บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 กระบวนการผลิตแฮม

แฮม (ham) เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรที่ผ่านการเคียว (curing) แล้ว และอาจรมควัน (smoking) หรือไม่ก็ได้ตามความต้องการแล้วนำไปทำให้สุก (cooking) การเคียวอาจทำโดยการฉีดสารละลายเกลือ (brine solution) เข้าในชิ้นเนื้อหรือโดยการนำชิ้นเนื้อไปคลุกเคล้ากับสารเคียว (curing agent) เป็นเวลาที่นานพอที่จะทำให้ส่วนผสมแทรกซึมเข้าไปในก้อนเนื้ออย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ (7) สารที่เป็นส่วนผสมหลักในการเคียวมี 3 ชนิดได้แก่ เกลือบริโภค (NaCl) สารประกอบไนไตรท์ และน้ำตาล เกลือบริโภคมีหน้าที่ช่วยเพิ่มรสชาติและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ การใช้เกลือบริโภคอย่างเดียวในการเคียวจะได้เนื้อที่มีสีคล้ำแห้ง และเค็ม จึงต้องใช้ร่วมกับน้ำตาลและสารประกอบไนไตรท์ และ/หรือ ไนเตรท (7) โดยทั่วไประดับเกลือที่ยอมรับในแฮมคือ 3% แต่ปริมาณอาจแปรได้ ขึ้นกับการยอมรับของผู้บริโภค น้ำตาลจะช่วยให้รสชาติดีขึ้น ทำให้รสชาติเกลือลดความรุนแรงลง ลดการสูญเสียน้ำจากเนื้อ และช่วยให้เกิดสีน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ในการเคียวไม่แน่นอน โดยทั่วไปผู้บริโภคจะชอบให้มีน้ำตาลในแฮม 2% สารประกอบไนไตรท์ และ/หรือ ไนเตรท ทำให้เกิดสีชมพูแดงในผลิตภัณฑ์ (cured meat color) ซึ่งเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ช่วยให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่มีรสชาติและกลิ่นเฉพาะตัว ช่วยถนอมอาหารโดยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์พวก Clostridium botulinum (C. botulinum) ที่ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษชนิดรุนแรงถึงแก่ชีวิต และยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย นอกจากนั้นไนไตรท์ยังช่วยลดอัตราการเกิดกลิ่นหืนของไขมันด้วย (7) ส่วนผสมอื่น ๆ นอกจากส่วนผสมหลักในการเคียว ได้แก่ phosphate ใส่เพื่อเพิ่มการอุ้มน้ำของเนื้อ ทำให้เนื้อสัมผัสดีขึ้น ลดการหดตัวของเนื้อ ascorbate เร่งให้เกิดสีเร็วขึ้นและอยู่ได้นาน ลดการเกิดกลิ่นหืนของไขมัน เครื่องเทศจะเพิ่มรสชาติให้กับผลิตภัณฑ์ (7)

การรมควันจะทำให้เกิดกลิ่นหอม ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และทำให้สีของเนื้อเคียวเกิดเร็วขึ้น แฮมบางชนิด เช่น แฮมสุก (cooked ham) จะนำเนื้อที่ผ่านการเคียวไปทำให้สุกเลยโดยไม่รมควัน (7) ส่วนของแฮม (ส่วนขาหลังของสุกร) ที่ถอดกระดูก นอกจากจะนำมาแปรรูปเป็นแฮมสุกซึ่งใช้เนื้อชิ้นเดียว ยังอาจแปรรูปเป็นแฮมอัด (pressed ham) โดยลดขนาดเนื้อหมูเป็นก้อนสี่เหลี่ยม (chunks) แล้วนำไปนวด (tumbling) จนเนื้อน่วม เพื่อสกัดโปรตีนที่ละลายเกลือ (salt soluble protein) จากนั้นนำก้อนเนื้อทั้งหมดไปอัดในแบบพิมพ์แล้วนำไปทำให้สุก จะได้ชิ้นแฮมที่มีรูปร่างตามแบบพิมพ์ Macfarlane และคณะ (9) ตรวจแรงยึดของ

เนื้อบด (patties) ที่ผ่านการอัด พบว่า ค่า tensile strength เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มแรงอัด เพิ่มเวลาในการอัด เพิ่มปริมาณเกลือบริโภค และที่ pH 5-6 การเติมเกลือบริโภคและสาร polyphosphate ระหว่างการเตรียมผลิตภัณฑ์ รวมทั้งการนวดจะช่วยสกัด myofibrilla protein มาเคลือบชิ้นเนื้อ ซึ่งเมื่อดันให้มาชิดกันจะเกิดแรงยึดระหว่างมวลและเมื่อนำไปให้ความร้อน โปรตีนเหล่านี้จะแปลงสภาพ (denature) เป็นของแข็งยึดให้ก้อนเนื้อติดกัน (10)

2.2 <u>การบรรจุและการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน</u>

กระป๋องที่ใช้บรรจุแฮมทำด้วยเหล็กกล้าอาบด้วยดีบุก (tinplate) และเคลือบผิวด้วย lacquer เนื่องจากแฮมเป็นอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง โดยเฉพาะมีกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบด้วย เมื่อโปรตีนถูกทำลายโดยความร้อนหรือแบคทีเรีย จะให้สารประกอบกำมะถัน ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับโลหะ เช่น เหล็ก ดีบุก ในภาชนะบรรจุแล้ว จะให้สีน้ำตาลเข้มหรือสีดำของโลหะ sulfide จับบนผิวโลหะบริเวณตัวและฝาภายในกระป๋อง เรียกว่า คราบกำมะถัน (sulphur staining) คราบนี้จะไม่เป็นอันตรายกับผู้บริโภค แต่จะทำให้เกิดความไม่มั่นใจในคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (11) การเคลือบ lacquer จะช่วยป้องกันปฏิกิริยาเคมีระหว่างอาหารกับโลหะที่ใช้ทำภาชนะบรรจุ ทำให้สามารถรักษาคุณภาพของอาหารไว้ได้ดี และช่วยเพิ่มอายุการเก็บของอาหารด้วย lacquer ที่จะใช้สำหรับแฮมบรรจุกระป๋องเป็นชนิด epoxy-phenolic ซึ่งมีส่วนผสมของสาร aluminum รวมอยู่ด้วย epoxy-phenolic เป็นสารที่ทนปฏิกิริยาที่ทำให้เกิด sulfide ได้ดี มีความยืดหยุ่นสูง และ aluminum จะช่อนหรือพรางการเกิดคราบ นอกจากนี้ lacquer ควรทนสารเคมีพวก polyphosphate ซึ่งมีอยู่ในผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ได้ดีด้วย (11)

แฮมที่จะนำมาบรรจุกระป๋องส่วนใหญ่จะไม่ผ่านการรมควัน แต่ถ้าต้องการรมควันจะใช้อุณหภูมิ 54-60 °ซ. เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง จากนั้นบรรจุกระป๋องโดยใช้เครื่องอัด (ham press) อุณหภูมิของแฮมขณะอัดควรต่ำประมาณ 4 °ซ. เพื่อรักษารูปร่าง ใส่ผงเจลาตินเล็กน้อยบนแฮมที่จะผ่านกระบวนการ pasteurize เพื่อทำให้สารละลายที่ออกมาจากการหดตัวของเนื้อข้นคล้ายของแข็งจึงมองไม่เห็นส่วนของของเหลวซึ่งเกิดจากการหดตัวของเนื้อ ส่วนในแฮม sterilize เจลาตินจะไม่มีผลเพราะสารละลายจากการหดตัวของเนื้อมีมาก (7) การปิดกระป๋องควรให้มีสุญญากาศไม่ต่ำกว่า 63.5 ซม.ปรอท (12)

แฮมที่บรรจุน้ำหนัก 1.4 กิโลกรัม หรือมากกว่าควรให้ความร้อนแบบ pasteurize ในน้ำที่มีการกวนอย่างสม่ำเสมอ ที่อุณหภูมิ 71.1-76.7 °ซ. จนอุณหภูมิที่จุดกึ่งกลางของผลิตภัณฑ์

เป็น 66-71 °ซ. เพราะความรุนแรงของความร้อนในกระบวนการ sterilize จะทำให้เนื้อหดตัวมาก จากนั้นทำให้เย็นโดยเร็วในน้ำเย็นจนอุณหภูมิที่จุดกึ่งกลางของผลิตภัณฑ์เป็น 37.8 °ซ. แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 3.3-4.4 °ซ. กระบวนการ sterilize มักใช้กับแฮมที่มีน้ำหนักต่ำกว่า 1.4 กิโลกรัม อุณหภูมิที่ใช้ในการฆ่าเชื้อคือ 110-116 °ซ. เวลาขึ้นกับน้ำหนักของแฮม โดยทั่วไปถ้าน้ำหนัก 680 กรัม ที่อุณหภูมิ 110 °ซ. จะใช้เวลา 160 นาที ส่วนที่อุณหภูมิ 116 °ซ. ใช้เวลา 110 นาที หลังจากการฆ่าเชื้อนำมาทำให้เย็นจนอุณหภูมิสุดท้าย 35-41 °ซ.(7) ตัวอย่างของแฮมบรรจุกระป๋องประเภทเก็บได้ที่อุณหภูมิห้อง (shelf-stable) ที่ผลิตทางการค้า มีน้ำหนักบรรจุ 680 กรัม มีค่า thermal death time (F_o) 1.28 นาที ที่อุณหภูมิ 110 °ซ. ใช้เวลาในการให้ความร้อน 130 นาที (12)

2.3 ปฏิกิริยาของ C. botulinum

แฮมบรรจุกระป๋องเป็นอาหารประเภทปริมาณกรดต่ำ เมื่อบรรจุในสภาพไม่มีอากาศ คุณภาพของผลิตภัณฑ์จะขึ้นกับคุณภาพของส่วนผสมที่ใช้ในการเคียวและกระบวนการให้ความร้อน แฮมกระป๋องเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคโดยการใช้ไนไตรท์ควบคุม C. botulinum ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสารพิษ สามารถเจริญในอาหารที่มีกรดต่ำ (pH สูงกว่า 4.6) และ water activity มากกว่า 0.85 สภาวะที่สร้างสารพิษคือ สภาวะสุญญากาศและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 18.3-29.4 °ซ. แบคทีเรียนี้มีอยู่ทั่วไปในดิน จึงอาจปนเปื้อนมากับอาหารโดยอาจมาจาก การขนส่ง การชำแหละที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เครื่องมือที่ใช้ผลิต ส่วนผสมที่ใช้หรือแม้แต่ฝุ่นผงในอากาศ แบคทีเรียนี้จะสร้างสารพิษและหลั่งออกนอกเซล (exotoxin) จึงพบพิษในอาหาร พิษเป็นสารจำพวกโปรตีน มีปฏิกิริยาในการหยุดยั้งการสร้างสาร acetylcholine ซึ่งเป็นตัวนำสารจากสมองไปสู่เซลทั่วร่างกาย ที่ myoneural junction เปลี่ยนแปลง cholinergic nerve cell activity พิษที่เกิดขึ้นไม่ทนความร้อน ทำลายได้โดยต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที แต่สปอร์ทนความร้อนได้ดีต้องทำลายที่อุณหภูมิและความดันสูง หลังจากได้รับพิษเข้าไป 8-72 ชั่วโมง จะเกิดผลต่อเนื้อเยื่อประสาท ทำให้มองเห็นภาพซ้อน กลืนไม่ได้ การพูดเลวลง หายใจลำบาก และเป็นอัมพาตของอวัยวะระบบหายใจ บางคนจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเดิน ผู้ป่วยประมาณ 70% จะตายภายใน 3-7 วัน (13 14) การเจ็บป่วยยากที่จะวิเคราะห์ เพราะเกิดขึ้นรวดเร็ว และอาการที่เป็นอาจสับสนกับโรคอื่น เมื่อเกิดอาการจึงมักสายเกินแก้ จากการทดลองใส่ C. botulinum ลงไปในเนื้อเคียว พบว่าเกิดสารพิษก่อนที่จะสังเกตเห็นความเสื่อมเสียของลักษณะภายนอก (12) ความเป็นกรดจะยับยั้งการเจริญของ

C. botulinum ได้ แต่อาจทำให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไปและเสี่ยงต่อความเป็นพิษจากการเกิดสาร nitrosamine จึงต้องมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยจาก botulism ของผลิตภัณฑ์

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุม C. botulinum

การควบคุม C. botulinum ในเนื้อเคียวมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ

2.4.1 ปริมาณสปอร์

ระดับการปนเปื้อนของสปอร์เริ่มต้น มีอิทธิพลต่อการควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษของ C. botulinum สปอร์ของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในเนื้อดิบค่อนข้างต่ำ (15) และสปอร์ของ C. botulinum ในเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อมีน้อยมาก (8 12) ประมาณว่าในผลิตภัณฑ์เนื้อ 0.5-3.2 กิโลกรัม จะมีสปอร์เพียง 1 สปอร์ (12) จากการทดลองใส่สปอร์ของ C. botulinum ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อเคียวหลายชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ปรากฏว่าที่ความเข้มข้น 140 หรือ 580 สปอร์ต่อกรัม ไม่พบสารพิษเมื่อเก็บที่ 27 °ซ. เป็นเวลา 25 วัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณสปอร์เป็น 980 สปอร์ต่อกรัม จะพบสารพิษหลังจาก 20 วัน ที่อุณหภูมิเดียวกัน (16)

2.4.2 การให้ความร้อนผลิตภัณฑ์

ผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดต่ำ เมื่อต้องการให้ปลอดภัยและเก็บได้นาน ต้องให้ความร้อนให้เพียงพอที่จะทำลายสปอร์ของ C. botulinum โดยใช้กระบวนการ 12D กรณีเนื้อเคียวบรรจุกระป๋องความร้อนในปริมาณดังกล่าวจะเป็นผลให้คุณภาพด้านการใช้บริโภคของผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับ ดังนั้นในทางการค้าจะใช้ F_0 ที่มีค่า 0.05-1.5 นาที (12 17) ซึ่งที่ระดับนี้การให้ความร้อนเพียงอย่างเดียวจะไม่เพียงพอในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ จึงต้องมีปัจจัยอื่นมาช่วยด้วย ได้แก่ เกลือบริโภค และไนไตรท์ นอกจากนั้นต้องควบคุมปริมาณการปนเปื้อนระหว่างการผลิตด้วย (12 18) Duncan และ Foster (19) ศึกษาผลของสารผสมในการเคียวและสรุปว่า ความร้อน เกลือบริโภค และไนไตรท์ ร่วมกันจะให้ผลในการยับยั้งสปอร์ของ PA 3679h ซึ่งเป็น varient ของ PA 3679 มีคุณลักษณะทาง morphology และชีวเคมีเหมือนกับ PA 3679 และผลนี้จะมีประสิทธิภาพมากขึ้นที่ pH 6.0 ระหว่างการให้ความร้อน ไนไตรท์อาจกระตุ้นให้สปอร์งอก (germinate) โดยเฉพาะภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ทำให้จุลินทรีย์ไม่ทนต่อความร้อน (20) Ingram (21) ชี้ว่า ในระบบที่มีการให้ความร้อน ไนไตรท์และเกลือบริโภคเป็นตัวยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญร่วมกับกระบวนการให้

ความร้อน เมื่อ F_o = 0.1-1.0 นาที จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อการบริโภค แฮมบรรจุกระป๋องที่ผ่านการ sterilize ต้องการ F_o = 0.4-1.0 นาที เพื่อป้องกันการเสียจากสปอร์ของ Bacillus ระหว่างการขนส่งและการเก็บ

2.4.3 อุณหภูมิเก็บ

อุณหภูมิที่จะป้องกันการเจริญของ C. botulinum ชนิด A และ B ต้องต่ำกว่า 10 °ซ. (12) เนื้อเคียวบรรจุกระป๋องและเบคอนถ้าเก็บที่ 7 °ซ. ตรวจไม่พบสารพิษจาก C. botulinum ขณะที่พวกที่เก็บที่ 27 °ซ. มีสารพิษผสมอยู่ ซึ่งแสดงว่าเชื้อสร้างสารพิษได้ที่อุณหภูมินี้ (8) อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับเนื้อเคียวมักใช้ 27 -30 °ซ. เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่อยู่ระหว่างอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของสปอร์ C. botulinum (32 °ซ.) กับอุณหภูมิห้อง (22 °ซ.) อุณหภูมินี้จะยอมให้สปอร์ที่รอดจากการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนเจริญอย่างรวดเร็ว และนอกจากนั้นอุณหภูมินี้ยังใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ผลิตภัณฑ์จะต้องวางขาย (8 12)

2.4.4 ความเป็นกรดด่าง (pH)

โดยทั่วไปเมื่อ pH ต่ำลงความต้านทานของสปอร์ต่อความร้อนจะลดลงด้วย เนื้อเคียวโดยปกติมี pH 5.5-6.6 (12) ขณะที่การงอกของสปอร์ C. botulinum ชนิด A และ B จะถูกยับยั้งที่ pH 4.6-5.0 (8 12) การใช้ไนไตรท์ร่วมกับการลด pH จะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยเฉพาะ C. botulinum เนื่องจากการเกิดกรด nitrous (16 22) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาณกรดอาจจะเสี่ยงกับการสร้างสาร nitrosamine ซึ่งสารตัวนี้ก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ และกรดจะทำให้รสชาติของอาหารเปลี่ยนไป

2.4.5 เกลือแกง (NaCl)

เกลือแกง 8.5-10.5% อย่างเดียวจะยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษของ C. botulinum ชนิด A และ B (15) ซึ่งปริมาณดังกล่าวจะสูงกว่าที่พบในผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตาม การเจริญของสปอร์ซึ่งต่างจากการเจริญของ vegetative cell จะถูกยับยั้งโดยเกลือที่ 3.5-6.7% (23) การงอกและการเติบโตของสปอร์ของแบคทีเรียมี 5 ขั้นตอน เรียงลำดับคือ germination, swelling, emergence, elongation และ cell division เกลือแกงที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จะมีผลในการยับยั้งการงอกและการเติบโตของสปอร์ต่างกัน

เกลือเข้มข้นมากกว่า 6% จะยับยั้งการ germination ของสปอร์ PA 3679h ขณะที่เกลือ 3-6% จะยับยั้งการแบ่งตัวของ cell (22) โดยทั่วไปในผลิตภัณฑ์เนื้อเดียวใช้เกลือ 2.0-3.0% เกลืออย่างเดียวจึงไม่พอยับยั้ง C. botulinum Riemann (18) พบว่า การยับยั้งสปอร์ของแบคทีเรียในเนื้อบรรจุกระป๋องโดยปฏิกิริยาร่วมของเกลือแกงกับไนไตรท์ และเกลือแกงกับไนเตรท จะเหมือนกับปฏิกิริยาร่วมของ pH กับเกลือแกง ในการทดลองต่อมาพบว่า C. botulinum ชนิด A, B และ F จะเจริญได้ดีที่ pH 6.0 เมื่อมีไนไตรท์ 150 หรือ 200 ppm. หรือมีเกลือ 6% แต่ภายใต้สภาวะเดียวกัน ไนไตรท์ 200 ppm. กับเกลือแกง 3% จะยับยั้งการเจริญเกือบทั้งหมด (24) จากผลเหล่านี้สรุปได้ว่า การเสริมกันระหว่างปัจจัยเหล่านี้ คือ เกลือแกง ไนไตรท์ และ pH จะมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้แต่ละอย่างเพียงอย่างเดียว และเมื่อนำสารที่เสริมกันเหล่านี้ไปใช้ร่วมกับสภาวะอื่น เช่น การฆ่าเชื้อด้วยความร้อน หรือการเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่ำ จะมีผลเสริมการยับยั้งมากขึ้นทวีคูณ

2.4.6 การฉายรังสี

ความต้านทานต่อรังสีของสปอร์ C. botulinum เมื่ออยู่ในชิ้นเนื้อจะมีมากกว่าเมื่ออยู่ในสารละลาย ความเข้มข้นของรังสีต่ำสุดที่ใช้ใน radappertization ของเบคอนและแฮมคือ 2.3 และ 3.7 Mrad ตามลำดับ (8)

2.4.7 ไนไตรท์

กลไกที่ไนไตรท์สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของ C. botulinum ยังไม่ทราบแน่ชัด คาดกันว่าเป็นการยับยั้งทางชีวเคมี ต่อ C. botulinum ไนไตรท์จะไปยับยั้ง enzyme ที่เกี่ยวข้องกับระบบการหายใจของแบคทีเรียหลายชนิด เชื่อว่ากรด nitrous สามารถเข้ารวมตัวในโครงสร้างโมเลกุลของน้ำย่อยพวก dehydrogenase และยังมีปฏิกิริยากับพวก monophenol เช่น tyrosine ทำให้องค์ประกอบของเซลเปลี่ยนไปหรือรวมตัวกับ heme pigment และ cytochrome ของเซลด้วย ทำให้เกิดการสูญเสียสาร catalyst ที่เกี่ยวข้องกับระบบการหายใจ (25) ซึ่งจะส่งผลไปป้องกันการรับและขนส่งพลังงาน ออกซิเจน โดยยับยั้งการเคลื่อนย้ายและปฏิกิริยา oxidative phosphorylation (8) ประสิทธิภาพการยับยั้งของไนไตรท์ไม่ได้เกิดเนื่องจากตัวของมันเองเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น pH เกลือ ความเข้มข้น ปริมาณสปอร์ เวลา และอุณหภูมิที่เก็บผลิตภัณฑ์

ได้มีผู้ศึกษาเพื่อตรวจสอบผลของไนไตรท์ต่อการงอกและเจริญของสปอร์ของ

แบคทีเรีย Duncan และ Foster (20) พบว่า ไนไตรท์จะกระตุ้นการงอกของสปอร์โดยเฉพาะภายใต้สภาวะที่เป็นกรด การเพิ่มความเข้มข้นของไนไตรท์จาก 0.03-0.2% จะเร่งอัตราการงอกของสปอร์ที่ pH 6.0 และนอกจากนั้นยังพบว่า อัตราการงอกของสปอร์ที่ pH 6.0 จะเร็วกว่าที่ pH 7.0 ส่วน pH 8.0 การงอกมีน้อยมาก ที่อุณหภูมิสูงขณะให้ความร้อนในกระบวนการผลิตไนไตรท์อาจเร่งให้สปอร์งอก ทำให้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน สปอร์ที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนอาจจะงอกภายหลัง แต่การเจริญจะถูกยับยั้งโดยปริมาณไนไตรท์ตกค้าง ในการทดลองกับเนื้อหมูเคียวที่ผ่านการ pasteurize ซึ่งขยายเวลาการเก็บที่ 10 °ซ. ก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 27 °ซ. พบว่า การยับยั้ง C. botulinum จะลดลงและพบว่าระดับของไนไตรท์ตกค้างลดต่ำลงเกินกว่าระดับที่ต้องการในการควบคุม C. botulinum อัตราการลดของปริมาณไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง อาทิ สูตรที่ใช้ กระบวนการผลิต pH และอุณหภูมิเก็บ (8)

ปริมาณไนไตรท์ที่ลดต่ำลงระหว่างเก็บผลิตภัณฑ์ ทำให้เกิดการเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่เหลืออยู่ โดยเฉพาะ C. botulinum แต่ถ้าปริมาณไนไตรท์ตกค้างอยู่มากไป ก็เป็นการเสี่ยงต่อการเกิดสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งเพราะเคยมีรายงานว่า ไนไตรท์ในเนื้อเคียวเป็นสารตั้งต้นในการเกิด nitrosamine ซึ่งมีคุณสมบัติก่อให้เกิดมะเร็งได้ (8) ดังนั้นในการใช้ไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ต้องควบคุมให้มีปริมาณที่พอเหมาะในการยับยั้งจุลินทรีย์ในช่วงอายุการเก็บที่ต้องการ และไม่มีไนไตรท์ตกค้างในปริมาณมากพอที่จะก่อให้เกิดสาร nitrosamine

แบคทีเรียต่างชนิดมีความต้านทานต่อสารไนไตรท์ต่างกัน สารไนไตรท์สามารถยับยั้งการเจริญของ Staphylococcus aureus, Streptococcus salivarius, Streptococcus mitis ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีเกลือบริโภคอยู่ด้วย การใช้น้ำเกลือเข้มข้น 3.6% และสารไนไตรท์ 150 ppm. สามารถป้องกันการเสียของเนื้อบดเมื่อมีสปอร์ของเชื้อ C. perfringens อยู่ในระดับน้อยกว่า 1 สปอร์ ต่อเนื้อ 1 กรัม และเหลือปริมาณไนไตรท์ตกค้าง 83 ppm. แต่จะไม่สามารถป้องกันเมื่อมีสปอร์ 50 สปอร์ ต่อเนื้อ 1 กรัม (25) มีรายงานว่าเชื้อ Stap. aureus ไม่สามารถเจริญในสภาวะสุญญากาศเมื่อมีไนไตรท์อยู่ด้วย (26) ไนไตรท์ 0.02% ที่ pH 6.0 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้คือ Achromobacter, Aerobacter, Escherichia, Flavobacterium, Micrococcus และ Pseudomonas ได้ (21)

2.5 ผลของไนไตรท์ เกลือ และกระบวนการให้ความร้อนต่อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อเคียว

เนื้อเคียวบรรจุกระป๋องประเภทเก็บได้ที่อุณหภูมิห้องที่ผลิตทางการค้ามีกระบวนการผลิต

ต่างกัน luncheon meat มีน้ำหนักบรรจุ 340 กรัม ความเข้มข้นน้ำเกลือ (brine concentration) 4.2-4.5% ระดับไนไตรท์ที่ใส่ 170 ppm. จะใช้ F_0 0.9-1.3 นาที แต่ถ้าความเข้มข้นน้ำเกลือ 4.9-5.7% ระดับไนไตรท์ที่ใส่ 91-113 ppm. จะใช้ F_0 0.5 นาที (17) แฮมบรรจุกระป๋องจะใช้น้ำเกลือเข้มข้นน้อยกว่า luncheon meat คือประมาณ 3.3% ระดับไนไตรท์ที่ใส่ 180 ppm. F_0 0.2-0.6 นาที เมื่อมีน้ำหนักบรรจุ 454-681 กรัม อาจกล่าวได้ว่า ในแฮมจะมีการปนเปื้อนของสปอร์จุลินทรีย์น้อยกว่าในเนื้อที่ผ่านการบดหรือ luncheon meat อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (17) ไส้กรอกบรรจุกระป๋องจะใช้ความเข้มข้นน้ำเกลือต่ำคือ 2-3% ไนไตรท์ 100-175 ppm. จึงต้องใช้ความร้อนสูงในการควบคุมจุลินทรีย์คือ F_0 1.0-1.5 นาที (17)

cured pork trimmings ที่มีเกลือ 3.5% ใช้ความร้อนซึ่งมีค่า F_0 0.13 นาที ถ้าใส่ไนไตรท์เริ่มต้น 78 ppm. จะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากธรรมชาติได้ แต่ถ้าใช้ไนไตรท์เริ่มต้น 39 ppm. จะเกิดการเสื่อมเสีย การใช้เกลือ 5% F_0 0.1 นาที โดยไม่ใส่ไนไตรท์ จะไม่สามารถป้องกันการเสื่อมเสียได้ (23) การใช้ F_0 0.05-0.6 นาที ระดับไนไตรท์ที่ใส่ 78-156 ppm. ปริมาณเกลือ 2-2.5% จะไม่เพียงพอในการยับยั้งสปอร์ที่ไม่ต้องการอากาศในจำนวนที่มากกว่า 10^2-10^4 ต่อเนื้อ 1 กรัม (12) อาจสรุปได้ว่า การใช้ F_0 0.1-0.4 นาที น้ำเกลือ 3.5-4.5% ไนไตรท์เริ่มต้น 75-150 ppm. จะปลอดภัยเมื่อมีสปอร์ Clostridium อยู่น้อยกว่า 1 สปอร์ ในเนื้อ 1 กรัม (23)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อระดับไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อเคียว

หลังผ่านกระบวนการผลิต ไนไตรท์จะเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นอย่างรวดเร็ว และเปลี่ยนแปลงต่อไปเมื่อเวลาในการเก็บผ่านไป จนปริมาณลดต่ำลงถึงระดับหนึ่งจึงคงที่ อัตราเร็วในการเปลี่ยนของไนไตรท์ขึ้นกับ pH กระบวนการให้ความร้อน อุณหภูมิการเก็บรักษา และระยะเวลาการเก็บรักษา (27) การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 107 °ซ. มีผลให้ไนไตรท์ตกค้างมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ 71 °ซ. (27) ไนไตรท์ที่ลดลงจะเปลี่ยนไปเป็นก๊าซ NO และ N_2O ระหว่างการผสมประมาณ 5% อยู่ในส่วนของ pigment 9-12% และจับกับ protein ในเนื้อโดยผ่านพันธะ thionitroso บางส่วน (27) ในผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่ผ่านความร้อน ไนไตรท์จะลดปริมาณลงจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ขณะที่ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผ่านการให้ความร้อน ไนไตรท์จะลดลงเนื่องจาก chemical reductants (28) อาจจะสรุปปัจจัยที่มีผลต่อระดับของไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อเคียวได้ดังนี้

reductants เช่น ascorbic acid, cysteine, amino acid histidine จะเปลี่ยนไนไตรท์เป็น nitric oxide ในสารละลายกรด อุณหภูมิเมื่อสูงขึ้นการสูญเสียไนไตรท์จะมากขึ้น free sulphydryl group จะทำปฏิกิริยากับไนไตรท์เกิดเป็น nitrosothiols (29) pH เมื่อลดลงปริมาณไนไตรท์จะลดลง (30) ช่วงเวลาการเก็บ เมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไว้นานขึ้น ปริมาณไนไตรท์ตกค้างจะยิ่งน้อยลง ชนิดของเนื้อและองค์ประกอบภายในของเนื้อ ถ้าต่างกันจะมีผลต่อปริมาณไนไตรท์ต่างกัน พบว่ากล้ามเนื้อขาว และ pH ต่ำ จะทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลงมากกว่ากล้ามเนื้อแดงที่ pH สูง และเมื่อปรับ pH เท่ากัน กล้ามเนื้อแดงจะทำให้ไนไตรท์ลดลงมากกว่ากล้ามเนื้อขาว (31) อิออนของโลหะได้แก่ ferrous ion, ferric ion และ cupric ion ทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลง ขณะที่ calcium ion และ magnesium ion ไม่มีผลต่อการลดลงของไนไตรท์ (32)

2.7 การใช้ C. sporogenes (PA 3679) แทน C. botulinum ในการศึกษาวิจัย

C. botulinum เป็นเชื้อที่สร้างสารพิษ เพื่อความปลอดภัยในทางปฏิบัติจึงใช้สปอร์ของ C. sporogenes (PA 3679, ATCC 7955) แทน เนื่องจาก PA 3679 มีความสามารถต้านทานต่อสารผสมในการเคียวเหมือนกับ C. botulinum แต่มีความต้านทานต่อความร้อนมากกว่า เมื่อใส่สปอร์ของ PA 3679 ในแฮมสับพบว่า $D_{250}{}^{o}{}_{F}$ เป็น 0.6 นาที ขณะที่ C. botulinum ชนิด A และ B มี $D_{250}{}^{o}{}_{F}$ 0.3 และ 0.4 นาที ตามลำดับ และยังพบอีกว่าสปอร์ที่สร้างในเนื้อดิบจะมีความต้านทานต่อความร้อนน้อยกว่าพวกที่สร้างในตัวกลางที่สุกหรือในอาหารที่ปลอดเชื้อ (18) นอกจากนั้น C. botulinum เมื่อเจริญในอาหารบางครั้งจะผลิต gasน้อยมาก กระป๋องจะแบนทำให้ตรวจสอบการเสียของอาหารได้ลำบากกว่าการใช้ PA 3679 ที่ผลิต gas มากกว่า ทำให้กระป๋องบวมเห็นชัดเจน (33) การทดลองใส่เชื้อในอาหารบรรจุกระป๋องทำเพื่อตรวจสอบและยืนยันประสิทธิภาพของกระบวนการผลิต เพราะในสภาพปกติปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจะต่ำกว่าปริมาณที่ใส่ลงไปเพื่อการทดลอง ถ้ากระบวนการผลิตสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ปริมาณที่ใส่เข้าไปได้ก็จะต้องสามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากการปนเปื้อนตามปกติได้

การใส่สปอร์จะใช้เข็มฉีดยาฉีดสารละลายของจุลินทรีย์เข้าไปยังจุดที่เย็นที่สุด คือจุดที่ความร้อนในการฆ่าเชื้อจะเข้าไปถึงช้าที่สุด สารละลายที่จะฉีดเข้าไปในอาหารที่เป็นของแข็งควรมีปริมาตร 0.1 หรือ 0.2 มิลลิลิตร (32) ซึ่งในปริมาตรดังกล่าวควรมีจำนวนสปอร์เท่าที่ต้องการด้วย ปริมาณสปอร์ที่จะศึกษาขึ้นกับขนาดของกระป๋องและความร้อนที่ใช้ อย่างไรก็ตามปริมาณของจุลินทรีย์ไม่ควรจะต่ำกว่า 10,000 ต่อกระป๋อง เพราะปริมาณที่ต่ำกว่านี้จะมี

ความผิดพลาดมาก (33)

2.8 ความเป็นพิษของไนไตรท์ การเกิดและการก่อมะเร็งของ nitrosamine

เมื่อรับประทานไนไตรท์เข้าไป จะเกิดการดูดซึมทันทีที่กระเพาะอาหารและไนไตรท์จะหายไปจากกระแสโลหิตอย่างรวดเร็ว ไนไตรท์ที่ถูกดูดซึม 30-40% ถูกขับถ่ายโดยไม่เปลี่ยนแปลงออกไปกับปัสสาวะ ที่เหลืออีก 60-70% ยังไม่ทราบแน่นอน ปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญที่สุดที่เกิดขึ้นในร่างกายคือ การเปลี่ยน hemoglobin ไปเป็น methemoglobin ทำให้รงควัตถุชนิดนี้ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวพา oxygen ได้อีก สำหรับคนขนาดที่ทำให้ถึงแก่ความตายคือ 0.18-2.5 กรัม (34)

อำนาจการก่อมะเร็งของ nitrosamine เมื่อทดลองในสัตว์ทดลองพบว่า nitrosamine จะเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้องอกชนิดเนื้อร้าย (malignant tumor) ในอวัยวะที่สำคัญ ๆ เช่นที่ ตับ ไต หลอดอาหาร กระเพาะปัสสาวะ ปอด ฯลฯ nitrosamine แต่ละชนิดมีศักยภาพในการก่อมะเร็งต่างกัน ปริมาณเฉลี่ยที่ทำให้เกิดมะเร็ง (D_{50}) ในหนูของ nitrosodimethylamine (NDMA), nitrosodiethylamine (NDEA) และ nitrosopyrrolidine (NPYR) คือ 400, 633 และ 3,900 ppb. ตามลำดับ (34) ตัวที่มีโอกาสพบมากในอาหารคือ NDMA, NDEA และ NPYR คาดว่ากลไกที่ nitrosamine ก่อให้เกิดมะเร็งคือ การเติมกลุ่ม alkyl ให้ nucleic acid ทำให้องค์ประกอบของ DNA เกิด mutation เป็นเซลมะเร็ง (34 35)

nitrosamine อาจจะเกิดในร่างกายได้เมื่อบริโภคอาหารที่มีสารประกอบ secondary amine และไนไตรท์ เช่น ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ผ่านภาวะเดียว และการเกิดในร่างกายคาดว่าเกิดจากปฏิกิริยา nitrosation ของไนไตรท์ และ secondary amine ที่กระเพาะอาหาร หรือจากจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่สร้าง NDMA เช่น E. coli, Proteus สำหรับ nitrosamine ที่เกิดขึ้นในตัวอาหารนั้นเกิดเนื่องจาก ไนไตรท์ทำปฏิกิริยากับ secondary amine ที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์ในสภาวะที่เป็นกรดซึ่งจะเกิดขณะผ่านกระบวนการผลิตหรือระหว่างการเก็บรักษา ตัวอย่างสมการการเกิด nitrosamine (35) มีดังนี้

$$2HNO_2 \longrightarrow N_2O_3 + H_2O$$

$$R_2NH + N_2O_3 \longrightarrow R_2NNO + HNO_2$$