# บทที่ 2
# ทฤษฎี

อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุ ไม่ว่าจากกระบวนการปรุงอาหาร หรือวิธีที่ใช้ในการถนอมอาหาร เช่น การให้ความร้อน การบด การใช้คลื่นไมโครเวฟ รวมทั้งการฉายรังสี เมื่อฉายรังสีอาหาร รังสีจะถ่ายทอดพลังงานบางส่วน ให้โมเลกุลต่าง ๆ ทำให้เกิดการแตกตัวเป็น โมเลกุล ที่มีประจุไฟฟ้า และโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้า ซึ่งมีอิเล็กตรอนขาดคู่อยู่ในวงโคจนนอกสุด เรียกว่า อนุมูลอิสระ[1]

อนุมูลอิสระจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีมาก เนื่องจากมีอิเล็กตรอนอิสระขาดคู่อยู่ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น การเรืองแสงความร้อน (Thermoluminescence ) การเรืองแสงเคมี (Chemiluminescence) และวิธีอิเล็กตรอนสปินเรโซแนนซ์ (Electron Spin Resonance) ซึ่งวิธี ESR เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการตรวจสอบหาอนุมูลอิสระที่เหลืออยู่ เนื่องจากมีความไวต่ออิเล็กตรอนที่ไร้คู่

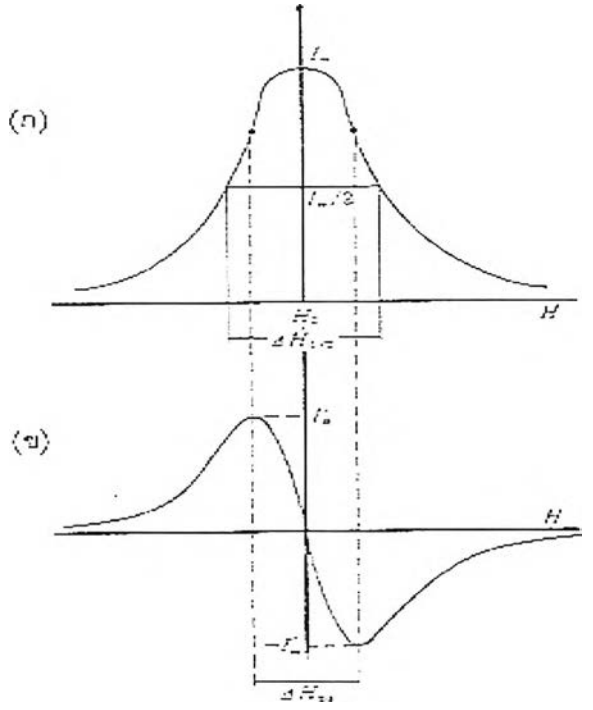
อิเล็กตรอนจะมีการหมุนรอบตัวเอง เรียกว่า อิเล็กตรอนสปิน (electron spin ) การหมุนรอบตัวเองเช่นนี้ทำให้เกิด โมเมนต์แม่เหล็กขึ้น อาจแทนขนาดและทิศทางของโมเมนต์แม่เหล็กด้วยสัญญาลักษณ์เป็นลูกศรชี้ขึ้น ถ้าในวงโคจรหนึ่งมีอิเล็กตรอน 2 ตัว และสปินมีทิศทางตรงกันข้าม (อิเล็กตรอนตัวหนึ่งหมุนตามเข็มนาฬิกา และอีกตัวหนึ่งหมุนทวนเข็มนาฬิกา) โมเมนต์แม่เหล็กก็จะหักล้างกันกลายเป็นศูนย์ ในวงโคจรที่มีอิเล็กตรอนเพียงตัวเดียวเราเรียกอิเล็กตรอนตัวนี้ว่า lone pair electron (อิเล็กตรอนไร้คู่) และเราเรียกอะตอมหรือโมเลกุลที่มี lone pair electron ว่า free radical หรือ radical ต่อจากนั้นถ้าเราป้อนสนามแม่เหล็กเข้าสู่ radical เหล่านี้ จะทำให้ระดับพลังงานของ lone pair electron ถูกแยกออกเป็น 2 ระดับ (เรียกว่า ปรากฏการณ์ Zeeman) ในขณะเดียวกันถ้าเรายิง คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีพลังงาน (eV) เท่ากับความแตกต่างของระดับพลังงานดังกล่าว อิเล็กตรอนไร้คู่เหล่านั้นจะดูดกลืนพลังงาน คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าดังกล่าวได้เป็นอย่างดี เราเรียกการดูดกลืนพลังงานคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า โดยอิเล็กตรอนไร้คู่เช่นนี้ว่า Electron Spin Resonance (ESR)[3]

ลักษณะของ ESR สเปกตรัมมีลักษณะเป็น เดริเวทีฟ เคิร์ฟ (Derivative curve) คือเป็น first derivative ของ แอบซอฟชั่น เคริฟ (Absorption curve) ที่พลอตกับความเข้มของสนามแม่เหล็ก (testa, T)

ข้อมูลที่ได้จาก ESR นั้น โดยทั่ว ๆ ไป จะใช้ยิงคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (ส่วนมากคือคลื่นไมโครเวฟ : GHz กำลังประมาณ 1 mW) ที่มีความถี่คงที่ค่าหนึ่งเข้าสู่วัสดุ และสแกน (scan) หรือเปลี่ยนค่าความเข้มของสนามแม่เหล็ก แล้วจึงวัดปริมาณการดูดกลืนคลื่นไมโครเวฟ ดังนั้น สเปกตรัม ESR ที่ได้มีแกนนอนเป็นความเข้มของสนามแม่เหล็ก และแนวแกนตั้งเป็นปริมาณการดูดกลืนคลื่นไมโครเวฟ แต่ในการปฏิบัติ นิยมพลอตกราฟในรูป differential curve ดังในรูปที่ 2.1

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากสเปกตรัม ESR ในรูปที่ 2.1 (ข) เราสามารถหาจำนวนอิเล็กตรอนอิสระไร้คู่ ได้จากพื้นที่ใต้กราฟ




รูปที่ 2.1 (ก) สเปกตรัมการดูดกลืนคลื่นไมโครเวฟ
(ข) ผลการ differential จากรูป (ก) ซึ่งรูปนี้นิยมใช้เป็นสเปกตรัมของ ESR

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากการฉายรังสี มีทั้งการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยา ขึ้นอยู่กับขบวนการฉายรังสีและหลังฉายรังสี อย่างไรก็ตามจะมีปริมาณอนุมูลอิสระที่คงเหลืออยู่ เมื่อฉายรังสีอาหารจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี คือ การเปลี่ยนแปลงโดยตรงและการเปลี่ยนแปลงโดยอ้อม[5]

การเปลี่ยนแปลงโดยตรง เกิดขึ้นกับโมเลกุลต่าง ๆ ในสารประกอบที่มีอยู่ในอาหารนั้น โดยพลังงานจากการฉายรังสีจะถ่ายเทมายัง โมเลกุลของสารทำให้เกิดการสลายตัวของพันธะทางเคมีขึ้น จะทำให้โมเลกุลอยู่ในสภาวะกระตุ้น (excited molecules) หรืออาจจะถึงระดับแตกตัวเป็นไอออน (ionization)ก็ได้

การเปลี่ยนแปลงในทางอ้อม เกิดขึ้นเนื่องจาก radiolytic products ที่เกิดจากการแตกตัวของโมเลกุลของน้ำที่เป็นองค์ประกอบหลักของอาหารเมื่อได้รับรังสี radiolytic products ที่เกิดขึ้นจะไปทำปฏิกิริยา กับสารประกอบอื่น ๆ ที่มีอยู่ในอาหารนั้น ๆ

การเกิด radiolytic products มีดังนี้

$$H_2O \longrightarrow H_2O^+ + e^-$$

โมเลกุลของน้ำซึ่งจะมีประจุบวกนี้ ( $H_2O^+$)ไม่อยู่ตัว จะสลายเป็น $H^+$ กับ $OH^\bullet$

$$H_2O^+ \longrightarrow H^+ + OH^\bullet$$

ส่วนอิเล็กตรอนที่หลุดออกมาจากวงโคจรจะเคลื่อนที่ไป และ ถูกจับไว้ด้วยโมเลกุลของน้ำกลายเป็น โมเลกุลของที่มีประจุลบ ($H_2O^-$)

$$H_2O + e^- \longrightarrow H_2O^-$$

โมเลกุลน้ำที่มีประจุลบนี้จะไม่อยู่ตัว จะสลายตัวต่อไปเป็นไฮโดรเจนแรดิคอล ( $H^\bullet$ ) กับไฮดรอกซิลไอออน ($OH^-$)

$$H_2O^- \longrightarrow H^\bullet + OH^-$$

ดังนั้น radiolytic products จะไปทำปฏิกิริยาในโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหาร

การเปลี่ยนแปลงในโปรตีน

ปฏิกิริยาของสารละลายกรดอะมิโนภายใต้เงื่อนไขที่ไม่มีอากาศ คือ เกิด deamination และ decarboxylation ดังสมการ

$$RCHNH_2COOH + H^\bullet \longrightarrow RC^\bullet HCOOH + NH_3$$

$$RC^\bullet HCOOH + RCHNH_2COOH \longrightarrow RCH_2COOH + RC^\bullet NH_2COOH$$

ผลของ decarboxylation ทำให้เกิด amine ที่มีอะตอมคาร์บอนน้อยกว่าอะมิโนแรกเริ่ม

$$RCHNH_2COOH \longrightarrow CO_2 + RCH_2NH_2$$

เนื่องจากมีออกซิเจน ทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidative deamination ดังสมการ

$$RCHNH_2COOH + OH^{\cdot} \longrightarrow RC^{\bullet}NH_2COOH + H_2O$$

$$RC^{\bullet}NH_2COOH + O_2 + H_2O \longrightarrow NH_3 + RCOCOOH$$

เนื่องจากโปรตีนมีโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงทำให้มีพื้นที่ผิวเอื้ออำนวยต่อปฏิกิริยาของรังสี พลังงานจะถูกดูดซับไว้ที่จุดหนึ่ง แต่ก็สามารถเคลื่อนที่ไปสู่อีกจุดหนึ่งภายในโมเลกุลได้ง่าย ทำให้พันธะระหว่างโมเลกุลแยกสลายไป ซึ่งทำให้อะตอมหรือกลุ่มของอะตอมแยกตัวออกและกลายเป็นอนุมูลอิสระ สำหรับกรณีที่รังสีกระทำต่อโปรตีนในลักษณะเฉพาะ อนุมูลอิสระจะไม่เกิดขึ้น การกระจายรังสีและการรวมตัวของอนุมูลอิสระจะไม่เกิดขึ้น การกระจายรังสีและการรวมตัวของอนุมูลจะเกิดขึ้นในวงจำกัดที่อุณหภูมิต่ำ ในขณะที่อุณหภูมิสูง ปฏิกิริยาต่างๆเกิดขึ้นได้อย่างดี

สภาพของโปรตีนก่อนการฉายรังสีจะมีผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์สุดท้ายกล่าวคือ ถ้านำโปรตีนที่เสียโครงสร้างมาฉายรังสีจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนที่เสียไปมีความสามารถในการรวมตัวน้อยมาก ผลกระทบทางอ้อมของการฉายรังสีโปรตีนที่มีน้ำอยู่ด้วย เช่นในกรณีที่เป็นน้ำอิสระ รังสีจะไปทำให้พันธะไฮโดรเจนแยกสลาย ซึ่งจะนำไปสู่การรวมตัวหรือแตกตัวไปเป็นหน่วยเล็กๆต่อไป ปรากฏการณ์นี้จะไม่พบถ้าน้ำที่มีอยู่เป็นน้ำชนิดที่รวมตัวแล้วหรืออยู่ในสภาวะที่เยือกแข็ง

การเปลี่ยนแปลงทั้งหมดนี้ จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติโดยทั่วไปของโปรตีน เช่น โปรตีนเกิดเสียสภาพหรือเอนไซม์ไม่ทำงาน การเปลี่ยนสี คุณสมบัติการทำงานของโปรตีนอาจจะถูกเปลี่ยนไป นอกจากนี้ เนื่องจากโปรตีนเป็นสารอาหารที่ให้กรดอะมิโนแก่ร่างกาย รังสีก็อาจจะทำลายกรดอะมิโนได้

การเปลี่ยนแปลงในคาร์โบไฮเดรต

โมโนแซคคาไรด์

จาก Radiolysis ของน้ำ อัตราการเกิดปฏิกิริยา ของ OH รวมทั้ง hexose สูง และอะตอมไฮโดรเจนในโมเลกุล hexose จะถูกแยกออกโดยไฮดรอกซิลแรดิคอล กลายเป็น hexose แรดิคอล

โพลีแซคคาไรด์

โพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง เซลลูโลส เพคติน และ glycogen ได้จากการแตกตัว glycosidiclink ผลิตภัณฑ์ที่เกิดเป็นส่วนน้อย เช่น กลูโคส มอลโทส และ dextrin ต่อไปสลายตัวให้สารประกอบทางเคมีที่เกิดขึ้นจากการฉายรังสี เหมือนกับของโมเลกุลเล็ก ๆ จาก โมโนแซคคาไรด์

การเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยา

การเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยา รังสีจะไปทำลายยีนส์ (gene) และรบกวนการแบ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเป็นผลให้จุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย ยีสต์ พยาธิและแมลง ตายหรือเป็นหมันได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณรังสีที่ใช้ ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ สำหรับในพืชนั้นรังสีจะทำให้อัตราการหายใจและกระบวนการทางชีวเคมีเปลี่ยนไป ทำให้ผลไม้บางชนิดสุกช้าลง มันฝรั่งและหอมหัวใหญ่ไม่งอก และเห็ดไม่บาน

การฉายรังสีโดยใช้ปริมาณรังสีต่ำไม่เกิน 1 กิโลเกรย์ สามารยับยั้งการงอกของมันฝรั่ง หอมหัวใหญ่ กระเทียม และขิง เป็นต้น กำจัดแมลงในธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวสาร และถั่วเขียว ผลิตภัณฑ์ประมงแห้ง เช่น ปลาเค็ม และปลารมควัน ผลิตภัณฑ์ธัญพืช เช่น แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวโพด รวมทั้งยังสามารถทำลายตัวอ่อนหรือดักแด้ของแมลงวันผลไม้ที่ติดไปในผลไม้ต่างๆ เพื่อป้องกันการแพร่พันธุ์ นอกจากนี้ การฉายรังสีปริมาณต่ำ สามารถทำลายพยาธิต่างๆ ในเนื้อสัตว์ และทำให้ชะลอกระบวนการทางชีววิทยาภายในผักสดและผลไม้โดยช่วยยืดอายุการวางตลาดได้นานขึ้น เช่นผักสดต่างๆ และชะลอการสุกของผลไม้บางชนิด เช่น กล้วย มะม่วง และมะละกอ เป็นต้น

การฉายรังสีโดยใช้ปริมาณรังสีปานกลางระหว่าง 1 –10 กิโลเกรย์ ทำให้ยืดอายุการเน่าเสียของอาหารและผลิตผลการเกษตร เช่น ปลาสด ผลสตรอเบอร์รี่ ทั้งนี้เนื่องจากรังสีจะเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ดังกล่าวลดน้อยลง นอกจากนี้รังสียังสามารถทำลายเชื้อโรคต่างๆ โดยเฉพาะเชื้อโรคที่เกี่ยวกับโรคท้องร่วง ทำให้อาหารและผลิตผลการเกษตรที่ผ่านการฉายรังสี สะอาดและปลอดภัยต่อการบริโภค เช่นอาหารทะเล และเนื้อสัตว์ทั้งสดและแช่แข็ง เป็นต้น การฉายรังสีด้วยปริมาณรังสีปานกลางยังมีส่วนช่วยในการปรับปรุงคุณภาพอาหารหรือผลิตผลการเกษตร เช่นผลองุ่นที่ผ่านการฉายรังสีสามารถคั้นน้ำออกมาได้มากกว่าปกติ เนื่องจากส่วนประกอบในเนื้อองุ่นเกิดการแตกตัว และในทำนองเดียวกัน อาหารจำพวกผักแห้งเมื่อผ่านการฉายรังสีจะทำให้เส้นใยยุ่ย สามารถดูดน้ำกลับคืนสู่สภาพเดิมได้รวดเร็วจึงช่วยประหยัดเวลาในการปรุงอาหาร

การฉายรังสีโดยใช้ปริมาณรังสีสูง ระหว่าง 10- 50 กิโลเกรย์ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตอาหารและผลิตผลการเกษตรปลอดเชื้อและกึ่งปลอดเชื้อ โดยการฉายรังสีร่วมกับความร้อน สามารถผลิตอาหารปลอดเชื้อในทางอุตสาหกรรม เช่น อาหารสำเร็จรูป อาหารผู้ป่วย หรือการฉายรังสี

เพื่อทำลายจุลินทรีย์ให้มีจำนวนลดลงในลักษณะกึ่งปลอดเชื้อ เช่น ในผลิตภัณฑ์ประเภทเครื่องเทศ เอ็นไซม์ที่ใช้ในการผลิตยาและการปรุงอาหารที่ช่วยให้เนื้อเปื่อยเร็วขึ้น

การหาปริมาณจุลินทรีย์ในอาหาร

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญเป็นโคโลนีและนับจำนวน เป็นวิธีที่ใช้หาปริมาณเซลล์จุลินทรีย์มีชีวิตที่มีในอาหารวิธีหนึ่ง

การนับจำนวนโคโลนี

หลังจากบ่มเพาะเชื้อตามกำหนดและจุลินทรีย์เจริญเป็นโคโลนีแล้ว ให้นับจำนวนโคโลนีที่พบจากแต่ละจานเพาะเชื้อ โดยนับโคโลนีทุกแบบและทุกขนาด การนับนั้นอาจอาศัยการสังเกตด้วยตาเปล่าหรืออาจใช้อุปกรณ์ช่วย ซึ่งได้แก่ เครื่องนับโคโลนี

การคำนวณจำนวนจุลินทรีย์

จำนวนจุลินทรีย์มีชีวิตในอาหาร 1 กรัม (กรณีอาหารตัวอย่างเป็นของแข็ง) หรือ 1 มิลลิลิตร (กรณีอาหารตัวอย่างเป็นของเหลว) คำนวณได้เมื่อทราบค่าจำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จานที่หาได้จากทุกซ้ำของความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีต่อจานระหว่าง 30-300 (หรือ 25-250) และสมมุติว่า 1 โคโลนีเจริญมาจาก 1 เซลล์ อย่างไรก็ตาม ในความเป็นจริงบางโคโลนีอาจเจริญมาจากเซลล์มากกว่า 1 ที่เกาะกลุ่มกันหรือเรียงต่อกันเป็นสาย ดังนั้น จึงควรใช้คำว่า colony formimg unit (CFU) แทนคำว่า colony และค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่าง

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = n/d

เมื่อ n คือ จำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จาน

และ d คือ ความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาเพาะในจานที่หาค่า n ได้

หรือ

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = n x df

เมื่อ df คือ dilution factor หรือ ส่วนกลับของความเจือจางดังกล่าว

วิธีนับจำนวนโคโลนีเป็นวิธีหาปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตวิธีหนึ่ง ดังนั้น จึงมีข้อดี คือ ทำให้เราทราบว่าอาหารตัวอย่างนั้นๆมีจุลินทรีย์ที่อาจเจริญเพิ่มจำนวนได้มากน้อยเพียงใด อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อเสียคือ สภาวะที่ใช้เลี้ยงอาจไม่เหมาะกับจุลินทรีย์ทุกกลุ่มที่มีในตัวอย่างทำให้ค่าที่ได้น้อยกว่าความเป็นจริง อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็เป็นที่นิยมใช้เนื่องจากไม่ต้องการเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ซับซ้อนจึงสามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป

วิธีการตรวจสอบจุลินทรีย์

การเตรียมการตรวจสอบ

1. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพื่อเจือจาง Phosphaste buffered solution, pH 7.2
   - สารละลายที่เก็บไว้ใช้ (Stock solution) เตรียมโดยชั่งโมโนโปตัสเซียมฟอสเฟต (monopotassium phosphate) หนัก 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับให้มีความเป็นกรด-ด่าง 7.2 แล้วเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร
   - สารละลายเพื่อเจือจาง (Dilution blanks) ดูดสารละลายจากข้อ 1.1 ด้วยปิเปตมา 1.25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ใส่ในขวดแก้วปริมาตร 99 มิลลิลิตร หรือ 225 มิลลิลิตร ตามความต้องการนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซนเซียส นาน 15 นาที
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธีเตรียม

   เพลตเคานต์อะการ์ (Plate Count Agar)

   | | | |
   |---|---|---|
   | ทริปโตน | 5 | กรัม |
   | ยีสต์เอกซแตรกต์ | 2.5 | กรัม |
   | เดกซโตรส | 1 | กรัม |
   | อะการ์ | 15 | กรัม |
   | น้ำกลั่น | 1 | ลิตร |

   นำส่วนผสมทั้งหมดใส่ในน้ำกลั่น ต้มให้ละลาย แบ่งใส่ขวดแก้ว ปิดจุก ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ อุณหภูมิ 121 องศาเซนเซียส 15 นาที
3. วิธีวิเคราะห์

   จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ลงในขวดที่มีสารละลายเพื่อเจือจาง 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 1 ต่อ 10 หรือ เจือจางต่อไปจนกว่าจะนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ 30 ถึง 300 โคโลนี ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่มีความเข้มข้นต่างๆ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อเข้มข้นละ 2 จาน เทอาหารเลี้ยงเชื้อเพลตเคาน์อะการ์ที่หลอมเหลวแล้ว มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซนเซียส ลงในจานเพาะเชื้อจานละประมาณ 12 – 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งกลับจานเพาะเชื้อให้ฝาอยู่ด้านล่าง แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35องศาเซนเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 30 ถึง 300 โคโลนี หาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัม โดยใช้สูตร

   จำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ x อัตราการเจือจาง

   รายงานผลเป็น CFU/g