ตามส่วนใหญ่พบว่าข้อสรุปเหล่านี้ไม่สมบูรณ์ จากผลการวิจัยเป็นที่ชัดเจนว่าพีเอชของอาหารมีผลต่อความสามารถของกรดซอร์บิกในการคัดเลือกจุลินทรีย์ โดยทั่วไปประสิทธิภาพของกรดซอร์บิกในการศึกษาเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ

กับปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของสารประกอบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ พิเศษของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ยังคงมีข้อมูลที่ขัดแย้งกับข้อสรุปข้างบน เช่น นักวิจัยบาง ท่านได้รายงานว่า *S. aureus* บางสายพันธุ์ ที่สร้างเอนไซม์อะคะเตเลสได้ เจริญได้ดีพอๆกับ *lactobacilli* ที่ไม่สร้างเอนไซม์อะคะเตเลสในสภาพที่มีกรดซอร์บิก และยังมีรายงานถึงความแปรผัน ในการทนต่อความเข้มข้นของกรดซอร์บิก ระหว่างสปีชีส์และสายพันธุ์ของ *clostridia* ที่ทดสอบ มี รายงานว่ากรดซอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.10 มีผลทำให้การเจริญและการผลิตกรดโดย *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* (ทั้งสองชนิดเป็นพวกไม่สร้างเอนไซม์ อะคะเตเลส) ลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Pediococcus cerevisiae* สองสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ซึ่งเป็นพวกที่มีการสร้างเอนไซม์อะคะเตเลสได้เล็กน้อย และพบว่าทนต่อกรดซอร์บิกได้เหมือนกับ แบคทีเรียพวกที่ไม่สร้างเอนไซม์อะคะเตเลส และสุดท้ายมีผู้สรุปว่ากรดซอร์บิกไม่สามารถยับยั้งหรือ กระตุ้นการเจริญของ *clostridia* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 6.7 (Sofos และ Busta. 1981)

2.6.3.8 การใช้ซอร์เบตในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ปัจจุบันได้มีการยอมรับให้ใช้ซอร์เบตในผลิตภัณฑ์เนื้อในประเทศสหรัฐอเมริกา เช่น ในการจุ่มไส้ที่ใช้สำหรับทำ stuffed dry sausages ด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้น ร้อยละ 2.5 เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราบนผิวหน้าผลิตภัณฑ์ในระหว่างเวลาที่ทำแห้ง จากการ รายงานที่ผ่านมาที่พบว่าซอร์เบตไม่สามารถยับยั้ง *clostridia* ในอาหารเลี้ยงเชื้อและการที่พบว่า ประสิทธิภาพของซอร์เบตในการต้านแบคทีเรียนั้นเป็นการยับยั้งแบบคัดเลือก จึงเป็นเหตุผลหลักที่ จำกัดการใช้ซอร์เบตในผลิตภัณฑ์เนื้อ การศึกษาโดย Tompkin และคณะ (1974) ซึ่งศึกษาผลของ โพแทสเซียมซอร์เบตต่อ *Clostridium botulinum*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* ในไส้กรอกสุก ซึ่งไม่ได้เติมสารยับยั้งชนิดอื่น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถชะลอการ เจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด *Salmonella* และ *S. aureus* ขณะที่จำนวน *C. perfringens* ลดลงจนถึง ระดับที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ในทั้งชุดควบคุมและตัวอย่างที่เติมซอร์เบต ซอร์เบตยังคงชะลอการ เจริญของ *C. botulinum* และการผลิตสารพิษจากเชื้อนี้ อย่างไรก็ตามสิ่งที่ค้นพบนี้เป็นสิ่งที่ไม่ได้ คาดคิดเนื่องจากรายงานที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ซึ่งได้พบว่ากรดซอร์บิกเป็นสารคัดเลือกเชื้อ *clostridia* ให้เจริญขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Sofos และ Busta. 1981) การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานต่างๆที่ เกี่ยวข้องกับไนไตรต์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในผลิตภัณฑ์ เนื้อปิ้งปรุงรส (cured meat products) และโดยเฉพาะอย่างยิ่งเบคอนทอดกรอบ (crisp-fried bacon) เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการรายงานว่าไนไตรต์เป็นสารก่อมะเร็งโดยตรงในสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามได้มีการ ใช้ไนไตรต์มาหลายปีในการใส่ถนอมเนื้อที่ซึ่งไนไตรต์มีการทำหน้าที่ที่สำคัญมากบางอย่าง ไน ไตรต์ทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน (myoglobin) ทำให้เกิดสีที่ดีของ cured meat ไนไตรต์มี ผลกระทบต่อกลิ่นรสของเนื้อและยังทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) การป้องกัน

การเกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีและที่สำคัญไนไตรต์ช่วยชะลอการผลิตสารพิษโดยเชื้อถ้าเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิไม่เหมาะสม จากความจำเป็นในการที่จะหาวิธีในการที่จะลดการสร้างไนไตรตามีนในผลิตภัณฑ์เนื้อ ขณะที่ยังคงให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยจากสารพิษ (botulinum toxin) ได้อย่างดีเยี่ยม ได้นำไปสู่งานวิจัยที่ได้มีการทดลองนำซอร์เบตมาใช้แทนไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์เนื้อทั้งหมดหรือใช้แทนบางส่วน ในการควบคุมเชื้อ *C. botulinum* ได้มีการศึกษาในหลายๆห้องทดลอง ซึ่งการทดลองพื้นฐานคือซอร์เบต (ร้อยละ 0.20) มีผลในการชะลอการสร้างสารพิษในหลายๆผลิตภัณฑ์และที่สำคัญอย่างมากคือการใช้ซอร์เบต (ร้อยละ 0.20) ร่วมกับไนไตรต์ที่มีความเข้มข้นต่ำลง (40-80 ppm) ให้ผลเสริมฤทธิ์กันและช่วยยืดยาวระยะเวลาในการสร้างสารพิษในผลิตภัณฑ์ที่เก็บภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม เมื่อวันที่ 16 พฤษภาคม ในปี ค.ศ.1979 กฎหมายที่ออกโดย USDA (USDA regulation) ได้อนุญาตให้ใช้โพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้นร้อยละ 0.26 ร่วมกับโซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 40 ppm ได้ในเบคอน จากการศึกษาของ USDA เมื่อเร็ว ๆ นี้เกี่ยวกับเบคอนถึงแม้จะมีการพิสูจน์ผลของกิจกรรมการต้านการสร้างสารพิษโบทูลินัมโดยการใช้ซอร์เบตร่วมกับไนไตรต์แล้วก็ตาม แต่ก็ยังมีรายงานว่าจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ซึ่งพบว่าการใช้ซอร์เบตร่วมกับไนไตรต์อาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาการแพ้ในบางคนได้ ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ได้คาดหมายและยังไม่ได้ตรวจสอบและเป็นสาเหตุให้มีการล่าช้าเกี่ยวกับการนำซอร์เบตไปใช้ในเบคอน

2.6.3.9 กลไกการต้านจุลินทรีย์ของซอร์เบต

จากการที่ทราบว่าซอร์เบตเป็นวัตถุดิบเสียที่สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ได้หรือทำให้การเจริญช้าลงโดยการยับยั้งหรือฆ่าสปอร์หรือเซลล์นั้นเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องเข้าใจกลไกที่ทำให้เกิดผลยับยั้งนี้ ความเข้าใจกลไกเหล่านี้ทำให้สามารถปรับปรุงและอาจขยายการใช้ประโยชน์ของซอร์เบตให้มากขึ้น และอาจมีประโยชน์ในการค้นหาวัตถุดิบเสียชนิดใหม่ที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพ (Sofos และ Busta, 1981)

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

เอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล (sulfhydryl) ได้ถูกกล่าวถึงอีกครั้งในความสัมพันธ์กับการยับยั้งของกรดซอร์บิก เอนไซม์ฟumarate รายงานว่าเป็นจุดที่มีการยับยั้งของ oxidative metabolism

ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลส ยีสต์และเชื้อราในสถานะที่มีกรดซอร์บิก มีรายงานว่า เอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริลอื่นๆที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบต ได้แก่ เอนไซม์แอสพาร์เตส (aspartase) ซัคซินิกดีไฮโดรจีเนส (succinic dehydrogenase) และ yeast alcohol dehydrogenase มีผู้กล่าวว่ากรดซอร์บิก uncouples oxidative phosphorylation โดยการยับยั้งเอนไซม์ภายในเซลล์ และการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสถานะที่ไม่มีอากาศอาจจะเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นที่สูงขึ้นของซอร์เบตที่พบในปฏิกิริยาอะมิเนชัน (amination) ของ α -ketoglutarate เนื่องจากกลไกหนึ่งของการยับยั้งเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล มีผู้แนะนำว่ากรดซอร์บิกเกิดปฏิกิริยาอย่างช้าๆกับซิสเทอีน (cysteine) โดยผ่านปฏิกิริยาการเติมหมู่ไทออล (thiol) ของซิสเทอีน และนี่คือกลไกการยับยั้งเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่ากิจกรรมของกรดซอร์บิกในการต้าน *Aspergillus niger* ได้เพิ่มขึ้นโดยซิสเทอีน รายงานวิจัยอื่นๆได้เสนอว่าการทำงานของซอร์เบตเหมือนกับการทำงานของกรดมาเลอิก (maleic acid) ซึ่งทำให้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนที่มีความเสถียรกับเอนไซม์ที่มีหมู่ซัลไฟดริล โดยผ่านอนุพันธ์ของกรด thiohexenoic ($\text{CH}_3\text{-CH=CH-RSCH-CH}_2\text{-COOH}$) รายงานต่อมาได้กล่าวว่าซอร์เบตยับยั้งเอนไซม์โดยการสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ระหว่างซัลเฟอร์ของหมู่ซัลไฟดริลที่สำคัญ หรือ ZnOH^- ของเอนไซม์ และเซลล์และ/หรือเบต้าคาร์บอนของซอร์เบตไอออน จากรายงานอื่นไม่เห็นด้วยกับข้อความข้างบนและกล่าวว่าจุดที่มีการยับยั้งการหมักกลูโคสโดยยีสต์ขนมปังคือจุดที่อยู่ระหว่าง 2-phosphoglyceric acid และ phosphoenolpyruvate ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์อินโนเลส (enolase) รายงานอื่นกล่าวว่าเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยซอร์เบตคือโปรตีนเอส (proteinase) ขณะที่ผู้เสนอว่าซอร์เบตยับยั้งกระบวนการการหายใจโดยการแข่งขันกับอะซิเตตตรงบริเวณที่มีการสร้าง acetyl-CoA ซอร์เบตจะแข่งขันในการจับกับ coenzyme A และอะซิเตต ดังนั้นจึงยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ coenzyme A ด้วย ในปี ค.ศ.1965 ซอร์เบตถูกกล่าวว่าเป็นตัวยับยั้งแบบคัดเลือกในการต้านแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลส โดยให้เหตุผลว่าผลการยับยั้งของซอร์เบตในการต้านเชื้อราอาจเนื่องมาจากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลส หรือการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลส จากผลการทดลองได้พบว่าซอร์เบตยับยั้งการงอกของสปอร์ *A. niger* และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลส ดังนั้นสรุปได้ว่าการยับยั้งเอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลสเป็นหนึ่งในกลไกที่ทำให้กรดซอร์บิกสามารถยับยั้งเชื้อราและยีสต์ (fungistatic) ได้ การยับยั้งเอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลสเป็นผลให้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งที่จะมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญและป้องกันการงอกของสปอร์ จากรายงานก่อนหน้านี้ที่ว่าเอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลสไม่เพียงแต่จะทำให้เกิดการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่านั้น แต่ตัวเอนไซม์เองยังถูกทำลายโดยสารประกอบนี้ในกระบวนการ และคาดว่ากรดซอร์บิกไวต่อ autoxidative deterioration ผ่านขั้นตอนของเปอร์ออกไซด์ (sorbyl peroxides) มีรายงานว่ากรดซอร์บิกในสถานะของเปอร์ออกไซด์อาจจะไปยับยั้งเอนไซม์อะซิโตน คาร์บอกซิลเลส หรือยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อื่นๆ หรือ co-enzymes ที่สำคัญต่อการพัฒนาเซลล์เชื้อรา และมีผู้กล่าวว่ากรดไขมันไม่

อนุมูลเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยกลไกอนุมูลอิสระ (free-radical mechanism) ซึ่งควบคุมการเจริญของสปอร์ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ากรดซอร์บิกต้านทานต่อการเกิดออกซิเดชันในอาหาร ทฤษฎีนี้ยังคงขัดแย้งกับผลการทดลองของการใช้ในไตรต์ร่วมกับซอร์เบต เพราะทราบกันดีว่าไนไตรต์ทำหน้าที่เป็นสาร antioxidant และกำจัดอนุมูลอิสระ ดังนั้นจึงช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน นอกจากนี้ระบบเอนไซม์หรือจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะควบคุมเป็นข้อจำกัดทำให้ผลการทดลองของการศึกษาข้างบนนี้อาจสรุปได้ ผลการทดลองอาจจะถูกต้องสมบูรณ์ภายใต้สภาวะเฉพาะที่ทดสอบเท่านั้น แต่กลไกต่างๆ ได้มาจากการเสนอขึ้นและเป็นเพียงสมมติฐานซึ่งไม่อาจนำไปใช้ประโยชน์ได้ภายใต้หลายๆ สภาวะที่ทดสอบ (Sofos และ Busta. 1981)

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

ซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิดไม่ว่าจะอยู่บนผิวหน้าอาหารหรืออยู่ในอาหาร ได้แก่ *Aeromonas* spp. ที่พบบนปลาเค็มตากแห้งซึ่งมีความเข้มข้นของซอร์เบตร้อยละ 1.5 สามารถยับยั้ง *Salmonella* spp. และ *S. aureus* ในไส้กรอก *S. aureus* ในเบคอน *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหารทะเล *Salmonella* spp., *S. aureus* และ *E. coli* ในสัตว์ปีก *Y. enterocolitica* ในเนื้อสุกร *Salmonella* Typhimurium ในนมและเนยแข็ง และ *E. coli* O157:H7 ในเนยแข็ง (Davidson. 2001)

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

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

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

2.7 การควบคุมจุลินทรีย์โดยการแช่แข็งและการทำให้ละลาย

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

2.7.1 การแช่แข็ง

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

ในระหว่างเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง อย่างไรก็ตามเซลล์ที่รอดชีวิตจากการแช่แข็งสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในอาหารหลังจากทำให้ละลายแล้วได้ (Ray, 1996)

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

2.7.1.1 กลไกการทำลายจุลินทรีย์

การทำลายจุลินทรีย์โดยการแช่แข็งมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของความดันออสโมติกระหว่างอาหารที่เป็นน้ำแข็งกับไซโตพลาสซึมของเซลล์ที่เย็นจัด ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของน้ำออกจากเซลล์ อัตราการสูญเสียน้ำของแต่ละเซลล์จะขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์ เซลล์ที่มีขนาดเล็กซึ่งมีพื้นที่ผิวมากจะสูญเสียน้ำได้เร็วกว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ถ้าการสูญเสียน้ำเกิดขึ้นช้าเพียงพอที่เซลล์จุลินทรีย์จะรักษาสมดุลออสโมติกระหว่างไซโตพลาสซึมและสิ่งแวดล้อมไว้ได้ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายในเซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างเหมาะสมกับอุณหภูมิที่ลดลงเพิ่มขึ้น และน้ำภายในเซลล์จะไม่เป็นน้ำแข็ง ดังนั้นอัตราการทำให้เย็นลง 1 องศาเซลเซียสต่อนาทีหรือน้อยกว่าจะทำให้ให้น้ำภายในเซลล์เป็นน้ำแข็งได้ช้ามาก แต่จะสร้างผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์จุลินทรีย์ ส่วนอัตราการทำให้เย็นลง 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีทำให้น้ำในเซลล์เบคทีเรียกลายเป็นน้ำแข็งอย่างสมบูรณ์โดยทั่วไปแล้วการรอดชีวิตของจุลินทรีย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยการเพิ่มอัตราการลดอุณหภูมิลง การลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วจะทำให้มีผลึกน้ำแข็งเล็กๆ 2-3 ผลึกเท่านั้นภายในเซลล์ และทำให้เซลล์รอดชีวิตได้เพิ่มขึ้น การรอดชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วอาจจะลดลงโดยการทำให้ละลายอย่างช้าๆ เพราะว่าผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้นในระหว่างที่มีกระบวนการทำให้ละลาย (Juneja และ Sofos, 2002)

มีหลายทฤษฎีที่อธิบายเกี่ยวกับกลไกการทำลายเซลล์เบคทีเรียโดยการแช่แข็ง ได้แก่ ในช่วงแรกๆ ได้กล่าวว่าการทำลายเซลล์เกิดจากการทำลายกลไกการทำงานของเซลล์และโครงสร้างของเซลล์โดยผลึกน้ำแข็งที่แตกละเอียด ต่อมาก็ได้มีการกล่าวว่าการทำลายเซลล์เกิดจากการดึงน้ำออกจากเซลล์ในระหว่างการแช่แข็ง แต่ส่วนใหญ่อ้างว่าการตายของจุลินทรีย์เกิดจากการสร้างน้ำแข็งภายในเซลล์ โดยเมื่อระบบเข้าสู่การแช่แข็ง อุณหภูมิที่ลดลงในช่วงแรกจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นจัดแต่น้ำภายในเซลล์ยังคงเป็นของเหลวอยู่ จนกระทั่งอุณหภูมิต่ำลงตั้งแต่ -10 องศาเซลเซียส ถึง -15

องศาเซลเซียสจะมีการสร้างผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ และเซลล์ตอบสนองต่อสมดุลออสโมติกทำให้น้ำภายในเซลล์เป็นน้ำแข็ง

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

2.7.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ในขณะแช่แข็ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ในขณะแช่แข็ง ได้แก่

1. ธรรมชาติของเชื้อประจำถิ่น

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

โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมลบมักไวต่อการบาดเจ็บจากการแช่แข็งมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อย่างไรก็ตามความไวต่อการแช่แข็งไม่ได้รวมถึงแบคทีเรียแกรมบวกทุกตัว เพราะว่าแบคทีเรียแลคติกบางตัวที่ใช้ในการหมักอาหาร และเซลล์ของคลอสตริเดียมไวต่อการแช่แข็งอย่างมาก แต่สปอร์ของมันต้านทานต่อการแช่แข็งได้ดีพอๆกับแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ตัวอื่นๆ (Juneja และ Sofos, 2002)

2. สารอาหาร

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในระหว่างการแช่แข็งมีผลอย่างมากต่อการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปอาหารที่มีความเข้มข้นมากจะทำให้จุลินทรีย์ได้รับผลกระทบจากการแช่แข็งน้อย เช่น ในสารละลายเกลือ น้ำ นม หรือในของเหลว มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตมากกว่าในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และรอดชีวิตในอาหารต่างๆได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องทดลอง อย่างไรก็ตามตัวถูกละลายในอาหารบางชนิด เช่น กรดแลคติกในเนื้อมีอาจทำให้เซลล์บาดเจ็บจากการแช่แข็งรุนแรงมากขึ้น ถ้ามีความเข้มข้นของกรดมากในระหว่างการแช่แข็งอย่างช้า (Juneja และ Sofos, 2002) การมีไนโตรเจนและคาร์บอนในปริมาณที่ต่างกันทำให้ต้านทานต่อการแช่แข็งได้ต่างกัน โดยเมื่อทดลองกับ *E. coli* พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด มีการสะสมปริมาณคาร์โบไฮเดรต

สูงขึ้นและต้านทานต่อการแช่แข็งมากขึ้น ทำให้ทราบว่าโพลีกลูโคส (polyglucose) และสารที่คล้าย โกลโคเจน สามารถใช้เป็นสารป้องกันเซลล์จากความเย็นได้โดยช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแรง มากขึ้น (Robinson, 1985)

3. อายุและอัตราการเจริญ

เซลล์ในระยะ exponential phase มีความไวต่อความเครียดจากการแช่แข็งและการทำให้ ละลายมากกว่าเซลล์ในระยะ stationary phase มาก อย่างไรก็ตาม มีผู้วิจัยพบว่าความไวต่อการแช่ แข็งของ *Pseudomonas* ที่มีระยะการเจริญต่างกัน ขึ้นอยู่กับอัตราการแช่แข็ง โดยที่อัตราการลด อุณหภูมิลง 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีหรือต่ำกว่า เซลล์ในระยะ exponential phase จะไวมากกว่า แต่ เมื่ออัตราการลดอุณหภูมิลงสูงกว่า 100 องศาเซลเซียสต่อนาทีหรือมากกว่า เซลล์ในระยะ stationary phase จะไวมากกว่า

4. อัตราการทำให้เย็นลง

เซลล์มีการรอดชีวิตเมื่ออัตราการทำให้เย็นลงเป็นไปอย่างช้าในช่วง 10 องศาเซลเซียส ต่อนาที แต่ถ้าอัตราการทำให้เย็นลงสูงขึ้นหรือต่ำกว่านี้ทำให้การรอดชีวิตลดลงด้วย ที่อัตราการ ทำให้เย็นลงสูงมากจนเข้าใกล้ 10,000 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำให้รอดชีวิตได้เพิ่มขึ้น แต่อัตรา การทำให้เย็นลงเช่นนี้ไม่ค่อยพบว่านำมาใช้ในทางการค้า ส่วนวิธีการแช่แข็งที่นำมาใช้กันมากคือ การใช้อุณหภูมิแช่แข็งในตู้เย็นถึงการใช้ในโตรเจนเหลว ซึ่งมีอัตราการทำให้เย็นลงตั้งแต่ 0.2 องศา เซลเซียสต่อนาทีถึง 200 องศาเซลเซียสต่อนาที

อัตราการทำให้เย็นลงอย่างช้ามากๆ ซึ่งต่ำกว่าอัตราที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการอยู่รอด ทำให้เกิดการสั่นไหวของน้ำแข็งภายนอกเซลล์ขึ้น และมีผลให้เซลล์ถูกทำลาย เนื่องจากความเข้มข้นของ ตัวถูกละลายสูงขึ้น ถ้าอัตราการทำให้เย็นลงสูงขึ้น เวลาที่เซลล์ต้องเผชิญกับความเครียดจากตัวถูกละลายเหล่านั้นจะลดลง ซึ่งมีผลให้เซลล์รอดชีวิตเพิ่มขึ้น ที่อัตราการทำให้เย็นลงสูงขึ้น (มากกว่า 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) น้ำแข็งภายในเซลล์เริ่มที่จะก่อตัวและทำให้การรอดชีวิตของจุลินทรีย์ต่ำลง (Robinson, 1985)

5. การเก็บรักษา

จุลินทรีย์จะสูญเสียความมีชีวิตเมื่ออยู่ในอุณหภูมิแช่แข็งหรือต่ำกว่า แต่เมื่ออุณหภูมิที่ใช้ ในการแช่แข็งต่ำลง อัตราการตายจะลดลงด้วย และที่อุณหภูมิต่ำกว่า -60 องศาเซลเซียส โดยปกติ อัตราการตายต่ำมากหรือไม่มีเลย (Robinson, 1985) การเก็บรักษาอาหารแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -10 องศาเซลเซียส มีผลให้จุลินทรีย์ลดจำนวนลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษา อุณหภูมิของการ เก็บรักษา ยิ่งต่ำลงเท่าใด อัตราการตายของจุลินทรีย์ก็จะยิ่งช้าลงเท่านั้น อาหารที่ผ่านการแช่แข็งไม่ จัดว่าปลอดภัย เพราะอาจมีจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายและสารพิษหลงเหลืออยู่ เช่น เนื้อไก่แช่แข็ง หลังจากแช่แข็งแล้วยังมีความเสี่ยงจากเชื้อ *Salmonella* อยู่เช่นเดิม (สุมนทนา วัฒนสินธุ์, 2545)

2.7.2 การทำให้ละลาย

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