บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หมูยอเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทหนึ่ง ที่ถูกปรุงให้สุกด้วยการใช้ความร้อนที่ไม่สูงนัก วัตถุประสงค์ของการใช้ความร้อน เพื่อทำลายเชื้อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสียในระหว่างการเก็บรักษา โดยทั่วไปหมูยอจะเก็บรักษาได้นานไม่เกิน 2 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (มหาวิทยาลัยมหิดล, สถาบันวิจัยโภชนาการ และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2545) แต่เนื่องจากหมูยอทำมาจากเนื้อสัตว์และส่วนผสมอย่างอื่น ซึ่งเป็นแหล่งของจุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งเชื้อโรค ดังนั้นหากผู้ผลิตใช้ความร้อนที่ไม่เพียงพอ อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค นอกจากนั้นแล้วยังอาจทำให้อายุของหมูยอสั้นลง วิธีการหนึ่งที่จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาหมูยอ คือการใช้วัตถุกันเสียในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งโซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) หรือกรดเบนโซอิก (benzoic acid) อาจทำให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าวได้ เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคได้หลายชนิด และทำลายจุลินทรีย์บางชนิดที่อาจทำให้หมูยอเกิดการเน่าเสียได้

การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

1. แหล่งที่มาของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์

โดยทั่วไปเนื้อของสัตว์ที่มีสุขภาพสมบูรณ์และยังมีชีวิตอยู่จะไม่พบจุลินทรีย์ใดๆ เจริญอยู่ ยกเว้นบริเวณผิวด้านนอกของร่างกายสัตว์ เช่น ขน หนังและกีบเท้า (Jackson, Acuff and Dickson, 1997; Jay, 2000a) ดังเช่นการศึกษาของ Bacon และคณะ (2000) ที่แสดงให้เห็นว่าบริเวณหนังของซากวัวจะมีจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ระหว่าง $1.58x10^{8}$ – $3.16 x10^{12}$ CFU/100 cm^{2} มี Coliform bacteria อยู่ระหว่าง $1.00x10^{6}$ – $7.94x10^{7}$ CFU/100 cm^{2} และ *Escherichia coli* อยู่ระหว่าง $3.16x10^{5}$ – $3.16x10^{7}$ CFU/100 cm^{2} นอกจากนี้ในลำไส้และกระเพาะอาหาร ยังปรากฏว่ามีจุลินทรีย์อยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูงอีกด้วย

ดังนั้นเมื่อสัตว์ตายลงและเนื้อถูกชำแหละ จุลินทรีย์จากภายนอกจึงมีโอกาสปนเปื้อนเข้าสู่ก้อนเนื้อได้อย่างสะดวก โดยเริ่มตั้งแต่ขั้นตอนการฆ่า ซึ่งจะส่งผลให้จุลินทรีย์แพร่กระจายไปตามกระแสเลือด ตลอดไปจนถึงการผ่าซากและการชำแหละในที่สุด นอกจากนี้ยังมีโอกาสปนเปื้อนได้จากแหล่งอื่นๆ เช่น จากเครื่องมือ เครื่องใช้ น้ำที่ใช้ในกระบวนการ ตลอดจนเสื้อผ้า หรือแม้แต่ร่างกายของผู้ปฏิบัติงาน (Jackson, Acuff and Dickson, 1997; Jay, 2000a)

ดังเช่นการศึกษาของ Rho และคณะ (2001) ได้ศึกษาชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในฟาร์มเลี้ยงหมู โรงฆ่าสัตว์และห้องตัดแต่ง พบว่ามีการปนเปื้อนของ *Salmonella, Staphylococcus aureus* และ *Clostridium perfringens* ในน้ำและอาหารที่อยู่ในราง ส่วนภายในโรงฆ่าและห้องตัดแต่ง พบการปนเปื้อนของ *S. aureus* อยู่ค่อนข้างบ่อย สำหรับ *Listeria monocytogenes* และ *Yersinia enterocolitica* พบการปนเปื้อนได้ในห้องตัดแต่ง ในส่วนของอุปกรณ์ที่ใช้ คือ หัวฉีดน้ำ พบจุลินทรีย์ทั้งหมดในปริมาณ $3.98x10^4 - 7.94x10^6$ CFU/ml

Duffy และคณะ (2001) ศึกษาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในเนื้อหมูดิบโดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่า โรงตัดแต่ง และร้านค้าปลีกในสหรัฐเมริกา พบว่าตัวอย่างหมูบดจากโรงฆ่าและโรงตัดแต่ง มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ $1.99x10^3$ CFU/g และพบการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคได้แก่ *L. monocytogenes, Salmonella, Y. enterocolitica,* และ *Campylobacter jejuni* กับ *C. coli* ร้อยละ 26.7 5.8 3.3 และ 6.7 ตามลำดับ

นงคราญ เรืองประพันธ์ (2544) ได้สุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อหมูจากฟาร์ม ร้านค้าในตลาดและซุปเปอร์มาร์เกตของจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าเนื้อหมูมีการปนเปื้อนของ *E. coli, S. aureus, C. perfringens* และ*Salmonella* ร้อยละ 75.0, 68.8, 44.4, และ 2.8 ตามลำดับ

Miwa และคณะ (1998) ศึกษาการปนเปื้อน *C. perfringens* ในเนื้อวัว หมู และไก่ที่จำหน่ายในตลาดของเขตชิโซโอกะ ประเทศญี่ปุ่น พบว่า เนื้อวัว หมู และไก่มีการปนเปื้อน *C. perfringens* อยู่ร้อยละ 16, 10, และ 84 ตามลำดับ

2. จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ พวกที่ก่อโรค และพวกที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย

2.1 จุลินทรีย์พวกที่ก่อโรค

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

แบคทีเรียชนิดนี้พบอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อม เช่น อากาศ ฝุ่น น้ำ อาหารและอุจจาระ มนุษย์ก็เป็นแหล่งที่สำคัญของเชื้อนี้ มีการตรวจพบเชื้อนี้ได้ที่โพรงจมูก ลำคอ และผิวหนังที่เกิดบาดแผล ฝี หนอง ทำให้มีแนวโน้มที่จะเกิดการปนเปื้อนสู่อาหารได้ ถ้าบุคคลนั้นทำงานที่สัมผัสกับอาหาร เช่น การชำแหละตัดแต่งซาก ประเภทของอาหารที่

พบการระบาดของเชื้อนี้ ได้แก่ เนื้อสัตว์ที่ปรุงสุกแล้วหรือผลิตภัณฑ์แปรรูป (Garbutt, 1997a; Batzing, 2002)

แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารพิษ ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ โดยพบว่า สารพิษประมาณ 10^{-9} กรัม/กรัมอาหาร หรือการได้รับเชื้อเข้าไปในปริมาณ $5x10^{6}$ เซลล์/กรัม ก็จะก่อให้เกิดอันตรายได้ (Garbutt, 1997a)

2.1.2 *Listeria monocytogenes*

เป็นแบคทีเรียที่มีอยู่มากมายในสิ่งแวดล้อม เช่น ฝุ่น ดิน น้ำ และมูลสัตว์ สามารถเจริญได้ในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน และชอบอุณหภูมิต่ำ รายงานการระบาดในหญิงตั้งครรภ์ อ้างว่าการติดเชื้อนี้จะเป็นสาเหตุให้เกิดการคลอดก่อนกำหนด และการแท้งบุตร สำหรับเด็กเล็กและ/หรือผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ อาจเกิดภาวะเลือดเป็นพิษเหตุติดเชื้อ (septicemia) หรือเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (menigitis) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ที่ไม่ได้ปรุงให้สุกหรือมีการปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิตอาหาร ส่วนใหญ่การติดเชื้อชนิดนี้มีสาเหตุมาจากการบริโภคเนยแข็ง หรือผลิตภัณฑ์เนื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลานาน (Batzing, 2002)

2.1.3 *Campylobacter jejuni*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวกับอาหารเป็นพิษ มักพบในนมดิบ และเนื้อสัตว์ปีกที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนหรือให้ความร้อนไม่เพียงพอ จึงพบได้น้อยในอาหารที่ผ่านกรรมวิธีทำให้สุกแล้ว อาการที่สำคัญคือปวดท้องรุนแรง มีไข้ หนาวสั่น และถ่ายเป็นเลือด (Garbutt, 1997a: Batzing, 2002)

2.1.4 แบคทีเรียที่สร้างสปอร์

แบคทีเรียที่สร้างสปอร์และทำให้อาหารเป็นพิษ มีอยู่ 2 สายพันธุ์ คือ *Bacillus* และ *Clostridium* สปอร์ของแบคทีเรียดังกล่าวสามารถทนทานต่อความร้อนได้ การงอกของสปอร์จะก่อให้เกิดสารพิษ ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์หากได้รับสารพิษของเชื้อดังกล่าวเข้าสู่ร่างกาย Garbutt (1997a) และ Batzing (2002) ได้กล่าวถึงลักษณะของเชื้อทั้ง 2 ชนิด และอาการของโรคที่เกิดจากสารพิษไว้ดังต่อไปนี้คือ

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน การเจริญของเชื้อดังกล่าวจะส่งผลให้เกิดอาหารเป็นพิษ ทำให้ผู้

บริโภคมีอาการท้องเสีย นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยน้ำตาล โปรตีนและไขมัน ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ซุป และซอส ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย

Clostridium เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญในที่ที่ไม่มีออกซิเจน สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษจากสารพิษที่สร้างขึ้นได้แก่ *C. perfringens* และ *C. botulinum* สำหรับ *C. perfringens* นั้น จะเป็นสาเหตุของโรคระบบทางเดินอาหารอักเสบ (gastroenteritis) ซึ่งผู้ป่วยจะต้องได้รับเชื้อเข้าไปในปริมาณมากคือ ประมาณ 7×10^5 เซลล์/กรัม แหล่งที่พบเชื้อดังกล่าว ได้แก่ เนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น เนื้อโค สุกร แกะและไก่ ทั้งในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์ ส่วน *C. botulinum* จะสร้างสารพิษที่มีผลต่อระบบประสาท (neurotoxin) ซึ่งทำให้เกิดอาการเป็นอัมพาตที่รุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิตได้ (fatal paralysis) หรือเป็นที่รู้จักกันดีในชื่อ botulism การระบาดของเชื้อจะพบได้ง่ายในอาหารกระป๋องที่ผลิตกันในครัวเรือน (home canning) เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และผัก เป็นต้น

2.1.5 *Escherichia coli* O157:H7

เป็นแบคทีเรียที่ผลิตสารพิษ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคที่สำคัญและโรคที่มักเกิดร่วมด้วย คือ Hemorrhagic colitis และ Hemolytic uremic syndrom การติดเชื้อดังกล่าวจะเกิดจากการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อที่ปรุงไม่สุก (undercook beef product) ดังนั้น คณะกรรมการอาหารและยา ประเทศสหรัฐอเมริกา (USFDA) จึงได้กำหนดให้อาหารทั่วไปต้องได้รับความร้อน จนกระทั่งอุณหภูมิตรงจุดกึ่งกลางภายในก้อนอาหารมีค่า 68.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 15 วินาที (Batzing, 2002)

2.1.6 *Salmonella*

แบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ และเจริญได้ในที่ที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ในธรรมชาติจะพบเชื้อดังกล่าวได้มากกว่า 2,300 ชนิด *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์หลายชนิด ผู้ที่ได้รับเชื้อจะแสดงอาการของโรคที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความต้านทานของแต่ละบุคคลและปริมาณของเชื้อที่ได้รับเข้าไป อาการที่สำคัญ คือ เป็นไข้ หนาวสั่น ท้องเดิน อาเจียน อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ เบื่ออาหาร และปวดเมื่อยตามตัว ในผู้ที่มีอายุน้อย หรือคนอ่อนแออาจถึงตายได้ อาหารที่เป็นแหล่งของเชื้อนี้ได้แก่ เนื้อสัตว์ปีก เนื้อสัตว์ ไข่และนม ที่ไม่ผ่านการปรุงให้สุก (Garbutt, 1997a; Batzing, 2002)

2.1.7 *Yersinia enterocolitica*

แบคทีเรียชนิดนี้มีรูปร่างเป็นแท่ง ติดสีแกรมลบ เริ่มมีผู้ให้ความสนใจเมื่อระยะเวลาที่ผ่านมาไม่นาน เนื่องจากพบว่ามีการแพร่ระบาดในเนื้อสุกรดิบ และนม มีผลต่อความเจ็บป่วยของผู้ที่ติดเชื้อ ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุ เช่น หากเกิดในเด็กทารก จะทำให้เกิดอาการปวดท้อง ถ่ายเป็นน้ำ ถ้าเกิดกับวัยรุ่น จะทำให้เกิดอาการอาการปวดท้องคล้ายกับเป็นไส้ติ่งอักเสบ ในผู้ใหญ่มักจะทำให้เกิดอาการท้องเสียเป็นระยะเวลานานถึง 2 สัปดาห์ และอาจจะมีผื่นแดงและข้ออักเสบ (Garbutt, 1997a; Batzing, 2002)

2.2 จุลินทรีย์พวกที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารบางชนิดเท่านั้น ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสีย ดังนั้นการเน่าเสียที่ปรากฏจึงมักจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะนั้นๆ ในอาหาร ซึ่ง Walker (1992) และ Garbutt (1997b) ได้กล่าวถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียไว้ดังนี้

2.2.1 แบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ

แบคทีเรียประเภทนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส แต่ยังสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิต่ำ 0 ถึง –3 องศาเซลเซียส จึงทำให้พบเชื้อในกลุ่มนี้ได้ในอาหารสดแช่เย็น เช่น เนื้อ ไก่ และปลา สมาชิกของกลุ่มที่พบได้บ่อยในอาหาร คือ *Pseudomonas* นอกจากนี้ยังอาจพบ *Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Alteromonas, Flavobaterium, Moraxella, Shewenella* และ *Vibrio* spp. จุลินทรีย์ประเภทนี้มักพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะในน้ำ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่ายในอาหาร แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ทนต่อความร้อน จึงถูกกำจัดได้โดยการใช้ความร้อนที่ไม่มากนัก

2.2.2 โคลิฟอร์ม/เอนเตริคแบคทีเรีย

เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ ไม่มีเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิช่วง 8-15 องศาเซลเซียส และมีการเจริญที่อุณหภูมิต่ำสุดช่วง –2 ถึง 8 องศาเซลเซียส เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สำหรับการเจริญในรูปแบบหลัง จะใช้กระบวนการหมัก (fermentation) เพื่อสร้างพลังงาน โดยการย่อยสลายสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นกรด ลักษณะการเน่าเสียอย่างอื่นที่อาจจัดรวมเข้าด้วยกัน คือ การสร้างรงควัตถุ ก๊าซ เมือก กลิ่นผิดปกติ และรสชาติผิดปกติ สมาชิกของกลุ่มได้แก่ *Citrobacter, Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Proteus* และ *Serratia* การพบแบคทีเรียกลุ่มนี้

ในอาหาร จะแสดงให้เห็นถึงการใช้ความร้อนที่ไม่เพียงพอในการฆ่าเชื้อ หรือเกิดการปนเปื้อนของอาหารภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการแปรรูปแล้ว

2.2.3 แบคทีเรียสร้างสปอร์แกรมบวก

แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะมีความสามารถในการสร้างสปอร์และเจริญอยู่ได้ที่อุณหภูมิต่ำสุดช่วง 0-5 องศาเซลเซียส สมาชิกของกลุ่มได้แก่ *Bacillus* และ *Clostridium* ผลจากการย่อยสลายอาหารของแบคทีเรียจะทำให้เกิดก๊าซ ซึ่งจะสังเกตเห็นได้จากการโป่งพองของภาชนะบรรจุ

2.2.4 แบคทีเรียแลกติก

เป็นแบคทีเรียรูปแท่งหรือกลม เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจน และสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำประมาณ 3.6 มีความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลกติก สมาชิกของกลุ่มได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Pediococcus* spp. แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์บรรจุสุญญากาศ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว

2.2.5 แบคทีเรียแกรมบวก

Brochothrix thermospacta และ *Micrococcus* เป็นแบคทีเรีย 2 ชนิด นอกเหนือจากแบคทีเรียแกรมบวกที่กล่าวมาแล้ว ที่มีผลต่อการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อ โดย อาจพบ *B. thermospacta* ในเนื้อสด ส่วน *Micrococcus* อาจพบได้ในพวกผลิตภัณฑ์เนื้อที่ผ่านการหมักเกลือ (cured meat product)

2.2.6 ยีสต์และราในเนื้อสัตว์

ยีสต์หลายชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นจึงพบการเจริญของยีสต์ได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อที่บรรจุแบบสุญญากาศ

ราเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำมากจนถึงในระดับแช่เยือกแข็ง ดังนั้นจึงอาจพบการเจริญของราได้ในอาหารแช่เยือกแข็ง

ยีสต์และราต่างเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ทนต่อความร้อน จึงถูกทำลายได้ง่ายโดยกระบวนการให้ความร้อนแบบธรรมดา

3. ลักษณะการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

การเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์จะทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านรสชาติ กลิ่น เนื้อสัมผัสและลักษณะปรากฏ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเกิดขึ้นเพียงลักษณะเดียวหรือหลายลักษณะรวมกันก็ได้ (Garbutt, 1997b)

3.1 การเปลี่ยนแปลงด้านกลิ่นและรสชาติ

3.1.1 การเกิดกลิ่นและรสเปรี้ยว

การย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์จะทำให้ได้กรดอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งทำให้อาหารมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง แบคทีเรียที่มีบทบาทในการทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ปรุงรสที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ มีปัญหาเรื่องกลิ่นและรสเปรี้ยว ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก (Borch, Kant-Muermans and Blixt, 1996; Huis in't Veld, 1996) ส่วนผลิตภัณฑ์ที่เก็บในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญ คือ *B. thermospacta*, *Lactobacillus* spp. และ *Carnobacterium* spp. (Borch, Kant-Muermans and Blixt, 1996; Jay. 2000b)

3.1.2 การเกิดกลิ่นเหม็นเน่า

แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteinase) จนเกิดเป็นสายเพปไทด์ ซึ่งโพลีเมอร์ดังกล่าวสามารถย่อยสลายต่อไปได้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) โดยการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์เพปติเดส (peptidase) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จะก่อให้เกิดสารประกอบทางเคมีหลายชนิดที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ เมอร์แคบแทน แอมโมเนีย เอมีน อินโดล สคาทอล (วิลาวัณย์ เจริญจิระกุล, 2537; Garbutt, 1997b) แบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยโปรตีน คือ *Clostridium* spp. และ *Bacillus* spp. (Frazier, 1967)

3.2 การเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัส

3.2.1 การเกิดเมือก

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ และมีความชื้นสูง มักจะเกิดลักษณะที่เป็นเมือก อันเนื่องมาจากแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* แต่ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูง การเกิดเมือกอาจเกิดจากแบคทีเรีย *Micrococcus, Bacillus, Leuconostoc* และ *Streptococcus* (วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

การเกิดเมือกของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ผ่านการปรุงสุกและบรรจุแบบสุญญากาศ มักเกิดจากแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. และ *Leuconstoc* spp ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแต่เพียงอย่างเดียว การปนเปื้อนที่พบเห็นได้มักเกิดขึ้นภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการผลิต (Borch, Kant-Muermans and Blixt , 1996) นอกจากนี้ Jay (2000b) ได้รายงานว่าการเกิดเมือกสีเทาที่ผิวด้านนอกของผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอกโดยเฉพาะแฟรงเฟอร์เตอร์ เกิดขึ้นเนื่องจากยีสต์และแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus, Enterococcus, Weissella* และ *B. thermospacta*

3.2.2 การเกิดก๊าซ

แบคทีเรียที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ แล้วได้ก๊าซออกมา มีอยู่ด้วยกันหลายสายพันธุ์ Borch, Kant-Muermans และ Blixt (1996) ได้รายงานว่าการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ มีความสัมพันธ์กับการเติบโตของ *Leuconostoc* spp. เช่น *Ln. mesenteroides, Ln. carnosum* และ *Ln. amelibiosum* ส่วน *Clostridium* spp. มีความสัมพันธ์กับการเกิดก๊าซไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้แล้ว *Bacillus* spp. ยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดก๊าซ และทำให้ภาชนะบรรจุพองบวมได้ (Brown and Gould, 1992)

3.2.3 การเกิดสีต่างๆของผลิตภัณฑ์

แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างรงควัตถุได้ เช่น *Serratia marcescens* จะให้รงควัตถุสีแดง ในขณะที่ *Pseudomonas syncyanea* จะให้รงควัตถุสีน้ำเงิน(วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

Jay (2000b) รายงานว่าแบคทีเรีย *Enterococcus cusseliflavus* เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดจุดสีเหลืองเล็กๆ บนอาหารประเภทลันชันมีท (luncheon-style meat) ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4.4 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชนิดนี้

สามารถทนต่อความร้อนได้สูง โดยยังคงสามารถรอดชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 77.1 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

3.2.4 การเปลี่ยนแปลงสีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของ *Weisella viridescens* ซึ่งทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 40 นาที จะปรากฏเป็นสีเขียว เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งจะไปออกซิไดซ์สารประกอบ nitrosohaemochrome ให้กลายเป็น choleomyoglobin ทำให้เกิดเป็นสีเขียวขึ้น การเกิดสีเขียวในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ยังอาจเกิดได้จากแบคทีเรียอีกหลายชนิด ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *C. divergens* (Borch, Kant-Muermans and Blixt, 1996; Jay, 2000b)

การควบคุมจุลินทรีย์โดยวิธีการให้ความร้อน

การต้มที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส จัดเป็นการฆ่าเชื้อโดยการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) ซึ่งสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสียที่ทนต่อความร้อนต่ำ เช่น แบคทีเรียที่ไม่สร้าง สปอร์ ยีสต์และรา และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในอาหาร (Fellows, 2000)

การให้ความร้อนจนกระทั่งอุณหภูมิภายในผลิตภัณฑ์มีค่าเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที หรือ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ดังแสดงในตารางที่ 1 จะสามารถทำลาย *Listeria, Salmonella, E.coli, Shigella, Campylobacter, S.. aureus, Yersinia, Vibrio* และเซลล์ของ *B. cereus* และ *C. perfringens* (Richmond, 1991 อ้างถึงใน Briggs and Lennard, 1997)

ตารางที่ 1 สมดุลของอุณหภูมิและเวลาภายในชิ้นอาหารเมื่อให้ความร้อน (cooking internal temperature equivalent) เพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค

อุณหภูมิ	เวลา
60 °C	45 นาที
65 °C	10 นาที
70 °C	2 นาที
75 °C	30 วินาที
80 °C	6 วินาที

ที่มา: ดัดแปลงจาก Richmond (1991) อ้างถึงใน Briggs and Lennard (1997)

Yuste, Pla และ Mor-Mur (2000) ได้ศึกษาการทำลายจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอกไก่ โดยการต้มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงไปมากกว่า 6 log unit นอกจากนี้ยังมีผลทำลาย *Salmonella enteritidis* ลงได้ประมาณ 7 log unit

ในประเทศอังกฤษมีการใช้ความร้อนในการพาสเจอร์ไรส์ โดยกำหนดให้อุณหภูมิตรงจุดกึ่งกลางของอาหารเป็น 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ส่วนในประเทศเนเธอร์แลนด์ได้กำหนดอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แต่อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติ ผู้ประกอบการด้านอาหารมักใช้ระยะเวลาที่ยาวนานกว่าที่กำหนด ทั้งนี้เพื่อให้มั่นใจว่าจะสามารถทำลายแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เช่น แบคทีเรียแลกติก (Brown and Gould, 1992)

การควบคุมจุลินทรีย์โดยการใช้วัตถุกันเสีย

วัตถุกันเสีย คือสารประกอบเคมีหรือส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้ในอาหารเพื่อป้องกันความเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา หลังจากการเก็บเกี่ยววัตถุดิบอาหารนั้นๆ การใช้วัตถุกันเสียเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยในการถนอมหรือยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้ เนื่องจากการเสียของอาหาร ส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร (ศิวาพร ศิวเวชช, 2535)

1. กลไกการต่อต้านจุลินทรีย์ของวัตถุกันเสีย

วัตถุกันเสีย จะยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้โดยการไปควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ หรือไปทำลายส่วนหนึ่งส่วนใดหรือทุกส่วนของเซลล์จุลินทรีย์ ดังที่ Branen (1993) ได้อธิบายถึงกลไกการทำงานของวัตถุกันเสียดังนี้

1.1 ปฏิกิริยาต่อเยื่อหุ้มเซลล์

วัตถุกันเสียมีผลทำให้หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป โดยเยื่อหุ้มเซลล์จะสูญเสียความสามารถ ในการยอมให้อาหารผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ แต่กลับยอมให้องค์ประกอบภายในเซลล์ผ่านออกสู่ภายนอกเซลล์ได้

1.2 ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญ

วัตถุกันเสียจะไปยับยั้งหรือลดทอนประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่สำคัญ ต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญหรือตายลงได้

1.3 ยับยั้งกิจกรรมของสารพันธุกรรม

วัตถุกันเสียมีผลต่อสารพันธุกรรมของเซลล์ เช่น DNA และ RNA ทำให้กระบวนการแบ่งเซลล์หยุดชะงักหรือผิดปกติ

2. คุณสมบัติของวัตถุกันเสียที่ดี

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ (2541) กล่าวถึงคุณสมบัติของวัตถุกันเสียในด้านที่เป็นประโยชน์ดังนี้คือ

2.1 สามารถยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ได้หลายชนิดในความเข้มข้นต่ำ

2.2 ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์

2.3 ไม่เป็นสารที่จะทำให้เกิดการสะสมในเนื้อเยื่อไขมัน

2.4 สามารถละลายน้ำได้ดี หรือในตัวทำละลายอื่น

2.5 มีความคงตัวในผลิตภัณฑ์อาหาร และไม่ไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่เติมในอาหาร หรือส่วนประกอบตามธรรมชาติของอาหาร

2.6 สามารถหาซื้อได้ง่าย และมีราคาถูก

2.7 ไม่มีกลิ่นเหม็นหรือกลิ่นรบกวน

2.8 สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ แล้วเข้าไปทำปฏิกิริยากับสารประกอบภายในเซลล์

3. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของวัตถุกันเสีย

ศิวาพร ศิวเวชช, 2535 และ Branen, 1993 ได้อธิบายคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของวัตถุกันเสีย ที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนี้คือ

3.1 ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายได้ในน้ำและไขมันของวัตถุกันเสีย จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ดังนี้คือ ความสามารถในการรวมตัวได้กับน้ำ จะมีผลในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากน้ำเป็นวัฏภาคที่จุลินทรีย์เจริญได้ ในขณะเดียวกันความสามารถในการละลายได้ในไขมัน จะช่วยทำให้วัตถุกันเสียสามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์

3.2 ความสามารถในการแตกตัวของวัตถุกันเสีย

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารจะมีผลต่อฤทธิ์ของวัตถุกันเสียอย่างมีนัยสำคัญ เพราะจะเป็นดรรชนีบ่งชี้ปริมาณของวัตถุกันเสียที่จำเป็นต้องใช้ในอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุกันเสียชนิดที่เป็นกรด เนื่องจากวัตถุกันเสียประเภทนี้จะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่ออยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว (undissociation form) ดังตัวอย่างที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ร้อยละของกรดอินทรีย์ในรูปที่ไม่แตกตัวในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกัน

กรดอินทรีย์	ร้อยละของกรดอินทรีย์ในรูปที่ไม่แตกตัว ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)				
	3	4	5	6	7
กรดอะซิติก	98.5	84.5	34.9	5.1	0.54
กรดเบนโซอิก	93.5	59.3	12.8	1.44	0.144
กรดซิตริก	53.0	18.9	0.41	0.006	0.001
กรดแลกติก	86.6	39.2	6.05	0.64	0.064
เมธิล, เอทธิล และ โพรพิล พาราเบน	99.99	99.99	99.96	99.66	96.72
กรดโพรพิโอนิก	98.5	87.6	41.7	6.67	3.71
กรดซอร์บิก	97.4	82.0	30.0	4.1	3.48

ที่มา: ดัดแปลงจาก ICMSF(1980) อ้างถึงใน ศิวาพร ศิวเวชช (2535)

3.3 ปฏิกิริยาทางเคมีกับองค์ประกอบของอาหาร

การรวมตัวกันระหว่างวัตถุกันเสียและองค์ประกอบของอาหาร เช่นไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และวัตถุเจือปนอาหารชนิดต่างๆ อาจมีผลในการลดคุณสมบัติด้านการต้านจุลินทรีย์ของวัตถุกันเสีย นอกจากนี้วัตถุกันเสียอาจมีผลต่อรสชาติของอาหาร เช่น กรดซอร์บิก มีคุณสมบัติในการเกิดปฏิกริยา autoxidation ได้ง่าย จึงส่งผลทำให้อาหารมีรสชาติที่ไม่ดี ดังนั้นการประเมินทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้วัตถุกันเสีย จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาด้วย

4. กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต

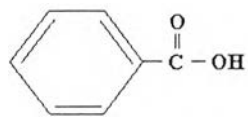
กรดเบนโซอิก (benzoic acid ; benzenecarboxylic acid; phenyl carboxylic acid; phenylformic acid) เป็นวัตถุกันเสียที่เก่าแก่ที่สุดตัวหนึ่ง ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยา และอาหาร ทั้งกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอตต่างเป็นวัตถุกันเสียชนิดแรก ที่ได้รับการรับรองให้ใช้ในอาหารโดยคณะกรรมการอาหารและยาสหรัฐอเมริกา ในธรรมชาติก็อาจพบวัตถุกันเสียนี้ได้ในพืชบางชนิด เช่น ลูกพรุน แคนเบอรี่ อบเชย และกานพลู (Chipley, 1993; World Health Organization, 2000; Davidson, Juneja and Branen, 2002)

4.1 คุณสมบัติทางเคมี

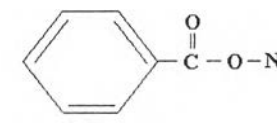
กรดเบนโซอิก มีสูตรเคมี คือ C_6H_5COOH มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 122.13 มีลักษณะเป็นเกล็ดเล็กๆ หรือรูปแท่งคล้ายเข็ม ไม่มีสี ซึ่งจะหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 122 องศาเซลเซียส มีความสามารถในการละลายในน้ำได้น้อย (ร้อยละ 0.27 ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส) (Chipley, 1993; World Health Organization, 2000; Davidson, Juneja and Branen, 2002)

โซเดียมเบนโซเอต มีสูตรเคมีคือ C_6H_5COONa มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 144.11 มีความคงตัว ไม่มีกลิ่น มีลักษณะเป็นแกรนูลสีขาว (white granule) หรือผลึกละเอียดสีขาว ละลายได้ดีในน้ำ(ร้อยละ 66 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส) จึงถูกนำมาใช้มากกว่ากรดเบนโซอิกซึ่งละลายน้ำได้น้อยกว่า (Chipley, 1993; World Health Organization, 2000; Davidson, Juneja and Branen, 2002)

โครงสร้างทางเคมีของกรดเบนโซอิก และโซเดียมเบนโซเอตดังแสดงในภาพที่ 1



Benzoic Acid



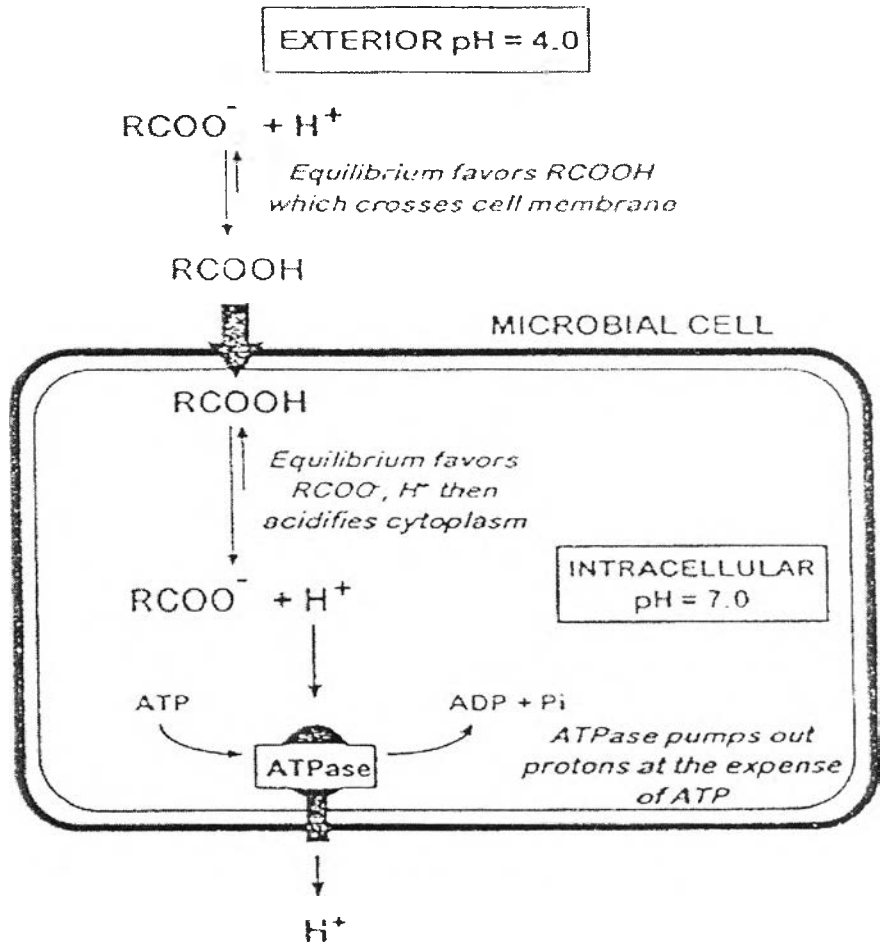
Sodium Benzoate

ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต

ที่มา: Chipley (1993)

4.2 กลไกการออกฤทธิ์

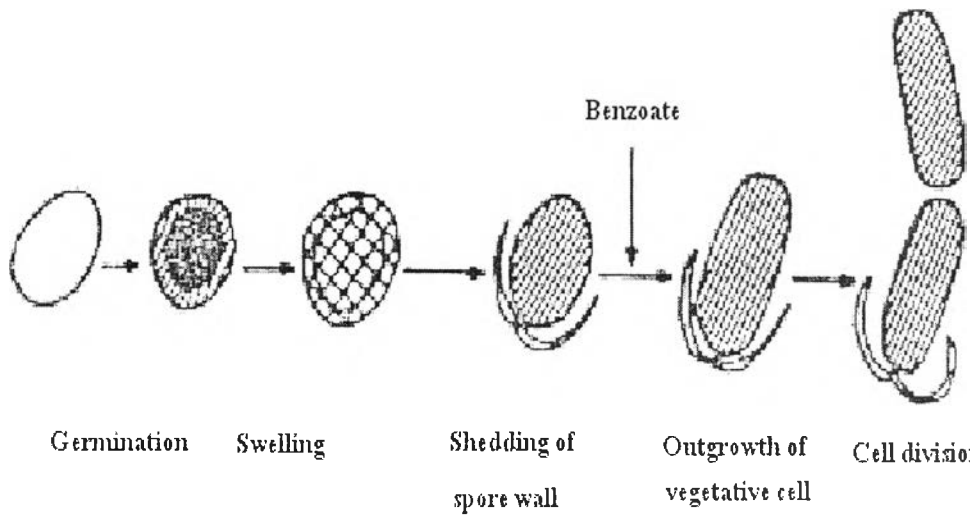
ฤทธิ์การต่อต้านจุลินทรีย์ของกรดเบนโซอิกยังไม่ชัดเจน แต่พออธิบายได้ว่ากลไกการออกฤทธิ์จะคล้ายกันกับกรดอินทรีย์ตัวอื่นๆ คือ กรดเบนโซอิกจะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ในรูปกรดที่ไม่แตกตัว จากนั้นจึงแตกตัวภายในเซลล์ ทำให้เซลล์มีสภาพความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้จุลินทรีย์ต้องปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในสภาวะสมดุลย์ ซึ่งต้องใช้พลังงานจำนวนหนึ่งในการผลักดันกลไกทางชีวเคมี เพื่อกำจัดไฮโดรเจนอิออน (H^+) ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง (Davidson, 1997; Jay, 2000c) ดังแสดงในภาพที่ 2 หรือไปรบกวนระบบการผ่านเข้าออกของสารตรงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Jay, 2000c; Davidson, Juneja and Branen, 2002)



ภาพที่ 2 กลไกการออกฤทธิ์ของกรดเบนโซอิกภายในเซลล์ของจุลินทรีย์

ที่มา: Davidson (1997)

นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นในปฏิกิริยาเคมีของกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์ของแบคทีเรีย เช่น oxidative phosphorylation, α- ketoglutarate และ succinate dehydrogenase ในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) การสร้างเอนไซม์ไลเปสของ *Pseudomonas fluorescens* หรือ Trimethylamine- N-oxide reductase ของ *E. coli* ส่วนในเซลล์ของรา จะมีผลยับยั้งการสร้างสารพิษอฟลาทอกซิน (aflatoxin) ของ *Aspergillus flavus* หรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 6-phosphofructokinase (Davidson, Juneja and Branen, 2002) และยังมีรายงานว่าเบนโซเอต มีความสามารถในการรบกวนการงอกของสปอร์อีกด้วย (Gould, 1964 อ้างถึงใน Jay, 2000) ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แผนภูมิการระงับการงอกของเอนโดสปอร์เมื่อใช้โซเดียมเบนโซเอตในปริมาณที่ต่ำที่สุด

ที่มา: ดัดแปลงจาก Gould (1964) อ้างถึงใน Jay (2000)

4.3 ความสามารถในการต่อต้านจุลินทรีย์

ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต จะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่ออยู่ในรูปของกรดที่ไม่แตกตัว คือเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มี ความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 2.5-4.0 และเมื่อความเป็นกรด-ด่าง มีค่าสูงกว่า 4.5 ประสิทธิภาพก็จะลดลง โดยที่ยีสต์และราจะถูกยับยั้งด้วยกรดเบนโซอิกในปริมาณ 20-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.0

แบคทีเรียบางชนิดที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ จะถูกยับยั้งด้วยกรดเบนโซอิกในปริมาณ 1,000-2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่การควบคุมแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียจำเป็นต้องใช้ปริมาณกรดเบนโซอิกมากกว่า ที่ใช้ควบคุมแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ (Chipley, 1993)

ความเข้มข้นต่ำที่สุดของกรดเบนโซอิกที่มีผลยับยั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 3 -5

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดเบนโซอิกที่มีผลยับยั้งแบคทีเรีย

แบคทีเรีย	ค่าความเป็นกรด-ด่าง/ อุณหภูมิ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
Bacillus cereus	6.3	500
Lactobacillus	4.3-6.0	300-1,800
Listeria monocytogenes	5.6, 4 °C; 5.6, 21°C	2,000; 3,000
Micrococcus	5.5-5.6	50-100
Streptococcus	5.2-5.6	200-400
Escherichia coli	5.2-5.6	50-120
Pseudomonas	6.0	200-480

ที่มา: ดัดแปลงจาก Davidson, Juneja และ Branen (2002)

สำนักวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดเบนโซอิกที่มีผลยับยั้งรา

รา	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
Aspergillus	3.0-5.0	20-300
Byssochamys nivea	3.3	500
Cladosporium herbarum	5.1	100
Mucor racemosus	5.0	30-120
Penicillium	2.6-5.0	30-280
Penicillium citrinum	5.0	2,000
Penicillium glaucum	5.0	400-500
Rhizopus nigricans	5.0	30-120

ที่มา: ดัดแปลงจาก Davidson, Juneja และ Branen (2002)

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดเบนโซอิกที่มีผลยับยั้งยีสต์

ยีสต์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
Candida krusei	-	300-700
Debaryomyces hansenii	4.8	500
Hansenula	4.0	180
Pichia membranefaciens	-	700
Rhodotorula	-	100-200
Saccharomyces bayanus	4.0	330
Zygosaccharomyces bailii	4.8	4,500
Zygosaccharomyces rouxii	4.8	1,000

ที่มา: ดัดแปลงจาก Davidson, Juneja และ Branen (2002)

4.4 ผลการใช้โซเดียมเบนโซเอตในอาหาร

4.4.1 ผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดสูง

Chung, Jorgensen และPrice (1988) ได้ศึกษาผลของโซเดียมเบนโซเอตในซอสเม็กซิกัน (Mexican-style sauce) ซึ่งมีความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 3.7-3.95 โดยการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 63 71 และ 79 องศาเซลเซียส ร่วมกับการเติมโซเดียมเบนโซเอตปริมาณ 700 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส นาน 96 วัน พบว่าการเติมโซเดียมเบนโซเอตร่วมกับการให้ความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ มีผลต่อการลดปริมาณจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ได้ให้ความร้อน

Fisher และ Golden (1998) ศึกษาในน้ำแอปเปิล (apple cider) โดยการเติมเชื้อ *E. coli* O157:H7 ปริมาณ 7 log CFU/ml ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมโซเดียมเบนโซเอต และเติมโซเดียมเบนโซเอตปริมาณ ร้อยละ 0.045 แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 10 และ 25 องศา

เซลเซียส พบว่า *E. coli* O157:H7 สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมโซเดียมเบนโซเอต เป็นเวลานานถึง 18 18 และ 3 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่เติมโซเดียมเบนโซเอตกลับตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าว เมื่อเก็บไว้นาน 9 12 และ 2 วัน ตามลำดับ ผลการศึกษาดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับรายงานของ Comes และ Beelman (2002) ที่อ้างว่า การเติมโซเดียมเบนโซเอตร้อยละ 0.05 ในน้ำแอปเปิลที่ปรับความเป็นกรด-ด่าง เป็น 3.3 จะสามารถลดปริมาณ *E coli* O157:H7 ลงได้ 5 log unit เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

Dock, Floros และ Linton (2000) ได้ศึกษาผลของโซเดียมเบนโซเอตต่อการทนทานต่อความร้อน (D value) ของ *E.coli* O157:H7 ในผลิตภัณฑ์น้ำแอปเปิลที่ปรับ ความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 3.1 พบว่า D_{50} ของ *E.coli* O157:H7 จะลดลงจาก 7 นาที เป็น 0.3 นาที ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่มีการเติมโซเดียมเบนโซเอต จะมีค่า D_{50} สูงถึง 65 นาที

Masuda, Hara-Kudo และ Kumagai (1998) ได้ศึกษาผลของโซเดียมเบนโซเอตต่อการลดจำนวน *E.coli* O157:H7 ที่เติมลงในซอสถั่วเหลือง ซึ่งมีส่วนผสมของเกลือ ร้อยละ 10 หรือ 16 เอธานอล ร้อยละ 5 ใช้กรดแลกติกหรือกรดอะซิติก เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 4.5 โดยทำการเติมโซเดียมเบนโซเอตปริมาณ 600 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ลงในซอสถั่วเหลือง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 9 วัน พบว่า *E. coli* O157:H7 จะลดปริมาณลงอย่างรวดเร็วในตัวอย่างที่เติมโซเดียมเบนโซเอต เมื่อเริ่มเข้าสู่วันที่ 3 ของการเก็บรักษา

4.4.2 ผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดต่ำ

Kasrazadeh และ Genigeorgis (1994) ศึกษาผลของการเติมโซเดียมเบนโซเอตปริมาณร้อยละ 0.3 ต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของ *Salmonella* ในเนยแข็งชนิดหนึ่ง (Hispanic type soft cheese) ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.6 ที่บรรจุแบบสุญญากาศ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8 10 12 16 20 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน พบว่าการเติมโซเดียมเบนโซเอตมีผลยืดระยะเวลาการเจริญของ *Salmonella* ออกไปได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้เติมโซเดียมเบนโซเอต แต่อย่างไรก็ตามหากเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงกว่า 12 องศาเซลเซียส ก็จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้

Hwang และ Beuchat (1995a) ศึกษาผลของการใช้สารละลายโซเดียมเบนโซเอตร่วมกับสารละลายกรดแลกติกต่อการฆ่าเชื้อโรค และเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของหนังไก่ โดยการเติมเชื้อ *Salmonella, L. monocytogenes, C. jejuni* และ *S. aureus* ประมาณ 10^3 CFU/ml ลงในหนังไก่ แล้วแช่ด้วยสารละลายผสม 2 ชนิด คือสารละลายผสมระหว่างกรด

แลกติกร้อยละ 0.3 และโซเดียมเบนโซเอตร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 30 นาที และสารละลายผสมระหว่างกรดแลกติกร้อยละ 0.5 และโซเดียมเบนโซเอตร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน พบว่าการใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับโซเดียมเบนโซเอตในสัดส่วนดังกล่าว สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคที่ศึกษาได้ และยังควบคุมแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrotrophs bacteria) ได้ในช่วงเวลาการเก็บรักษา 16 วัน ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรียชนิดนี้สูงขึ้นถึง 4 log CFU/cm^2 เมื่อเก็บไว้ 2 วัน

Kasrazadeh และ Genigeogis (1995) ศึกษาผลการเติมโซเดียมเบนโซเอตปริมาณร้อยละ 0.3 ต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของ *E.coli* O157:H7 ในเนยแข็งชนิดหนึ่ง (Hispanic type soft cheese) ซึ่งบรรจุแบบสุญญากาศ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8 10 12 16 20 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน พบว่าการเติมโซเดียมเบนโซเอต จะมีผลต่อการยืดระยะเวลาการเจริญของ *E.coli* O157:H7 ออกไป เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้เติมโซเดียมเบนโซเอต แต่อย่างไรก็ตามการเติมโซเดียมเบนโซเอตร้อยละ 0.3 ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 16 องศาเซลเซียส จะมีผลยับยั้งการเติบโตของ *E.coli* O157:H7 ในขณะที่หากไม่เติม โซเดียมเบนโซเอต จะต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 8 องศาเซลเซียส จึงจะมีผลในการยับยั้งการเติบโตของ *E.coli* O157:H7 ได้

Hwang และ Beuchat (1995b) ศึกษาผลของการใช้โซเดียมเบนโซเอตกับกรดแลกติกในการฆ่าเชื้อโรคและเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของไก่ดิบ โดยการเติมเชื้อ *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *C. jejuni, S. aureus* และ *E. coli* แล้วล้างด้วยสารละลายผสมระหว่างกรดแลกติกร้อยละ 0.5 และโซเดียมเบนโซเอตร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 30 นาที แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน พบว่าการใช้กรดแลกติกร่วมกับโซเดียมเบนโซเอตมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญเติบโตของ *Salmonella, C. jejuni* และ *E. coli* O157:H7 แต่จะมีประสิทธิภาพต่ำต่อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* นอกจากนี้ยังมีผลป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวกที่ชอบอุณหภูมิต่ำอีกด้วย

Efiuvwevwere และ Ajiboye (1996) ศึกษาการใช้โซเดียมเบนโซเอตร่วมกับการรมควัน ในการยืดอายุการเก็บรักษาปลาดุก โดยการจุ่มปลาดุกที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.08-6.65 ในสารละลายโซเดียมเบนโซเอตเข้มข้นร้อยละ 0.2 หรือ 0.4 เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงนำไปรมควันก่อนเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 วัน พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 4 วัน ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่จุ่มด้วยโซเดียมเบนโซเอต

Samelis และคณะ (2001) ได้ศึกษาผลของการจุ่มไส้กรอกโบลอกน่าในสารละลายโพแทสเซียมเบนโซเอต ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ต่อการเปลี่ยนแปลง

ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ซึ่งถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์หลังจากการหั่น พบว่า การจุ่มชิ้นไส้กรอกโบลอกน่า ลงในโพแทสเซียมเบนโซเอต สามารถควบคุมปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ ในช่วงเวลาการเก็บรักษานาน 120 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาพการบรรจุแบบสุญญากาศ

Ismail และคณะ (2001) ได้ศึกษาผลของการจุ่มปีกไก่ดิบด้วยสารละลายผสมระหว่างกรดแลกติกร้อยละ 2 และโซเดียมเบนโซเอตร้อยละ 0.2 0.4 และ 0.8 ต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อยีสต์ *Yarrowia lipolytica* ซึ่งเป็นสาเหตุการเน่าเสียของไก่ดิบ พบว่าสารละลายดังกล่าวสามารถลดปริมาณ *Y. lipolytica* และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดได้

Islam และคณะ (2002) ศึกษาผลของการสเปรย์สารละลายโซเดียมเบนโซเอตเข้มข้นร้อยละ 15 20 และ 25 ต่อการเติบโตของ *L. monocytogenes* บนชิคเคนลันชันมีท (chicken luncheon meat) ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 13 และ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าการใช้โซเดียมเบนโซเอตจะทำให้ปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* เริ่มต้นมีค่าลดลงระหว่าง 0.78-1.32 log CFU/g และเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะสามารถควบคุมปริมาณเชื้อดังกล่าวได้ดี ในขณะที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส จะให้ผลในการควบคุมปริมาณเชื้อที่ด้อยกว่า สำหรับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส จะไม่ให้ผลในการควบคุมปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes*

เนาวรัตน์ หน่อแก้ว (2542) ศึกษาผลของเบนโซเอตในการยืดอายุการเก็บหมูบดที่อุณหภูมิห้อง โดยการเติมโซเดียมเบนโซเอตลงในหมูบดปริมาณแตกต่างกัน พบว่าการใช้โซเดียมเบนโซเอตปริมาณ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะสามารถควบคุมจำนวนเชื้อให้อยู่ในมาตรฐานได้นาน 6 ชั่วโมง โซเดียมเบนโซเอต 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถควบคุมได้นาน 4 ชั่วโมง แต่ปริมาณ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ไม่ให้ผลการเก็บรักษาแตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยไม่สามารถควบคุมจำนวนเชื้อให้อยู่ในมาตรฐานได้

4.5 ผลการใช้โซเดียมเบนโซเอตต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

Efiuvwevwere และ Ajiboye (1996) ได้ทำการประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสของปลารมควัน ที่จุ่มด้วยสารละลายโซเดียมเบนโซเอตเข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.4 พบว่า การใช้โซเดียมเบนโซเอตในความเข้มข้นดังกล่าว ไม่มีผลกระทบต่อคุณลักษณะด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์

Hathcox และคณะ (1995) ได้ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของไก่ทอด ที่จุ่มด้วยสารละลายผสมระหว่างกรดแลกติกเข้มข้นร้อยละ 0.5 และโซเดียมเบนโซเอตร้อยละ 0.05 เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปทอด พบว่า การใช้สารละลายดังกล่าว ไม่มีผลต่อสีภายนอก เนื้อสัมผัส รสชาติ และการยอมรับโดยรวมของไก่ทอด

Comes และ Beelman (2002) รายงานว่าการเติมโซเดียมเบนโซเอตร้อยละ 0.05 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในน้ำแอปเปิลจะได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม

เนาวรัตน์ หน่อแก้ว (2542) ได้อ้างถึงผลการทดลองของการยอมรับด้านประสาทสัมผัส ของผลิตภัณฑ์หมูบดเมื่อมีการเติมโซเดียมเบนโซเอตในปริมาณ 250-1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างควบคุม

4.6 ปริมาณกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอตที่ใช้ในอาหาร

ในต่างประเทศ กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตจะอนุญาตให้ใช้ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน สำหรับประเทศสหรัฐอเมริกาได้กำหนดให้ใช้ในปริมาณ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และในสหภาพยุโรปอนุญาตให้ใช้ได้ในปริมาณ 150-5,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (World Health Organization, 2000)

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2527) ได้กำหนดปริมาณสูงสุดของกรดเบนโซอิกในอาหารบางชนิด ได้แก่ อาหารประเภทเครื่องดื่ม ใช้ได้ไม่เกิน 200 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม (ร้อยละ 0.02) ส่วนในอาหารประเภทแตงกวาดอง เนยเทียม มะกอกดอง แยม และเยลลีใช้ได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (ร้อยละ 0.1)

4.7 ความเป็นพิษของกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต

กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำต่อมนุษย์และสัตว์ Sax (1979) อ้างถึงใน Davidson, Juneja และ Branen (2002) ได้รายงานว่าปริมาณของโซเดียมเบนโซเอตที่จะเกิดพิษในมนุษย์ด้วยวิธีฉีดใต้ผิวหนังคือ 6 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แต่ในทางกลับกันการบริโภคโซเดียมเบนโซเอตปริมาณ 5-10 กรัม ติดต่อกันเป็นเวลาหลายวัน กลับไม่มีผลข้างเคียงต่อสุขภาพ (Dakin, 1909 อ้างถึงใน Davidson, Juneja and Branen, 2002)

การเกิดพิษแบบเฉียบพลันทั้งในสัตว์และมนุษย์พบว่าอยู่ในเกณฑ์ต่ำ ในหนู ค่า LD_{50} จะมากกว่า 1,940 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในแมวจะมีค่าประมาณ 450 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในมนุษย์ทั้งกรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต จะเป็นสาเหตุของการเกิด

โรคภูมิแพ้เทียม (pseudo allergy) ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการเป็นผื่น หรือหอบ (World Health Organization, 2000)

การศึกษาระยะสั้นในหนู พบว่าความผิดปกติต่อระบบประสาทส่วนกลาง จะเกิดขึ้นหลังจากการกินกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอตในปริมาณสูงตั้งแต่ 1,800 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลานานกว่า 5-10 วัน (World Health Organization, 2000)

การศึกษาระยะยาวในหนูทดลอง พบว่ากรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอตในปริมาณร้อยละ 1 ของอาหารที่ให้กิน ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ และวงจรชีวิต (Kiekebusch และ Lang, 1960 อ้างถึงใน World Health Organization, 2000) นอกจากนี้รายงานจากการศึกษาในหนู เมื่อได้รับสารดังกล่าวในปริมาณร้อยละ 1-2 ต่อปริมาณอาหารที่กินเข้าไปเป็นเวลา 18-24 เดือน พบว่า ไม่มีผลก่อให้เกิดมะเร็ง (Sodemoto และ Enomoto, 1980 อ้างถึงใน Davidson, Juneja and Branen, 2002) ดังนั้นจึงอาจกล่าวในขณะนี้ได้ว่าโซเดียมเบนโซเอตและกรดเบนโซอิก ไม่น่าจะเป็นสารก่อมะเร็งหรือก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (World Health Organization, 2000; Njagi and Gopalan, 1980 อ้างถึงใน Davidson, Juneja and Branen, 2002) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่ว่ากรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต เป็นสารที่มนุษย์และสัตว์มีกลไกสำหรับกำจัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยการเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของกรดฮิปพิวริก (hippuric acid) หรือกรดเบนโซอิว-กลูคิวโรนิก (benzoyl glucuronic acid) แล้วถูกขับออกทางปัสสาวะ (Chipley, 1993)

หลักการผลิตหมูยอ

หมูยอเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปประเภทอิมัลชั่นชนิดหนึ่ง ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับไส้กรอกชนิดบดละเอียด โดยที่หมูยอและไส้กรอกต่างก็เป็นตัวอย่างของอิมัลชั่นชนิดไขมันในน้ำ โดยไขมันเป็นวัฏภาคกระจาย (disperse phase) น้ำและตัวถูกละลายต่างๆ เป็นวัฏภาคต่อเนื่อง (continuous phase) โปรตีนไมโอซินที่ถูกสกัดให้ละลาย (solubilize) ออกมาจากเส้นใยกล้ามเนื้อในระหว่างขั้นตอนการบดผสม จะทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ส่งผลให้น้ำรวมตัวเข้ากับไขมัน (Food and Agriculture Organization of the United Nation, 1985; ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529ก; เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536; สัญชัย จตุรสิทธา, 2543)

1. สูตรและกรรมวิธีการผลิตหมูยอ

ในอดีตผู้ผลิตหมูยอจะมีการใช้ส่วนผสมของเนื้อหมูและเนื้อวัวในสูตร แต่ในช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา หมูยอจะผลิตขึ้นจากเนื้อหมูแต่เพียงอย่างเดียว ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากพฤติกรรมในการบริโภคเนื้อสัตว์ของผู้บริโภคได้เปลี่ยนแปรไป โดยจะหันเหความ

สนใจไปสู่การบริโภคเนื้อหมู หรือเนื้อไก่ มากกว่าเนื้อวัว (กิตติ ลิ่มสกุล บุญมี สัญญสุจจารี และนิทรา กิตติสมุทร์, 2540) หมูยอที่ผลิตในประเทศไทยถึงแม้จะมีส่วนผสมที่คล้ายคลึงกัน คือ มีเนื้อหมูและ/หรือเนื้อวัว ไขมัน และเครื่องปรุงรสอื่นๆ แต่คุณสมบัติด้านประสาทสัมผัสของหมูยอ ในแต่ละจังหวัดจะแตกต่างกัน ทั้งในด้านสี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัส (ทิพย์วรรณ ประสิทธิ์ล้ำคำ, 2518 อ้างถึงในศรัณยา เปียแดง, 2528) สูตรและกรรมวิธีการผลิตหมูยออาจมีได้แตกต่างกันดังตัวอย่างรายงานผลการศึกษาดังต่อไปนี้ คือ

ทิพย์วรรณ ประสิทธิ์ล้ำคำ (2518) อ้างถึงในศรัณยา เปียแดง(2528)ได้อธิบายวิธีการทำหมูยอ โดยเริ่มจากการซื้อเนื้อหมูจากตลาดสดในตอนเช้ามืด แล้วนำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง จากนั้นนำเนื้อหมูมาแล่พังผืดออก แล้วหั่นหมูให้ได้ขนาดประมาณ 2 นิ้ว มีน้ำหนักรวม 2 กิโลกรัม นำไปบดแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น ต่อจากนั้นทำการบดไขมันหนัก 0.6 กิโลกรัม แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นเช่นเดียวกัน เตรียมส่วนผสมหมูยอซึ่งประกอบด้วย น้ำปลา 120 มิลลิลิตร พริกไทย 6 กรัม หอม 1.2 กรัม ผงชูรส 5 กรัม ฟอสเฟต 6 กรัม นำมาสับผสมโดยดำเนินตามขั้นตอนดังนี้คือ ครั้งแรกสับผสมเนื้อหมูประมาณ 10 นาที แล้วค่อยๆ เติมส่วนผสมลงไปสับรวมกับเนื้อหมู สักครู่จึงเติมไขมันลงไปทีละน้อยในเครื่องสับผสม พร้อมทั้งเติมน้ำแข็งป่นเพื่อควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกินไปขณะสับผสม ใช้เวลาทั้งหมดในการสับผสมประมาณ 45 นาที นำส่วนผสมที่ได้มาใส่ถุงโพลีเอทธีลีนแล้วห่อด้วยใบตอง ก่อนนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส

รสริน ว่องวิไลรัตน์ (2528) ได้กล่าวถึงวิธีการทำหมูยอดังนี้คือ นำเนื้อ และไขมันที่บดละเอียดแล้ว ใส่ในเครื่องผสมละเอียดพร้อมกับเครื่องปรุง ทำการบดผสมนาน 5 นาที แล้วจึงนำมาบรรจุลงในพิมพ์ตามขนาดที่ต้องการ นำไปนึ่งนาน 1 ชั่วโมง หมูยอดังกล่าวจะมีส่วนประกอบคือ เนื้อวัว 10 กิโลกรัม เนื้อไก่ 2 กิโลกรัม ไขมัน 2 กิโลกรัม เกลือ 2 ขีด น้ำตาล 2 ขีด พริกไทย 1 ขีด และผงชูรส 1 ขีด

ทัศนีย์ ชาเจียมเจน (2545) รายงานการทำหมูยอ ดังนี้ สับนวดเนื้อหมูด้วยเครื่องสับนวดจนละเอียดและเข้ากันดี ใส่น้ำแข็งสลับกับเครื่องปรุงรสทั้งหมดแล้วจึงใส่มันแข็งสับนวดต่อให้เข้ากัน บรรจุโดยอัดเป็นแท่ง นำไปนึ่งนาน 45 นาที แล้วจึงทำให้เย็น โดยสูตรที่ใช้ประกอบด้วยเนื้อหมู ร้อยละ 63.15 มันแข็ง ร้อยละ 15.79 น้ำแข็ง ร้อยละ 15.79 เครื่องปรุงและเครื่องเทศ ร้อยละ 3.38 และเกลือร้อยละ 1.89

มหาวิทยาลัยมหิดล, สถาบันวิจัยโภชนาการ และสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2545) ได้สุ่มสำรวจสถานประกอบการผลิตหมูยอในภาคเหนือ 3 แห่งและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 28 แห่งรวมทั้งสิ้น 31 แห่ง พบว่าผู้ประกอบการใช้กรรมวิธีการผลิตหมูยอดังนี้ ใช้เนื้อหมูส่วนที่เป็นขาหลัง สันใน หรือสันนอก โดยทั่วไปใช้เนื้อที่ได้ภายหลังจากการฆ่าทันที (prerigor

mortis) นำเนื้อหมูมาตัดแต่งแยกเอาส่วนที่เป็นเอ็นหรือมันเปลวออก นำไปหั่นให้มีขนาดเล็กลง แล้วจึงนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ส่วนมันหมูใช้เฉพาะส่วนที่เป็นมันแข็ง นำมาตัดแต่งจะนำไปใช้ได้เลยหรือหมักเกลือเก็บไว้ใช้ในวันต่อไปก็ได้ นำมาต้มหรือลวกในน้ำเดือดแล้วจึงแช่เย็น นำเนื้อหมู มันหมูและส่วนผสมทั้งหมดได้แก่น้ำแข็ง เกลือ น้ำตาล พริกไทย ผงชูรส น้ำปลา ฟอสเฟต เบนโซเอต (benzoate) ผู้ประกอบการบางรายมีการเติมแป้งมัน แป้งข้าวจ้าว แป้งสาลี แป้งดัดแปร (modified starch) โปรตีนจากถั่วเหลือง หอมแดง ผักชี เห็ดหอมเข้าไปด้วย มาสับผสมรวมกันในเครื่องสับผสมจนเหนียวเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำเนื้อที่สับผสมแล้วมาห่อด้วยใบตองหรือพลาสติกแล้วหุ้มด้วยใบตองอีกชั้นหนึ่ง หรือบรรจุเนื้อในถุงพลาสติกที่สวมอยู่ในบล็อกโลหะ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15-30 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดและปริมาณหมูยอในหม้อต้ม แล้วจึงทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องหรือใช้น้ำราด แล้วนำไปผึ่งจนแห้ง

2. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของหมูยอ

2.1 คุณภาพของเนื้อที่นำมาผลิต

เนื้อที่เหมาะแก่การทำผลิตภัณฑ์พวกอิมัลชั่นคือ เนื้อที่มีคุณภาพปกติ กล่าวคือต้องเป็นเนื้อที่มีความเป็นกรด-ด่างลดต่ำลงอย่างสม่ำเสมอ อันเนื่องมาจากกรดแลกติกที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลายไกลโคเจน (glycogen) ภายหลังจากที่สัตว์ถูกฆ่า ทำให้ความเป็นกรด-ด่างของกล้ามเนื้อค่อยๆ ลดลงมา โดยปกติขณะที่สัตว์มีชีวิตอยู่ กล้ามเนื้อจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 แต่เมื่อสัตว์ตายลงค่าความเป็นกรด-ด่างจะค่อยๆ ลดลงจนถึง 5.6- 5.7 ภายใน 6-8 ชั่วโมง และประมาณ 24 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงถึง 5.3 –5.7

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของกล้ามเนื้อมีความสำคัญอย่างมากต่อผลิตภัณฑ์ เมื่อความเป็นกรด-ด่าง มีค่าระหว่าง 5.4-6.2 โปรตีนแอกติน (actin) และ ไมโอซิน (myosin; myofibrillar protiens) ในกล้ามเนื้อ ซึ่งละลายได้ดีในเกลือแกง (NaCl) จะถูกสกัดออกจากเส้นใยกล้ามเนื้อได้ดีที่สุด ซึ่งมีผลต่อความชุ่มฉ่ำ (juiciness) ของเนื้อ เมื่อความเป็นกรด-ด่าง มีค่าระหว่าง 6.0-6.5 โปรตีนจะทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ได้ดีที่สุด ดังนั้นการทำผลิตภัณฑ์จึงไม่ควรใช้เนื้อที่เก็บไว้นาน (aging) เพราะจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงต่ำจนเกินไป และมีผลต่อรสชาติ และคุณภาพของเนื้อ (Kramlich, Pearson and Tauber, 1980; ทัศนีย์ สุพจนาพรชัย, 2530; เพ็ญศรี จูงศิริวัฒน์ และ สมพิศ ชูแสงจันทร์, 2537)

2.2 การอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity : WHC)

การอุ้มน้ำของเนื้อ คือ ความสามารถของเนื้อที่ยึดหรืออุ้มน้ำที่มีอยู่ตามธรรมชาติในเนื้อหรือน้ำที่เติมเข้าไปในเนื้อไว้ได้ ในระหว่างที่มีแรงจากภายนอกมากระทำต่อก้อนเนื้อ ซึ่งได้แก่ ความดัน ความร้อน การบด เป็นต้น ดังนั้น WHC จึงมีผลโดยตรงต่อความนุ่ม ความชุ่มฉ่ำ และความโอชารสของเนื้อ

โปรตีนแต่ละชนิดมีความสามารถในการยึด (binding) น้ำได้แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการดูดน้ำกลับคืนของโปรตีน โดยทั่วไปโปรตีน 1 กรัม จะยึดกับน้ำได้ประมาณ 0.2-0.5 กรัม ความสามารถในการยึดน้ำขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อ หากเนื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 5.0-5.4 ซึ่งอยู่ในช่วง isoelectric point ของโปรตีน จะทำให้คุณสมบัติการอุ้มน้ำต่ำ การเติมเกลือต่างๆ เช่น เกลือแกง สารประกอบฟอสเฟต (phosphate compounds) จะทำให้เกิดประจุไฟฟ้า (ionization) ซึ่งส่งผลให้โปรตีนมีประจุไฟฟ้าเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจน ซึ่งสามารถยึดโมเลกุลของน้ำไว้ได้ และยังขึ้นอยู่กับการสลายตัวของโปรตีน (proteolysis) ซึ่งเกิดจากการใช้ความร้อน หรือใช้เอนไซม์จากธรรมชาติ หรือจากเชื้อจุลินทรีย์ หรือการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง นอกจากนี้ยังขึ้นกับขบวนการทางชีวเคมีซึ่งเกิดในช่วง rigor mortis ทำให้มีการปลดปล่อย Mg^{++} และ Ca^{++} ออกมารวมกับประจุของโปรตีน ทำให้จำนวนประจุบนโปรตีนที่จะยึดน้ำไว้ได้ลดลง (Paul and Palmer, 1972; ชัยณรงค์ ดันธพนิต, 2529ข; เพ็ญศรี จูงศิริวัฒน์ และสมพิศ ชูแสงจันทร์, 2537)

2.3 โปรตีนในเนื้อ

โปรตีนในเนื้อมีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการยึดเกาะน้ำและการสร้างอิมัลชั่น โปรตีนในเนื้อสัตว์ชนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ได้แก่ คอลลาเจน (coliagen) หากโดนความร้อนก็จะเปลี่ยนรูปไปเป็นวุ้น ซึ่งมีความสามารถในการยึดเกาะน้ำต่ำมาก จึงไม่ค่อยมีประโยชน์ในการทำผลิตภัณฑ์พวกอิมัลชั่น ส่วนโปรตีนที่ได้จากกล้ามเนื้อพวกไมโอไฟบริล (myofibril) จะถูกสกัดหรือละลายออกมาจากเนื้อสัตว์ โดยเกลือหรือน้ำเกลือ และกรรมวิธีการบด การสับ การนวด โดยที่ แอกติน และ ไมโอซิน ที่ละลายหรือถูกสกัดออกมา จะทำให้เกิดลักษณะเป็น solubilized protein sol หรือ paste และเมื่อนำไปให้ความร้อน sol จะเปลี่ยนไปเป็นร่างแหเจลที่มีโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนเป็นรูปตาข่าย (actomyosin network) ส่งผลทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อมีความยืดหยุ่นและรวมตัวกันเป็นเนื้อเดียวกัน (Kramlich, Pearson and Tauber, 1980: เพ็ญศรี จูงศิริวัฒน์ และสมพิศ ชูแสงจันทร์, 2537)

2.4 ไขมัน

ไขมันเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ เนื่องจากช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติที่ดีมีความอร่อย ปริมาณของไขมันมีผลต่อความนุ่มและลักษณะชุ่มฉ่ำของ ผลิตภัณฑ์ และนอกจากนั้นไขมันยังทำหน้าที่เป็นวัฏภาคกระจายในอิมัลชั่นอีกด้วย (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529ก)

2.5 ชนิดและจำนวนของส่วนผสมอื่น

2.5.1 สารประกอบฟอสเฟต (phosphate compound)

การเติมสารประกอบฟอสเฟตทำให้แอกโตไมโอซิน (actomyosin) แยกออกเป็นแอกติน และ ไมโอซิน ซึ่งมีผลดีต่อการสร้างอิมัลชั่น เนื่องจากมีอิมัลซิไฟเออร์ ในระบบมากขึ้น อันส่งผลให้ระบบอิมัลชั่นดีขึ้นกว่าเดิม เพิ่มความคงตัวของอิมัลชั่น นอกจากนี้การใช้สารฟอสเฟตยังช่วยให้เนื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่าง สูงกว่าเดิม ประมาณ 0.5 จึงทำให้โปรตีนสามารถจับน้ำได้ดีขึ้น และยังช่วยป้องกันการเกิดกลิ่นเหม็นหืน ซึ่งเกิดจากการออกซิเดชั่นของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529ก)

2.5.2 เกลือแกง

เกลือแกงที่ใช้ในการแปรรูปเนื้อสัตว์ ต้องเป็นเกลือที่มีความสะอาด ดังนั้นจึงนิยมใช้เกลือสินเธาว์ที่ปราศจากโลหะมากกว่าเกลือสมุทร เนื่องจากเกลือสมุทรอาจมีแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม (halophilic bacteria) และมีอนุมูลของสารพวกแคลเซียม แมกนีเซียมซึ่งมีผลต่อการดูดซึมน้ำของเกลือ ทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง ส่วนโลหะหนัก เช่น ทองแดง ถ้ามีอยู่ในเกลือก็จะมีผลเร่งปฏิกิริยาการหืนของไขมัน แต่ถ้าเกลือสมุทรได้ผ่านขบวนการกำจัดสิ่งไม่พึงประสงค์ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ก็สามารถนำมาใช้ในการผลิตได้

เกลือมีผลต่อการลดน้ำในผลิตภัณฑ์และทำให้เกิดแรงดันออสโมติค (osmotic pressure) เปลี่ยนไป ค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity) ลดลง จึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และป้องกันการเน่าเสีย นอกจากนี้เกลือยังช่วยเพิ่มรสชาติให้แก่ผลิตภัณฑ์ แต่ถ้าหากใส่มากเกินไป จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสไม่นุ่มนวล และสีของเนื้อแดง มีสีดำ ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์เหี่ยวย่น ไม่เป็นที่พึงปรารถนาของผู้บริโภค (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)

2.5.3 แป้ง

แป้งมีส่วนช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัส เพื่อเพิ่มความเหนียว ยืดหยุ่น และช่วยลดต้นทุนการผลิตของอาหารที่ผ่านการทำให้สุก เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

ของแป้งในระหว่างการทำให้สุก (gelatinization) แป้งแต่ละชนิดจะให้ความแข็งแรงของเจลแตกต่างกัน เช่น แป้งมันฝรั่งและแป้งมันสำปะหลัง จะให้เนื้อสัมผัสและการพองตัวที่ดี (Meyer, 1973; ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529ก)

2.5.4 น้ำ

น้ำในผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบ แต่อย่างไรก็ตามก็อาจมีการเติมน้ำเข้าไปในกระบวนการผลิตในรูปของน้ำแข็ง เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีความชุ่มฉ่ำพอสมควร นอกจากนี้การเติมน้ำในรูปของน้ำแข็ง ยังช่วยลดอุณหภูมิของส่วนผสมและป้องกันการแตกตัวของอิมัลชั่น น้ำยังทำหน้าที่เป็นตัวกลางแพร่กระจายส่วนประกอบอื่นๆ ที่ใช้ในกระบวนการผลิต และช่วยทดแทนส่วนที่ระเหยออกไปในระหว่างการใช้ความร้อน จึงทำให้ผลผลิตไม่สูญเสียน้ำมากเกินไป (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529ก)

2.6 การสับหรือนวดเนื้อ และระยะเวลาที่ใช้

การสับหรือการนวดอาจใช้เครื่องมือที่เป็นใบมีด (cutter) หรือเครื่องสับนวด (silent cutter) ซึ่งการนวดต้องเพียงพอเพื่อให้เกิดการละลายของแอกโตไมโอซินสูงที่สุด ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเหนียว (ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529ก; เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536)

2.7 อุณหภูมิที่ใช้ในการสับหรือนวด

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสกัดโปรตีนและความคงตัวของอิมัลชั่น ในขั้นตอนการสับหรือนวดเนื้อกับเกลือ ควรให้มีอุณหภูมิในช่วง 5-15 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยทำให้โปรตีนถูกสกัดออกมาได้มาก สำหรับช่วงที่มีการเติมเครื่องปรุงและไขมัน อุณหภูมิอาจสูงขึ้นได้เล็กน้อย ทั้งนี้เพื่อช่วยให้การรวมตัวของโปรตีนและไขมันเป็นไปได้ดีขึ้น แต่ในช่วงสุดท้ายอุณหภูมิไม่ควรสูงเกิน 16 องศาเซลเซียส เพราะจะทำให้อิมัลชั่นที่ได้ไม่คงตัว ทำให้โปรตีนและน้ำแยกออกจากกันและไม่สามารถรักษาโครงสร้าง ซึ่งเป็นตาข่ายหุ้มอนุภาคของไขมันไว้ได้ นอกจากนี้อุณหภูมิต่ำยังช่วยลดอัตราการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดการสูญเสียไกลโคเจน ครีเอตินฟอสเฟต (creatin phosphate) และเอทีพี (ATP) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เนื้อมีคุณภาพลดลง ดังนั้นการใช้น้ำแข็งผสมเข้าไปจะช่วยลดอุณหภูมิของเนื้อได้เป็นอย่างดี (Paul and Palmer, 1972; ชัยณรงค์ คันธพนิต, 2529ก; ทัศนีย์ สุพจนาพรชัย, 2530; เพ็ญศรี จูงศิริวัฒน์ และ สมพิศ ชูแสงจันทร์,2537; สัญชัย จตุรสิทธา, 2543)

2.8 การต้ม

ความร้อนจะทำให้เนื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ โดยเกิดการตกตะกอน (coagulation) และการเสียสภาพของโปรตีน (denaturation) และเนื้อมีการเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นเทาหรือน้ำตาลเทา โดยเริ่มแรกจะเกิดขึ้นบริเวณผิวก่อน แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาปฏิกิริยานี้ก็จะเกิดขึ้นภายในชิ้นเนื้อ ช่วยทำให้รสชาติของเนื้อเข้มข้นขึ้น โดยจะเปลี่ยนแปลงรสชาติของเนื้อดิบไปเป็นรสชาติของเนื้อสุก เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) และความนุ่ม (tenderness) ของผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้จุลินทรีย์บางส่วนถูกทำลายด้วยความร้อน จึงส่งผลให้อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ยืดยาวขึ้น (Kramlich, Pearson and Tauber, 1980; ชัยณรงค์ ฉันธพนิต, 2529ค)

3. ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในหมูยอ

ทัศนีย์ ชาเจียมเจน (2545) ได้ศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของหมูยอที่ผลิตขึ้นในห้องปฏิบัติการ โดยการนึ่งหมูยอนาน 45 นาที ผลปรากฏว่า ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ใดๆ รวมทั้งเชื้อโรค ได้แก่ *S. aureus, C. perfringens* และ *Salmonella* ในขณะที่ดัชนีของเชื้อโรค ได้แก่ Coliform bacteria และ *E.coli* มีค่าน้อยกว่า 3 MPN/g

จากการศึกษาของนักวิจัยหลายรายทำให้พิจารณาได้ว่า หมูยอที่ผลิตเสร็จใหม่หรือที่วางจำหน่ายในท้องตลาด จะมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมากมาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ อาทิ คุณภาพของวัตถุดิบด้านจุลชีววิทยา การควบคุมกระบวนการผลิต อายุของผลิตภัณฑ์และวิธีการเก็บรักษา เป็นต้น อนุชิตา ชาวเหนือ (2534) พบว่าหมูยอที่ผลิตเสร็จใหม่จากสถานที่ผลิต จะมีประมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด อยู่ระหว่าง $5.8x10^3$ - $1.1x10^4$ CFU/g ในขณะที่รสริน ว่องวิไลรัตน์ (2528) พบว่าหมูยอที่วางจำหน่ายที่อุณหภูมิแช่เย็นและมีอายุไม่เกิน 1 วัน จะมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในช่วง $2x10^2$- $1.4x10^4$ CFU/g ส่วนศรัณยา เปียแดง (2528) พบว่าหมูยอที่ผลิตเสร็จใหม่มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ $1.6x10^6$ CFU/g สำหรับหมูยออายุ 7 ชั่วโมง ที่วางจำหน่ายในท้องตลาด ณ อุณหภูมิห้อง มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ $1.9x10^7$ CFU/g

ส่วนแบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรค และแบคทีเรียที่เป็นดัชนีของเชื้อโรคจะมีการรายงานผลที่แตกต่างกัน โดยมีการศึกษาที่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp, *S. aureus*, Coliform bacteria และ *E. coli* มากกว่า 3 MPN/100 g ในผลิตภัณฑ์หมูยอทั้งที่ผลิตเสร็จใหม่และ/หรือที่วางขายในท้องตลาด (ศรัณยา เปียแดง, 2528) ในขณะที่อนุชิตา ชาวเหนือ (2534) ไม่พบการปนเปื้อนของ *Salmonella* spp, *S. aureus* ส่วน Coliform bacteria และพบ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g