บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ในปัจจุบันอาหารแช่แข็งนับว่ามีความสำคัญเป็นอันดับต้น ๆ ที่มียอดการส่งออกสูงสามารถนำเงินตราจากตลาดโลกเข้าประเทศได้ไม่ต่ำกว่าแสนล้านบาทต่อปี โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ *(Peneaus monodon)* นับว่าเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของไทยเป็นอย่างมาก นับตั้งแต่มีการเลี้ยงอย่างจริงจัง ปี 2530 เป็นต้นมา การเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ปริมาณการส่งออกกุ้งกุลาดำของไทยโดยเฉพาะกุ้งสดแช่เยือกแข็ง จัดเป็นสินค้าส่งออกที่นำรายได้เข้าประเทศมากที่สุด 10 อันดับแรก ติดต่อกันมาตั้งแต่ปี 2534 และในปี 2544 มูลค่าการส่งออกสินค้าประมงและผลิตภัณฑ์ทั้งหมดเท่ากับ 190,900 ล้านบาท โดยที่สินค้าประเภทกุ้งเป็นสินค้าส่งออกมากเป็นอันดับ 1 ในปี 2545 มูลค่าการส่งออกสินค้าประมงและผลิตภัณฑ์ลดลงเหลือ 169,193 ล้านบาท โดยที่สินค้าประเภทกุ้งแช่เยือกแข็งยังเป็นสินค้าส่งออกมากเป็นอันดับ 1 เช่นเดิม โดยมีมูลค่าการส่งออก 73,943 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 43.7 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าประมง และผลิตภัณฑ์ทั้งหมด (กองเศรษฐกิจการประมง, 2547) และถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อการส่งออกหลายชนิดมีแนวโน้มลดลง เช่น ไก่แช่แข็ง เนื่องจากปัญหาโรคระบาดในไก่ แต่กุ้งขาวแช่เยือกแข็งและแปรรูปยังคงเติบโตในอัตราสูง การบริโภคกุ้งขาวเริ่มเป็นที่นิยมมากขึ้น พฤติกรรมดังกล่าวเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดทิศทางตลาดกุ้งในอนาคต (นุชจรินทร์, 2547) ภายใต้ศักยภาพของอุตสาหกรรมอาหารไทย ตลาดส่งออกส่วนใหญ่ยังเป็นสหรัฐอเมริกา กลุ่มประเทศยุโรปและญี่ปุ่นท่ามกลางความเป็นผู้นำระดับแนวหน้าของอุตสาหกรรมอาหารโลก มีทั้งโอกาสและปัญหา โอกาสสำคัญที่สุดอยู่ที่ไทยมีวัตถุดิบการผลิตที่หลากหลายปริมาณมาก ทางด้านอุปสรรค การกีดกันทางการค้ายังเป็นปัญหาใหญ่ที่สุดสำหรับผู้ประกอบการไทย ไม่ว่าจะเป็นการกีดกันในแง่ของมาตรการทางภาษี หรือมาตรการที่ไม่ใช่ภาษี โดยเฉพาะมาตรการด้านคุณภาพและความปลอดภัยด้านสุขอนามัยจะเป็นแนวโน้มใหม่ ที่มีความสำคัญเข้มข้นและรุนแรงมากขึ้น สำหรับเวทีการค้าระหว่างประเทศในอุตสาหกรรมอาหาร ในรอบปี พ.ศ.2542-2543 ที่ผ่านมาปรากฏว่าสหรัฐอเมริกาไม่

อนุญาตนำเข้าสินค้าไทยด้วยเหตุผลสำคัญๆ 5 ประการ และ 1 ใน 5 นั้นก็มีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารส่งออก (จันทนา, 2544) จากการศึกษาเพื่อ
ตรวจหาเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *V. parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลเพื่อส่งออกจำนวน 630 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อนี้คิดเป็นร้อยละ 14.14 ของอาหารแช่แข็งทั้งหมด โดยแยกชนิดของอาหารเป็น 4 ชนิด คือ กุ้งดิบแช่แข็ง กุ้งผ่านความร้อนก่อนแช่แข็ง ปลาแช่แข็ง และอาหารมูลค่าเพิ่มแช่แข็ง เช่น กุ้งชุบแป้งทอด ฮะเก๋ากุ้ง ตรวจพบร้อยละ 41.05, 1.64, 6.26 และ 15.58 ของอาหารแต่ละชนิดตามลำดับ (นิตยา และ อารุณี, 2538) ในปี 2543-2544 รายงานของสหภาพยุโรปผ่านกระทรวงพาณิชย์ ระบุว่าตรวจพบการปนเปื้อนของ *V. cholerae* บ่อยครั้งในสินค้าสัตว์น้ำแช่เยือกแข็งส่งออก ได้แก่ กุ้งกุลาดำ ปลาหมึกสาย ปลาหมึกกล้วย และปลาแซลมอน และจากการที่กรมประมงได้ตรวจคุณภาพจุลินทรีย์ของสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์ส่งออก ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง กรกฎาคม 2545 พบ *V. cholerae* non O1 /non O139 ในกุ้งกุลาดำ จำนวน 14 ตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 481 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3 สหภาพยุโรปตรวจพบ *V. cholerae* ในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง มีการกักกันระหว่างเดือนมีนาคม 2543 - กุมภาพันธ์ 2544 ทั้งสิ้น 6 ครั้ง (EU แจ้งผ่านอัครราชทูตที่ปรึกษา : ฝ่ายเกษตรประจำกรุงบรัสเซล)

แบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ที่เป็นสาเหตุก่อโรคอุจจาระร่วงที่สำคัญที่สุดคือ *V. cholerae* รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* *V. cholerae* ทำให้เกิดโรคอหิวาต์ ซึ่งมีรายงานผู้ป่วยทั่วประเทศประมาณ 3,000 - 5,000 รายต่อปีทำให้มีผลกระทบต่อการท่องเที่ยวของประเทศ จนทำให้ต้องเปลี่ยนชื่อโรคอหิวาต์เป็นอุจจาระร่วงอย่างแรง (severe diarrhea) ส่วน *V. parahaemolyticus* ทำให้เกิดลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ทำให้ผู้ป่วยมีอาการท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน ปัจจุบันทั่วโลกกำลังเฝ้าระวังเชื้อกลุ่มนี้ การติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ส่วนใหญ่เกิดจากการดื่มน้ำหรือรับประทานอาหารทะเลที่ปนเปื้อนเชื้อพบว่ากุ้งทะเลสดแช่เยือกแข็ง 30 % มีเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ในกรรมวิธีการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็ง มีขั้นตอนที่ช่วยลดจำนวนเชื้อ *Vibrio* ออกจากวัตถุดิบได้ คือ การล้างวัตถุดิบด้วยน้ำคลอรีน ก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง สารคลอรีนเป็นสารที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง (WHO, 1989) ความเข้มข้นที่โรงงานอุตสาหกรรมใช้ในการล้างครั้งแรกจะเริ่มด้วยความเข้มข้นค่อนข้างสูง (100 ppm) การล้างครั้งต่อไปจะลดความเข้มข้นลงตามลำดับ (50 และ 25 ppm) ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวนี้มีผลข้างเคียงต่อผู้ปฏิบัติงาน คือ มีการระคายเคืองต่อผิวหนัง ทำให้ผิวหนังอักเสบเป็นผื่นแดง ระคายเคืองต่อจมูก แสบจมูก ทำให้ตาแดง แสบตา และระคายเคืองระบบหายใจส่วนบน ทำให้หลอดลมอักเสบ หากใช้ติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้สมรรถภาพการทำงานของปอดลดลงอย่างถาวร (www.ccohs.ca/

oshanswers/chemicals/chem_profiles/chlorine/health-chlorine.htm) และการใช้คลอรีนในการฆ่าเชื้อโรคยังมีข้อด้อย คือ มีการทำปฏิกิริยาของคลอรีนกับกลุ่มของกรดอินทรีย์คือกรดฮิวมิคทำให้เกิดไตรฮาโลมีเทน (Trihalomethanes : THMs) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Andrews *et al.*, 2002)

จากการทดลองของ No *et al.* (2002) พบว่าไคโตแซนจากเปลือกปูที่ความเข้มข้น 0.1 % มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย 7 ชนิด และจากการศึกษาของ Simpson *et al*., (1997) พบว่าการนำไคโตแซนไปใช้ในการเก็บรักษากุ้งสด (*Pandalus borealis*) โดยทดลองในกุ้งทั้งตัวและกุ้งเด็ดหัว โดยที่นำตัวอย่างทั้ง 2 จุ่มลงในสารละลายไคโตแซนความเข้มข้นต่าง ๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 – 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน พบว่าไคโตแซนสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ที่ช่วงความเข้มข้นของไคโตแซนระหว่าง 0.0075–0.01% และยังมีรายงานการศึกษาถึงความสามารถของไคโตแซนในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อราและแบคทีเรีย (Kendra and Hadwiger, 1984 ; Papineau *et al*., 1991 ; Sudarshan *et al.,* 1992 ; Wang, 1992) ซึ่งพบว่ามีผลทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Escherichia coli, Yersinia enterocolitica, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ไคโตแซนเป็นสารป้องกันการเน่าเสียของอาหารอีกด้วย (Darmadji and Izumimoto, 1994) จากคุณสมบัติดังกล่าวของไคโตแซน ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดว่าน่าจะประยุกต์ใช้ไคโตแซนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากการแปรรูปเปลือกของกุ้ง ปู กุ้งเคย สัตว์ทะเลต่าง ๆ ที่อยู่ในตระกูลครัสเตเชียน แกนหมึก ผนังของสาหร่ายและเห็ดราบางชนิด (สิริรัตน์ และคณะ, 2546) มาล้างตัวอย่างอาหารเพื่อลดจำนวน *Vibrio* ก่อโรคก่อนแช่เยือกแข็ง เพื่อลดปัญหาจากการใช้สารคลอรีน นอกจากนี้ยังเป็นการแปรรูปเปลือกกุ้ง ปู หอย ฯลฯ ซึ่งเป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทะเลมาใช้ให้เป็นประโยชน์

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 การส่งออกกุ้งแช่เยือกแข็ง

กุ้งเป็นสินค้าสัตว์น้ำที่มีความสำคัญ ทั้งในแง่ที่เป็นแหล่งอาหารโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีการบริโภคกันทั่วไปภายในประเทศ และยังมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจกับประเทศไทยอีก สามารถส่งเป็นสินค้าออกที่ทำรายได้ให้ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท กุ้งที่ส่งออกไปขายยังต่างประเทศนั้นมีหลายประเภทเช่น กุ้งสดแช่เยือกแข็ง กุ้งต้มสุกแช่เยือกแข็ง กุ้งกระป๋อง ซึ่งกุ้งสดแช่เยือกแข็งยังสามารถแบ่งย่อย ตามรูปแบบต่าง ๆ ที่ประเทศผู้ซื้อต้องการเช่น กุ้งทั้งตัว กุ้งเด็ดหัว กุ้งเด็ดหัวและปอกเปลือกแบบชักไส้และผ่าหลัง นอกจากผลิตภัณฑ์กุ้งดิบและกุ้งต้มแล้ว ในปัจจุบันมีการผลิต ผลิตภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูป สำเร็จรูป หรือผลิตภัณฑ์เพิ่มมูลค่า (value added) คือ กุ้งชุบแป้งทอด กุ้งบาบีคิว ฮะเก๋ากุ้ง ลูกชิ้นกุ้ง ซึ่งผลิตภัณฑ์ประเภทหลังนี้มีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (ศิริลักษณ์, 2541)

ประเทศไทยเริ่มส่งออกกุ้งแช่เยือกแข็งออกสู่ตลาดโลกในปี พ.ศ. 2508 มีปริมาณมูลค่าและอัตราการขยายตัวสูงมาก ปริมาณการส่งออกของกุ้งแช่เยือกแข็งเพิ่มขึ้นทุกปี ประเทศไทยสามารถครองส่วนแบ่งตลาดโลกได้มากที่สุดเป็นอันดับหนึ่งในการส่งออกกุ้งแช่แข็งมาตั้งแต่ปี 2534 รวมเป็นเวลามากกว่า 10 ปี แต่อัตราการเพิ่มขึ้นมีการลดลงในช่วงปีหลัง ๆ ซึ่งการส่งออกที่มีอัตราการขยายตัวต่ำลงมีสาเหตุมาจากหลายประการ กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ (2529)และธรรมนูญ (2532) รายงานว่ามีปัญหาหลายด้าน เช่น ด้านคุณภาพสินค้า การขนส่ง ภาษีอากรส่งออก การเอารัดเอาเปรียบ และการกีดกันเชิงการค้า การกระจายของตลาดส่งออก การแข่งขันในตลาดส่งออกด้านราคา และปัญหาที่สำคัญที่สุดคือ ด้านคุณภาพ และมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ในด้านความสะอาดและความสดของสินค้า ปัญหาสิ่งปลอมปนต่างๆ เช่น เศษไม้ ยางวง ขนสัตว์ นอกจากผลจากสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้จะมีผลกับการส่งออกแล้ว คุณภาพในด้านจุลินทรีย์ และการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ ยังเป็นปัญหาที่สำคัญจนทำให้ถูกตีกลับ หรือถูกทำลายเมื่อส่งไปขายยังต่างประเทศ
(เพ็ญศรี และคณะ, 2530)

1.2.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพและการปนเปื้อนของแบคทีเรียในกุ้ง

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกุ้งสดหลังการเก็บเกี่ยวก่อนนำไปแช่เยือกแข็ง เกิดขึ้นโดยกลไกสำคัญ 2 ประการคือ การย่อยสลายเซลล์ (cell autolysis) โดยเอนไซม์หลายชนิดจากไลโซโซม

และแบคทีเรีย อัตราการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการเช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาการเก็บรักษาระหว่างกระบวนการผลิต และปริมาณเริ่มต้นของแบคทีเรีย

ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียเริ่มต้นในกุ้งสดที่ได้จากแหล่งที่ต่างกันอาจมีความแตกต่างกัน ภัทราภรและคณะ (2533) รายงานว่าแบคทีเรียที่พบในกุ้งกุลาดำสดซึ่งสุ่มจากจากบ่อเลี้ยงบริเวณอ่าวปัตตานีส่วนใหญ่ประกอบด้วย *Vibrio, Krebsiella, Yersinia* และ *Pseudomonas* โดยพบใน ทางเดินอาหารด้วยปริมาณสูงที่สุดถึง $2.1x10^7$ โคโลนี/กรัม สำหรับ *Aeromonas, Enterobacter* และ *Plesiomonas* พบในปริมาณเล็กน้อย อรัญ (2516) รายงานว่าแบคทีเรียซึ่งตรวจพบในกุ้งที่โรงงานแปรรูปกุ้งแช่เยือกแข็งประกอบด้วย *Coliform, Proteus, Streptococcus, Staphylococcus, Salmonella และ Clostridium* อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์กุ้งทะเลแช่เยือกแข็งอาจตรวจพบแบคทีเรียที่มีอันตรายต่อผู้บริโภคซึ่งนำมาใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพ เช่น *V. cholerae, E. coli, S. aurius* และ *Salmonella* (กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, 2528) สำหรับแบคทีเรียที่พบบ่อยในกุ้งสดจากแหล่งน้ำธรรมชาติคือ *Achrobactor, Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas* และ *Flavobacterium* (อรัญ, 2516)

1.2.3 คุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์กุ้งเพื่อการส่งออก

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกุ้งแช่เยือกแข็ง ตามมาตรฐานที่ มอก. 115 - 229 ซึ่งกำหนดสุขลักษณะของผลิตภัณฑ์ โดยจุลินทรีย์ต้องไม่เกินเกณฑ์กำหนดดังต่อไปนี้ ในกรณีที่เป็นกุ้งดิบ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (total viable count) ต้องไม่เกิน $1x10^7$ โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และจะมีจุลินทรีย์เกิน $1x10^6$ โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง *E. coli* ค่า most probable number ต้องไม่เกิน $4x10^2$ ต่อตัวอย่าง 1 กรัม และจะมีค่า MPN เกิน 4 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง *S. aureus* ต้องไม่เกิน $5 x10^3$ โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และจะมีจำนวนเกิน $1x10^3$ โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ไม่เกิน 3 ตัวอย่างใน 5 ตัวอย่าง *Salmonella* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม (มอก.115-2529)

สำหรับการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออกนั้น ประเทศผู้นำเข้าที่สำคัญของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ออสเตรเลีย ประเทศต่าง ๆ เหล่านี้ได้กำหนดมาตรฐานสำหรับผลิตภัณฑ์กุ้ง โดยทั่วไปมุ่งเน้นถึงมาตรฐานในการผลิตให้ถูกสุขลักษณะ (sanitation and hygiene requirement) การกำหนดมาตรฐานทางจุลชีววิทยา (microbiological standard) ได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ หรือปริมาณเชื้อทั้งหมดสำหรับผลิตภัณฑ์สุกและผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค จะกำหนดระดับการยอมรับและการตรวจสอบที่เข้มงวดสำหรับปริมาณเชื้อทั้งหมด รวมทั้งปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและปริมาณเชื้อที่ทำให้

เกิดอาหารเป็นพิษ โดยเฉพาะเชื้อ *L. monocytogenes* การกำหนดมาตรฐานทางเคมี โดยทั่วไปประเทศต่าง ๆ มีกำหนดโดย ดัชนีวัดความสดของสัตว์น้ำ ได้แก่ total volatile nitrogen หรือ indole (โดยเฉพาะสหรัฐอเมริกา) สารเจือปน ได้แก่ สารเมตาไบซัลไฟต์ สารฟอสเฟต EDTA รวมถึงสารเคมีหรือสารปฏิชีวนะตกค้าง เช่น ออกซี่เตตราซัยคลิน และออกโซลินิเอซิด สารปนเปื้อน ได้แก่ โลหะหนัก สารฆ่าแมลงต่าง ๆ เป็นต้น กำหนดมาตรฐานทางกายภาพ ได้แก่ชนิดของสัตว์น้ำ ปริมาณน้ำหนัก ลักษณะทางประสาทสัมผัส ได้แก่ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส โดยสหรัฐอเมริกาและแคนาดาจะกำหนดการตรวจสอบทางประสาทสัมผัสที่เข้มงวด โดยมาตรฐานในการผลิตให้ถูกสุขลักษณะ ผู้ผลิตสามารถควบคุมมาตรฐานให้เป็นตามข้อกำหนดของประเทศผู้นำเข้าได้ โดยการควบคุมสุขลักษณะการผลิตและกระบวนการควบคุมการผลิตตามหลัก HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) (ศิริลักษณ์, 2541)

โดยในมาตรฐานทางจุลชีววิทยาของกุ้งทั้งตัวและกุ้งเด็ดหัวแช่เยือกแข็งในการส่งออกไปยังต่างประเทศ ได้กำหนดไว้ว่า total viable count /กรัม ไม่เกิน 100 *E. coli* MPN/กรัม ไม่พบ *S. aureus* coagalase - positive MPN /กรัม ไม่พบ *V. cholerae* /กรัม ไม่พบ *Salmonella* /กรัม ไม่พบ (วรรณา และคณะ, 2533) International Comission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF, 1974) และ Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO, 1979) ได้กำหนดค่าการยอมรับสำหรับ *V. parahaemolyticus* ให้มีปริมาณไม่เกิน 100 เซลล์/กรัม ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลต้มสุกและ ICMSF(1996) ได้กำหนดค่าการยอมรับของ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งดิบแช่แข็ง ว่าต้องไม่เกิน $1x10^3$ โคโลนีต่อตัวอย่างอาหาร 1 กรัม และจะมีจำนวน $1x10^2$ โคโลนีต่อตัวอย่างอาหาร 1 กรัม ได้ไม่เกิน 1 ตัวอย่าง ใน 5 ตัวอย่าง

1.2.4 จีนัส *Vibrio*

จีนัส *Vibrio* จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae ซึ่งประกอบด้วย 4 จีนัส คือ *Aeromonas, Photobacterium*, *Plesiomonas* และ *Vibrio* เชื้อในจีนัส *Vibrio* มีมากกว่า 30 สปีชีส์ แต่สปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคนมี 12 สปีชีส์คือ *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cincinatiensis*, *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. hollisae*, *V. metchnikovii*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* และ *V. parahaemolyticus* (Farmer, 1991)

Vibrio เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้ง หลายสปีชีส์เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagellum ในอาหารเหลว แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella ได้ เชื้อในจีนัส *Vibrio* ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน สามารถเผา

ผลาญอาหารได้ โดยใช้กระบวนการหายใจและกระบวนการหมัก พบทั่วไปทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตอยู่ระหว่าง 18-37 องศาเซลเซียส สปีชีส์ที่ทำให้เกิดโรคในคนเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (halophile) โดยสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคในคนต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 1-3% มีบางสายพันธุ์ไม่สามารถเติบโตในที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ มีช่วง pH ในการเติบโต 6.0-9.0 *Vibrio* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส โดยทั่วไปสามารถสร้าง indole, catalase และ oxidase สามารถย่อยไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ สามารถสร้างเอนไซม์หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (exoenzyme) ได้แก่ protease, amylase, lipase, lecitinase, DNAase และ chitinase เชื้อในจีนัส *Vibrio* มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ซึ่งให้ผล oxidase เป็นลบ จากการศึกษาทางชีวโมเลกุลพบว่า *Vibrio* ที่ทำให้เกิดโรคในคนมีปริมาณ guanine รวมกับ cytosine (ค่า G+C content) ของดีเอ็นเอ เท่ากับ 39-51 mol % (Lee, 1990)

เชื้อในจีนัส *Vibrio* สามารถเจริญบน nutrient agar ที่มีเกลือ 0.5% โดยทั่วไปโคโลนีมีลักษณะ กลมนูน ขอบเรียบ สีครีม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 มิลลิเมตร แต่บางสปีชีส์ เช่น *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* โคโลนีมีลักษณะแผ่ (swarm) *Vibrio* ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดี และ pH สูงได้ มีความสามารถในการใช้ telluritenthiosulphate citrate จึงมีการนำสารต่าง ๆ เหล่านี้ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเป็น selective media นอกจากนี้ยังใช้น้ำตาลซูโครส แมนโนสหรือ คาร์โบไฮเดรต เป็นดัชนีบ่งชี้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิด มีการใส่ polymyxin B ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อคัดเลือกเชื้อ *V. parahaemolyticus* หรือแยกเชื้อ *V. cholerae* El Tor ออกจาก *V. cholerae* Classical เนื่องจาก *V. cholerae* Classical มีความไวต่อ polymyxin B อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจีนัส *Vibrio* ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายคือ thiosulphate – citrate - bile salts - sucrose (TCBS) agar ซึ่งสามารถแยกเชื้อตามคุณสมบัติการหมักน้ำตาลซูโครสได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสโคโลนีจะมีสีเหลืองได้แก่ *V. cincinatiensis*, *V. cholerae*, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. metchnikovii* และ *V. carchariae* ส่วนกลุ่มที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครส โคโลนีจะมีสีเขียวได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* และ *V. vulnificus* เชื้อในจีนัส *Vibrio* ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้บน MacConkey's bile – salt agar และสามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นที่ใช้ในการแยกเชื้อก่อโรคในลำไส้ แต่ *V. hollisae* เป็นสปีชีส์เดียวที่ไม่สามารถเจริญบน TCBS หรือ selective media อื่น แต่สามารถแยกเชื้อ *V. hollisae* จากอุจจาระบน blood agar หรือ marine agar เท่านั้น (Hickman *et al.,* 1982)

Vibrio สามารถพบได้ในน้ำทะเลทั่วโลก และปนเปื้อนในสัตว์ทะเล ในประเทศไต้หวันได้มีการศึกษาการแยกเชื้อ *Vibrio*จากอาหารทะเลพบ *V. alginolyticus*,*V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *Aeromonas caviae*, *A.hydrophila* และ *A. sobria* (Wong *et al.,* 1992) ในประเทศฮ่องกง Chan *et al.*(1989) ได้แยกเชื้อกลุ่ม *Vibrio* อื่น ๆรวมทั้ง *V. parahaemolyticus* จากอาหารทะเลที่จำหน่ายในตลาดพบว่าสามารถแยกเชื้อ *V. alginolyticus* ได้มากที่สุด รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. Pelagius*, *V. compbellii*, *V. spendidus* และ*V. marius* ตามลำดับ ในประเทศอิตาลี Baffone *et al.*(2000) ศึกษากุ้งทะเลสดแช่แข็ง พบว่า 30% ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 129 ตัวอย่าง มีเชื้อ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. metchnikovii*, *V. cholerae* non-O1 และ *V. fluvialis* จากการศึกษาของ Lowy *et al.* (1989) ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่า 100% ของจำนวนหอยนางรมดิบปนเปื้อนด้วยเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ 67% ปนเปื้อนด้วย *V. vulnificus* การก่อโรคลำไส้อักเสบของ *Vibrio* เกิดจากการรับประทานอาหารทะเลดิบ หรือปรุงสุก ๆ ดิบ ๆ นอกจากนี้ น้ำที่ปนเปื้อนเป็นสาเหตุสำคัญในการติดเชื้อ *V. cholerae* (Lee, 1990) จากการศึกษา *Vibrio* ในหอยและน้ำทะเลในประเทศฝรั่งเศส ระหว่างเดือน กรกฎาคม- กันยายน ปีค.ศ. 1999 จำนวน 189 ตัวอย่างพบ *V. alginolyticus* มากที่สุด 99 ตัวอย่าง รองลงมาคือ *V. parahaemolyticus* 41 ตัวอย่าง *V. vulnificus* 20 ตัวอย่างและ*V. Cholerae* non-O1/ non-O139 20 ตัวอย่าง (Hervio-Health *et al.,* 2002)

1.2.4.1 *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus จัดเป็นเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning bacteria) ถูกพบครั้งแรกโดย Fujino และคณะ ในปี ค.ศ.1950 โดยขณะนั้นเชื้อดังกล่าวเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในเมืองโอซากา ประเทศญี่ปุ่น มีผู้ป่วยที่แสดงอาการกระเพาะและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรงจำนวน 272 ราย และเสียชีวิต 20 รายเนื่องจากการรับประทานชิราสุ ซึ่งเป็นปลาซาร์ดีน (half-dried sardine) ตัวเล็กกึ่งตากแห้ง โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มีระยะฟักตัวของโรค 2-6 ชั่วโมง อาการโดยทั่วไปประกอบด้วยปวดเกร็งในช่องท้อง อาเจียน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ แต่บางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปน ปวดศรีษะหนาวสั่น Fujino ตั้งชื่อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุว่า *Pasteurella parahaemolytica* ต่อมาในปี ค.ศ.1953 ได้มีการศึกษาลักษณะของเชื้อพบว่าเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนปลายมนยาว 1-3 μm หมักน้ำตาล กลูโคส ให้กรดแต่ไม่ให้แก๊ส เคลื่อนที่ได้โดยใช้ single polar flagellum ให้ผลบวกในการทดสอบ indole และในปี ค.ศ.1955 Takikawa พบว่า *P. parahaemolytica* เป็นแบคทีเรียที่มีแหล่งกำเนิดจากทะเลและเป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือในการเจริญเติบโต (halophile) สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3% ในปี ค.ศ.1963

Sakazaki และคณะได้ศึกษาลักษณะรูปร่าง การเพาะเลี้ยงเชื้อ และลักษณะทางชีวเคมีของเชื้อ *P. parahaemolyticus* จึงเปลี่ยนจากจีนัส *Pasteurella* เป็นจีนัส *Vibrio* (Miwatani and Takeda, 1976)

V. parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ลักษณะเป็นท่อนตรงหรือโค้งเล็กน้อยขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 μm สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ มีแคปซูล เมื่ออยู่ในอาหารเหลวเคลื่อนที่ด้วย single polar flagellum แต่เมื่อเจริญในอาหารแข็งสามารถสร้าง peritrichous flagella เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ สามารถสร้างเอนไซม์ catalase และ oxidase ไม่สามารถหมักน้ำตาล sucrose แต่สามารถหมักน้ำตาล glucose ให้กรดแต่ไม่ให้แก๊ส ดังนั้นลักษณะโคโลนีบนอาหาร จึงมีสีเขียวอมน้ำเงินขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร *V. parahaemolyticus* สามารถหมักน้ำตาล manitol และ mannose แต่ไม่สามารถหมัก salicin และcellubiose สามารถเปลี่ยน tryptophan เป็น indole (Lee, 1990)

การศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าเชื้อ *V. parahaemolyticus* เจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส (mesophile) อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 44 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ที่ pH ค่อนข้างกว้างคือ 4.8 - 11 แต่ pH ที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 7.6 - 8.6 นอกจากนี้โซเดียมคลอไรด์ก็เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอ-ไรด์ที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 0.5 - 8% ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2 - 3% เมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ alkaline peptone water ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะมี generation time สั้นประมาณ 11 นาที (Lee, 1990)

การอยู่รอดในอาหารต่าง ๆ พบว่า เมื่อนำกุ้งทั้งตัวเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 3, 7, 10 หรือ -18 องศาเซลเซียส ปริมาณ *V. parahaemolyticus* จะลดลงแต่ยังมีชีวิตอยู่ได้ 8 วัน ในหอยนางรมที่วางบนชั้นจำหน่ายอาหารอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้อย่างน้อย 3 อาทิตย์ และสามารถเพิ่มจำนวนได้เมื่อนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 วัน และเช่นเดียวกัน *V. parahaemolyticus* ในซูริมิ (surimi) ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีปริมาณเชื้อลดลงแต่สามารถเพิ่มจำนวนได้อีกเมื่อวางไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Wong *et al.,* 1994) สำหรับผลของความร้อนต่อการอยู่รอดของ *V. parahaemolyticus* พบว่าที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที สามารถทำลายเชื้อจำนวน $5x10^2$ เซลล์ได้ แต่หากเชื้อมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น จำเป็นต้องใช้เวลาในการทำลายเชื้อเพิ่มมากขึ้น เช่น ปริมาณเชื้อ $2x10^5$เซลล์ ถูกทำลายด้วยอุณหภูมิ 60 องศาสเซลเซียส หรือ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเชื้อสามารถถูกทำลายได้ในน้ำเดือดที่เวลา 1 นาที (Vanderzant and Nickelson, 1972)

V. parahaemolyticus พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งทะเล ในน้ำทะเล ในตะกอนดิน สัตว์ทะเล เช่น กุ้ง หอย ปู ปลา แพลงก์ตอน และสาหร่าย การกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมขึ้นกับฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนพบเชื้อมากกว่าฤดูหนาว จากการศึกษา *V. parahaemolyticus* ในหอยนางรมที่จำหน่ายในร้านค้าปลีก ช่วงปี 1998 - 1999 ในสหรัฐอเมริกาโดยวิธี Most Probable Number พบว่าปริมาณ *V. parahaemolyticus* เพิ่มขึ้นสูงมากในช่วงฤดูร้อน (Cook *et al*., 2002) ในช่วงฤดูหนาวเชื้อจะอาศัยอยู่ในตะกอนใต้น้ำ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนและปนเปื้อนในน้ำทะเลมากขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ในแพลงก์ตอนสัตว์ โดยเชื้อดูดซับสารไคตินบนแพลงก์ตอนเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมเชื้อจะย่อยผนังเซลล์ของแพลงก์ตอน และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในทะเล จากการศึกษาพบว่า ไม่สามารถแยกเชื้อในน้ำทะเลที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส แต่สามารถแยกเชื้อจากตะกอนดินได้แม้ว่าอุณหภูมิของตะกอนดินจะต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (Kaneko and Cowell, 1973)

ในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ *V. parahaemolyticus* ครั้งแรกในปี ค.ศ.1970 ครั้งนั้น *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคอุจจาระร่วงสูงถึงร้อยละ 25 ของสาเหตุทั้งหมด ซึ่งสูงกว่า *Salmonella* และ *Shigella* (อรษา, 2541) ในปีค.ศ. 1978 Maruyama และคณะ พบว่าสาเหตุของการเกิดโรคอุจจาระร่วงในจังหวัดจันทบุรี มีสาเหตุมาจาก *V. parahaemolyticus* 39.9 % จากการศึกษาอุบัติการณ์ของโรคร่วมกับชนิดของอาหารรับประทานพบว่า สาเหตุเกิดจากการรับประทานปูแสม (ปูเค็ม) ปลาทะเล กุ้งทะเล ลูกชิ้นปลาทะเล และหอยแมงภู่ (บุญเยี่ยม และคณะ, 2527) ในปี ค.ศ.1999 มีรายงานการตรวจแยกเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารทะเลส่งออกจำนวน 686 ตัวอย่าง ซึ่งมาจากฮ่องกง อินโดนีเซีย ไทยและเวียดนาม พบ *V. parahaemolyticus* สูงถึง 45.9% โดยส่วนใหญ่พบเชื้อในตัวอย่างที่มาจากฮ่องกงและประเทศไทยสูงกว่าตัวอย่างที่มาจากอินโดนีเซียและเวียดนามมาก ซึ่งตัวอย่างที่พบส่วนใหญ่ เป็น กุ้ง ปู ปลา และหอย (Wong *et al*., 1999)

ประเทศไทยมีอุณหภูมิตลอดปีไม่แตกต่างกันมาก ดังนั้นการระบาดของเชื้อจึงพบได้ทุกเดือน แต่พบผู้ป่วยมากที่สุดในเดือนมิถุนายน และพบน้อยที่สุดในเดือนธันวาคม จากการสำรวจเชื้อบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน และอ่าวไทย โดยเก็บตัวอย่างน้ำทะเลทั้งหมด 234 ตัวอย่าง จากระดับผิวน้ำ ระดับกลาง และระดับผิวดิน จากตะกอนดิน 78 ตัวอย่าง พบว่าบริเวณฝั่งอ่าวไทยตอนบนมีเชื้อมากกว่าฝั่งทะเลอันดามัน (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2524)โดยบริเวณฝั่งอ่าวไทยมีเชื้อในน้ำทะเล 54% ตะกอนดิน 72 % ฝั่งทะเลอันดามันมีเชื้อในน้ำทะเล 8 % ตะกอนดิน 44 % ผลดังกล่าวอาจเกิดจากบริเวณฝั่งอ่าวไทยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระจายของเชื้อคือ บริเวณที่ประชากรหนาแน่น มีสารอินทรีย์และสิ่งปฏิกูลจากคนและสัตว์ไหลจากพื้นดินสู่อ่าวไทยจำนวนมาก จึงทำ

ให้สภาวะเหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนและการกระจายของเชื้อมากกว่าฝั่งทะเลอันดามัน (บุญเยี่ยม และคณะ, 2527)

ปัจจัยก่อความรุนแรงของโรค

1. Thermostable direct hemolysin

แม้ว่า *V. parahaemolyticus* มีแหล่งที่อยู่ในน้ำทะเลและชายฝั่งทะเลทั่วโลก แต่มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้น ที่ก่อให้เกิดโรคลำไส้อักเสบในมนุษย์ โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้าง hemolysin ซึ่งทำให้เกิดปรากฏการณ์เม็ดเลือดแดงของคนหรือกระต่ายแตกแบบสมบูรณ์ (β-hemolysin) บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดพิเศษที่เติมเลือด ชื่อ Wagatsuma agar ปรากฏการณ์ดังกล่าวเรียกว่า Kanagawa phenomenon ซึ่งพบได้ใน *V. parahaemolyticus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยประมาณ 88-96% ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมพบเพียง 1-2 % เท่านั้น ดังนั้น hemolysin ดังกล่าวจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการก่อโรค ซึ่งต่อมาเรียกว่า Thermostable direct hemolysin (TDH) (Miyamoto *et al*., 1969) TDH จัดเป็น pore – forming toxin ทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงและทำให้เซลล์แตกในเวลาต่อมา

2. Thermostable direct hemolysin-related hemolysin

Thermostable direct hemolysin-related hemolysin (TRH) มีฤทธิ์คล้ายกับ TDH โดยสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดแตก ทำให้สัตว์ทดลองตาย มีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ เพิ่มการซึมผ่านของของเหลวบริเวณผิวหนัง และทำให้เกิดการสะสมของน้ำในลำไส้ (Honda *et al*., 1990) TRH เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 189 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 48 kDa ประกอบด้วย 2 ยูนิตที่เหมือนกัน แต่ละยูนิตมีขนาด 23 kDa ไม่ทนความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส 10 นาที ควบคุมการสร้างโดยจีน *trh* (Nishibuchi *et al.*, 1989)

ToxR

เป็นจีนที่ถูกอนุรักษ์ไว้ (conserved sequence) ในวงศ์ Vibrionaceae พบครั้งแรกใน *V. cholerae* โดยทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของ cholerae toxin และต่อมาพบว่าสามารถควบคุมการทำงานของจีนอื่นๆ อีกหลายชนิด โดย *ToxR* ทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของจีนก่อความรุนแรงของโรค โดยสร้างโปรตีน ToxR ไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง upstream ของ promotor ของจีนก่อความรุนแรงของโรค (Miller *et al*., 1987 ; Lin *et al*., 1993) พบว่าสามารถพบจีน *ToxR* ทุกสายพันธุ์ทั้งในผู้ป่วยและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีการใช้ *ToxR* เป็นจีนเป้าหมายในการบ่งชี้เชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี PCR ซึ่งพบว่าให้ผลที่ถูกต้องและแม่นยำ (Kim *et al.,*1999)

พยาธิสภาพ

V. parahaemolyticus ทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) ผู้ป่วยแสดงอาการอุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน อาจมีไข้ ผู้ป่วยบางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปน โดยพบว่าผู้ป่วยมากกว่า 90% มีอาการอุจจาระร่วง อาการของโรคลำไส้อักเสบเกิดขึ้นหลังได้รับเชื้อ 10^6-10^9 เซลล์ โดยมีระยะฟักตัวประมาณ 4-9 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย ระยะเวลาในการป่วยประมาณ 2-3 วัน ในรายที่รุนแรงอาจป่วยนาน 1-2 สัปดาห์ โดยปกติมักหายเอง สาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารทะเลดิบหรือปรุงแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ

1.2.4.2 *V. cholerae*

V. cholerae เป็นแบคทีเรียรูปแท่งสั้น ปลายโค้งเล็กน้อย ขนาด 0.4-0.6 x 1.5-3.0 μm (Wolin, 1973) ติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่ได้ด้วย polar flagellum มีความยาว 1.5-2.0 μm หนา 24-30 nm (Lee, 1990) ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ดีในที่มีออกซิเจนช่วงอุณหภูมิ 16 - 42 องศาเซลเซียส แต่ที่ 37 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุด เจริญได้ดีในสภาวะด่าง pH 6.4 - 9.6 (Wolin, 1973) ให้ผลบวกต่อการทดสอบ oxidase, gelatin, indole, lysine และ ornithine decarboxylase ส่วน arginine dihydrolase ให้ผลลบ (Benenson, 1991) เชื้อสามารถหมักย่อย carbohydrate ได้หลายชนิด ได้แก่ dextrose, galactose, maltose, sucrose และ mannitol เกิดกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ สามารถทนต่อ bile salt bismuth-sulfide และ tellurite เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ neuraminidase ซึ่งไฮโดรไลซ์ N-acetylneuraminic acid, sialic acid และ mucin สามารถหมักย่อยน้ำตาลซูโครสได้โคโลนีสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar (Oliver and Kaper, 1997)

การแบ่งชนิดของ *V. cholerae* อาศัยโครงสร้างของแอนติเจน (antigenic structure) มีทั้ง O - antigen และ H - antigen ซึ่ง O - Ag คือ somatic antigen เป็นพวก lipopolysaccharide และ polysaccharide สามารถทนต่อความร้อนได้ดี ส่วน H - Ag หรือ flagella antigen ไม่ทนร้อน จากความแตกต่างของโครงสร้าง O - Ag สามารถจัดแบ่ง *V. cholerae* ได้มากกว่า 200 serogroup (Rivera *et al*., 2001) แต่โดยทั่วไปมักแบ่งเป็น 3 serogroup ใหญ่ ๆ ได้แก่ O1, O139 และ non-O1/non-O139 สำหรับ serogroup O1 แบ่งย่อยได้ 2 biotype คือ Classical และ El Tor โดยอาศัยคุณสมบัติการทดสอบทางชีววิทยา (ตาราง 1.1) สำหรับ biotype Classical และ El Tor ยังแบ่งย่อยเป็น serotype คือ Ogawa, Inaba และ Hikojima ทั้ง 3 serotype มี antigenic determinant หรือตำแหน่งย่อยของแอนติเจนร่วมกัน คือ A แอนติเจนแต่มีแอนติเจนที่จำเพาะอีก 2 ชนิด ได้แก่ B และC โดย Inaba จะมีแอนติเจน C ส่วน Ogawa มีทั้ง แอนติเจน B และ C แต่สัดส่วนของแอนติเจน B มีมากกว่า C และ Hikojima จะพบแอนติเจนทั้งสามชนิด (Kaper *et al*., 1995) จากการศึกษา *V. cholerae* serogroup O139 พบว่าคุณสมบัติส่วนใหญ่มีความคล้ายกับ serogroup O1 biotype El Tor ยกเว้น O139 สามารถสร้างแคปซูลได้ (Albert *et al*., 1997)

ตาราง 1.1 ความแตกต่างระหว่าง biotype Classical และ El Tor (Lee, 1990)

การทดสอบ	Classical	El Tor
การเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดง	-	+
การสลายของเม็ดเลือดแดงแกะในหลอดทดลอง	-	+
การทดสอบ Voges-Proskauer	-	+
ความไวต่อโพลีมิกซิน บี (50 ยูนิต)	S	R
ความไวต่อไวรัสของแบคทีเรีย(phage IV)	S	R

S = ไวต่อการทดสอบ R = ดื้อต่อการทดสอบ

V. cholerae พบแพร่กระจายทั่วไปในแหล่งน้ำ ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย บริเวณปากแม่น้ำ หรือแถบชายฝั่งทะเล (Colwell *et al*., 1981) ส่วนใหญ่มักพบ *V. cholerae* non-O1/ non-O139 (Kaper *et al*., 1979) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบในอาหารทะเล หรือสัตว์ทะเลที่มีเปลือกหุ้ม (Depaola *et al*., 1983) หรือแม้แต่ในไข่เต่า (Lin *et al*., 2001) *V. cholerae* non-O1 มีโอกาสมีชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้มากกว่า *V. cholerae* O1 (Chaudhuri *et al*., 1992) แต่ในบริเวณพื้นที่เขตระบาดของอหิวาต์ตกโรค มีโอกาสพบ *V. cholerae* O1 หรือ O139 ได้สูง เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อนเชื้อจากอุจจาระผู้ป่วยลงสู่แหล่งน้ำ (Ghosh *et al*., 1994) โดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนาที่มีประชากรอาศัยอยู่หนาแน่น และมีระบบทางด้านสาธารณสุขไม่ดีพอ แต่ในสภาวะปกติโอกาสการตรวจพบ *V. cholerae* O1 หรือ O139 ในสิ่งแวดล้อมเป็นไปได้ยากทั้งนี้เพราะบางสภาวะอาจไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตอยู่ของเชื้อ โดยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ระดับความเป็นกรด ด่าง อุณหภูมิ ความเค็ม ความอุดมสมบูรณ์ของสารอาหาร เป็นต้น (Depaola *et al*., 1983) อย่างไรก็ตามมีรายงานหลายฉบับบ่งชี้ว่า เชื้อมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอด โดยปรับลดขนาดของเซลล์ เปลี่ยนแปลงรูปร่าง ลดการทำงานภายในเซลล์ เรียกสภาวะดังกล่าวว่า ระยะ viable but non culturable (VBNC) (Xu *et al*., 1982) อีกทั้งยังทำให้ยากต่อการตรวจพบโดยวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อธรรมดา แต่สามารถตรวจหาเชื้อโดยตรงด้วยวิธี direct viable count fluorescent antibody (Brayton *et al*., 1987) จากการศึกษาโดยนำเชื้อ *V. cholerae* ไปเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีอาหารค่อนข้างจำกัด พบว่าเชื้อมีจำนวนลดลง เพราะการปรับตัวเข้าสู่ระยะ VBNC แต่เมื่อปรับอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 30 องศาเซลเซียส เชื้อกลับเจริญเติบโตมีจำนวนเพิ่มขึ้น (Ravel *et al*., 1995)

นอกจากนี้ *V. cholerae* ยังเกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในแหล่งน้ำ ได้แก่ พืชน้ำ (Islam *et al.,* 1990) แพลงก์ตอนทั้งชนิด แพลงก์ตอนพืช (phytoplankton) และแพลงก์ตอนสัตว์ (zooplankton) Huq *et al.*(1983) รายงานว่า copepod ซึ่งเป็นแพลงก์ตอนสัตว์เป็นแหล่งสะสม *V. cholerae* มากที่สุดสามารถพบเชื้อได้บริเวณปาก และรังไข่ (egg sac) จากการมองผ่านด้วยกล้อง electron microscope พบว่า copepod 1 ตัวมีปริมาณเชื้อสูงถึง 10^4-10^5 เซลล์ (Cowell and Huq, 1994) *V. cholerae* สามารถแทรกเข้าไปอยู่ใต้ไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของสัตว์ทะเล ไคตินยังช่วยป้องกันเชื้อในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด เช่นในระบบทางเดินอาหารของคน และ *V. cholerae* สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสช่วยย่อยสลายไคตินเพื่อเกาะติดกับระบบทางเดินอาหาร(Nalin *et al.,* 1979)นอกจากนี้พบว่า copepod ช่วยป้องกัน *V. cholerae*ไม่ให้ถูกฆ่าด้วยสารประเภทคลอรีน (Chowdhury *et al.,* 1997) มีรายงานว่าในช่วงฤดูร้อนแต่ละปี แถบประเทศบังคลาเทศมักมีปรากฏการณ์การเพิ่มจำนวน (boom) ของแพลงก์ตอนพืช ตามด้วยการเพิ่มปริมาณของแพลงก์ตอนสัตว์ และนำไปสู่การระบาดของอหิวาต์ตกโรคเสมอ (Huq *et al.,* 1995)

พยาธิสภาพ

เมื่อคนรับประทานอาหารหรือน้ำที่ปนเปื้อน *V. cholerae* เชื้อบางส่วนอาจหลุดรอดจากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหารผ่านมายังลำไส้เล็กแล้วใช้ polar flagellum ว่ายแทรกผ่านเยื่อเมือก (mucosa) มายึดเกาะกับ microvilli ของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) ลำไส้เล็ก โดยเฉพาะบริเวณเจจูนัม (jejunum) การยึดเกาะดังกล่าวช่วยให้ตัวเชื้อไม่ถูกขับลงสู่ลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีแบคทีเรียประจำถิ่น (normal microbiota) อยู่เป็นจำนวนมาก หลังจากนั้นเชื้อจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวน พร้อมทั้งสร้างสารพิษที่เรียกว่า cholera toxin (CT) ซึ่งมีผลทำให้ การดูดซึมน้ำและอีเลคโตรไลท์เข้าสู่ภายในเซลล์ถูกยับยั้ง แต่ไปเพิ่มการหลั่งน้ำและอิเลคโตรไลท์ออกจากเซลล์ไปสู่โพรงลำไส้ (lumen) ทำให้เกิดอาการถ่ายอุจจาระเหลวเป็นน้ำ (Barbara *et al*., 1987)

อาการโรคในผู้ที่ติดเชื้อแต่ละคน อาจแสดงอาการไม่เท่ากัน ขึ้นกับปริมาณเชื้อที่ได้รับและความต้านทานของแต่ละบุคคล ระยะฟักตัวของเชื้อประมาณ 1-5 วัน อาการที่เห็นได้ชัด ได้แก่ อุจจาระร่วง ลักษณะอุจจาระในระยะแรกมักมีเศษอาหารปนอยู่ ต่อมามีอาการถ่ายเป็นน้ำคล้ายน้ำซาวข้าว มีกลิ่นคาว ถ้าถ่ายนาน ๆ อาจมีน้ำดีปนออกมาด้วย อุจจาระไม่มีมูกเลือด ผู้ป่วยอาจมีอาเจียนร่วมด้วย ส่วนอาการปวดท้องและมีไข้ไม่ค่อยพบ ในรายที่อาการไม่รุนแรงมักมีอาการคล้ายกับอาการของโรคติดเชื้อในลำไส้จากเชื้อต่าง ๆ ได้แก่ *Salmonella*, *Shigella* และ *E. coli* เป็นต้น ในรายที่อาการรุนแรง จะพบสภาวะร่างกายขาดสารน้ำและแร่ธาตุ ทำให้อ่อนเพลีย มือและนิ้วเหี่ยวย่น ตัวเย็น ชีพจรเบาจนกระทั่งจับไม่ได้ เลือดข้น มีความเป็นกรดในเลือดสูง ความดันโลหิตต่ำ ลักษณะนี้ถ้าให้การรักษาไม่ถูกต้องและทันท่วงที ผู้ป่วยอาจช็อก ไตวายอย่างเฉียบพลัน เป็น

สาเหตุให้เสียชีวิตได้รวดเร็ว อาการอุจจาระร่วงและอาเจียนอาจทำให้ผู้ป่วยสูญเสียน้ำไปมากกว่า 1 ลิตรต่อชั่วโมง หรือ 10-15 ลิตรต่อวัน (ร่างกายของมนุษย์มีน้ำประมาณ 20-40 ลิตร) อุจจาระของผู้ป่วยจะประกอบด้วย epithelial cell, mucosa cell อีเลคโตรไลท์และเชื้อ *V. cholerae* ประมาณ 10^7-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (อรษา, 2541)

การติดต่อและแพร่กระจายของ *V. cholerae* มีน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเป็นสื่อโดยที่ผู้ป่วยอาจได้รับเชื้อทั้งทางตรงและทางอ้อม น้ำจัดเป็นสิ่งสำคัญที่สุด ในการแพร่เชื้ออหิวาตกโรค ส่วนอาหารมักเป็นอาหารทะเลซึ่งอยู่ในลักษณะกึ่งสุกกึ่งดิบ นอกจากนี้อาจพบเชื้อได้ในผักสด ถ้านำน้ำที่ปนเปื้อนเชื้อมาใช้ในการรดน้ำผัก แหล่งแพร่เชื้อที่สำคัญสู่สิ่งแวดล้อมคืออุจจาระของผู้ป่วย ผู้ที่เป็นพาหะและไม่มีอาการของโรค สามารถเดินทางไปยังที่ต่างๆ ทำให้โอกาสแพร่เชื้อมีมากกว่าผู้ป่วย ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการแพร่กระจายเชื้ออย่างรวดเร็ว ได้แก่ เศรษฐกิจฐานะ และสุขอนามัยของประชาชน นอกจากนี้การอพยพเคลื่อนย้ายหรือการคมนาคมที่สะดวก ทำให้เชื้อกระจายไปได้ไกลและรวดเร็ว (อรษา, 2541)

1.2.5 กระบวนการแช่เยือกแข็ง

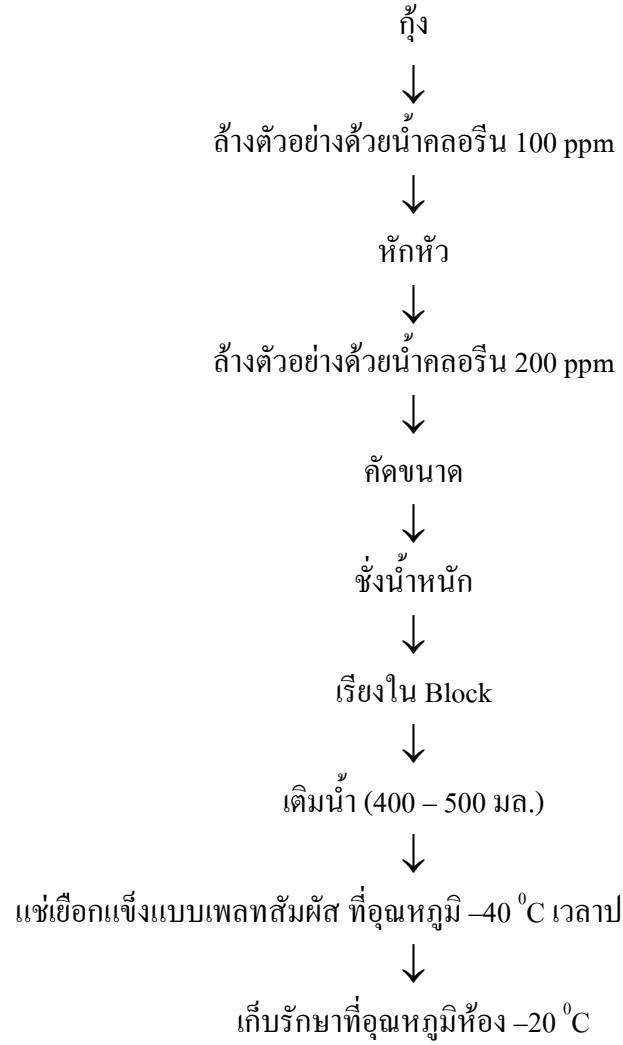
การแช่เยือกแข็ง เป็นวิธีถนอมอาหารโดยการลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์นั้นเพื่อให้อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่ในอาหารรวมทั้งกระบวนการย่อยสลายตัวเองของเซลล์ให้ต่ำ หลักการสำคัญคือ การเปลี่ยนสถานะของน้ำในอาหารที่เป็นของเหลวให้เป็นน้ำแข็งเพื่อมิให้น้ำนั้นสามารถทำหน้าที่ต่าง ๆ ในปฏิกิริยาเคมี และไม่เป็นซับสเตรทให้กับเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนมากับอาหารได้(คณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, 2540)

กุ้งแช่เยือกแข็ง (quick frozen shrimp or prawn หรือ frozen shrimp or prawn) หมายถึง กุ้งที่ผ่านกรรมวิธีเยือกแข็ง (แบบเป็นก้อนหรือแบบเป็นตัว)โดยให้มีระยะเวลาการตกผลึก อย่างรวดเร็วให้มีอุณหภูมิที่จุดกึ่งกลางของผลิตภัณฑ์ต่ำกว่า –18 องศาเซลเซียส และต้องควบคุมอุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่ –18 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าโดยสม่ำเสมอและตลอดเวลา (มอก.115-2529)

กระบวนการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็ง

ในกระบวนการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็งสามารถผลิตได้หลายวิธี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประเภทของสินค้าที่ต้องการ แต่ขั้นตอนที่สำคัญที่ใช้ในกระบวนการผลิตส่วนใหญ่มีดังแสดงในรูปที่ 1.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็งชนิดเด็ดหัว (Headless)

ขั้นตอนการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็งชนิดเด็ดหัว (Headless)



รูปที่ 1.1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการผลิตกุ้งแช่เยือกแข็งชนิดเด็ดหัว (Headless)
ที่มา : อภิชาต (2538)

ในกระบวนการแช่เยือกแข็งนั้น กรณีที่ผลิตภัณฑ์คือ กุ้งสดแช่แข็ง วัตถุดิบจะไม่ได้มีการผ่านความร้อนหรือกระบวนการอื่นใดเพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมา มีเพียงการแช่เยือกแข็งเท่านั้น ซึ่งแบคทีเรียบางจำพวก ก็สามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำ และระดับอุณหภูมิแช่เยือกแข็งได้ (เพ็ญศรีและคณะ, 2530) การใช้อุณหภูมิต่ำจะมีผลในการชะลอการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียลงได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียพวก mesophile ซึ่งอุณหภูมิต่ำจะไปยืดระยะ lag phase ของแบคทีเรีย ทำให้ระยะวงจรชีวิตของแบคทีเรียยาวนานขึ้นกว่าเดิม (Brown, 1991) การลดอุณหภูมิของกุ้งให้ต่ำลง มีความสำคัญตั้งแต่จับกุ้งขึ้นมาจากน้ำ โดยต้องมีการดองน้ำแข็ง โดยอัตราส่วนของน้ำแข็งจะต้องมากกว่าหรืออย่างน้อยที่สุดต้องเท่ากับกุ้ง วิธีการดองน้ำแข็งที่มีประสิทธิภาพคือ ต้องแช่กุ้งในน้ำผสมน้ำแข็งให้เย็นจัดในระยะสั้น ๆ เพื่อให้อุณหภูมิในตัวกุ้งลดลงอย่างรวดเร็ว แล้วจึงเอากุ้งออก

มาวางสลับชั้นกับน้ำแข็ง เพราะว่าถ้ามีการวางกุ้งสลับชั้นกับน้ำแข็งเลยจะทำให้กุ้งเย็นช้า (บังอรและอรุณ, 2512) การล้างกุ้งเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในการแปรรูปกุ้งแช่เยือกแข็ง ตั้งแต่จับกุ้งขึ้นมาจากน้ำ ก็จะมีการล้าง ถ้าเป็นการล้างกุ้งที่จับจากบ่อเลี้ยง จะเป็นการล้างด้วยน้ำเพื่อล้างโคลนและสิ่งสกปรกที่ติดมากับกุ้งออก และเพื่อลดจุลินทรีย์ที่ติดมา ส่วนถ้าเป็นกุ้งที่จับจากทะเล ก็จะล้างด้วยน้ำทะเลที่สะอาด เพื่อลดสิ่งสกปรกลงเช่นเดียวกัน เมื่อกุ้งขนส่งมาถึงโรงงานจะต้องล้างที่จุดรับวัตถุดิบอีกครั้งหนึ่งเป็นจุดสำคัญ ส่วนการล้างในขั้นต่อ ๆ มาจะแตกต่างกันไปตามแต่ละโรงงาน บังอรและอรุณ (2512) ทำการวิเคราะห์กุ้งสดในระยะต่างๆก่อนการแช่เยือกแข็ง พบว่าหลังการล้างน้ำหลาย ๆ ครั้งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดต่ำลงแสดงว่าคุณภาพของกุ้งดีขึ้น

เนื่องจากการล้างกุ้งมีจุดประสงค์ใหญ่ที่จะลดปริมาณแบคทีเรีย ดังนั้นน้ำที่ใช้ล้างกุ้งจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะคำนึงถึง ทั้งนี้เพราะถ้าน้ำที่ใช้ล้างกุ้งมีจำนวนแบคทีเรียสูง ก็จะมาเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในกุ้ง ซึ่งเป็นผลทำให้คุณภาพของกุ้งต่ำลง ดังนั้นนอกจากจะใช้น้ำที่มีอุณหภูมิต่ำแล้ว ยังมีการเติมสารเคมีที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียลงไปในน้ำ เพื่อช่วยลดปริมาณแบคทีเรียให้ต่ำลงไปอีก สารเคมีที่เติมมีทั้งที่เป็นตัวฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย หรือลดค่า pH ให้ต่ำลง เช่น chlorotetracycline, sodium bisulfite สารประกอบคลอรีน ซึ่งสารประกอบคลอรีนมีการนำมาใช้มากที่สุด (Ward and Baj, 1998) ความเข้มข้นที่ใช้ก็จะมีความแตกต่างกันไปตามจุดประสงค์ของการใช้งาน (โดยคำนึงถึงปริมาณคลอรีนที่ละลายอยู่ในน้ำ) ขั้นตอนการใช้งานและความถี่ในการล้าง (Marriott, 1989) เช่น ถ้าเป็นการล้างกุ้งตรงจุดรับวัตถุดิบ ก็จะใช้ปริมาณความเข้มข้นสูงมากกว่าที่ใช้ล้างกุ้งในขั้นตอนอื่น ส่วนการล้างภาชนะเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ จะใช้ความเข้มข้นสูงกว่าที่ใช้ล้างกุ้ง

1.2.6 การใช้คลอรีนในอุตสาหกรรมอาหาร

1.2.6.1 คลอรีนและสารประกอบคลอรีน

คลอรีน (Cl_2) เป็นธาตุตัวหนึ่งในกลุ่มของฮาโลเจน (halogen) และอยู่ในรูปของก๊าซคลอรีนที่มีสีเหลืองแกมเขียว (greenish-yellow) ซึ่งถูกค้นพบโดยนักเคมีชาวสวีเดน Kar Wilhelm Scheele ในปี ค.ศ. 1774 (Laubusch, 1971) ซึ่งได้จากการทำปฏิกิริยาของกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และแมงกานีสออกไซด์ (MnO_2) และถูกทำให้เป็นของเหลวโดย Thomas Northmore ในปี ค.ศ. 1805-1806 และถูกค้นพบว่าเป็นธาตุชนิดหนึ่งในปี ค.ศ. 1810 โดย Humphrey Davy และตั้งชื่อโดยมาจากภาษากรีก cloros หมายถึงสีเขียวที่เป็นสีของก๊าซ ก๊าซนี้มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 2.48 เมื่อเปรียบเทียบกับอากาศ (Cheremisinoff *et al.,* 1981) มีเลขอะตอมเท่ากับ 17 มีมวลอะตอมเท่ากับ 35.457 และค่ามวลโมเลกุลเท่ากับ 70.914 (Faust and Aly, 1983)

สารประกอบคลอรีนหรือสารประกอบไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) เกิดจากเกลือของคลอรีน ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) และแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($Ca(OCl)_2$) ซึ่ง ($Ca(OCl)_2$) มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีคลอรีนอิสระ (free available chlorine :FAC) อยู่สูงมาก ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ส่วน NaOCl เป็นของเหลวที่มี FAC ประมาณ 7-20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทั้งก๊าซคลอรีน โซเดียมไฮโปคลอไรท์และแคลเซี่ยมไฮโปคลอไรท์ จะมีความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยมีการแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) ดังสมการต่อไปนี้

ก๊าซคลอรีน

$$Cl_2 + H_2O \rightarrow HOCl + HCl$$

แคลเซียมไฮโปคลอไรท์

$$Ca(OCl)_2 + H_2O \rightarrow HOCl + Ca(OH)_2$$

โซเดียมไฮโปคลอไรท์

$$NaOCl + H_2O \rightarrow HOCl + NaOH$$

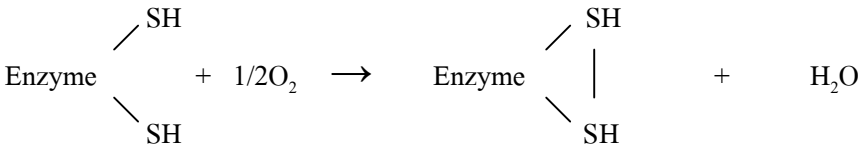
ผลของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนในการกำจัดจุลินทรีย์ คือ เกิดการออกซิไดซ์อย่างรุนแรงกับส่วนประกอบของเซลล์ จึงทำลายจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้สารประกอบคลอรีนยังรวมกับโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์และเอนไซม์ มีผลทำให้เซลล์ตายได้ กลไกการทำลายเชื้อของคลอรีนและสารประกอบคลอรีนโดยการเกิดกรดไฮโปคลอรัส (ดังแสดงในสมการ) และกรดไฮโปคลอรัสจะแตกตัวต่อไปได้แนสเซนต์ออกซิเจน (nascent oxygen) ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์ที่รุนแรงมาก สามารถออกซิไดส์ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ทำให้แบคทีเรียตาย ดังแสดงในรูปที่ 1.2

$$Cl_2 + H_2O \rightarrow HOCl + HCl$$

chlorine water hypochlorous acid hydrochloric acid

$$HOCl \rightarrow HCl + O\cdot$$

hypochlorous acid hydrochloric acid oxygen



active enzyme oxidizing agent inactive enzyme

รูปที่ 1.2 ก๊าซคลอรีนทำปฏิกิริยากับน้ำได้กรดไฮโปคลอรัส ซึ่งแตกตัวได้แนสเซนต์ออกซิเจนไปออกซิไดซ์เอนไซม์ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ (Mckane and Kandal, 1985)

คลอรีนถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพราะมีการจัดคลอรีนเป็นสารประเภทที่เรียกว่า "Generally Recognized As Safe" (GRAS) จึงมีความปลอดภัยที่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ คลอรีนถูกนำไปใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นครั้งแรกในต้นศตวรรษที่ 19 เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในโรงพยาบาลจากนั้นก็มีผู้พบว่าแบคทีเรียสามารถถูกทำลายได้จากคลอรีน สารประกอบคลอรีน และผลิตผลที่แตกตัวจากคลอรีน และต่อมา The American Public Health Association (APHA) ได้มีการรายงานการรับรองการใช้คลอรีนเพื่อเป็นสารฆ่าเชื้อ (disinfectant) (Wei *et al*., 1985) จึงทำให้การใช้คลอรีนและสารประกอบคลอรีนแพร่หลาย ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่ไม่ได้มีจุดประสงค์ในการฆ่าเชื้อ เช่น อุตสาหกรรมฟอกสีต่าง ๆ อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมการทอผ้า อุตสาหกรรมการผลิตยา เป็นต้น

Kirk และ Mitchell (1980) รายงานการใช้คลอรีนในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้คลอรีนในการล้างวัตถุดิบ เช่น เนื้อแดง ไก่ เพื่อลดจำนวนและป้องกันการสะสมของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดเมือกและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ของวัตถุดิบ ทำให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของผลผลิตลดลงเมื่อล้างวัตถุดิบด้วยคลอรีน Cunningham and Lawrence (1980) กล่าวว่า คลอรีนสามารถใช้เป็นสารฟอกสีแป้งเค้ก เป็นสารฆ่าเชื้อในน้ำดื่ม น้ำที่ใช้ล้างเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ปลา และ ไก่ และใช้ในการล้างทำความสะอาดในโรงงานแปรรูปนม และโรงงานแปรรูปอุตสาหกรรมแทบทุกชนิด Wei *et al.* (1985) รวบรวมข้อมูลการใช้คลอรีนได้แก่ ใช้ในการทำความสะอาดอุปกรณ์ ภาชนะบรรจุอาหาร ใช้ล้างผัก ผลไม้ดิบ ใช้ในน้ำหล่อเย็นหลังการฆ่าเชื้ออาหารกระป๋อง ใช้ในอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเล ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อโรคในโรงฆ่าสัตว์ ชำแหละสัตว์ โรงเก็บซากสัตว์ ใช้สารละลายคลอรีนเจือจางฉีดพ่นฝอย ในระหว่างการลำเลียง การทำความเย็นแก่วัตถุดิบ

Bailey *et al.* (1986) และ Thomson *et al.* (1979) พบว่า คลอรีนมีผลต่อการลดปริมาณ *S. typhimurium* โดยใช้คลอรีนเพื่อเป็นสารทำความสะอาดสัตว์ทะเลที่มีเปลือก (shellfish) เช่น กุ้ง หอย ปู ที่ยังมีชีวิตที่จับจากน้ำที่มีแบคทีเรียอยู่ในปริมาณมาก ทำให้สามารถลดปริมาณ *Salmonella* และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคลงได้

Foegeding (1983) พบว่าคลอรีนนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และในด้านสุขาภิบาล Johnston *et al.* (1983) พบว่าในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ ระดับความเข้มข้นโดยประมาณ 100 – 200 ppm ใช้ล้างอาหารทะเล สัตว์ปีก และเนื้อแดง

Somers (1951) และ Wei *et al.*(1985) ได้สรุปว่า คลอรีนสามารถลดปริมาณแบคทีเรียพวก mesophillic aerobe ที่มีการปนเปื้อนในระหว่างการเตรียมการผลิต ปนเปื้อนในน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต ลดการสะสมของจุลินทรีย์ คราบเมือกของจุลินทรีย์บนเครื่องมืออุปกรณ์สายพาน การใช้น้ำผสมคลอรีนทำความสะอาด ป้องกันการเกิดกลิ่นผิดปกติ (off odors) จากการหมักหรือการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ ทำให้สามารถยืดระยะเวลาแต่ละช่วงของการทำความสะอาด ทำให้จำนวนแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ที่สำเร็จแล้ว มีค่าลดลง ถ้ามีการทำความสะอาดวัตถุดิบด้วยคลอรีน

ในการใช้คลอรีน และสารประกอบไฮโปคลอไรท์ อาจประสบปัญหาหลายอย่างได้ เช่น ในน้ำที่ใช้มีสารแขวนลอย ซึ่งจะห่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ไว้ไม่ให้ถูกทำลายโดยคลอรีน สารอินทรีย์ยังทำปฏิกิริยากับคลอรีนทำให้เสียคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ เช่นแอมโมเนีย (NH_3) จะทำปฏิกิริยากับคลอรีนเกิดเป็นพวกคลอรามีน ทำให้คุณสมบัติในการฆ่าเชื้อต่ำกว่าไฮโปคลอรัส ถ้ามีอนุมูลเหล็กและแมงกานีสอยู่ในน้ำจะทำให้เกิดกลิ่นที่ผิดปกติหลังการใช้คลอรีน แต่ปัญหาเหล่านี้ก็ไม่เป็นปัญหาที่มีความสำคัญเท่ากับเมื่อใช้คลอรีนแล้วทำให้เกิดความเป็นพิษ และมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคและผู้ปฏิบัติงานที่ต้องสัมผัสโดยตรงกับคลอรีน

1.2.6.2 โทษของคลอรีน

อันตรายเฉียบพลัน

คลอรีน เมื่อผสมกับน้ำจะมีฤทธิ์เป็น “ กรด ” และให้ก๊าซคลอรีน ทำให้เกิดการระคายเคือง ซึ่งผู้ที่แพ้คลอรีนจะแสดงอาการคือ ถ้าหายใจเข้าไป ทำให้ระคายเคืองต่อจมูก คอ และระบบหายใจส่วนบน คลอรีนปริมาณ 0.2 ส่วนในอากาศล้านส่วนจะทำให้คันจมูก ส่วนปริมาณ 1 ส่วนในอากาศล้านส่วนจะทำให้คอแห้ง ไอ และหายใจลำบาก และปริมาณ 1.3 ส่วนในล้านส่วนขึ้นไป ทำให้หายใจตื้น ปวดหัว ถ้ามากกว่า 30 ส่วนในอากาศล้านส่วนทำให้สำลัก เจ็บหน้าอก และอาเจียน และถ้าได้รับมากเกินกว่า 100 ส่วนในอากาศล้านส่วน ทำให้หลอดลมอักเสบ ปอดบวม และเสียชีวิตได้ ถ้าเข้าตาทำให้เคืองตาอย่างรุนแรง ก๊าซคลอรีน ทำให้ปวดแสบปวดร้อน และน้ำตาไหล คลอรีนเหลวทำให้ไหม้และอาจตาบอดได้ ถ้าถูกผิวหนัง ผิวหนังจะระคายเคือง ก๊าซที่มีความเข้มข้นสูง จะทำให้ผิวหนังไหม้และเป็นตุ่มแดง ถ้าคลอรีนเหลวถูกผิวทำให้ไหม้และเนื้อเยื่อตาย (www.nice.labour.go.th)

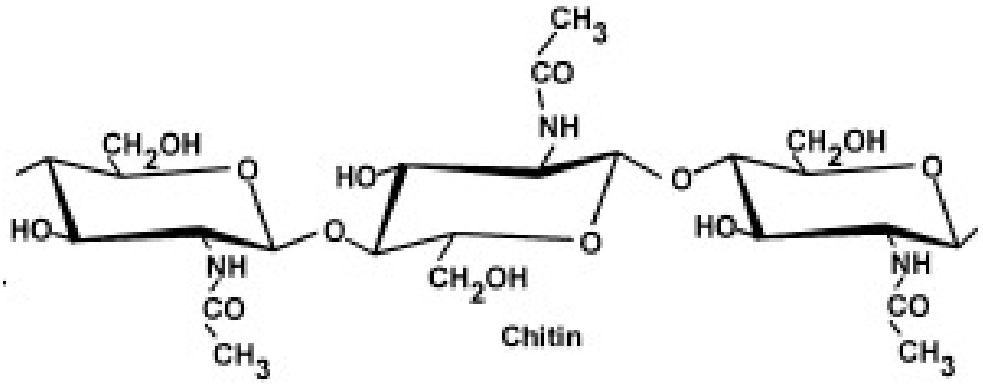
1.2.7 ไคติน – ไคโตแซนและโครงสร้างทางเคมี

สารไคติน-ไคโตแซน จัดอยู่ในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตผสมที่ประกอบด้วย หน่วยของ β-(1$\rightarrow$4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose และ β-(1$\rightarrow$4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose ที่มี

ธาตุไนโตรเจนติดอยู่ด้วย ทำให้มีคุณสมบัติที่โดดเด่นและหลากหลายมีประสิทธิภาพสูงในกิจกรรมชีวภาพ และยังย่อยสลายได้ตามธรรมชาติจึงเป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม (Liu *et al.,* 2004)

ไคตินได้รับการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1811 โดย Braconnot ต่อมาในราวปี คศ. 1823 พอลิเมอร์ชนิดนี้ถูกเรียกว่า ไคติน โดย Odier ซึ่งคำว่า ไคติน มาจากคำว่า Chiton ในภาษากรีก ที่มีความหมายว่า เกราะหุ้ม ไคตินเป็นสารอินทรีย์ประเภท คาร์โบไฮเดรต ที่เกิดตามธรรมชาติ (ภาวดี และคณะ , 2542) ไคตินเป็นหนึ่งในสามของสารประกอบน้ำตาลที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ นอกจากเซลลูโลสและแป้ง โดยถูกจัดให้อยู่ในอันดับที่สองถัดจากเซลลูโลสของสารประกอบอินทรีย์ที่มีมากที่สุดในโลก (อัธยา, 2541) ไคตินเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดหนึ่ง ที่ธรรมชาติสร้างสรรค์ขึ้นมาเพื่อเป็นองค์ประกอบในโครงสร้างต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตมากมายหลายชนิดไม่ว่าจะเป็นเปลือกหุ้มของแพลงค์ตอน เปลือกของกุ้ง ปู และพวกแมลง หรือแม้แต่แกนหมึก หรือดาวทะเล (ปิ่วย, 2544) ในอนาคตแหล่งผลิตของไคตินอาจจะมาจากเทคโนโลยีชีวภาพ เพราะหากไคตินและไคโตแซนมีความต้องการใช้ในปริมาณที่เพิ่มมากขึ้น เราสามารถผลิตไคตินจากจุลินทรีย์ โดยพัฒนาจุลินทรีย์ที่ผ่านกระบวนการด้านพันธุวิศวกรรมให้ผลิตโมเลกุลเหล่านี้ (Knorr, 1991) ซึ่งสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงจะสามารถผลิตไคตินได้ในปริมาณที่แน่นอน นอกจากนี้ไคตินยังสามารถผลิตได้จากเส้นใยของเชื้อรา สาหร่ายบางชนิดสามารถผลิตไคตินบริสุทธิ์ได้จากเส้นใยภายนอกเซลล์ และสามารถสกัดไคตินออกได้ง่ายให้ผลผลิตไคตินถึง 80 % (ธีรพล, 2534) เนื่องจากไคตินเป็นพอลิเมอร์ที่พบในธรรมชาติ จึงมักพบไคตินในรูปสารประกอบเชิงซ้อนที่อยู่รวมกับสารอื่นๆ เช่น พบไคตินในผนังเซลล์ของพืชโดยพบรวมกับเซลลูโลส (Knorr, 1991) พบไคตินรูปของสารประกอบเชิงซ้อนไคติน - โปรตีน (chitin-protein complex)ในเปลือกของแมลง ส่วนในเปลือกของพวกกุ้ง ปู นอกเหนือจากโปรตีนแล้วจะพบอยู่รวมกับสารพวกหินปูน และในพวกเห็ดราก็จะพบไคตินรวมอยู่กับสารอินทรีย์อื่น ๆ อีก (ปิ่วย, 2544)

ไคตินเป็นพอลิเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine เชื่อมต่อกันโดยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) ชนิด β-1,4 เกิดเป็นโครงสร้างของโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงยาว เช่นเดียวกับเซลลูโลส ต่างกันตรงที่หน่วยย่อย (monomer) ของเซลลูโลสเป็น D-glucose ส่วนหน่วยย่อยของไคตินนั้นคาร์บอนตัวที่ 2 หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) จะถูกแทนที่โดยกลุ่ม acetylamine (-$NHCOCH_3$) ดังนั้นไคตินจึงเป็นพอลิเมอร์ของ N-acetyl-D-glucosamine (2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) (รูปที่ 1.3) ชื่อทางเคมีของไคตินคือ Poly β-(1$\rightarrow$4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucose ไคตินเป็นของแข็งสีขาวมีรูปร่างไม่แน่นอน ผลึกมีลักษณะเป็นสะเก็ด (flaky) และเป็นมัด (fibrous) (Muzzarelli,1977)

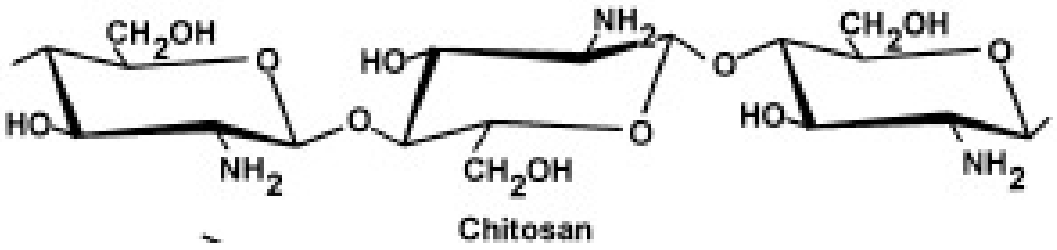


รูปที่ 1.3 โครงสร้างทางเคมีของไคติน

โครงสร้างเส้นสายของไคตินนั้นจะไม่ได้อยู่เป็นเส้นสายเดี่ยวๆ จะพับกันเป็นแผ่นซ้อนกันจนเป็นโครงสร้างผลึก (crystal structure) ซึ่งการซ้อนของแผ่นไคตินจะมี 2 รูปแบบ คือ แบบขนาน (parallel pattern) และแบบสวนทาง (antiparallel pattern) ซึ่งการซ้อนทับกันทั้งสองแบบทำให้เกิดโครงสร้างผลึกที่แตกต่างกันออกไปเป็น 3 รูปแบบ อัลฟา –ไคติน (α-chitin) ซึ่งจะจัดเรียงตัวแบบสวนทางกัน มีพันธะที่แข็งแรงมาเชื่อมเส้นสายไคติน จะพบไคตินแบบนี้ได้บ่อยกว่าอีก 2 รูปแบบเนื่องจากมีการเกิดพันธะไฮโดรเจน ทั้งภายในและระหว่างสายโซ่ของโมเลกุล (intramolecular and intermolecular chain) มากกว่าจึงทำให้มีเสถียรภาพทางเคมี (chemical stability) มากกว่าแบบอื่น ๆ พบในไคตินจากเปลือกกุ้ง กระดองปู ส่วนไคตินที่พบในแกนหมึกจะเรียงตัวแบบขนาน ที่มุ่งไปทางเดียวกัน เรียกว่า เบตา-ไคติน (β-chitin) ซึ่งโครงสร้างแบบนี้จะเสถียรน้อยกว่า อัลฟา – ไคติน (α-chitin) เนื่องจากมีปริมาณของพันธะไฮโดรเจนน้อยกว่า เบตา - ไคติน (β-chitin) สามารถเปลี่ยนไปเป็น อัลฟา - ไคติน (α-chitin) ได้เมื่ออยู่ในสารละลายกรดแก่ และยังสามารถจับกับโมเลกุลของน้ำอย่างถาวร เป็นไคตินที่มีน้ำอยู่หนึ่งโมเลกุล (chitin monohydrate) ไคตินอีกชนิดหนึ่งที่มีผลึกซับซ้อนกว่า 2 แบบแรก คือ แกมมา-ไคติน (γ-chitin) เป็นรูปแบบของการซ้อนทั้งแบบขนานและแบบสวนทางสลับกันอยู่ในโครงสร้างผลึกเดียวกัน (ปิ่ วย, 2544)

สำหรับไคโตแซนนั้นมีชื่อทางเคมีว่า Poly β-(1$\rightarrow$4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose (รูปที่ 1.4) เป็นอนุพันธ์ของไคติน ที่เกิดจากการนำไคตินมาต้มกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่เข้มข้นมากๆ ซึ่งปฏิกิริยานี้จะดึงเอาหมู่อะซิติล (CH_3CO) บางส่วนออกจากสายโซ่โมเลกุล ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เรียกปฏิกิริยานี้ว่า deacetylation เหลือส่วนที่เป็นหมู่อะมิโนอิสระ (NH_2) ทำให้สาย

พอลิเมอร์มีหน่วยย่อยเป็น glucosamine เมื่อเพิ่มอุณหภูมิหรือความเข้มข้นของสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์หมู่อะซิติลจะหลุดออกไปมากขึ้น



รูปที่ 1.4 โครงสร้างทางเคมีของไคโตแซน

ดังนั้นนักเคมีสามารถผลิตไคโตแซนให้มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ทำให้มีคุณสมบัติและการใช้ประโยชน์แตกต่างกัน ความสามารถในการใช้งานของไคโตแซนจะขึ้นอยู่กับหมู่อะมิโน (NH_2) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่แอคทีฟ (active)และพร้อมจะทำปฏิกิริยา โดยเมื่อละลายในกรดอินทรีย์หมู่ NH_2 สามารถรับโปรตรอนกลายเป็น NH_3^+และทำให้พอลิเมอร์ที่ได้มีประจุเป็นบวก ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพ สามารถใช้ในการตกตะกอน ดึงเอาสารอื่นลงมารวมเป็นกลุ่มของตะกอนได้ดี (ธีรพล, 2534) ในธรรมชาติมีไคตินและไคโตแซนประกอบอยู่ในพอลิเมอร์ที่เป็นสายยาวในสัดส่วนต่างๆ กัน ถ้ามีปริมาณของ glucosamine มากกว่า 60% ขึ้นไป แสดงว่าพอลิเมอร์นั้นแสดงคุณสมบัติค่อนไปทางไคโตแซนซึ่งจะสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์ต่างๆ ทำให้เป็นสารละลายที่มีลักษณะเหนียวและมีความใส สามารถขึ้นรูปได้หลายรูปแบบ ซึ่งต่างจากไคตินที่โดยธรรมชาติไม่ละลายน้ำและในสารอินทรีย์ทั่วไป (สุวลี, 2544)

1.2.7.1 กระบวนการผลิตไคตินและไคโตแซน

การผลิตไคติน-ไคโตแซน ประกอบด้วยหลักการที่สำคัญ 3 ขั้นตอน (รูปที่ 1.5) คือ

1. การกำจัดโปรตีน (deproteinization)
2. การกำจัดเกลือแร่ (demineralization)
3. การกำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation)

เปลือกกุ้ง (crustacean shell)

↓

บดให้ละเอียด (size reduction)

↓

กำจัดโปรตีน (protein separation)

↓

ล้าง (washing)

↓

กำจัดแร่ธาตุ (demineralization)

↓

ล้างและอบจนแห้ง (washing and dewatering)

↓

ไคติน (chitin)

↓

กำจัดหมู่อะซิติล (deacetylation)

↓

ล้างและอบจนแห้ง (washing and dewatering)

↓

ไคโตแซน (chitosan)

รูปที่ 1.5 แผนภูมิการผลิตไคตินและไคโตแซนจากเปลือกกุ้ง

ที่มา : ดัดแปลงจาก Knorr (1984)

การกำจัดโปรตีน

ขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีนออกจากไคติน สามารถทำได้ 2 วิธี คือ โดยการใช้ด่าง (alkali) กับการใช้เอนไซม์โปรติเอส (protease)

1. การกำจัดโปรตีนโดยการใช้ด่าง

สารละลายด่างที่มีรายงานการใช้มาก คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เนื่องจากเป็นสารที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆหาง่ายในตลาดและราคาถูก (ภาวดีและคณะ, 2542) ทำการต้มวัตถุดิบกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1-10% ที่อุณหภูมิ 65-100 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีถึง 6 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายด่างและอุณหภูมิที่ใช้ (จิราภรณ์, 2544) เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 % (น.น./ ปริมาตร) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยอัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบและสารละลายด่างเท่ากับ1:10 (น.น./ปริมาตร) (สุทธวัฒน์ และไพรัตน์, 2533)

2. การกำจัดโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอส

การกำจัดโปรตีนวิธีนี้สามารถทำได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงเมื่อเทียบกับการสกัดแยกโปรตีนโดยการใช้สารละลายด่าง ทำให้มีผลน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุล และค่าระดับของการเกิดดีอะซิติเลชัน (deacetylation) ของไคติน แต่การใช้เอนไซม์อาจไม่สามารถแยกโปรตีนออกจากวัตถุดิบได้ทั้งหมดและจะใช้เวลาในการย่อยนานกว่าการใช้ด่าง (จิราภรณ์, 2544)

การกำจัดเกลือแร่

นำวัตถุดิบที่ผ่านการกำจัดโปรตีนออกแล้วมาทำปฏิกิริยากับกรดเจือจาง เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และกรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ซึ่งส่วนมากจะใช้กรดเกลือ ความเข้มข้น 3-5% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 คืน ทำให้สารละลายเกลือแร่ส่วนใหญ่ เช่น หินปูน ($CaCO_3$) ถูกกำจัดออกโดยเปลี่ยนเป็นเกลือแคลเซี่ยมที่ละลายน้ำ ($CaCl_2$) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ส่วนที่เหลือคือไคตินที่ไม่ละลายน้ำ ล้างให้เป็นกลางและอบให้แห้ง (อรพรรณ, 2546)

การกำจัดหมู่อะซิติล

กระบวนการผลิตไคโตแซนจำเป็นต้องกำจัดหมู่อะซิติลออกจากหมู่เอมีนในโครงสร้างของไคติน โดยใช้สารละลายด่างเข้มข้นและอุณหภูมิสูง โดยปกติความเข้มข้นของสารละลายด่างที่ใช้จะอยู่ในช่วง 40-50% และอุณหภูมิในช่วง 100-150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (สุทธิวัฒน์ และไพรัตน์, 2533) วิธีการที่ใช้ในการเตรียมไคโตแซนจากไคตินทำได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีจะแตกต่างกันในรายละเอียด สามารถแบ่งวิธีการที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาได้เป็น 2 วิธีคือ

1. การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับด่าง (จิราภรณ์, 2544)

1.1 การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับด่างที่หลอมละลาย (alkali fusion)

เป็นการทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันในสภาวะที่รุนแรง โดยการหลอมละลายด่างที่อุณหภูมิสูง เพื่อให้ทำปฏิกิริยากับไคติน เช่น การหลอมโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส โดยให้ทำปฏิกิริยาภายใต้บรรยากาศของไนโตรเจน ไคโตแซนที่เตรียมได้จากวิธีนี้จะมีเปอร์เซ็นต์ดีอะซิติเลชันสูงถึง 95% แต่สภาวะที่รุนแรงทำให้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซนที่ได้มีค่าต่ำ

1.2 การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับสารละลายด่าง

สารละลายด่างที่ใช้กันมาก คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์แต่ก็มีการใช้สารละลายด่างชนิดอื่น ๆ เช่น โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ลิเทียมไฮดรอกไซด์ (LiOH) และแคลเซียมไฮ-ดรอกไซด์ $Ca(OH)_2$ สภาวะที่ใช้จะแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5% (น.น./ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยานาน 24 ชั่วโมง หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% (น.น./ปริมาตร)ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ทำปฏิกิริยานาน 1 ชั่วโมง

2. การทำปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันของไคตินกับเอนไซม์ (ภาวดี และคณะ, 2542)

เป็นการลดหรือกำจัดหมู่อะซิติลของไคตินในปฏิกิริยาดีอะซิติเลชันโดยใช้เอนไซม์ไคติน- ดีอะซิติเลส (chitin-N-deacetylase)

1.2.7.2 ประโยชน์ของไคตินและไคโตแซน

ไคติน-ไคโตแซนมีความหลากหลายและโดดเด่นในทางเคมีโดยเฉพาะอย่างยิ่งประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยากับสารที่มีประจุลบ จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในหลายสาขา ได้แก่

1. ด้านการแพทย์และเภสัชวิทยา Brzeski (1987) สรุปการใช้ประโยชน์ไคตินและไคโตแซนในด้านการแพทย์และเภสัชวิทยาว่า ใช้เป็นเลนส์สายตา เนื่องจากมีคุณสมบัติยอมให้ออกซิเจนผ่านเข้าออกได้ ไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ ใช้เป็นแคปซูลบรรจุยา อนุพันธ์ของไคโตแซนบางชนิดใช้เป็นสารป้องกันการตกตะกอนของเลือด ใช้เป็นตัวจับคอเลสเตอรอล และใช้ในด้านทันตกรรมเป็นสารเชื่อมหรืออุดฟัน

2. ด้านการเกษตร ปิ่วย (2544) สรุปว่าไคโตแซนสามารถใช้เป็นฟิล์มบาง ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เคลือบผิวเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตรและเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากช่วยลดอัตราการหายใจ การผลิตก๊าซเอทิลีน ลดการเปลี่ยนสีของผลไม้ ลดการรบกวนของเชื้อราและแมลง ซึ่งสอดคล้องกับ Knors (1991) รายงานว่าในอุตสาหกรรมอาหารใช้ประโยชน์จากไคโตแซนโดยทำเป็นแผ่นฟิล์มเคลือบผักผลไม้ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา Brzeski (1987) สรุปว่า ในสหรัฐอเมริกาใช้ไคตินในการจับกับสารเคมีหรือยากำจัดโรคพืชชนิดต่าง ๆ เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวช่วยปลดปล่อยสารเหล่านั้น ทำให้ลดการใช้สารเคมีและยากำจัดโรคพืช นอกจากนี้ไคโตแซนยังสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับต้นไม้ โดยกระตุ้นดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์พืชให้สร้างจีนที่ควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน และยังมีผลต่อการสร้างลิกนินในพืช ซึ่งจะทำให้ไข (wax) ที่เคลือบบนใบพืชหนาขึ้นต้านทานโรคได้ดีขึ้น ในด้านการปศุสัตว์ สามารถนำไคติน- ไคโตแซนเป็นอาหารเสริมผสมลงในอาหารสัตว์บก เช่น สุกร วัว ควาย เป็ด ไก่ ช่วยเพิ่มปริมาณแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในทางเดินอาหาร ช่วยลดอาการท้องเสียของสัตว์ได้ และช่วยลดอัตราการตายของสัตว์วัยอ่อนเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดในทางเดินอาหาร (ปิ่วย, 2544)

3. ด้านอุตสาหกรรมอาหาร ในหลายประเทศได้ขึ้นทะเบียนไคติน-ไคโตแซน เป็นสารที่ใช้เติมในอาหารและยาโดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นมีผลิตภัณฑ์อาหารที่ผสมไคติน-ไคโตแซนเป็นจำนวนมากออกวางขายในท้องตลาดเป็นเวลานานแล้วจากคุณสมบัติที่สามารถต่อต้านจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิดจึงมีการใช้สารไคติน-ไคโตแซน เป็นสารกันบูด สารปรุงแต่งเพื่อความคงรูปและคงสีในอาหารต่างๆ สารเคลือบอาหาร และผักผลไม้ (สุวลี, 2544) ไคโตแซนและอนุพันธ์สามารถนำมาใช้ในการช่วยลดความขุ่นของน้ำผลไม้เช่นน้ำแอปเปิ้ล น้ำแครอท (Soto-Peralta *et*

al., 1989) มีงานวิจัยที่ได้มีการนำไคโตแซนไปเคลือบสตรอเบอรี่สด Ghaouth (1991) รายงานว่าสามารถชะลอการเน่าเสียของผลสตรอเบอร์รี่ และให้ผลดีกว่าผลสตรอเบอร์รี่ที่ผ่านการเคลือบด้วยสารยับยั้งรา iproione

มีผู้วิจัยหลายท่านได้ทดลองนำไคโตแซนใช้ในการถนอมอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา และพบว่าไคโตแซนมีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในกุ้งสด (Simpson *et al*., 1997) หอยนางรม (Chen *et al*., 1998) นม (Tsai *et al*., 2000) เนื้อหมูสด(Sagoo *et al*., 2002) Darmadji และ Izumimoto (1994) พบว่าการเติมไคโตแซนโอลิโกเมอร์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ยังสามารถลดการเกิดการหืน (lipid oxidation) และลดการเน่าเสีย (putrefaction) ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นและรสชาติดีกว่า นอกจากนี้ยังช่วยรักษาสีแดงของเนื้อในระหว่างการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังใช้ไคติน -ไคโตแซนเป็นอาหารเสริม (nutritional additives) ที่ไม่ให้พลังงานและไม่มีการดูดซึมเข้าร่างกาย เนื่องจากคนไม่มีเอนไซม์ที่ช่วยย่อยไคติน-ไคโตแซน ดังนั้นจึงมีการนำไปใช้ในอาหารสำหรับการควบคุมน้ำหนัก(ภาวดี และคณะ, 2542)

4. ด้านอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ เส้นใยและสิ่งทอ ไคติน -ไคโตแซน ใช้ในการผลิตผ้าที่ย้อมสีติดทนนาน ไม่หดตัว มีความนุ่มนวล ใช้เคลือบเส้นใยผ้าเพื่อลดกลิ่นต่าง ๆ ได้ เช่น กลิ่นเหงื่อ กลิ่นอับชื้น ส่วนในอุตสาหกรรมกระดาษ จะใช้ไคโตแซนในกระบวนการผลิตกระดาษที่มีคุณสมบัติทางกายภาพสูง เช่น เหนียวแน่นขึ้น แข็งแรงขึ้น ทนทานต่อการฉีกขาด หรือผลิตกระดาษที่ซับหมึกได้ดี เพื่อการพิมพ์ที่ต้องการคุณภาพสูง (ปิ่วย, 2544)

5. ด้านเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว สารไคติน - ไคโตแซนมีสมบัติโดดเด่นในการอุ้มน้ำและเป็นตาข่ายคลุมผิว ตลอดจนต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ได้ จึงใช้เป็นทั้งสารเติมแต่งและสารพื้นฐานของเครื่องสำอางหลายประเภท เช่น ผสมเป็นแป้งทาหน้าเพื่อความชุ่มชื้นและป้องกันเชื้อโรค เป็นส่วนผสมของแชมพูครีมและสบู่ ผสมในโลชั่นสำหรับเคลือบเพื่อป้องกันรวมถึงบำรุงผิวและเส้นผม (สุวลี, 2544)

6. ด้านสิ่งแวดล้อม ใช้ไคโตแซนเป็นสารตกตะกอนในการบำบัดน้ำเสียและโลหะหนักในการบำบัดน้ำทิ้ง น้ำเสีย เนื่องจากไคโตแซนมีความสามารถในการจับกับของแข็งแขวนลอยได้ดี และจับกับอะตอมของโลหะหนัก เช่น ปรอท แคดเมียม ตะกั่ว ด้วยพันธะเชิงซ้อน (ปิ่วย, 2544)

1.2.7.3 ผลของไคโตแซนต่อจุลินทรีย์

ธีระพล (2534) รายงานว่าสารไคติน-ไคโตแซน มีการนำมาใช้ในรูปของการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราบางชนิด

Kendra และ Hadwiger (1984) ศึกษาผลของไคโตแซนในการเก็บรักษาราสเบอรี่ พบว่าไคโตแซนเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้พอๆกับสาร thiabendazole ที่ใช้ในการ

ควบคุมการเน่าเสียของสตรอเบอรี่และราสเบอร์รี่ ที่ทำการเก็บที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเคลือบด้วยไคโตแซนจะช่วยเพิ่มปฏิกิริยาของไคติเนส และเบต้ากลูโคเนส ซึ่งสองตัวนี้สามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

Ghaouth (1991) ได้ศึกษาผลของการนำไคโตแซนไปเคลือบสตรอเบอร์รี่สด โดยศึกษาในเชิงของการเก็บรักษาและคุณภาพ จากผลการศึกษาพบว่า ไคโตแซนที่มีความเข้มข้น 10 % และ 15% w/v สามารถยืดอายุการเก็บรักษาสตรอเบอร์รี่ไว้ได้

Atistiar (1995) รายงานว่าการใช้ไคติน-ไคโตแซนเป็นสารกันเสียในอาหารพบว่ามีการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *Fusarium oxysporum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบอีกว่าเชื้อ *E. coli* , *S. aureus* และ *Saccharomyces cerevisiea* ถูกยับยั้งด้วยสารไคโตแซนแลคเตทและไคโตแซนไฮโดรกลูตาเมท ในการหมักโดยใช้ยีสต์และเสริมไคตินหรือไคโตแซนในการทำขนมปัง ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตช้า นั่นก็แสดงว่าไคติน-ไคโตแซนมีส่วนช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดและเชื้อราในอาหาร

สิริรัตน์ และคณะ (2546) ได้ศึกษาถึงการใช้ไคโตแซนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย โดยทดลองกับเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิดคือ *E. coli* , *S. aureus* , *V. cholerae* และ *S. weltevreden* ไคโตแซนที่ใช้มีน้ำหนักโมเลกุล 10^6 ดาลตัน 0 % , 0.001 % , 0.01 % , 0.1 % และ 1 % ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า ที่สารละลายไคโตแซนเข้มข้น 0.1 % สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้ และที่สารละลายไคโตแซนเข้มข้น 0.01 % ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ด้วย ซึ่งไคโตแซนจะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยไปยืดระยะของช่วงก่อนการเจริญเติบโต (lag phase) ของแบคทีเรีย โดยจะทำให้แบคทีเรียโตช้า ซึ่งถ้ามีอยู่ในปริมาณน้อยก็สามารถยับยั้งได้ 100 %

Simpson *et al.* (1997) แสดงถึงการนำไคโตแซนไปใช้ในการเก็บรักษากุ้งสด (*Pandulus borealis*) โดยทดลองในกุ้งทั้งตัวและกุ้งเด็ดหัว โดยที่นำตัวอย่างทั้งสองจุ่มลงในสารละลายที่มีไคโตแซนความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 -7 ^{0}C เป็นเวลา 20 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่าการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่าไคโตแซนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ที่ช่วงความเข้มข้นของไคโตแซนระหว่าง 0.0075-0.01 %

Sudarshan *et al*. (1992) รายงานว่า ไคโตแซนนอกจากมีผลในการต่อต้านยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียแล้ว ยังมีบทบาทในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบด้วย เช่น *E. coli* , *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae* , *Vibrio* spp. และ *S. typhimurium* และมีรายงานว่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจะมีค่าตั้งแต่ 100 จนถึง 10000 ppm

อรพรรณ (2546) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร ของ

ไคโตแซนจากเปลือกหัวกุ้งกุลาดำ พบว่า ตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน ได้แก่ กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร จะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และจะเกิดขึ้นได้ดีที่สภาวะ pH เป็นกรด ช่วง 4.5 – 6.0 และกระบวนการผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 72 , 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีก็ไม่มีผลทำให้ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนเสียไปเลย เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหาร 9 ชนิด (*E. coli* , *S. aureus* , *B. cereus* , *C. albican*s , *P. fluorescens* , *Salmonella* sp. , *Lactobacillus* sp., *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp.) ของ native chitosan พบว่าไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 90 จะมีประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 9 ชนิดโดยรวมดีที่สุด รองลงมาคือ ไคโตแซนทางการค้าที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 80 native chitosan ที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 74.80 และไคโตแซนทางการค้า ที่มีร้อยละระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเป็น 70 ตามลำดับ โดยค่า MIC ที่ได้จะมีหลากหลายแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราจะถูกยับยั้งโดยไคโตแซนได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย จากการทดลองพบว่า *Penicillium* sp. จะไวต่อการยับยั้งโดยไคโตแซนมากที่สุด ค่า MIC ที่ยับยั้งเชื้อรา *Penicillium* sp. ได้เท่ากับ 39.06 ppm ขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* sp. จะมีความทนทานต่อการยับยั้งของไคโตแซนได้ดีที่สุด ต้องใช้ความเข้มข้นของไคโตแซน >1250 ppm จึงจะยับยั้งได้ อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ *E. coli* , *S. aureus* และ *C. albican*s โดยวิธีการนับจำนวนด้วยวิธี plate count ที่ความเข้มข้นของไคโตแซน (native chitosan) เป็น 156.25 – 1250 ppm พบว่าที่ความเข้มข้นของไคโตแซนที่ทดสอบสามารถลดจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ได้อย่างรวดเร็วและไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์เลยในเวลา 6 ชั่วโมงหลังการบ่ม

จิราภรณ์ (2544) รายงานว่า ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร ปัจจุบันความต้องการใช้สารจากธรรมชาติเพื่อมาช่วยปรุงแต่งอาหารมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้มีการศึกษาวิจัยสารธรรมชาติอย่างมากมาย ไคติน-ไคโตแซนและอนุพันธ์เป็นสารธรรมชาติที่ปราศจากพิษ จึงได้ถูกนำมาทดลองใช้เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เพื่อยืดอายุการเก็บและเติมลงไปเพื่อปรับปรุงคุณภาพอาหาร และหลีกเลี่ยงการใช้สารกันบูดหรือสารปรุงแต่งอาหารอื่นๆ ที่อาจมีโทษต่อผู้บริโภคได้ กลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตแซนยังมีปัจจัยต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้องและมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้ง อาทิเช่น ชนิดของจุลินทรีย์และวัตถุดิบที่ใช้ และระดับการกำจัดหมู่อะซิติล (No *et al.,* 2002) น้ำหนักโมเลกุล ตัวทำละลาย (Tsai and Huey, 1999) และค่า pH ของอาหาร

No *et al.* (2002) ศึกษาถึงผลของความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนและโอลิโกเมอร์ไคโตแซนที่ได้จากเปลือกกุ้ง พบว่า ไคโตแซน

โดยทั่วไป จะให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบที่ความเข้มข้น 0.1% (น.น./ปริมาตร) และความเข้มข้นต่ำสุดของไคโตแซน (Minimum inhibitory concentration, MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้อยู่ในช่วง 0.05%->0.1%(น.น/ปริมาตร)ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียและน้ำหนักโมเลกุลของไคโตแซน และได้รายงานไว้ว่าตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนคือ 1% acetic acid และค่า pH ที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนได้ดีจะอยู่ที่ 4.5 โดยได้ศึกษาผลของพีเอชในช่วง 4.5 , 5.0 , 5.5 และ 5.9 ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย 6 ชนิด (*E. coli* , *S. typhimurium* , *L. monocytogenes* , *S. aureus* , *Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis*) ของไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 3 ระดับ (1671,, 746 และ 470 kda สำหรับ 4, สายพันธุ์แรกและ 1106 , 224 และ 28 kda สำหรับเชื้อ *Lactobacillus*) พบว่า การยับยั้งแบคทีเรียโดยไคโตแซนจะเกิดขึ้นได้ดีในสภาวะที่มี pH ต่ำ โดยที่ pH 4.5 จะให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด

Wang (1992) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียต่อเชื้อก่อโรค 5 ชนิดในอาหาร (*S. aureus* , *E. coli* , *Yersinia enterocolitica* , *S. typhimurium* และ *L. monocytologenes*) ของไคโตแซนที่ความเข้มข้นเป็น 0 , 0.5 , 1.5 , 2.0 และ 2.5 %ที่อาหาร pH 5.5 และ 6.5 ทุกความเข้มข้นจะมีฤทธิ์ของการต้านเชื้อแบคทีเรียที่ pH 5.5 จะดีกว่า pH 6.5

Tsai และ Huey (1999) ศึกษาผลของ pH ต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของไคโตแซนพบว่าสภาวะ pH เป็นกรดจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดโดยได้ศึกษา pH ในช่วง 5.0 , 6.0 , 7.0 , 8.0 และ 9.0 ซึ่งที่ pH 5.0 และ 6.0 จะให้ผลการยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุดโดย pH 5.0 ยับยั้งได้ดีกว่า pH 6.

1.2.7.4 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน

ไคโตแซนจะให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ในวงกว้าง คือ ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียกแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ เชื้อรา และเชื้อยีสต์ ซึ่งประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนก็แตกต่างกันไปตามชนิดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ คุณสมบัติของไคโตแซนและอนุพันธ์ของไคโตแซน (Yalpani *et al*., 1992)

ไคโตแซนมีประจุบวกอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (C_2) ของโมโนเมอร์กลูโคซามีน (glucosamine monomer) ที่สภาวะพีเอชต่ำกว่า 6.0 จึงทำให้ไคโตแซนมีสมบัติการละลายและมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าไคติน สารละลายไคโตแซนมีความเหนียว ใส มีพฤติกรรมแบบนอน-นิวโตเนียน (non-newtonian) ในสารละลายหมู่อะมิโนของไคโตแซนจะแตกตัว โดยมีสัมประสิทธิ์การแตกตัว (pKa) ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประจุของโพลิเมอร์ โดย pKa ของ

ไคโตแซนมีค่าอยู่ในช่วง 6.2 ถึง 6.8 ไคโตแซนมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยทำให้เกิดการเสื่อมเสียบางอย่าง เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างประจุบวกของโมเลกุลของไคโตแซนกับประจุลบบนชั้นเมมเบรนของของจุลินทรีย์ ไคโตแซนจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดรูรั่ว สูญเสียคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านส่งผลให้สารพวกโปรตีนและสารประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แพร่ผ่านออกมาภายนอกเซลล์และสารบางชนิดภายนอกสามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้น (Chen *et al*., 1998 ; Young *et al*., 1982) ทำให้เกิดการเสียสมดุลภายในเซลล์ นอกจากนี้ไคโตแซนยังมีคุณสมบัติเป็นสารจับโลหะ (chealating agent) ที่สามารถเลือกจับกับโลหะบางชนิดเพื่อยับยั้งการสร้างสารพิษ และยังสามารถดูดซับสารชีวภาพและสารอาหารของจุลินทรีย์ได้ด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือ อาจเป็นเพราะความสามารถในการจับกันของไคโตแซนและ DNA ของจุลินทรีย์จะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ mRNA โดยไคโตแซนจะซึมผ่านเข้าสู่นิวเคลียสของจุลินทรีย์และไปรบกวนกระบวนการสร้าง mRNA และโปรตีน (Shahidi *et al*., 1999 ; Hadwiger *et al* .,1984)

อรพรรณ (2546) รายงานว่าภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชันของเชื้อ *E. coli* ก่อนและหลังเติมไคโตแซน พบว่า ก่อนเติมไคโตแซน เซลล์ *E. coli* มีรูปร่างเป็นแท่ง ปกติเซลล์แต่ละเซลล์ไม่มีความแตกต่างกัน แม้จะมีกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 0.06 อยู่ด้วยก็ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ในขณะที่หลังการเติมไคโตแซนความเข้มข้น 0.0625% ลงไปพบว่าเซลล์ *E. coli* มีรูปร่างเปลี่ยนแปลง บางเซลล์จะเห็นผนังเซลล์เกิดรูรั่ว และมีปริมาณไซโตพลาสซึมหรือสารบางอย่างภายในเซลล์รั่วไหลออกมานอกเซลล์ และบางเซลล์ปริมาณไซโตพลาสซึมจะเกิดการกระจายแยกออกจากชั้นผนังเซลล์พื้นผิวเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง

1.2.7.5 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซนและอนุพันธ์

1. น้ำหนักโมเลกุลและความหนืดของไคโตแซน ไคโตแซนมีความสามารถในการละลายต่ำ (poor solubility) สารละลายซึ่งเตรียมจากไคโตแซนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีความหนืดมาก ไม่สะดวกในการนำมาประยุกต์ใช้กับกระบวนการผลิตอาหาร ดังนั้นจึงมีการพัฒนาและปรับปรุงคุณสมบัติด้านนี้ของไคโตแซนและอนุพันธ์ให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้นโดยผ่านกรรมวิธีทางเคมีหรือใช้เอนไซม์ตัดสายโซ่พอลิเมอร์ของไคโตแซนให้สั้นลง เพื่อลดน้ำหนักโมเลกุลเป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายให้ดีขึ้น และสามารถเพิ่มคุณสมบัติด้านการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามไคโตแซนและอนุพันธ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเกินไปจะไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Xie *et al*., 2001)

2. ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้เตรียมสารละลายไคโตแซน ไคโตแซนสามารถละลายได้ดีในกรดทั้งกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ แต่การนำไคโตแซนมาประยุกต์ใช้ทางด้านอาหาร

จึงเป็นข้อจำกัดให้สามารถใช้ได้เพียงกรดอินทรีย์เท่านั้น โดยทั่วไปกรดอินทรีย์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยตัวของกรดเองและการลดค่า pH ของระบบ ดังนั้นกรดอินทรีย์จึงช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตแซน ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นกับชนิดของกรด โดยกรดอะซิติค กรดแลคติค และกรดฟอร์มิค มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากกว่า กรดโพรพิออนิคและกรดแอสคอร์บิค (No *et al*., 2002)

3. ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของไคโตแซนและอนุพันธ์ที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์อาจแตกต่างกันไป ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ มีรายงานว่าไคโตแซนและอนุพันธ์สามารถยับยั้งแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ

Darmadji และ Izumimoto (1994) ศึกษาประสิทธิภาพของไคโตแซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในเนื้อวัวสด พบว่าไคโตแซน 0.01% สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* , *E. coli* , *P. fragi* และ *S. aureus* ได้ แต่ต้องใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนสูงขึ้น (0.1 ถึง 1.0%) จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. plantalum* , *P. pentosaceus* และ *M. varians* ได้

4. ลักษณะของอาหาร ชนิดของอาหารแตกต่างกัน ต้องใช้ความเข้มข้นของไคโตแซนแตกต่างกัน โดยถ้าลักษณะของอาหารมีองค์ประกอบของอนุภาคมากก็จะขัดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลพอลิเมอร์ของไคโตแซน ซึ่งเป็นการลดโอกาสของไคโตแซนในการสัมผัสกับเซลล์ของจุลินทรีย์ Tsai *et al.*(2000) พบว่า องค์ประกอบในน้ำนม สามารถลดประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของไคโตแซน โดยไคโตแซนจะจับกับไขมันทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง Roller และ Covill (2000) พบว่าการเติมกรดอะซิติกในมายองเนส ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของไคโตแซนในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าการเติมน้ำมะนาว

5. อุณหภูมิ มีงานวิจัยที่สนับสนุนว่าประสิทธิภาพของไคโตแซน ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ว่าจะเกิดได้ดีขึ้น เมื่อใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำโดย Chen *et al.* (1998) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการยืดอายุการเก็บรักษาหอยนางรม คือ การใช้ไคโตแซน ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส Roller และ Covill (2000) พบว่าประสิทธิภาพของไคโตแซนในการเป็นวัตถุกันเสียในมายองเนส ควรใช้ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า chitooligosaccharide ในน้ำนมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียลดลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่เหมาะสมในการยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนม คือ ใช้ chitooligosaccharide ร่วมกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Tsai *et al*., 2000)

1.3 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ที่มีในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวก่อนนำเข้ากระบวนการผลิตกุ้งแช่แข็ง

2. ศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาของคลอรีนและไคโตแซนที่สามารถลดจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในหลอดทดลองได้ร้อยละ 90

3. ศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาของคลอรีนและไคโตแซนที่สามารถลดจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* ในกุ้งสดที่มีการเติมเชื้อได้ร้อยละ 90

4. ศึกษาความสามารถของคลอรีนและไคโตแซนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการล้างกุ้งสดที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ตามธรรมชาติ