



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียม ไคโตซาน และสารประกอบ
เชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก
หมูไขมันต่ำ

โดย ดร.ทานตะวัน พิรักษ์

เดือน พฤศจิกายน ปี 2553

สัญญาเลขที่ MRG 5180302

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียม ไคโตซาน และสารประกอบ
เชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก
หมูไขมันต่ำ

ผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร.ทานตะวัน พิรัชย์ ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (หัวหน้าโครงการ)
2. รศ.ดร.อนุวัตร แจ่มชัด ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (นักวิจัยที่ปรึกษา)
3. รศ.ดร.พันธุ์พา จันทวัฒน์ ข้าราชการบำนาญ (นักวิจัยที่ปรึกษา)

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุน

สนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code : MRG 5180302

Project Title : Applications of allicin, chitosan and allicin-chitosan complexes as antimicrobial agent in low fat pork sausage

Investigator: Dr. Tantawan Pirak, Department of Product Development, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University

Mentor: 1. Assoc.Dr. Anuvaj Jangchud, Department of Product Development, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University

2. Assoc.Dr. Pantipa Jantawat, Retired Government Officer

E-mail Address : fagitwk@ku.ac.th, tantawan.k@hotmail.com

Project Period : 2 years 1 month (Including the extension period)

Abstract:

The application of allicin, chitosan and allicin-chitosan complexes as antimicrobial agent in low fat pork sausage as expressed in term of antimicrobial inhibition activity, product quality (physical and chemical properties), sensory characteristics and shelf life of low-fat pork sausage was studied in this research. The optimum condition and process for producing allicin-chitosan complexes was also studied. Chitosan was prepared with 2 different deacetylation steps in our laboratory. The obtained chitosan possessed molecular weight more than 10^6 Dalton and %degree of deacetylation (%DD) at 78 (sample 1) and 88% (sample 2), respectively. Allicin was extracted from fresh garlic and freshly used or kept in refrigerator at 4°C for using within 24 hours. The concentration of allicin in allicin solution was 13.5-14.2 mg/ml. The allicin-chitosan complexes were prepared using the optimum process at the weight ratio of allicin:chitosan at 1:1, 2:1 and 3:1. The result showed that the obtained complex solution possessed 20-21% total soluble solid with pH at 4.5-4.8. Among four drying methods, freeze drying, spray drying, vacuum drying and tray drying, freeze drying gave the highest yield at the optimum ratio at 1:1. The obtained complex had light cream color ($L^*87.3$, $a^*-0.45$, $b^*16.82$) and can dissolve in water with the wide pH range. The disk diffusion test showed the ability of complex to inhibit *E. coli* and *S. aureus* with the minimum inhibition concentration at 6.25 mg/ml. Scanning electron microscope revealed the round shape structure of complexes with diameter at 5-15 μm . FT-IR spectra of all complexes were not significantly different, exhibited that most of functional groups were similar. The result from XRD showed that crystal type of complexes was amorphous.

The application of allicin-chitosan complexes into low fat pork sausage resulted in increasing of lightness and reducing of water holding capacity ($p \leq 0.05$). Moreover, the addition of the allicin-chitosan complexes also resulted in significant increase of hardness, cohesiveness, gumminess and chewiness ($p \leq 0.05$), while springiness and adhesiveness was not significantly difference ($p > 0.05$). The sensory results using 9-point hedonic scaling test exhibited that overall liking score of low fat pork sausages with allicin or chitosan alone was less than control. The highest score was found in sausage with 0.5% allicin-chitosan complex produced with 88% DD chitosan sample with the weight ratio of allicin to chitosan at 1:1. After keeping at 4°C for 15 days, all of sensory scores were found to be not acceptable by consumer. Retardation of bacterial growth and inhibition of yeast and mold growth in low fat pork sausage were received; moreover, the shelf life of low fat pork sausage was extended to 15 days at 4°C.

Keywords : allicin, chitosan, allicin-chitosan complexes, antimicrobial agent, low fat pork sausage

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG 5180302

ชื่อโครงการ การประยุกต์ใช้สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียม ไคโตซาน และสารประกอบ
เชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก
หมูไขมันต่ำ

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: ดร.ทานตะวัน พิทักษ์ ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะ

อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา: 1. รศ.ดร.อนุวัตร แจ่มชัดภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะ

อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. รศ.ดร.พนัธิพา จันทวัฒน์, ข้าราชการบำนาญ

E-mail Address: fagitwk@ku.ac.th, tantawan.k@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี 1 เดือน (รวมระยะเวลาที่ขอขยาย 7 เดือน)

บทคัดย่อ:

งานวิจัยนี้ศึกษาการประยุกต์ใช้อัลลิซิน ไคโตซานและสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในไส้กรอกหมูไขมันต่ำ โดยแสดงผลในค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ คุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางด้านกายภาพและเคมี คุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส อายุการเก็บรักษา รวมทั้งศึกษาภาวะในการผลิตและกระบวนการผลิตสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เหมาะสม ไคโตซานที่ใช้ในงานวิจัยนี้เตรียมในห้องปฏิบัติการด้วยกระบวนการดั่งหมูอะเซทิลที่แตกต่างกัน 2 ระดับเพื่อให้ได้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10^6 ดาลตันและมีระดับการดั่งหมูอะเซทิล (degree of deacetylation, %DD) 2 ระดับคือ 78 และ 88% อัลลิซินที่สกัดได้จากกระเทียมใช้ในการทดลองทันทีหรือเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสและใช้ภายในเวลาไม่เกิน 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของอัลลิซินที่สกัดได้อยู่ระหว่าง 13.5-14.2 mg/ml สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานซึ่งเตรียมด้วยภาวะที่เหมาะสมจากงานวิจัยนี้ นำมาศึกษาที่อัตราส่วนอัลลิซินต่อไคโตซาน 1:1 2:1 และ 3:1 ผลจากการทดลองพบว่า สารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมได้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ระหว่าง 20-21% และpH 4.5-4.8 สำหรับตัวอย่างที่ทำแห้งทั้งหมด 4 วิธี ได้แก่ freeze drying spray drying vacuum drying และtray drying พบว่า freeze drying ให้ผลผลิตสูงสุด อัตราส่วนที่เหมาะสมและให้ผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานสูงสุดคือ 1:1 สารประกอบที่ได้มีสีเหลืองครีม ($L^*87.3$, $a^*-0.45$, $b^*16.82$) ละลายน้ำได้ที่ช่วง pH กว้าง ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ โดยปริมาณต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้เท่ากับ 6.25

mg/ml จากการศึกษาด้วย scanning electron microscope พบว่าสารประกอบที่ได้มีลักษณะเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-15 μm ขณะที่สเปกตรัมของทุกตัวอย่างจากเครื่อง FT-IR ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนแสดงให้เห็นว่าลักษณะโครงสร้างของสารประกอบทุกตัวอย่างคล้ายคลึงกัน และผลจากเครื่อง XRD แสดงลักษณะผลึกแบบอสัณฐาน เมื่อนำสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานมาประยุกต์ใช้ในไส้กรอกหมูไขมันต่ำ เป็นผลให้ไส้กรอกมีค่าความสว่างของสีเพิ่มขึ้น ความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง ($p \leq 0.05$) เนื้อสัมผัสซึ่งอธิบายด้วย hardness cohesiveness gumminess และ chewiness เพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ springiness และ adhesiveness ไม่เปลี่ยนแปลง ($p > 0.05$) ผลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสแสดงให้เห็นว่า คะแนนความชอบโดยรวมของไส้กรอกผสมอัลลิซินหรือโคโคซานอย่างใดอย่างหนึ่งมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ขณะที่ไส้กรอกผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ที่อัตราส่วน 1:1 ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนักได้รับคะแนนความชอบโดยรวมสูงสุด หลังจากเก็บไส้กรอกไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน ผู้ทดสอบไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานมีผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ยีสต์และรา จึงทำให้อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ยาวนานกว่าตัวอย่างควบคุม เป็นเวลา 15 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส

คำสำคัญ: อัลลิซิน โคโคซาน สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การประยุกต์ใช้สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียม ไลโคโทซาน และ
สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไลโคโทซานเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ใน
ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ
(ภาษาอังกฤษ) Applications of allicin, chitosan and allicin-chitosan complexes
as antimicrobial agent in low fat pork sausage
ชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานที่สังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
หัวหน้าโครงการ: อ.ดร.ทานตะวัน คชนทร์ชัย
หน่วยงานที่สังกัด: ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ที่อยู่: 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทร. 02-562-5004 ต่อ 5259, โทรสาร 02-562-5005
e-mail: tantawan.k@hotmail.com, fagitwk@ku.ac.th

สาขาวิชาที่ทำการวิจัย การพัฒนาและประยุกต์ใช้ไลโคโทซาน ไฮโดรคอลลอยด์ หรือสารสกัด
จากธรรมชาติในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

ระยะเวลาดำเนินงาน 2 ปี 1 เดือน

ปัญหาที่ทำการวิจัย และความสำคัญของปัญหา

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่เสื่อมเสียได้ง่ายจากเชื้อจุลินทรีย์ (perishable food) เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นและค่า water activity (A_w) สูง มีสารอาหารครบสมบูรณ์เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยเหตุนี้ ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจึงมักมีอายุการเก็บรักษาสั้น ซึ่งจะส่งผลให้ผู้ผลิตมีความเสี่ยงสูงเนื่องจากไม่สามารถวางจำหน่ายผลิตภัณฑ์ได้นานเท่าที่ควร เป็นผลให้ผู้ผลิตมีความจำเป็นในการใช้วัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมี เพื่อป้องกันการเน่าเสียและยืดอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ซึ่งสารเคมีบางชนิดที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม อาทิเช่น สารฟอสเฟต (phosphate) สารไนเตรตและไนไตรท์ (nitrate and nitrite) อาจมีผลข้างเคียงต่อสุขภาพในระยะยาวของผู้บริโภคได้ เช่น การบริโภคสารฟอสเฟตในระยะเวลายาวนาน อาจมีผลทำให้กระดูกพรุนเร็วขึ้น หรือหากผู้ผลิตใช้ในปริมาณที่มากเกินไป อาจทำให้เกิดการตกค้างของสารดังกล่าว เช่น สารไนเตรตและไนไตรท์ ที่มีรายงานว่า เป็นสารก่อมะเร็งในร่างกายของหนูทดลองได้ ประกอบกับในปัจจุบันความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์แปรรูปได้เปลี่ยนแปลงไป โดยผู้บริโภคเริ่มให้ความสนใจและตระหนักถึงปัญหาสุขภาพที่อาจเกิดขึ้น เนื่องจากการบริโภค

อาหารที่ไม่มีคุณภาพและไม่ถูกต้องตามหลักโภชนาการ ควบคู่ไปกับการพิจารณาถึงราคาของผลิตภัณฑ์ และความสะดวกในการเลือกซื้อหรือปรุงประกอบ จึงเป็นผลให้ผู้บริโภคตัดสินใจเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูง ปลอดภัย ได้มาตรฐาน และมีคุณประโยชน์ทางด้านโภชนาการเหมาะสมต่อร่างกายของตนเอง ดังนั้น งานวิจัยที่มุ่งเน้นในการค้นคว้าและพัฒนาสารสกัดจากธรรมชาติที่มีความสามารถในการต้านทานการเน่าเสียจากเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ ช่วยเพิ่มหรือปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์แปรรูป และทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณลักษณะที่ดีตรงตามความต้องการของผู้บริโภค จึงเป็นสิ่งจำเป็นและเป็นที่ต้องการอย่างมากในอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์แปรรูปในประเทศไทย

นอกจากนี้ จากรายงานการสำรวจตลาดหลายรายงานได้พบว่า ตลาดของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อสุขภาพและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อินทรีย์มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น (Resurreccion, 2003; Bernés, Olaiola and Corcoran, 2003; Ngapo, *et al.*, 2003) และมีอัตราการเติบโตอย่างรวดเร็วในปี 2006 โดยเฉพาะในตลาดต่างประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และกลุ่มประเทศยุโรป (Aymerich, Picouet and Monfort, 2007; Sebranek and Bacus, 2007) ซึ่งปัจจัยทั้งหมดนี้ เป็นแรงผลักดันให้ผู้ผลิตมีความจำเป็น ในการปรับเปลี่ยนแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ให้สอดคล้องต่อความต้องการของกลุ่มผู้บริโภคดังกล่าวที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ

สารสกัดจากธรรมชาติ มีอยู่หลายชนิดที่สามารถออกฤทธิ์ต้านทาน ยับยั้ง หรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้นั้น เช่น สารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียม หอมหัวใหญ่ อบเชย ใบโคลฟ (clove) ไทม์ (thyme) ออริกาโน (oregano) และเซจ (sage) เป็นต้น ซึ่งสารสกัดแต่ละชนิดนั้น มีความยากง่ายในการสกัดและความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน สำหรับในงานวิจัยนี้ ได้เลือกทำการศึกษาสารสกัดจากธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและมีประสิทธิภาพสูงจำนวน 2 ชนิดคือ สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมและไคโตซาน ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่สกัดได้ง่าย พบมาก และมีราคาไม่แพงมากนัก จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ได้ง่าย และให้ความปลอดภัยมากกว่าวัตถุกันเสียจำพวกสารเคมี ที่ปัจจุบันใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เช่น ไส้กรอกและลูกชิ้น เป็นต้น

จากการค้นคว้าผลงานวิจัยต่าง ๆ ตั้งแต่ในอดีตมาจนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาผลของการใช้สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมร่วมกับไคโตซาน เพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป รวมทั้งไม่มีงานวิจัยใดที่แก้ไขปัญหาความไม่เสถียรของอัลลิซิน หรือศึกษาวิธีการเพิ่มความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงของอัลลิซิน ที่มักจะเกิดขึ้นโดยอัลลิซินจะเปลี่ยนรูปไปอย่างรวดเร็วหลังจากการสังเคราะห์ของเอนไซม์อัลลิเนส ทำให้เป็นสารที่มีความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาเพื่อให้ได้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์จากสารสกัดธรรมชาติที่มีการออกฤทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยเลือกพัฒนาจากสารสกัดธรรมชาติที่มีความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์สูง 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมและไคโตซาน ด้วย

วิธีการทำให้เกิดการเกาะเกี่ยวกันด้วยพันธะแบบประจุ และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของสารทั้งสองชนิด (polyelectrolyte complexation) และศึกษาการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปโดยเลือกผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ โดยมุ่งหวังให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ที่มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น มีความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย โดยไม่ต้องใช้วัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมี มีคุณลักษณะทางคุณภาพที่ดี มีรสชาติอร่อย มีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี โดยเฉพาะมีไขมันต่ำ และเหมาะสมต่อผู้บริโภคทุกเพศทุกวัย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากิจกรรมวิธีการผลิตอัลลิซิน-โคโตซานคอมเพล็กซ์ที่เหมาะสม รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีและทางด้านกายภาพของคอมเพล็กซ์ที่ผลิตได้

2. เพื่อศึกษาผลของอัลลิซิน โคโตซาน และอัลลิซิน-โคโตซานคอมเพล็กซ์ ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และผลที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 อัลลิซิน: สารสกัดอัลลิซินสกัดได้จากกระเทียมสดในห้องปฏิบัติการ อ้างอิงวิธีสกัดของ Curtis *et al.* (2004) ซึ่งสารสกัดที่ได้จะนำมาใช้ทดลองต่อทันที หรือหากในกรณีที่ไม่ได้ใช้ทันทีจะเก็บไว้ในภาชนะปิดที่บดแสงที่อุณหภูมิ 4 °C และใช้ทดลองภายใน 24 ชั่วโมง

1.2 โคโตซาน: โคโตซานเตรียมได้จากเปลือกกุ้งที่แห้งและสะอาด จากบริษัท ต้าหมิง เอนเตอร์ไพรส์ จำกัด (สมุทรสาคร) โดยอ้างอิงตามวิธีการเตรียมของ Tolaimate และคณะ (2003) และ Kachanechai และคณะ (2008) เพื่อให้ได้โคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10^6 Dalton และมีค่า DD 2 ระดับ คือ 70-85 และ 85-100%

2. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน

2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน

2.1.1 ศึกษาอัตราส่วนของโคโตซานต่ออัลลิซินที่เหมาะสม

วิธีเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานในงานวิจัยนี้ อ้างอิงตามวิธีของ Takeuchi และคณะ (2000) โดยแปรอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินต่อโคโตซานเป็น 1:1 2:1 และ 3:1 และทำการศึกษาตัวอย่างโคโตซาน 2 ตัวอย่างที่ DD 2 ระดับ (จาก 1.2) ตรวจวัดปริมาณอัลลิซินที่คงเหลือในสารละลายในส่วนบน ด้วยวิธี Spectrophotometric Assay ด้วยปฏิกิริยาของ 4-mercaptopyridine กับ Thiosulfonates (Miron *et al.*, 2002) และเลือกอัตราส่วนของอัลลิซินต่อโคโตซานที่เหมาะสมที่สุดจากปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ และปริมาณอัลลิซินที่คงเหลือหลังจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

2.1.2 ศึกษาวิธีการทำแห้งสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เหมาะสม

นำตัวอย่างที่ได้ หลังจากการทิ้งไว้ให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนอย่างสมบูรณ์แล้วมาตรวจวัดค่า pH และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, (°Brix)) จากนั้นนำมาทำแห้งโดยศึกษาวิธีการทำแห้งที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาวิธีการทำแห้งทั้งหมด 4 วิธี คือ การทำแห้งด้วยเครื่อง spray drier freeze drier vacuum drier และ tray drier ซึ่งวิธีในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เหมาะสมที่สุด ที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ดัดแปลงจากวิธีของ Takeuchi และคณะ (2000)) ชั่งน้ำหนักสารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมและสารละลายโคโคซานตามอัตราส่วน นำสารสกัดอัลลิซินที่อยู่ในบีกเกอร์มา homogenize ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm นาน 10 วินาที ค่อย ๆ หยดสารละลายโคโคซานด้วยหลอดหยดลงในสารสกัดอัลลิซิน (ปั่นด้วยความเร็วรอบ 11,000 rpm ต่อเนื่องจนกระทั่งหยดสารละลายโคโคซานจนหมด (ประมาณ 10 นาที)) ปั่นต่ออีก 30 วินาที นำสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้ใส่ลงในภาชนะปิด ทึบแสง เก็บไว้ที่ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยสมบูรณ์ นำมาปั่นเหวี่ยงแยกสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานด้วยเครื่อง centrifuge โดยใช้ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทแยกส่วนใสลงในภาชนะปิด ทึบแสงและเก็บไว้ที่ 4°C เพื่อรอการตรวจวัดปริมาณอัลลิซินที่คงเหลืออยู่ด้วยวิธี Spectrophotometric Assay ด้วยปฏิกิริยาของ 4-mercaptopyridine กับ Thiosulfates (Miron *et al.*, 2002) ทำการทำแห้งตัวอย่างด้วยเครื่อง freeze drier ในการทดลองนี้ จะเลือกสภาวะการทำแห้งที่ให้อัตราผลผลิตที่ได้ (%yield) ที่สูงที่สุดเพื่อเตรียมตัวอย่างต่อไป โดยในงานวิจัยขั้นตอนนี้จะทำการวางแผนการทดลองแบบ CRD และทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002)

2.2 ศึกษาคุณลักษณะ สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน

นำสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เตรียมได้ทั้งหมด มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994) รูปร่างของสารประกอบเชิงซ้อนโดยใช้วิธี Scanning electron microscopy (SEM) (Gómez-Guillén *et al.*, 2005) ลักษณะโครงสร้างของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) (Umemura and Kawai, 2007) ค่าความเป็นผลึก (crystallinity) ของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี X-ray Diffraction (XRD) (Wang, Du and Liu, 2004) ค่าความสามารถในการละลายน้ำ (Takeuchi *et al.*, 2000)

การทดลองในขั้นนี้ วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล แบบ Completely Randomized Design เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลการทดลองของแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002) โดยใช้การวิเคราะห์ทางความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test

2.3 ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน

ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ต่อเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Streptococcus faecalis* และ *Salmonella typhimurium* โดยการทดสอบความไวของจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk diffusion test (Kirby-Bauer) ซึ่งวัดผลโดยการวัดขนาดของ clear zone หรือ zone of inhibition และศึกษาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ด้วยวิธี Broth dilution method

3. ศึกษาผลของอัลลิซิน โคโคซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวต่อลักษณะทางเคมี กายภาพ ประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

3.1 สูตรและวิธีการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมอัลลิซิน โคโคซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน

เตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำโดยอ้างอิงวิธีของ Georgantelis และคณะ (2007b) แปรปริมาณ อัลลิซิน โคโคซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน 2 ระดับ คือ 0.5 และ 1% โดยน้ำหนัก และเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารดังกล่าว

3.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

เตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำตามวิธีที่อ้างอิง ทำการศึกษาเบื้องต้นกับตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานทั้งหมดที่ผลิตได้ จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน 0.5 และ 1% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารประกอบเชิงซ้อน ประเมินคุณภาพโดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และวิเคราะห์เชื้อราและยีสต์โดยอ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007) เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 ศึกษาผลของอัลลิซิน โคโคซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ และผลต่อลักษณะทางเคมี กายภาพ ประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ผลิตไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมอัลลิซิน โคโคซาน และสารประกอบที่ความเข้มข้นเหมาะสมที่สรุปได้จากข้อ 3.2 มาวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ ได้แก่ ได้แก่ ความชื้น (Moisture content) โดยใช้วิธีมาตรฐานของ AOAC (1995) สีของตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994) เนื้อสัมผัส ด้วยเครื่อง texture analyzer

(Barbut, 2006) ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity, WHC) ด้วยวิธี Centrifugation method (Honikel and Hamm, 1994)

จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับของผู้บริโภค โดยใช้แบบสอบถาม ชนิด 9-point hedonic scale ทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ โดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝน จำนวน 30 คน โดยทดสอบผลิตภัณฑ์ทุก ๆ 7 วัน จนกว่าตัวอย่างไส้กรอกจะเสื่อมเสีย และประเมินอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และปริมาณเชื้อราและยีสต์ อ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007) ทุก ๆ 5 วัน จนกว่าตัวอย่างไส้กรอกจะเสื่อมเสีย

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Completely Randomized Design ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

อัลลิซิน: สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมมีลักษณะเป็นของเหลว สีเหลืองใส และมีร้อยละผลผลิตที่ได้อยู่ในช่วง 50-52% ปริมาณอัลลิซินที่ตรวจวัดด้วยวิธี Spectrophotometric Assay ด้วยปฏิกิริยาของ 4-mercaptopyridine กับ Thiosulfinates (Miron *et al.*, 2002) พบว่าอยู่ในช่วง 13.5-14.2 mg/ml จึงปรับความเข้มข้นเป็น 13.5 mg/ml ก่อนนำมาผสมกับสารละลายไโคโตซานในขั้นตอนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนในการทดลองขั้นต่อไป

ไโคโตซาน: ไโคโตซานที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ อ้างอิงตามวิธีของ Tolaimate และคณะ (2003) และ Kachanechai และคณะ (2008) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย มีคุณลักษณะตรงตามต้องการ กล่าวคือ ไโคโตซานตัวอย่างที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.10×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 78% และไโคโตซานตัวอย่างที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.02×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 88%

สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไโคโตซาน: จากการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเลือกวิธีการทำแห้งที่เหมาะสม จากวิธีทำแห้งทั้งหมด 4 วิธี ได้แก่ freeze drying, spray drying, vacuum drying และ tray drying โดยใช้ไโคโตซานตัวอย่างที่ 2 ที่อัตราส่วนไโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 พบว่า การทำแห้งทั้ง 4 วิธีให้ร้อยละผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไโคโตซานเป็น 66.37, 37.84, 8.02, และ 5.11 ดังนั้นจึงได้ทำการเลือกการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ซึ่งวิธีนี้นอกจากจะให้ร้อยละผลผลิตสูงสุด ยังไม่มีการใช้ความร้อนในการทำให้ตัวอย่างแห้ง จึงไม่ทำให้เกิดการสลายของสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ สำหรับสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไโคโตซาน พบว่าเป็นสารละลายสีเหลืองนวล มีค่า %total soluble solid ของตัวอย่างสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไโคโตซานที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารสกัดอัลลิซิน ทั้งยังมีผลทำให้ค่า pH มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งการ

เพิ่มขึ้นดังกล่าวอาจเนื่องจาก pH ของสารละลายอัลลิซิน ที่ สูงกว่าสารละลายไคโตซาน เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักขึ้น จึงส่งผลให้ pH ของสารละลายอัลลิซิน-ไคโตซานสูงขึ้น ในขณะที่ร้อยละผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้ ลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารสกัดอัลลิซินและอัตราส่วนที่ดีที่สุด ที่ให้ร้อยละผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนสูงที่สุดและมีปริมาณอัลลิซินคงเหลือต่ำที่สุด คือ ตัวอย่างที่เตรียมจากไคโตซาน ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1.02×10^6 Dalton 88% DD ด้วยอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1

คุณสมบัติของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน:

สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่ผลิตได้ มีสีเหลืองนวล มีค่า L^* 81.00-87.30 ค่า a^* -0.47-2.18 และ ค่า b^* 16.82-21.18 และมีสีที่แตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) เมื่ออัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินเพิ่มขึ้น พบว่า ค่าความสว่างลดลง ค่าสีแดงและค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) ซึ่งเป็นผลมาจากสีที่ค่อนข้างเหลืองของสารละลายอัลลิซินที่สกัดได้

ภาพจาก scanning electron micrograph แสดงให้เห็นว่า สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน มีลักษณะเป็นทรงกลม หลายขนาด โดยมีขนาดอยู่ในช่วง 5-15 μm ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Shu และ Zhu (2000) Mi และคณะ (2002) และงานวิจัยของ Sankalia และคณะ (2007)

ลักษณะโครงสร้างและหมู่ function ของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 6 ตัวอย่างมีลักษณะโดยรวมของ spectra คล้ายคลึงกันมาก มีเพียงบางตำแหน่งของ spectra เท่านั้นที่มีความแตกต่างกัน และลักษณะโครงสร้างของ spectra ก็แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบการ shift ของ spectra ที่ตำแหน่งบนแกน Y ที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้สรุปได้ว่า ลักษณะโครงสร้างและหมู่ function ของสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 6 ตัวอย่าง ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน มีเพียงหมู่ function บางหมู่เท่านั้น ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากไคโตซาน 2 ตัวอย่างที่แตกต่างกัน (DD = 78% และ 88%) ไม่มีความแตกต่างที่ชัดเจน แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซิน จะมีผลทำให้มีหมู่ function และโครงสร้างแตกต่างออกไปเล็กน้อย โดยมีหมู่ function เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานกับอัลลิซินที่เท่ากัน ซึ่งหมู่ function ที่พบหลัก ๆ คือ alkyl group-hydroxy or possibly amino substituent, hydroxyl or amino compound general และ Aliphatic alcohol with carbonyl substitution

ผลจาก X-ray diffraction (XRD) แสดงความคล้ายคลึงของ XRD patterns ของสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 6 ตัวอย่าง บ่งบอกลักษณะของผลึกแบบอสัณฐาน (Amorphous crystal) จากลักษณะของ patterns ค่อนข้างแบนและกว้าง ขณะที่ลักษณะรูปร่างของยอด (peak) ของ XRD pattern ที่เกิดขึ้น ก็แตกต่างจาก pattern ของไคโตซานเพียงอย่างเดียว (Ou et al., 2010) Ou และ คณะ (2010) กล่าวว่า ลักษณะของไคโตซานจะให้ผลของยอดที่ 2 θ แบบแคบ (narrow peak) เป็น 2 ตำแหน่งคือ ที่ 9.85° และ 19.70° แตกต่างอย่างเห็นได้ชัดกับผลการทดลองที่ได้ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ที่ให้ผลของยอดที่มีความกว้างมาก

(broad peak) ที่ 2θ เพียงตำแหน่งเดียว และเกิดขึ้นที่ตำแหน่งระหว่าง $20-21^\circ$ ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซิน จะเห็นได้ว่า ยอดของ XRD pattern ของตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานตัวอย่างที่ 1-3 และตัวอย่างที่ 4-6 มีการเลื่อนเข้าหาตำแหน่งที่ 20° มากขึ้น แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินต่อโคโตซานจาก 1:1 เป็น 2:1 และ 3:1 ตามลำดับ ไม่ได้ส่งผลให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนเกิดได้ดีขึ้น สารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จะแสดงลักษณะของยอดที่เข้าใกล้ตำแหน่งของโคโตซานมากขึ้น และแสดงสมบัติการเป็นโคโตซานมากขึ้น บ่งชี้ได้ว่าการเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซิน ไม่ช่วยทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้มากขึ้น

สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานทุกตัวอย่างละลายน้ำได้ช่วง pH ค่อนข้างกว้าง (pH 3-11) และความสามารถในการละลายเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซิน นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของค่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินอีกด้วย

ผลการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ต่อเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *S. aureus*, *Strep. faecalis* และ *Sal. typhimurium* ด้วยวิธี Disk diffusion test (Kirby-Bauer) วัดขนาดของ clear zone หรือ zone of inhibition ซึ่งพบว่า clear zone มีความกว้างอยู่ระหว่าง 11.5-17 mm โดยสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1.02×10^6 Dalton 88% DD ด้วยอัตราส่วนโดยน้ำหนักของโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 ให้ผลการยับยั้งเชื้อดีที่สุด โดยให้ผล และผลจากการศึกษาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *E. coli* และ *S. aureus* โดยให้ผลในการยับยั้งการเจริญได้แต่ไม่สามารถฆ่าทำลายเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ จึงไม่สามารถหาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ได้ โดยค่า MIC ของเชื้อ *E. coli* ที่ต่ำที่สุดคือตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ที่เตรียมจากโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1.02×10^6 Dalton 88% DD ด้วยอัตราส่วนโดยน้ำหนักของโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 (6.25 mg/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับสารอัลลิซิน (25 mg/ml) และโคโตซาน (12.5 mg/ml) และสำหรับเชื้อ *S. aureus* จะให้ค่า MIC ที่เท่ากัน (12.5 mg/ml)

สมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และผลต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส:

ในการทดลองนี้ แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรก คัดเลือกความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนที่เหมาะสมสำหรับเติมลงในไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ซึ่งการทดลองส่วนแรกนี้ เพื่อให้การทดลองในส่วนที่ 2 มีหน่วยทดลองไม่มากเกินไป และลดการสิ้นเปลืองของสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมไว้ ส่วนการทดลองส่วนที่ 2 ศึกษาเปรียบเทียบผลของอัลลิซิน โคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และผลต่อลักษณะทางเคมี กายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุ

การเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ โดยศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ในการทดลองส่วนแรก ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ โดยศึกษากับตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 6 ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 ระดับคือ 0.5 และ 1.0%(w/w) วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) และปริมาณยีสต์-รา หลังการเตรียมเสร็จเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดและนำมาใช้ต่อในการทดลองส่วนที่ 2 ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ไม่มีผลในการช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) และปริมาณยีสต์-รา ของตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน มีค่าน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างชัดเจน แสดงถึงความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อน เมื่อความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนเพิ่มจาก 0.5% เป็น 1.0% โดยน้ำหนัก พบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อรา-ยีสต์ ที่ตรวจวัดได้ไม่แตกต่างกัน จึงตัดสินใจเลือกความเข้มข้นที่ 0.5% โดยน้ำหนัก มาศึกษาต่อในการทดลองที่ 2 ต่อไป

ในการทดลองส่วนที่ 2 ศึกษาเปรียบเทียบผลการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของ อัลลิซิน โคโคซานและสารประกอบเชิงซ้อน กับตัวอย่างควบคุม โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และปริมาณเชื้อรา-ยีสต์ในตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำ (Kok and Park, 2007) ทุก ๆ 5 วัน ซึ่งจากการทดลองพบว่า สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัลลิซินหรือโคโคซาน เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ของทุก ๆ ตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้น โดยตัวอย่างควบคุมจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์-รา สูงที่สุด โดยเพิ่มจาก 1.4×10^2 cfu/g เป็น 3.2×10^5 4.2×10^7 และ 6.7×10^7 ตามลำดับ ซึ่งเห็นได้ว่า ตัวอย่างควบคุมเกิดการเสื่อมเสียในอัตราเร็วสูงมาก อาจเนื่องมาจากการเก็บรักษาในภาวะบรรจุสนิทแต่ไม่ได้ใช้ระบบสุญญากาศร่วมด้วย จึงทำให้มีการเสื่อมเสียในอัตราเร็วที่สูงและไม่สามารถรับประทานได้เมื่อเก็บรักษาไว้นานกว่า 10 วัน เนื่องจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่า 10^6 cfu/g ซึ่งอายุการเก็บรักษาของตัวอย่างควบคุมจะอยู่ที่ประมาณ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมอัลลิซิน พบว่า ไม่แตกต่างกันกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากการสลายตัวของอัลลิซินอย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสกับแสงและอุณหภูมิสูง ซึ่งธรรมชาติของสารอัลลิซินจะเป็นสารที่ไม่เสถียร เมื่อถูก catalyze ด้วยเอนไซม์ allianse เกิดการเปลี่ยนสารอัลลิซิน (alliin) ให้เป็น อัลลิซิน (allicin) ภายหลังจากกลีบกระเทียมสัมผัสอากาศและมีแรงกด สับหรือทุบแล้วนั้น สารอัลลิซินก็จะค่อย ๆ สลายตัวลงไปเรื่อย ๆ และลดความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ลง (Ankri and Mirelman, 1999; Yin and Cheng, 2003) ดังนั้นผลที่ได้จึงสอดคล้องกันกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ระหว่างตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมไคโตซานเพียงอย่างเดียว พบว่า ไคโตซานสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีในระดับหนึ่ง แต่ยิ่งต่อยกว่าสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ซึ่งการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของไคโตซานจะดีกว่าการใช้สารอัลลิซิน และสามารถยับยั้งเชื้อยีสต์และรา ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย สำหรับไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน จะพบว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และรา ในอัตราที่ต่ำที่สุด และมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานที่สุดถึง 15 วัน แสดงให้เห็นความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบดังกล่าว โดยให้ผลออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้ดีกว่าแบคทีเรีย ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองที่ได้จากตัวอย่างไส้กรอกผสมไคโตซานเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองนี้ ชี้ให้เห็นว่าการใช้ไคโตซานเพียงอย่างเดียว สามารถในผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ในระดับหนึ่ง แต่เมื่อใช้สารประกอบเชิงซ้อนจะให้ผลที่ดีกว่า และแสดงให้เห็นถึงความสามารถของไคโตซานที่สามารถจับสารอัลลิซินไว้ ทำให้สารประกอบเชิงซ้อนที่ประกอบได้ด้วยไคโตซานและอัลลิซินให้ผลในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ซึ่งตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.10×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 78% จะมีอัตราการเพิ่มของเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าตัวอย่างที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.02×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 88% แสดงให้เห็นว่า ไคโตซานที่มี DD เพิ่มขึ้น จะสามารถจับกับสารอัลลิซินได้มากขึ้น โดยอาจเนื่องมาจากค่า DD สูงกว่า แสดงถึงการมีหมู่อะมิโนที่สูงกว่า และเข้าถึงได้ง่ายกว่า เป็นผลให้มีความสามารถในการละลายที่ดี และมีหมู่ต่าง ๆ ในปริมาณที่มากกว่าในสายโมเลกุล อีกทั้งมีจำนวนประจุมากกว่า ทำให้สามารถมีความสามารถในการจับกับสารอัลลิซินได้มากกว่าและให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่านั่นเอง ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด จะพบได้ในตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.02×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 88% ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1:1 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองด้วยวิธี disk diffusion ที่สารประกอบตัวอย่างนี้ก็ให้ผลในการเกิด clear zone ที่กว้างที่สุดแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงที่สุด และให้ค่า MIC ที่ต่ำที่สุดด้วย เมื่อนำมาใช้ในตัวอย่างไส้กรอก จึงให้ผลในการยับยั้งเชื้อและยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีที่สุดนั่นเอง และผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จะพบว่ายับยั้งเชื้อยีสต์และรา ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียสอดคล้องกับงานวิจัยของ Giatrakou และคณะ (2010) ที่พบการยับยั้งของไคโตซานร่วมกับน้ำมันจากไทม์ (thyme) ที่ยับยั้งเชื้อยีสต์และราได้ดีกว่าแบคทีเรียเช่นกัน สำหรับผลงานวิจัยที่พบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Georgantelis และคณะ (2007b) ที่ทำการศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และอายุการเก็บรักษาของไส้กรอกหมู fresh sausage ผสมสารสกัดโรสแมรี่ ไคโตซานหรือ แอลฟา-โทโคฟีรอล ที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวก็พบว่า ไคโตซานสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาไส้กรอกได้ยาวนานกว่าตัวอย่างควบคุม แต่ผลที่ดีที่สุดจะพบเมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่ นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับ

งานวิจัยของนักวิจัยกลุ่มดังกล่าว ที่ทำการทดลองกับตัวอย่างไส้แฮมเบอร์เกอร์เนื้อวัว ซึ่งจะพบว่าการใช้โคโตซานร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่ จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษาได้นานที่สุดเช่นกัน (Georgantelis *et al.*, 2007a)

สำหรับการศึกษาผลของอัลลิซิน โคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ต่อลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ได้แก่ ความชื้น (Moisture content) โดยใช้วิธีมาตรฐานของ AOAC (1995) สีของตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994) เนื้อสัมผัส ด้วยเครื่อง texture analyzer (Barbut, 2006) และค่าความอุ้มน้ำ (water holding capacity, WHC) (Honikel and Hamm, 1994) พบว่า การเติมสารไม่ว่าจะเป็น อัลลิซิน โคโตซานหรือ สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานลงในไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ส่งผลให้สีของตัวอย่างไส้กรอกทั้งสีที่ผิวของไส้กรอกและสีด้านในเนื้อไส้กรอกมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ค่าความสว่าง (L^*) ค่าความเป็นสีแดง (a^*) และค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) ของทุกหน่วยทดลองที่ศึกษา มีความแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) การเติมสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินที่เพิ่มสูงขึ้น จะเป็นผลให้ค่าความสว่างเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าความเป็นสีแดงและค่าความเป็นสีเหลืองมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ซึ่งผลนี้เกิดเนื่องมาจากสีของสารอัลลิซิน โคโตซานหรือสารประกอบเชิงซ้อนที่เติมลงในไส้กรอก มีสีที่อ่อนกว่าเนื้อหมู เป็นผลให้สีของไส้กรอกที่ได้มีสีที่อ่อนลง

สำหรับค่าความสามารถในการอุ้มน้ำและความชื้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมสารอัลลิซิน หรือโคโตซาน หรือประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ($p \leq 0.05$) โดยค่าความสามารถในการอุ้มน้ำจะต่ำที่สุดในตัวอย่างที่เติมโคโตซาน ($p \leq 0.05$) อาจเนื่องมาจาก pH ของสารละลายโคโตซานก่อนทำแห้งที่ค่อนข้างต่ำ เป็นผลให้เมื่อทำแห้งแล้วเติมลงในตัวอย่างไส้กรอกจะได้ตัวอย่างที่มี pH ต่ำกว่าตัวอย่างอื่น จึงมีความสามารถในการจับกับน้ำต่ำที่สุดสำหรับตัวอย่างไส้กรอกผสมอัลลิซิน จะมีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$) และมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่นุ่มและกว่าตัวอย่างไส้กรอกอื่น ๆ ($p \leq 0.05$) ซึ่งเมื่อพิจารณาตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนพบว่า มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำลงจากตัวอย่างควบคุม ยกเว้นตัวอย่างที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินในปริมาณที่สูง สอดคล้องกับผลการทดลองของตัวอย่างที่ผสมอัลลิซินเพียงอย่างเดียว ซึ่งเมื่อยิ่งเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินต่อโคโตซานในการผลิตสารประกอบเชิงซ้อนจาก 1:1 เป็น 1:2 และ 1:3 ตามลำดับ จะพบว่าค่าความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) แสดงผลของการอุ้มน้ำที่เพิ่มขึ้นจากสารอัลลิซิน ซึ่งค่าที่ได้ก็สอดคล้องกับค่าความชื้นของตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาถึงความเชื่อมโยงกับการเสื่อมเสีย ก็พบว่า ตัวอย่างที่ยังมีปริมาณน้ำมาก ก็ยังมีอัตราการเสื่อมเสียที่เร็วขึ้น ดังนั้นตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เตรียมจากโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.02×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 88% ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1:1 ที่พบว่ามีอัตราการเสื่อมเสียที่ช้าที่สุดนั้น จึงเป็นตัวอย่างที่มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำและค่าความชื้นต่ำที่สุด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการยอมรับจากคะแนนความชอบของตัวอย่างจากการทดลองความชอบ 9 point hedonic scaling test ก็พบว่า

ตัวอย่างดังกล่าวได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบมากกว่า ตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองการตรวจวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกหมูไขมันต่ำด้วย texture profile analysis พบว่า การเติมอัลลิซิน หรือโคโตซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ไม่มีผลต่อค่า cohesiveness springiness และ adhesiveness ($p > 0.05$) แต่จะส่งผลต่อค่า hardness gumminess และ chewiness อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยตัวอย่างไส้กรอกหมูควบคุมจะมีเนื้อสัมผัสที่นุ่มที่สุด และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างที่มีการเติมสารอัลลิซิน ($p > 0.05$) ซึ่งเมื่อพิจารณาตัวอย่างทั้งหมด พบว่า ตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมโคโตซาน จะมีเนื้อสัมผัสที่แข็งกระด้างที่สุด ดังจะเห็นได้จากค่าความแข็ง (hardness) ที่สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ซึ่งตัวอย่างที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนจะมีค่าความแข็งต่ำลงมาตามลำดับ โดยตัวอย่างไส้กรอกหมูที่ผสมกับสารประกอบเชิงซ้อน ที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้เนื้อสัมผัสเปลี่ยนแปลงมากขึ้น ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบตัวอย่างทั้งหมดจะพบว่า ตัวอย่างไส้กรอกหมูผสมสารประกอบเชิงซ้อน ที่เตรียมจากโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.02×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 88% ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1:1 ให้ผลจากการทดสอบ texture profile analysis (hardness, cohesiveness, springiness, gumminess, chewiness and adhesiveness) ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$) ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ตัวอย่างดังกล่าวให้ผลที่ดีที่สุด ทั้งในด้านความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และผลที่มีต่อคุณลักษณะทางด้านกายภาพและเคมี โดยได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากที่สุดด้วย

สำหรับอายุการเก็บรักษาของตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำ เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสร่วมกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และราที่วิเคราะห์ได้ สามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำสามารถมีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่ได้ทำการบรรจุแบบสุญญากาศ ได้เป็นระยะเวลาประมาณ 15 วัน

สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองทั้งหมดด้านบนสามารถสรุปได้ว่า โคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเป็นสารช่วยจับสารสกัดต่าง ๆ ที่ไม่เสถียร เช่น สารอัลลิซินที่สกัดจากกระเทียมได้ ด้วยกระบวนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (polyelectrolyte complexation) ทั้งนี้สภาวะที่เหมาะสมของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนคือ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินต่อโคโตซานเท่ากับ 1:1 ซึ่งระยะเวลาในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยสมบูรณ์คือ 48 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส จากผลการทดสอบความไวในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด พบว่า ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.02×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 88% ที่อัตราส่วนโคโตซานต่ออัลลิซิน 1:1 ให้ผลดีที่สุด ทั้งในด้านความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และผลที่มีต่อ

ลักษณะทางด้านกายภาพและเคมีของไส้กรองหุ้มไขมันต่ำ สำหรับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่า ตัวอย่างไส้กรองหุ้มไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างดังกล่าว ได้รับการยอมรับมากที่สุด ดังนั้น ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากโคโคซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.02×10^6 Dalton และค่า DD อยู่ที่ 88% ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนัก 1:1 จึงเป็นตัวอย่างที่ดีที่สุด ที่พบในงานวิจัยนี้ และความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.5% โดยน้ำหนัก ไส้กรองหุ้มไขมันต่ำที่ผลิตได้มีอายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เท่ากับ 15 วัน โดยที่ไม่จำเป็นต้องบรรจุแบบสุญญากาศ

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

เนื้อสัตว์และการเสื่อมเสียด้วยเชื้อจุลินทรีย์

เนื้อสัตว์เป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่าย (perishable food) ชนิดหนึ่ง เนื่องจากเนื้อสัตว์มีความชื้นสูงถึงร้อยละ 50-75 มีค่า water activity (A_w) มากกว่า 0.99 มี pH 5.4-5.6 และมีธาตุอาหารพวกไนโตรเจน แร่ธาตุและวิตามินที่อุดมสมบูรณ์ อีกทั้งยังมีลักษณะทางกายภาพเหมาะสมคือลักษณะโดยทั่วไปของเนื้อ มีช่องว่างและโพรงอากาศมากมายที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถแทรกอยู่ได้ คุณลักษณะเหล่านี้เหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ และส่งผลให้เกิดการเสื่อมเสียอันเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยง่าย (Marshall and Bal'a, 2001) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงทำให้กระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจำเป็นต้องมีการควบคุมความสะอาดในทุกขั้นตอนตั้งแต่ วัตถุดิบ กระบวนการผลิตขั้นตอนต่าง ๆ การบรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ และการเก็บรักษาในระหว่างการวางจำหน่ายจนถึงมือผู้บริโภค ลักษณะของการเสื่อมเสียเนื่องมาจากจุลินทรีย์ เกิดได้หลายลักษณะขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ และสามารถแยกได้เป็นลักษณะต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ (Vernam and Sutherland, 1995)

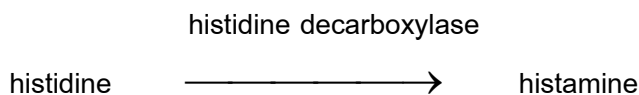
1. เกิดการเหม็นหืน (rancidity) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไขมันได้

(lipolytic bacteria) ได้แก่ "เอนไซม์ออกซิเดส" จะเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับกรดไขมันที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ "เอนไซม์ไลเปส" จะไฮโดรลิซิส (hydrolysis) โมเลกุลของไขมัน เป็นต้น ทำให้เกิดเป็นสารประกอบต่าง ๆ ได้แก่ กรดไขมันอิสระ กลีเซอรอล อัลดีไฮด์ คีโตน แอลกอฮอล์ เปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ ทำให้อาหารมีกลิ่นรสผิดปกติไป แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไขมันได้ ได้แก่ *Pseudomonas spp.*, *Achromobacter spp.*

โดยทั่วไปจุลินทรีย์เป็นสาเหตุใหญ่ประการหนึ่งที่ทำให้เกิดการเหม็นหืน แต่ไม่ค่อยสำคัญมากในเนื้อ เพราะสารประกอบต่าง ๆ ที่ได้จากการย่อยสลายของไขมัน จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะสารพวกเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ที่เกิดขึ้นระหว่างการออกซิเดชันของกรดไขมัน จะเป็นพิษอย่างยิ่งต่อจุลินทรีย์ และนอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเมดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักอีกด้วย และพบว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียสามารถย่อยโปรตีนได้ดีกว่า ดังนั้นกลิ่นและรสต่าง ๆ ที่เกิดจากการย่อยโปรตีนหรือกลิ่นเหม็นเน่า จึงบดบังกลิ่นและรสที่เกิดจากการกระบวนการเติมออกซิเจนหรือกลิ่นเหม็นหืนจนหมด แต่ถ้าเป็นเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ซึ่งไม่เหมาะกับการย่อยโปรตีน กลิ่นและรสที่เกิดจากการเติมออกซิเจนจะเด่นชัดขึ้น

2. เกิดการเหม็นเน่า (putrefaction) เกิดจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ (proteolytic bacteria) เช่น *Proteus sp.*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas sp.* จะไปย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนหรือสายเปปไทด์หรือกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็น

องค์ประกอบสำคัญในเนื้อสัตว์ ทำให้เกิดเป็นสารที่ระเหยได้ ได้แก่ พวกไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide) เมอร์แคปแทน (mercaptans) อินโดล (indoles) แอมโมเนีย (ammonia) เอมีน (amines) และอื่น ๆ เกิดเป็นกลิ่นเหม็นเน่าขึ้นมา เช่น การเกิด bone-taint หรือ bone-souring ซึ่งมักเกิดกับบริเวณใกล้ ๆ กระดูก ซึ่งได้รับความเย็นไม่เพียงพอ



3. การเกิดก๊าซและรสเปรี้ยว (gassing and souring) เกิดจากแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการอา-

(anaerobic bacteria) เช่น พวก lactic acid bacteria ชนิดต่าง ๆ, *Streptococcus faecium*, *Streptococcus faecalis*, *Microbacterium thermosphactum* ไปย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ เช่น แป้ง น้ำตาล ทำให้เกิดสารประกอบพวกกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น กรดอะซิติก ทำให้เนื้อมีค่า pH ลดลง และเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับแอลกอฮอล์ขึ้นมาในเวลาเดียวกัน มักพบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกขนาดใหญ่ หรือในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุแบบสุญญากาศ เช่น พบในแฮมและเบคอนที่นำมาหั่นบาง ๆ บรรจุพลาสติกแบบสุญญากาศ

4. การเกิดเมือกที่ผิวหน้า (slime surface) เมือกเป็นสารพวก polysaccharides ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมาและสะสมอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเราสามารถมองเห็นโคโลนีของจุลินทรีย์ด้วยตาเปล่าได้ ก็จะมองเห็นเป็นเมือกเกิดขึ้น อาจมีสีขาวหรือสีเหลืองเกิดขึ้นบนผิวหน้าของชิ้นเนื้อ และมีกลิ่นเหม็น มักเกิดภายใต้สภาวะมีอากาศ มักเกิดจากแบคทีเรียพวก *Pseudomonas sp.*, *Achromobacter sp.* ในเนื้อสัตว์ที่แขวนไว้ในห้องเย็นที่มีความชื้นสูง แต่ถ้ามีความชื้นต่ำในห้องเย็นจะพบพวก micrococcus เช่น *Microbacterium thermosphactum* หรือ *Streptococcus sp.* หรือยีสต์ปะปน เช่น ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกสุกพวกแฟรงค์เฟิร์ตเตอร์และโปโลญา

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่บรรจุแบบสุญญากาศมักไม่ค่อยพบการเน่าเสียในลักษณะนี้ เพราะการปนเปื้อนของ anaerobic bacteria ในธรรมชาติมีน้อยกว่าพวก aerobic bacteria และพวก aerobic bacteria โดยปรกติจะผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียเหล่านี้จะมีผลยับยั้งการเจริญของพวก anaerobic bacteria ด้วย แต่ถ้าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาสภาพสุญญากาศ มีการปนเปื้อนจาก anaerobic bacteria ขึ้น และเก็บรักษาไว้ในชั่วระยะเวลาหนึ่ง ก็อาจเกิดการเน่าเสียที่สังเกตได้ เป็นเมือกสีขาวคล้ายน้ำมัน (whitish liquid) ในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุธรรมดา เมือกของแบคทีเรียจะปรากฏเห็นเป็นรูปลูกบิดเล็ก ๆ ละเอียดย่น ๆ จะเป็นยางเหนียว และมีกลิ่นเหม็น (off odor) บางครั้งมองเห็นคล้ายยีสต์

5. การเกิดสีต่าง ๆ บนผิวหน้า (discoloration) ของชิ้นเนื้อ เกิดเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่เจริญเติบโตแล้วสร้างเม็ดสีขึ้นมา ทำให้มองเห็นเป็นจุดสีต่าง ๆ เช่น จุดสีแดงจาก

Serratia marcescens จุดสีฟ้าจาก *Pseudomonas synchyanea* จุดสีน้ำเงินแกมเขียวหรือดำแกมน้ำตาลจาก *Chromobacterium lividum* เป็นต้น

6. การเปลี่ยนแปลงสีของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก จุลินทรีย์ตัวที่มีบทบาทสำคัญคือ *Lactobacillus viridescens* หรืออาจเป็นพวก *Leuconostoc* sp. ที่ปนเปื้อนเข้ามาในส่วนผสมของเนื้อในขณะเตรียมการ ในการอบและการรมควันผลิตภัณฑ์ให้ความร้อนไม่เพียงพอต่อการทำลายแบคทีเรียที่ปนเปื้อนได้หมด แบคทีเรียที่เหลือรอดอยู่จะเจริญเติบโตและสามารถสร้างสารพวกเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารออกซิไดซ์อย่างแรง สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลเฟอร์สในโครงสร้างวงแหวนพอร์ฟินของเม็ดสีไมโอโกลบิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของไนโตรโซฮีโมโครม ไปเป็น *cholemyoglobin* ซึ่งอยู่ในรูปของ *verdoheme* ทำให้เกิดเป็นสีเขียว (*greening*) ขึ้นในไส้กรอก ลักษณะการเกิดสีเขียวส่วนใหญ่มี 3 ลักษณะคือ

6.1 การเกิดสีเขียวบริเวณแกน (*core greening*) การเกิดจุดสีเขียวเล็ก ๆ ขึ้นที่กึ่งกลางของชิ้นไส้กรอกและจะขยายวงกว้างจากจุดนี้ไปรอบ ๆ มักพบในไส้กรอกขนาดใหญ่ เช่น โบโลญา ที่ถูกตัดและผิวหน้าถูกปล่อยทิ้งไว้สัมผัสกับอากาศ

6.2 การเกิดสีเขียวบริเวณผิวหน้า (*surface greening*) พบมาก คือการเกิดเป็นสีเขียวเทา ๆ ที่ผิวหน้าไส้กรอก มักเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการเกิดเมือก สาเหตุเพราะสภาวะลักษณะในการผลิตไม่ดี เกิดการปนเปื้อนที่ผิวหน้าหลังจากการทำให้สุก โดยเฉพาะในช่วงของการลอกไส้และการบรรจุ หรือเกิดการปนเปื้อนของผลิตภัณฑ์หลังการผลิตเสร็จใหม่ ๆ กับการปนเปื้อนข้าม (*cross contamination*)

6.3 การเกิดวงแหวนสีเขียว (*green ring*) คือ การเกิดวงแหวนสีเขียวขึ้นภายในไส้กรอกที่ช่วงความลึก 2-3 มิลลิเมตร จากผิวหน้าของไส้กรอก ปกติแล้วไม่ค่อยพบ สาเหตุที่ทำให้เกิดยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่ามักเกิดกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้วัตถุดิบ ซึ่งมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์มาก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายในระหว่างการอบและรมควัน แต่สิ่งที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ยังคงอยู่ ได้แก่ เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้น และสามารถออกซิไดซ์เม็ดสีได้ จะเกิดมีปฏิกิริยาต่อไปได้ ประกอบกับสภาพต่าง ๆ เหมาะสม ทำให้ *hemochrome* เปลี่ยนแปลงไปเป็น *verdoheme* ทำให้เกิดเป็นวงแหวนสีเขียวขึ้น โดยปกติการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นภายใน 1-2 วัน หลังจากทำไส้กรอกเสร็จ ซึ่งไม่สามารถสังเกตเห็นได้ จนกระทั่งทำการผ่าหรือตัดออกดูภายใน นอกจากนี้ยังอาจเกิดการซีดจางของสี (*color degradation*) ได้ เนื่องจากการเก็บที่อุณหภูมิสูงและการที่สภาวะลักษณะในการผลิตไม่ดี ทำให้มีแบคทีเรียเริ่มต้นสูงและเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงแบคทีเรียก็ยิ่งเจริญเติบโตได้ดี และผลิตสารประกอบที่สามารถทำลายเม็ดสีได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus viridescens*, *Leuconostoc* spp. เป็นต้น

7. การเกิดเชื้อราที่ผิวหน้า โดยทั่วไปเป็นเชื้อราพวก *Cladosporium* ทำให้เกิดจุดสีดำ *Thamnidium*, *Muco* , หรือ *Rhizopus* ทำให้เกิด " whisker " ที่ผิวหน้าของเนื้อวั *Penicillium* ทำให้เกิด *green patch* และ *Sporotrichum* ทำให้เกิดจุดสีขาว มักพบในเนื้อที่ตัดแบ่งครึ่งหรือแบ่งสี่ที่เก็บรักษาในห้องเย็น ที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียส เพื่อการบ่มเนื้อให้นุ่ม

(aging) วัตถุประสงค์ของการบ่มเนื้อเพื่อให้เนื้อมีความนุ่มตามต้องการและมีการผลิตกลิ่นรสเฉพาะขึ้นเรียกว่า “aged flavor” ซึ่งยังไม่มีมีการสำรวจหรือตรวจหาจุลินทรีย์พวกนี้ในเนื้อว่าทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น หรือมีกลิ่นของเนื้อเพิ่มมากขึ้นอย่างไร แต่การขึ้นราในเนื้อเป็นผลให้ต้องตัดแต่งเนื้อทิ้งไป เมื่อนำไปทำผลิตภัณฑ์อื่นต่อไป

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เน่าเสีย

ผลิตภัณฑ์	จุลินทรีย์	ชนิดของการเน่าเสีย
เนื้อสด	<i>Pseudomonas</i>	มีเมือกเปลี่ยนเป็นสีเขียว มีรังควันที่เรืองแสง
	<i>Achromobacter</i>	มีจุดสีขาว หรือจุดสี ซึ่งเป็นโคโลนีของแบคทีเรีย
	<i>Flavobacterium</i>	
		
เนื้อที่ผ่านการแปรรูป แฮมที่ผ่านการหมัก เกลือ	<i>Lactobacillus</i>	เกิดเมือกหรือลักษณะเหนียว รสเปรี้ยว หรือเน่าเสีย
	<i>Microbacterium</i>	
	<i>Micrococcus</i>	
		
เนื้อที่ผ่านการแปรรูป แฮมที่ผ่านการหมัก เกลือ	<i>Achromobacter</i>	
	<i>Pseudomonas</i>	รสเปรี้ยว
	<i>Bacillus</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	
เนื้อที่ผ่านการแปรรูป แฮมที่ผ่านการหมัก เกลือ		
	<i>Streptococcus</i>	เกิดก๊าซ ขึ้นเนื้อมีอาการบวม เปลี่ยนเป็นสีเขียว
	<i>Clostridium</i>	
		
เนื้อที่ผ่านการแปรรูป แฮมที่ผ่านการหมัก เกลือ	<i>Micrococcus</i>	มีเมือกตรงผิวหน้า
	<i>Microbacterium</i>	
	<i>Yeasts</i>	
		
เบคอน	<i>Streptococcus</i>	เกิดเมือก มีจุดสีขาวหรือจุดสี
	<i>Molds</i>	
		
	<i>Lactobacillus</i>	มีรสเปรี้ยวเล็กน้อยในเบคอนที่บรรจุโดยระบบ
เบคอน	<i>Micrococcus</i>	สุญญากาศ
	<i>Streptococcus</i>	

ไส้กรอกที่ผ่านการหมักเกลือ	<i>Micrococcus</i> <i>Yeasts</i>	มีเมือกตรงผิวหน้า
	<i>Lactobacillus</i>	ผลิตก๊าซในไส้กรอกแฟรงค์เฟิร์ตเตอร์ที่บรรจุโดยระบบสุญญากาศ
	<i>Leuconostoc</i>	สีซีดบริเวณผิว
	<i>Micrococcus</i>	
	<i>Lactobacillus</i>	สีเปลี่ยนเป็นสีเขียว
ไส้กรอกเปรี้ยว	ราและยีสต์	มีเมือกและเปลี่ยนสี
	<i>Lactobacillus</i>	น้ำหมักมีลักษณะขุ่น
		
ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการหมักโดยเติมน้ำส้มสายชู	สปอร์ของ <i>Bacillus</i> สปอร์ของ <i>Clostridium</i>	จุลินทรีย์พวก thermophillic เจริญเติบโตเนื่องมาจากการทำให้เย็นไม่เพียงพอ และจำนวนจุลินทรีย์ที่เริ่มต้นมีมากเกินไป
ผลิตภัณฑ์เนื้อกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อชนิด commercially sterilization	 <i>Streptococcus</i>	มีรสเปรี้ยวและเปลี่ยนสี
ผลิตภัณฑ์เนื้อกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อชนิด semi-preserved หรือ pasteurization	<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>	ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 10°C จะผลิตก๊าซ มีเจลาคินเี่ยมออกมา และมีการเน่าจากการสลายตัวของโปรตีน

สำหรับการเกิดโรคในจากอาหารเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ มักเกิดมาจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคพวกนี้ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อทั้งก่อนและระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งอาจปนเปื้อนมาจากฝุ่นดินและผู้ปรุงประกอบอาหาร ซึ่งบางชนิดสามารถทนความร้อนสูงและเจริญเติบโตเพิ่ม

จำนวนเซลล์มากขึ้น พร้อมกับผลิตสารพิษ (Kotula, Berry and Emswiler-Rose, 1987; Vernam and Sutherland, 1995) ซึ่งได้แก่

1. *Clostridium botulinum* เกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเป็นพิษชนิดอื่น ๆ พบประมาณ 10-30 ราย/ปี แต่ก็ถือว่ามีความสำคัญเพราะเป็นชนิดของอาหารเป็นพิษที่รุนแรงที่สุด เพราะสารพิษอาจทำให้ตายได้แม้จะได้รับในปริมาณเล็กน้อย สารพิษถูกสร้างขึ้นและขับออกจากเซลล์มาอยู่ในอาหารเป็นพวก exotoxin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10,000 ถึง 900,000 ดาลตัน ถูกทำลายได้ง่าย โดยการนำไปต้มในน้ำเดือด (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) นาน 15-20 นาที

มักเกิดจากการบริโภคอาหารกระป๋องที่ผลิตในครัวเรือน(home-canned food) ที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอที่จะทำลายสปอร์ของเชื้อนี้ และไม่ได้ผ่านการให้ความร้อนอีกครั้งก่อนรับประทาน เพื่อทำลายสารพิษในไส้กรอก ผลิตภัณฑ์เนื้ออื่นๆ ได้แก่ ลันเชียนมีท แฮม แต่ไม่พบบ่อยนักในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีการเติมในเตาเพราะสารนี้จะยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อนี้ได้ ความเป็นพิษของ botulism พบว่าเกิดภายหลังการบริโภคสารนี้เพียงเล็กน้อย ไม่กี่นาโนกรัม ก็ทำให้เกิดอาการเป็นพิษได้ภายใน 18-48 ชั่วโมง อาการจะเป็นดังนี้คือ กล้ามเนื้ออ่อนเพลีย ไม่มีแรง สูญเสียความสามารถในการสั่งงานของสมองส่วนกลาง ตาพร่า กลืนน้ำลายลำบาก อาเจียน ท้องเดิน และตามด้วยท้องผูก ถ้าบริโภคมากอาจตายได้ ชนิดของ botulism มี 7 ชนิดคือ A,B,C,D,E,F และ G แต่ที่สำคัญคือชนิด E เซลล์ของ *Cl. botulinum* มีลักษณะเป็นแท่ง กรั่มบวก (gram-positive) สามารถสร้างสปอร์ได้ สปอร์ทนความร้อนได้ดี เจริญเติบโตได้ดีในที่ที่ไม่มีอากาศ พบอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นในดิน น้ำและอาหารชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอาหารประเภทโปรตีน

2. *Staphylococcus aureus* (Staphyloenterotoxigenesis หรือ Staphyloenterotoxemia) เซลล์มีลักษณะกลม อาจอยู่ในลักษณะเป็น pairs, short chains หรือ bunched, grape-like clusters ก็ได้ gram-positive ไม่สร้างสปอร์ สามารถสร้างสารพิษที่ทนความร้อนเป็น enterotoxin ซึ่งสร้างภายในเซลล์ และเมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีเซลล์ของแบคทีเรียชนิดนี้ในจำนวนมากพอ ก็จะเกิดอาการอาหารเป็นพิษขึ้นมาได้ สารพิษเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000 ดาลตัน ทนความร้อนที่น้ำเดือดได้นานถึง 60 นาที ต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จึงทำลายสารพิษนี้ได้

อาการเป็นพิษจะเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน พบว่าภายใน 2-6 ชั่วโมง ภายหลังการได้รับสารพิษ ผู้ป่วยจะเกิดการบวมพองของผนังลำไส้และกระเพาะ (gastroenteritis หรือ gastrointestinal upset) ขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ปริมาณของเชื้อที่ร่างกายได้รับ โดยทั่วไปต้องมากกว่า 100,000 โคโลนีต่อกรัม และปริมาณสารพิษ ซึ่งโดยทั่วไปเพียง 1.0 ไมโครกรัม ก็จะทำให้เกิดอาการได้ นอกจากนี้เชือนี้ยังสามารถเป็นผลร้ายต่อระบบประสาทได้ เช่นเดียวกับกรณีของ botulism ด้วย มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลีย ถ้าเป็นมากก็จะปวดศีรษะ ปวดตามกล้ามเนื้อ และเกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตและอัตราการเต้นของชีพจรชั่วคราว ส่วนการตายอันเนื่องมาจากอาหารเป็นพิษแบบนี้มีเป็นจำนวนน้อย

มักจะหายได้ภายใน 2-3 วัน แต่ถ้าเป็นมากก็จะใช้เวลานานกว่านี้ และที่ตายไปนั้นส่วนใหญ่จะมีผลมาจากมีอาการหรือโรคอื่นแทรกอยู่แล้วมากกว่า มักเป็นกับเด็กเล็กหรือผู้สูงอายุ ซึ่งมีความต้านทานต่ำและสุขภาพอ่อนแออยู่ก่อนแล้ว

มักพบในผลิตภัณฑ์นม ไก่และแฮม รวมทั้งอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่ปิ้งย่าง ร้อนวัน และเนื้อสด ซึ่งผ่านการให้ความร้อนในช่วงแรกไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ของเชื้อชนิดนี้ได้ ควรให้ความร้อนสูงถึง 60 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า ไม่เช่นนั้นความร้อนที่จะใช้เป็นตัวกระตุ้นให้แบคทีเรียที่มีอยู่เจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ในช่วงที่ทำให้เย็นลงอย่างช้า ๆ และตั้งรอเวลาไว้ 8-12 ชั่วโมง ก่อนนำมารับประทาน โดยไม่ได้เก็บในที่เย็นพอ (7.2 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่า)

เกิดจากโรงงานมีการสุขาภิบาลที่ไม่ดีพอ โดยเฉพาะมีสุขวิทยาส่วนบุคคลของคณงานไม่ดี มักพบเชื้อนี้เป็นเอนมาจากคณงานที่มีโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ หรือมีบาดแผล ฝี หนองต่าง ๆ

3. *Clostridium perfringens* พบในเนื้อสัตว์หลายชนิด ได้แก่ เนื้อโค สุนัข แกะและไก่ ทั้งในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์ เช่น roast beef, luncheon meat, แฮม, corned beef ส่วนใหญ่จะพบในเนื้อที่ผ่านการทำให้สุก และทิ้งไว้ให้เย็นอย่างช้า ๆ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องและไม่ได้อุ่นซ้ำอีกครั้งก่อนรับประทาน ผู้บริโภคจะมีอาการปวดท้องและท้องเสีย ภายหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้เป็นเอนอยู่ในปริมาณมากกว่า 10⁸ โคโลนีของเซลล์ปกติต่อกรัมเป็นเวลา 8-22 ชั่วโมง หรืออาจจะเกิดเนื่องจากรับประทานอาหารที่มีสปอร์ของเชื้อนี้อยู่ แล้วเกิดการงอกของสปอร์ในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร (digestive tract) และสร้างสารพิษขึ้นมา ดังนั้น *Cl. perfringens* จึงอาจจัดเป็น foodborne infection ได้ด้วย การหุงต้มโดยปกติจะสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียพวกนี้ได้ และถ้าต้องการทำลายสปอร์ต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้น *Cl. perfringens* จัดเป็นแบคทีเรียประเภทไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เป็นพวก gram-positive ลักษณะเป็นแท่งและผลิตสารพิษได้หลายชนิดด้วยกัน ตั้งแต่ type A ถึง F สารพิษเป็นพวก enterotoxin นอกจากนั้นแบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถผลิตก๊าซออกมาได้ด้วย

การป้องกันอาหารเป็นพิษแบบนี้สามารถทำได้โดยการ ทำให้เนื้อที่ผ่านการทำให้สุก แล้วนั้นเย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส อย่างมิดชิด หรือถ้าเป็นอาหารที่เหลือก็ควรนำมาอุ่นใหม่ให้ความร้อนจนเดือดหรือร้อนจัด เพื่อสามารถทำลายสารพิษที่อาจจะมียูอยู่ได้

4. *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อหรืออาหารเป็นพิษ (foodborne infection)

แบคทีเรียนี้สามารถเจริญได้ในร่างกายของผู้บริโภคแล้วผลิตสารพิษ endotoxin ขึ้นภายในเซลล์ ทำให้ผู้ติดเชื้อมีอาการเวียนศีรษะ อาเจียนและท้องเดิน ระยะเวลาของการพักตัวหรือช่วงเวลาหลังรับเชื้อเข้าไป ถึงปรากฏอาการออกมาจะกินเวลานานกว่า 6 ชั่วโมง มีรายงานว่าอาการที่จะปรากฏอาการออกมาได้นั้น ผู้ป่วยต้องได้รับเชื้อในปริมาณมากถึงประมาณ 1 ล้านตัว และอาจ

ทำให้ถึงตายได้ถ้าผู้ป่วยเป็นเด็กหรือผู้สูงอายุที่มีสุขภาพอ่อนแอมาก่อนแล้วหรือเป็นโรคอย่างอื่นมาก่อนแล้ว

แบคทีเรียเหล่านี้มักจะพบในเนื้อเยื่อและลำไส้ของสัตว์โดยทั่ว ๆ ไปอยู่แล้ว โดยที่ไม่เป็นอันตรายแต่อย่างใดต่อสัตว์เหล่านั้นเลย การปนเปื้อนมักเกิดกับซากที่ทำการฆ่าแบบสกปรก โดยเฉพาะแบบที่ปฏิบัติกันอยู่โดยทั่วไปในโรงฆ่าสัตว์ประเทศไทยในปัจจุบัน

5. *Yersinia* ที่สำคัญได้แก่ *Y. enterocolitica* และ *Y. pseudotuberculosis* ซึ่งทำให้เกิดโรค Yersiniosis มีอาการบวมพองของผนังลำไส้และกระเพาะ ท้องร่วง และ/หรือ อาเจียน และมีอาการที่เด่นชัดกว่าโรคอาหารเป็นพิษชนิดอื่นคือ จะมีอาการเป็นไข้และปวดท้อง ระยะเวลาแสดงอาการคือ 24-48 ชั่วโมง ลักษณะทั่วไปของเชื้อนี้คือ เป็นรูปแท่ง gram-negative มักพบในอาหารพวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ได้แก่ เนื้อหมู เนื้อวัว และเนื้อแกะ เป็นต้น ที่สุขาภิบาลไม่ดี และผ่านการฆ่าเชื้อไม่เพียงพอ รวมทั้งมีการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม

6. *Listeria monocytogenes* เป็นแบคทีเรียชนิด gram-positive มีแฟลกเจลลา (flagella) ช่วยให้สามารถเคลื่อนที่ได้ ทำให้เกิดโรค Listeriosis อาจทำให้สตรีมีครรภ์แท้งได้ และอาจมีผลต่อระบบทางเดินอาหารทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียนและท้องเดิน เนื่องจากเชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 3 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงมักจะก่อให้เกิดปัญหาในอาหารแช่เย็น มักพบในอาหารพวก raw milk, cheese, ไอศกรีม, ผักสด, fermented raw-meat sausage, raw and cooked poultry, เนื้อสัตว์ทุกชนิด, raw hot dog, raw and smoked fish

7. *Escherichia coli* ที่สำคัญได้แก่ *E. Coli* 0157:H7 สามารถสร้างสารพิษได้ สารพิษมีชื่อว่า verotoxin อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกลุ่ม Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) จะไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียส ไม่ทนความร้อน ทำให้เกิดอาการดังนี้ ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย อาจอาเจียนด้วย ตัวไม่ร้อน มักพบในอาหารพวก undercooked/raw hamburger (ground beef) dry-cured salami และ home cooked hamburger

จากการเสื่อมเสียได้ง่ายของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อย่างที่ได้กล่าวไปข้างต้น ทำให้ผู้ผลิตมีความจำเป็นในการใช้เทคนิควิธีต่าง ๆ เพื่อช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ให้ได้มากที่สุด วิธีหนึ่งที่ผู้ผลิตมักเลือกใช้คือ การเติมวัตถุกันเสียหรือสารกันบูดลงในผลิตภัณฑ์เพื่อให้ยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานขึ้น สำหรับชนิดวัตถุกันเสียที่สำคัญที่มีการใช้กันหมายรวมถึง ซอร์เบต เบนโซเอต ไนเตรตและไนไตรต์ โดยวัตถุกันเสียชนิดที่มีการใช้กันมากที่สุดและองค์การอาหารและยารับรองให้ใช้ คือสารประกอบไนเตรตและไนไตรท์ (คิวพร, 2535) สารนี้มักเติมลงในอาหารเนื้อสัตว์เพื่อให้เนื้อสัตว์มีสีชมพู/แดงที่คงที่ และเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium botulinum* ซึ่งสามารถผลิตสารพิษ botulinum toxin ที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต อาหารที่มักพบว่าใส่สารประกอบเหล่านี้ ได้แก่ เนื้อเค็ม เนื้อแดดเดียว ปลาแดดเดียว ไส้กรอก หมูแฮม เบคอน ซึ่งวัตถุกันเสียเหล่านี้ ได้มีงานวิจัยยืนยันว่า หากรับประทานไปเป็นระยะเวลานาน อาจทำ

ให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพหรือทำให้เกิดโรคในระยะยาวได้ นอกจากนี้ผู้ผลิตบางรายยังมีการใช้วัตถุกันเสียแบบจงใจใช้ผิดประเภท โดยเติมวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหารลงในผลิตภัณฑ์ เช่น ใช้กรดซาลิไซลิกซึ่งห้ามใช้ในอาหารมาใช้เป็นสารกันบูดเพราะกรดซาลิไซลิกทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ หรือการใช้บอแรกซ์ซึ่งเป็นวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหารเช่นกัน บอแรกซ์หรือโซเดียมบอเรต หรือผงกรอบ น้ำประสานทอง หรือเฟ่งแซ เป็นสารเคมีที่ไม่มีกลิ่น ผลึกละเอียด สีขาว ละลายน้ำได้ดี ใช้ในอุตสาหกรรมทำแก้วและเป็นสารประสานทองแต่ผู้ผลิตบางรายนำมาใช้เติมในอาหารพวกลูกชิ้น หมูยอ ทอดมัน ไส้กรอก เนื้อบดปรุงรสต่าง ๆ ไก่บด เนื้อปลาซด ทำให้อาหารเหล่านี้มีความหยุ่น เหนียว กรอบ แต่สารนี้มีอันตรายทำให้กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับอักเสบ การทำงานของไตล้มเหลว อาจมีปัสสาวะออกน้อยหรือไม่ออก ปริมาณที่เป็นพิษในผู้ใหญ่ 5 - 10 กรัม ถ้าได้รับ 15 - 30 กรัมอาจตายได้ ภายใน 2-3 วัน ส่วนในเด็กนั้น ถ้าได้รับ 4.5-14 กรัม ทำให้เกิดอาการพิษและตายได้ หรือในผู้ผลิตบางรายอาจมีการใช้วัตถุกันเสียในปริมาณมากกว่าที่กฎหมายอนุญาต เช่น สารประกอบไนเตรต ไนไตรท์ ซึ่งกฎหมายอนุญาตให้ใช้ได้ ในรูปไนไตรท์ไม่เกิน 200 ส่วนในล้านส่วน (125 มก./กก.) และไนเตรต 500 ส่วนในล้านส่วน (500 มก./กก.) ถ้าใช้สองชนิดรวมกันให้ใช้ได้ไม่เกิน 125 มก./กก. เป็นต้น ซึ่งการใช้ในปริมาณมากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้โดยที่ผู้บริโภคไม่รู้เท่ากันไม่การณ เพราะสารประกอบไนไตรต์และไนเตรตจะรวมตัวกับสารประกอบเอมีน (amine) ในอาหารและเกิดเป็นสารประกอบไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ทำให้เกิดเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (ศิวาพร, 2546) นอกจากนี้ยังพบการใช้วัตถุเจือปนอาหารที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน เพราะมีราคาถูกกว่าอีกด้วย

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เครื่องเทศ หรือสมุนไพรในอาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

การใช้เครื่องเทศ สมุนไพร หรือสารสกัดจากเครื่องเทศหรือสมุนไพรในอาหารนั้น มีมาตั้งแต่ในอดีต เพราะนอกจากจะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีกลิ่นรสดีขึ้นแล้ว ยังมีผลช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วย ส่วนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดของเครื่องเทศและสมุนไพรในการยับยั้งจุลินทรีย์ คือ ส่วนของน้ำมันหอมระเหย น้ำมันหอมระเหยนั้นนอกจากจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิด (อาทิเช่น *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* และ *Clostridium botulinum*) ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ของเชื้อราบางชนิด (อาทิเช่น *Penicillium* และ *Aspergillus*) ได้อีกด้วย (ศิวาพร, 2546)

สำหรับการใช้เครื่องเทศ สมุนไพร หรือสารสกัดจากเครื่องเทศหรือสมุนไพรในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปนั้นมีการใช้กันมาตั้งแต่ในอดีต แต่มักใช้เพื่อเหตุผลในการสร้างหรือเพิ่มกลิ่นรสเฉพาะตัวให้กับผลิตภัณฑ์ มิได้ใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันมีงานวิจัยหลายงาน ที่ได้ให้ความสนใจและศึกษาผลของสารสกัดจากธรรมชาติดังกล่าวในผลิตภัณฑ์

อาหารประเภทต่าง ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้ผลิตและผู้บริโภคที่สนใจอาหารเพื่อสุขภาพที่จะหลีกเลี่ยงการเติมวัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมี จากบทความของ Devlieghere, Vermeiren และ Debevere (2004) ก็ได้กล่าวเช่นกันว่า การใช้วัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมีจะเปลี่ยนเป็นการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ เช่น น้ำมันหอมระเหย (essential oil) ไคโตซาน (chitosan) ไนซิน (Nisin) และไลโซไซม์ (Lysozyme) เป็นต้น นอกจากนี้ สารสกัดจำพวกแบคทีริโอซิน (bacteriocin) ที่สกัดหรือได้มาจากกระบวนการต่าง ๆ ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น Lactic acid bacteria เป็นต้น ก็ได้รับความสนใจจากงานวิจัยหลายงานด้วยกัน เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Hugas, Garroga and Aymerich, 2003) สำหรับสารจำพวกนี้ที่ได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน ตัวอย่างเช่น ไนซิน ไลโซไซม์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide) ซาคาซิน (Sakacin P หรือ K) เคอร์วาซิน (Curvacin A) คาร์โนแบคทีริโอซิน (Carnobacteriocin A) เพดิโอซิน (Pediocin) ลิวโคซิน (Leucosin) มีเซนเทอริซิน (Mesentericin) เอนเทอโรโรซิน (Enterocin A หรือ B หรือ P) เป็นต้น (Työppönen, Petäjä and Mattila-Sandholm, 2003)

จากรายงานของ Shibasaki (1982) ได้เสนอว่า สารเจือปนในอาหารเพื่อดำเนินงานเชื้อจุลินทรีย์มีได้ทั้งสารที่เป็นสารเคมีและสารที่มาจากธรรมชาติ โดยสารที่ได้รับการยอมรับในญี่ปุ่นได้แก่ กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ไกลซีน (glycine) และ โมโนไกลซีน (monoglycine) กรดไขมันบางชนิด เช่น formic acid, acetic acid, diacetic acid, propionic acid, sorbic acid และ caprylic acid เป็นต้น สารฟีนอลิกต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) เช่น catechol, 3-methylcatechol, 4-methylcatechol และ methylhydroquinone เป็นต้น นอกจากนี้ในรายงานยังกล่าวอีกว่า สารสกัดจากโกโก้เข้มข้น 5% มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Salmonella typhimurium* และสารคาเฟอีน (caffeine) หรือ สาร theophylline มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus parasitiosus* ได้อีกด้วย

Shelef (1983) ได้นำเสนอบทความที่กล่าวถึงผลในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของเครื่องเทศต่าง ๆ ทั้งในรูปผงแห้ง สารสกัดด้วยน้ำ สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์ และน้ำมันหอมระเหย ในบทความได้กล่าวว่า เครื่องเทศหลายชนิด เช่น กระเทียม หอมหัวใหญ่ อบเชย ใบโคลฟ (clove) ไทม์ (thyme) ออริกาโน (oregano) และเซจ (sage) เป็นต้น ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราและยีสต์ได้อีกด้วย โดยเชื้อราจะมีความไวต่อสารยับยั้งเชื้อจากเครื่องเทศมากที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรีย แต่เครื่องเทศมีผลน้อยมากต่อสปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ และผลในการยับยั้งจะได้ ก็ต่อเมื่อใช้เครื่องเทศดังกล่าวในปริมาณที่สูง สารออกฤทธิ์ในเครื่องเทศทุกชนิดจะเป็นสารจำพวกฟีนอล (phenol compounds) ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 150-160 เช่น สาร eugenol, carvanol และ thymol ในใบโคลฟ อบเชย เซจ และออริกาโน ในบทความยังได้เสนออีกว่า เครื่องเทศจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในทุก ๆ สภาวะ ทำให้ lag phase ยาวนานขึ้น ทำให้อัตราการเติบโตและแบ่งตัวในช่วง log phase ต่ำลง และทำให้จำนวนเซลล์โดยรวมลดลงได้

การศึกษาของ Grohs และ Kunz (2000) ถึงผลของการใช้สมุนไพรหลายชนิดผสมกันเพื่อช่วยในการเก็บรักษาและเพิ่มความคงตัวของเนื้อหมูสด ได้พบว่าเครื่องเทศชนิดต่าง ๆ ให้ผลในการลดการเสื่อมเสียทางด้านสีและกลิ่นได้ดี และยังช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และยับยั้งไม่ให้มีการเจริญเพิ่มขึ้นได้อีกด้วย

Nattress, Yost และ Baker (2001) ได้ทำการศึกษาความสามารถของไนซินและไลโซไซม์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเนื้อสัตว์ 2 ชนิด ได้แก่ *Brochothrix thermosphacta* B2 และ *Carnobacterium* sp. 845 และพบว่าการใช้ไนซินหรือ ไลโซไซม์ หรือใช้ทั้งสองชนิดร่วมกัน ในปริมาณ 250 µg/ml of APT broth จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *Brochothrix thermosphacta* B2 ได้เป็นเวลา 10 วัน ที่ 2 องศาเซลเซียส แต่สำหรับการยับยั้งเชื้อ *Carnobacterium* sp. 845 ในเนื้อหมูไร้มัน (lean pork) พบว่า ไลโซไซม์เพียงชนิดเดียวไม่สามารถยับยั้งได้ ต้องใช้ร่วมกับไนซิน หรือไนซินเพียงชนิดเดียวก็ให้ผลในการยับยั้งได้เช่นกัน

Lemay และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาผลของ Microgard™ 100, Microgard™ 300, nisin, Alta™ 2002, Perlac™ 1902, sodium lactate และน้ำมันหอมระเหยจากมัสตาร์ด (essential oil of mustard) ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกจากเนื้อไก่ mechanically deboned และพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากมัสตาร์ดเพียงชนิดเดียว ทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียจำพวก aerobic mesophilic และ lactic acid bacteria ลดลงได้

Fernández-López และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากโรสแมรี่ (rosemary) ส้ม และมะนาว ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นแบบสวีเดน (Swedish-style meat-balls) และพบว่าสารสกัดจากโรสแมรี่ทั้งที่สกัดด้วยน้ำและน้ำมันให้ผลในการลดความหืนได้ดีที่สุด อีกทั้งยังให้ในการต้านเชื้อจำพวก lactic acid bacteria และ *Listeria* อีกด้วย สำหรับผลในด้านประสาทสัมผัส สารสกัดจากโรสแมรี่และสารสกัดจากส้มให้ผลที่ดีเป็นที่ยอมรับ

การศึกษาของ Oussalah และคณะ ในปี 2006 ได้ทำการศึกษาถึงผลของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) จากพืชสมุนไพรต่าง ๆ จำนวน 60 ชนิด ที่มีต่อการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas putida* สายพันธุ์ที่พบในเนื้อหมูสด โดยทำการแปรความเข้มข้นเป็นระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.003 – 0.8% (w/v) จากการทดลองได้พบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก *Corydothymus capitatus* ให้ผลที่ดีที่สุด เมื่อใช้ในปริมาณต่ำสุดคือ 0.025 สำหรับน้ำมันหอมระเหยอื่น ๆ อีก 7 ชนิด ได้แก่ *Cinnamomum cassia*, *Origanum compactum*, *Origanum heracleoticum*, *Satureja hortensis*, *Satureja montana*, *Thymus vulgaris carvacroliferum* และ *Thymus vulgaris thymoliferum* ก็ให้ผลที่ดีในการยับยั้งการเจริญของ *P. putida* เช่นกัน แต่ต้องใช้ในการความเข้มข้นที่มากกว่าคือ 0.05% สำหรับน้ำมันหอมระเหยอื่น ๆ อีก 10 ชนิด ได้แก่ *Cinnamomum verum* (leaf and bark), *Eugenia caryophyllus*, *Cymbopogon martinii* var. *motia*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca linariifolia*, *Origanum majorana*, *Pimenta dioica*,

Thymus satureoides, *Thymus serpyllum* ก็ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวเช่นกัน แต่ต้องใช้ในปริมาณมากขึ้นเป็นระหว่าง 0.1% และ 0.4%

การศึกษาของ Theivendran, Hettiarachchy และ Johnson (2006) ได้ศึกษาผลในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ผสมสารสกัดสองชนิดคือ ไนซินกับสารสกัดจากเม็ดองุ่น หรือ ไนซินกับสารสกัดจากชาเขียว พบว่า เมื่อทดลองเคลือบฟิล์มทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวลงบนผลิตภัณฑ์ไส้กรอกไก่จะช่วยให้ผลที่ดีมากต่อการยับยั้งเชื้อดังกล่าวเมื่อใช้ในซินเข้มข้น 10,000 IU ร่วมกับสารสกัดจากเม็ดองุ่นหรือสารสกัดชาเขียวเข้มข้น 1% โดยมีผลทำให้จำนวนเชื้อลดลงจากเชื้อตั้งต้นถึง 2 log cycle หลังการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 28 วัน

จากงานวิจัยของ Sofia และคณะ (2007) ได้พบว่า สารสกัดจากสมุนไพรที่มีในประเทศอินเดีย 6 ชนิด ได้แก่ โคลฟ ออบเชย มัสตาด กระเทียม ขิง และ สะระแหน่ มีแนวโน้มในการเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์เป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยจากการทดลองได้พบว่า สารสกัดจากโคลฟ ออบเชยและมัสตาดจะให้ผลที่ดีมากที่สุดในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษ 3 ชนิดคือ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* รองลงมาคือ สารสกัดจากกระเทียม เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1% และหากใช้ที่ความเข้มข้น 3% จะมีผลทำลายเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้ทั้งหมดแต่สำหรับสารสกัดจากขิงและสะระแหน่ ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อดังกล่าว

งานวิจัยของ Busatta และคณะ (In press) ได้รายงานว่ น้ำมันสกัดจากพืชสมุนไพร *Origanum majorana* L. ให้ผลดีในการต้านทานเชื้อ *Escherichia coli* ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกดิบ นอกจากนี้ งานวิจัยของ Solomakos และคณะ (In press) ยังได้รายงานว่ น้ำมันหอมระเหยจาก thyme ในปริมาณ 0.3, 0.6 และ 0.9% หรือ ไนซินในปริมาณ 500 และ 1000 IU หรือใช้ทั้งสองอย่างร่วมกัน ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบดที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิต่ำ มีผลช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes* แต่ผลที่ได้ก็ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ และสารทั้งสองชนิดให้ฤทธิ์ที่เสริมกัน ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ดีขึ้น การยับยั้งที่ดีที่สุดพบในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบดที่ผสมน้ำมันหอมระเหย 0.6% ร่วมกับ ไนซิน 1000 IU/g โดยให้ผลยับยั้ง *L. monocytogenes* ทำให้มีจำนวนเชื่อน้อยกว่า 2 log CFU/g เมื่อเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

การใช้สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

เป็นที่ทราบกันดีว่ กระเทียม (*Allium sativum* L.) เป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี ดังนั้นจึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มาตั้งแต่ในอดีต และมีการพัฒนาต่อเนื่องมาจนทราบว่า สารออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุดในกระเทียมสดคืออัลลิซิน (allicin) โดยอัลลิซินนี้เป็นสารที่เกิดมาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารอัลลิอิน (alliin) ซึ่งมีอยู่ในกระเทียมสด ด้วยเอนไซม์ อัลลิอินเอส (allinase) หลังผ่านการทุบ ปอกเปลือก หรือมีการสัมผัสอากาศแล้ว ซึ่งมีงานวิจัยหลายงาน ได้

ศึกษาถึงความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของอัลลิซิน และผลของอัลลิซินต่ออายุการเก็บรักษา ความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์และผลต่อคุณลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์อาหาร โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และในบางงานวิจัยยังได้ศึกษาผลของอัลลิซินในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารอีกด้วย

Yin และ Cheng (2003) ได้ศึกษาผลของสารอนุพันธ์จำพวก organosulfur ที่สกัดจากกระเทียม 4 ชนิด ได้แก่ diallyl sulfide, diallyl disulfide, s-ethyl cysteine และ n-acetyl cysteine ต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบด ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า สาร อนุพันธ์ทั้ง 4 ชนิดดังกล่าว ให้ผลดีในด้านการชะลอการเปลี่ยนแปลงของสีของเนื้อวัว และช่วยชะลอการเกิดกลิ่นหืนของไขมันในเนื้อวัวได้ดี แต่ในด้านผลของการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ สาร diallyl sulfide และ diallyl disulfide เพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่ให้ผลในการลดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 5 ชนิด ($p < 0.05$) ได้แก่ *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และ *Campylobacter jejuni*

งานวิจัยของ Kim และ Kyung ในปี 2003 ได้พบว่า การหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลลิซินไม่ทำให้เปลี่ยนอัลลิอินเป็นอัลลิซิน โดยการให้ความความกระเทียมสดที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที มีผลทำให้กระเทียมดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ดีกว่าอย่างอื่น และเป็นลักษณะพิเศษซึ่งอัลลิซินไม่สามารถยับยั้งได้ ดังนั้นสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่มากในกระเทียมรูปแบบนี้ คือ สารอัลลิอิน นั่นเอง

จากงานวิจัยของ Sallam, Ishioroshi และ Samejima ในปี 2004 ได้พบว่า การใช้กระเทียมทั้งในรูปของกระเทียมสด ผลกระเทียมแห้งและน้ำมันสกัดกระเทียม ให้ผลดีในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และป้องกันการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกไก่ดิบที่เก็บที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส แต่ผลที่ได้นั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณหรือความเข้มข้นของสารที่นำมาใช้ โดยผลที่ดีที่สุดจะพบในตัวอย่างที่มีกระเทียมสด 30 g/kg หรือผงกระเทียม 9 g/kg ซึ่งจะให้ผลที่ดีทั้งทางด้านการเป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระ จึงเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นถึง 21 วัน และได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคกล่าวคือ มีกลิ่นกระเทียมไม่มากจนเกินไป

การใช้โคโตซานจากเปลือกกุ้งในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

โคโตซานเป็นสารประเภทโพลีเมอร์ธรรมชาติ (biopolymer) ของคาร์โบไฮเดรตที่ได้มาจากการกำจัดหมู่อะเซทิล (acetyl group or $-CH_3$) ออกจากสายโมเลกุลของสารไคติน ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่พบอยู่ในธรรมชาติมากเป็นอันดับสอง รองจากเซลลูโลส โดยแหล่งใหญ่ของไคตินที่สามารถนำมาผลิตเป็นโคโตซาน ได้แก่ เปลือกกุ้งชนิดต่าง ๆ และกระดองปู จากบทความของ No และคณะ (2007) ได้กล่าวว่า โคโตซานเป็นโพลีเมอร์ที่ได้รับความนิยมในการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างมาก เพราะโคโตซานมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี อีกทั้งยังให้ผลในการยับยั้งเนื้อมีกลิ่น และมีการพัฒนาโคโตซานเป็นยาที่ช่วยลดปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือดได้อีกด้วย ในบทความนี้ยังได้ทำการแจกแจงและสำรวจ

การประยุกต์ใช้โคโตซานในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ และผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ที่มีการตีพิมพ์ไว้ในวารสารนานาชาติ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยจากผลการสำรวจของ No และคณะ ทำให้ทราบว่า โคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่มีความสามารถสูงในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้ง แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในอาหารหลายประเภท อาทิเช่น น้ำผลไม้ ผักและผลไม้ อาหารทะเล ขนมอบัง นม เนื้อสัตว์สดและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไข่ กรอก เป็นต้น ดังนั้นโคโตซานจึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะนำมาพัฒนาให้เป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ทดแทนวัตถุกันเสียจากสารเคมี และมีข้อดี คือเป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ จึงทำให้มีความปลอดภัยในอาหารต่อผู้บริโภคมากกว่าการใช้สารเคมี

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้โคโตซานเพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ

Microorganism		Foods	References
Bacteria	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Bacillus cereus</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Meat	Rao and others (2005)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Bread	Lee and others (2002b)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Bread	Lee and others (2002b)
		Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Milk	Lee and Lee (2000b)
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Meat	Lee and others (2003)
	<i>Clostridium histolyticum</i>	Sausage	Youn and others (2001b)
	<i>Clostridium perfringens</i>	Sausage	Youn and others (2001b)
	<i>Coliform</i>	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994b)
		Soybean sprouts	Choi and others (2000)
	<i>Enterobacter aeromonas</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Bread	Lee and Lee (1997)
	<i>Escherichia coli</i>	Bread	Lee and Lee (1997)
		Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Lee and others (2003), Rao and others (2005)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000, 2001b)
		Seafoods	Cho and others (1998a), Tsai and others (2002)
		Soybean curd	Chun and others (1997, 1999)
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Meat	Lee and others (2003)
	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	Mayonnaise	Roller and Covill (2000)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Kimchi	Lee and Cho (1998), Lee and Jo (1998), Son and others (1996), Yoo and others (1998)
		Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Lee and others (2003)
	<i>Lactobacillus sakei</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	<i>Lactobacillus viridescens</i>	Meat	Sagoo and others (2002)
		Sausage	Youn and others (2001b)
	<i>Lactobacillus</i> sp.	Kimchi	Jang and Jeong (2005)
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Kimchi	Yoo and others (1998)
	<i>Leuconostoc</i> sp.	Kimchi	Lee and Cho (1998), Lee and Jo (1998), Son and others (1996)
	<i>Listeria innocua</i>	Meat	Lee and others (2003), Sagoo and others (2002)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Meat	Lee and others (2003)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Micrococci</i>	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994b)
	<i>Micrococcus varians</i>	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a)
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Lee and others (2003)
	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meat	Lee and others (2003)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
		Milk	Ha and Lee (2001)
	<i>Pseudomonas fragi</i>	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Lee and others (2003)
	<i>Pseudomonades</i>	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994b)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Meat	Rao and others (2005)
		Seafoods	López-Caballero and others (2005)
	<i>Salmonella</i> Enteritidis	Mayonnaise	Roller and Covill (2000)
		Meat	Lee and others (2003)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000, 2001b)
	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Bread	Lee and Lee (1997)
		Meat	Lee and others (2003)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000, 2001b)
		Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Serratia liquefaciens</i>	Meat	Lee and others (2003)
	<i>Serratia marcescens</i>	Bread	Lee and others (2002b)
	<i>Shigella dysenteriae</i>	Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Bread	Lee and Lee (1997)
		Meat	Darmadji and Izumimoto (1994a), Rao and others (2005)
		Sausage	Park and others (1999), Youn and others (2000)
		Seafoods	Tsai and others (2002)

(continued on next page)

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้โคโตซานเพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ (ต่อ)

Microorganism	Foods	References	
Yeast	<i>Staphylococci</i>	Meat	Darmadji and Izumimoto (1994b)
	<i>Vibrio cholerae</i>	Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Candida albicans</i>	Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Candida lambica</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	<i>Cryptococcus humiculus</i>	Fruits and vegetables	Devlieghere and others (2004)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bread	Lee and Lee (1997), Lee and others (2002b)
		Juice	Roller and Covill (1999)
		Milk	Ha and Lee (2001)
		Juice	Roller and Covill (1999)
Mold	<i>Saccharomyces exiguus</i>	Juice	Roller and Covill (1999)
	<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Juice	Roller and Covill (1999)
		Meat	Sagoo and others (2002)
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Juice	Roller and Covill (1999)
	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Juice	Roller and Covill (1999)
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Aspergillus niger</i>	Bread	Lee and Lee (1997), Lee and others (2002b)
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Botrydipodia lecanidion</i>	Fruits and vegetables	Chien and Chou (2006), Chien and others (2007a)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Fruits and vegetables	Chien and Chou (2006), Chien and others (2007a), El Ghauth and others (1992a)
	<i>Cladosporium</i> sp.	Fruits and vegetables	Park and others (2005)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Seafoods	Tsai and others (2002)
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Bread	Lee and Lee (1997)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Fruits and vegetables	Chien and Chou (2006), Chien and others (2007a)
	<i>Penicillium expansum</i>	Bread	Lee and others (2002b)
	<i>Penicillium italicum</i>	Fruits and vegetables	Chien and Chou (2006), Chien and others (2007a)
	<i>Penicillium notatum</i>	Bread	Lee and Lee (1997)
	<i>Rhizopus nigricans</i>	Bread	Lee and Lee (1997)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Fruits and vegetables	El Ghauth and others (1992a)
<i>Rhizopus</i> sp.	Fruits and vegetables	Park and others (2005)	

ที่มา: No, Meyers, Prinyawiwatkul and Xu, 2007

อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้โคโตซานเพื่อวัตถุประสงค์ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์นั้น ยังคงมีปัญหาหลักเกิดเนื่องมาจากคุณสมบัติในการละลายของโคโตซาน กล่าวคือ โคโตซานเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์เท่านั้น เช่น กรดน้ำส้ม (acetic acid) หรือกรดแลคติก (lactic acid) เป็นต้น ดังนั้นการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีค่า pH เป็นกลางจึงเป็นไปได้ยาก และโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จะมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี แต่จะสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์เท่านั้น ไม่สามารถละลายในน้ำกลั่นได้ ดังนั้นจึงทำให้โคโตซานมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาพัฒนาลักษณะโครงสร้างของโคโตซาน ความยาวสายโมเลกุล หรือการใช้โคโตซานรวมกันกับสารอื่น เพื่อให้โคโตซานมีความสามารถในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวางขึ้น

วิธีหนึ่งที่โคโตซานได้รับความสนใจในการศึกษาอย่างแพร่หลายคือ การนำโคโตซานมาผลิตเป็นฟิล์มบิโภาค ซึ่งฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี แต่ก็มีอายุการเก็บรักษาต่ำและมักเกิดสีเหลือง ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด ซึ่งในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ทำการศึกษาเรื่องฟิล์มของโคโตซาน

Outtara และคณะ (2000a) ได้พบว่าการแพร่ของกรดน้ำส้มและกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) จากฟิล์มโคโตซานที่ใช้กรดดังกล่าวเป็นตัวทำละลาย สามารถเกิดขึ้นได้ในอัตราการแพร่ที่แตกต่างกัน แต่หากนำฟิล์มดังกล่าวมาผสมกับ lauric acid ด้วยความเข้มข้น 1% w/w, cinnamaldehyde หรือ eugenol ด้วยความเข้มข้น 0.5% w/w จะสามารถยับยั้งการแพร่ของกรดดังกล่าวได้

Outtara และคณะ (2000b) ได้ศึกษาถึงผลของไคโตซานฟิล์มในการลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียที่ผิวของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เช่น โบโลญา แฮมและ พาสตรามี (pastrami) และพบว่าฟิล์มของไคโตซานที่ละลายในกรดโพธิ์ฟอนิกให้ผลในการยับยั้งเชื้อ enterobacteria และ *Serratia liquifaciens* ได้ดี และสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่ 4 องศาเซลเซียสได้ถึง 21 วัน

Pranoto, Rakshit และ Salokhe (2005) ได้ศึกษาถึงผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มจากไคโตซานเมื่อผสมน้ำมันกระเทียม หรือโพแทสเซียม ซอร์เบท (potassium sorbate) หรือไนซิน ซึ่งพบว่า ฟิล์มจากไคโตซานเมื่อผสมน้ำมันกระเทียมในปริมาณ 100µl/g หรือโพแทสเซียม ซอร์เบทในปริมาณ 100 mg/g หรือไนซินในปริมาณ 51,000 IU/g จะให้ผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ได้เป็นอย่างดี

Rao, Chander และ Sharma (2005) ได้ทำการศึกษาถึงการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่มีความชื้นปานกลาง โดยเพิ่มอายุการเก็บรักษาด้วยวิธีการหุ้มด้วยฟิล์มจากไคโตซานและการฉายรังสี โดยการศึกษาพบว่า ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวไม่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตหลงเหลืออยู่ เมื่อนำไปผ่านการเคลือบด้วยฟิล์มไคโตซานและฉายรังสี (4 kGy)

Sebti และคณะ (2005) ศึกษาถึงการใช้ฟิล์มจากไคโตซานเพื่อลดหรือต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่เมื่อเกิดการปนเปื้อนลงในอาหารแล้วจะทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษได้ โดยการศึกษาพบว่าได้ผลการยับยั้งดีมาก ไม่มีจำนวนการสร้างสปอร์ของเชื้อดังกล่าวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการศึกษาและยังช่วยลดการเสียน้ำออกไปจากวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ถึง 30% ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงกล่าวว่า ไคโตซานมีความสามารถที่ดีในการนำมาทำเป็นฟิล์มเพื่อยับยั้งเชื้อชนิดดังกล่าว

Zivanovic, Chi และ Draughon (2005) ได้ทำการศึกษาถึงผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มจากไคโตซานผสมน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 4 ชนิด ได้แก่ anise, basil, coriander และ oregano ในปริมาณ 1% พบว่า ฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* O157:H7 ที่แตกต่างกัน โดยฟิล์มไคโตซานที่ผสมน้ำมันหอมระเหยจาก oregano จะให้ผลที่ดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจาก coriander, basil และ anise ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Li และคณะ ในปี 2006 พบว่า ความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มจาก konjac glucomanan จะเพิ่มมากขึ้น และจะให้ผลในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ได้เป็นอย่างดี เมื่อมีการผสมไคโตซานลงในฟิล์มในอัตราส่วน 20% ของน้ำหนักฟิล์ม และมีการเติมไนซินลงในฟิล์มในปริมาณ 413 IU/disk film

ในงานวิจัยอื่น ๆ อีกหลายงาน ได้มีการศึกษาผลของการผสมไคโตซานในรูปแบบต่าง ๆ ต่อคุณลักษณะและความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ผลิตภัณฑ์อาหาร

การศึกษาของ Sagoo, Board และ Roller ในปี 2002 ได้กล่าวว่า การยับยั้ง ยีสต์ที่มักจะทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร (*Saccharomyces exiguous*, *Saccharomyces ludwigii* และ *Torulaspora delbrueckii*) จะได้ผลดีเมื่อมีการใช้โคโตซานที่อยู่ในรูปของ chitosan glutamate ในปริมาณ 0.005% ร่วมกับ sodium benzoate ในปริมาณ 0.025%

การศึกษาของ Zheng และ Zhu ในปี 2003 พบว่า โคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* แตกต่างกัน โดยโคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 300 kDalton จะให้ผลดีในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* ได้

López-Caballero และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้โคโตซานเพื่อเติมลงในไส้กรอกปลาสด (cod sausage) ในปริมาณ 1.5% พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณลักษณะทางคุณภาพที่ดีเมื่อใช้ร่วมกับการขึ้นรูปด้วยการอัดความดัน 350 MPa ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นอกจากนี้งานวิจัยยังพบว่า การเติมโคโตซานมีผลช่วยลดเชื้อจุลินทรีย์ ยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ และมีผลทำให้ไส้กรอกที่ได้มีเนื้อสัมผัสที่ยืดหยุ่นมากขึ้นและมีสีเหลืองขึ้นด้วย

Qin และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงวิธีการทำให้โคโตซานละลายน้ำได้โดยการใช้การตัดสายโมเลกุลด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของโคโตซานที่ผลิตได้ ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า โคโตซานที่ผลิตได้สามารถละลายได้ในน้ำแต่ไม่มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังทำให้เชื้อ *Candida albicans* เจริญเติบโตได้ดีขึ้นอีกด้วย ดังนั้นโคโตซานที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีควรมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 5×10^4 ขึ้นไป

Georgantelis และคณะ (2007b) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากโรสแมรี่ (rosemary extracts) ร่วมกับโคโตซาน หรือ α -tocopherol ในการเป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์และผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเลชันของไขมันในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกสดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และพบว่าทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ถึง 20 วัน และตัวอย่างที่เก็บได้นานที่สุด พบในผลิตภัณฑ์ที่ผสมโคโตซานร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่

จากการศึกษาของ Juneja และคณะ (2006) ได้พบว่า โคโตซานสามารถควบคุมการสร้างสปอร์ของ *Clostridium perfringens* ในเนื้อวัวและเนื้อไก่กึ่งงวด ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นได้ โดยปริมาณที่ให้ผลดีที่สุดคือ 3% โดยน้ำหนัก

การศึกษาของ Kok และ Park ในปี 2007 ได้พบว่า อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ set fish ball ที่ทำมาจากการขึ้นรูปซูริมิ (surimi) ด้วยความร้อนด้วยเครื่องเอ็กทรูดเดอร์ (extruder) จะยาวนานขึ้นเมื่อมีการเติมโคโตซาน พร้อมกับกรดน้ำส้มหรือ glucono delta lactone โดยการใช้โคโตซานละลายในกรดน้ำส้มก่อนผสมลงในผลิตภัณฑ์ก่อนที่จะนำไป

ขึ้นรูป จะให้ผลในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ถึง 21 วัน โดยที่ยังคงมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์ น้อยกว่า 1 log CFU/g

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษากิจกรรมวิธีการผลิตอัลลิซิน-โคโตซานคอมเพล็กซ์ที่เหมาะสม รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติทางด้านเคมีและทางด้านกายภาพของคอมเพล็กซ์ที่ผลิตได้
2. เพื่อศึกษาผลของอัลลิซิน โคโตซาน และอัลลิซิน-โคโตซานคอมเพล็กซ์ ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ
3. เพื่อศึกษาผลของอัลลิซิน โคโตซาน และอัลลิซิน-โคโตซานคอมเพล็กซ์ ที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1 อัลลิซิน: สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมได้มาจากการสกัดอัลลิซินจากกระเทียมสดในห้องปฏิบัติการเอง โดยอ้างอิงวิธีสกัดของ Curtis *et al.* (2004) ซึ่งสารสกัดที่ได้จะนำมาใช้ทดลองต่อทันที หรือหากในกรณีที่ไม่ได้ใช้ทันทีจะเก็บไว้ในภาชนะปิดที่ทึบแสงในอุณหภูมิ 4 °C และใช้ทดลองภายใน 24 ชั่วโมง

1.2 โคโตซาน: โคโตซานที่จะใช้ในงานวิจัยนี้เตรียมได้จากเปลือกกุ้งที่แห้งและสะอาด ที่ซื้อมาจาก บริษัท ต้าหมิง เอนเตอร์ไพรส์ จำกัด (สมุทรสาคร) โดยอ้างอิงตามวิธีการเตรียมของ Tolaimate และคณะ (2003) และ Kachanechai และคณะ (2008) เพื่อให้ได้โคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10⁶ Dalton และมีค่า Degree of deacetylation (%DD) 2 ระดับ คือ 70-85 และ 85-100% ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียมแสดงได้ดังต่อไปนี้

สกัดโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งที่สะอาดและแห้ง
โดยแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.5M เป็นเวลา 12 ชม.



ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง



สกัดเกลือแร่ออกจากเปลือกกุ้ง
โดยแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.5M เป็นเวลา 12 ชม.



ล้างด้วยน้ำกลั่นจน pH เป็นกลาง



สกัดรงควัตถุที่ให้สีออกจากเปลือกกุ้ง
โดยแช่ในเอทานอลเข้มข้น 75% นาน 1 ชม.

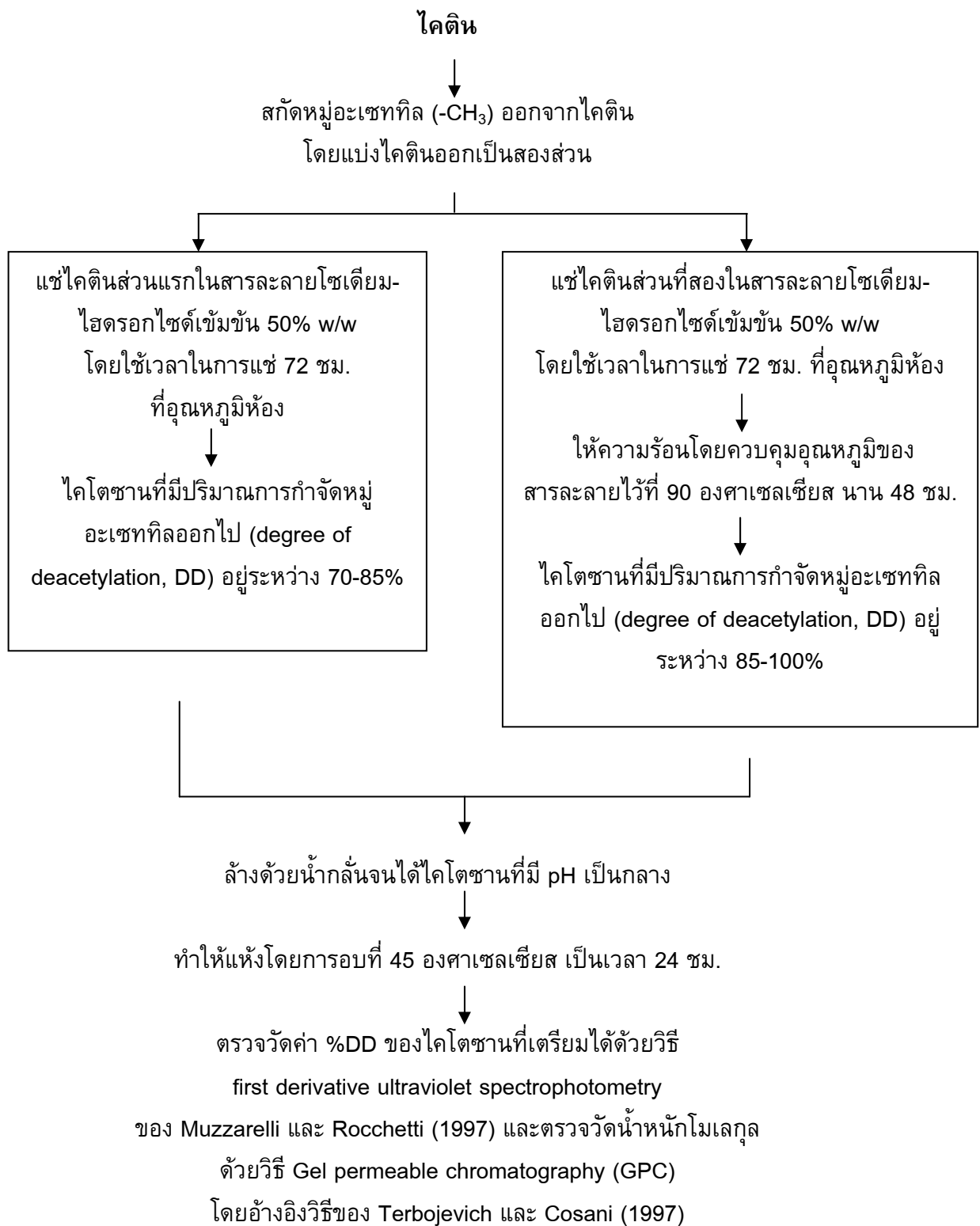


ล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด



ไคติน

แผนผังที่ 1 วิธีการสกัดไคตินจากเปลือกกุ้ง



แผนผังที่ 2 วิธีการสกัดโคโตนจากเปลือกกุ้งที่สามารถควบคุมปริมาณการกำจัดหมู่อะเซทิล (%DD) และน้ำหนักโมเลกุลของโคโตนได้ตามที่ต้องการ

2. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

2.1.1 ศึกษาอัตราส่วนของไคโตซานต่ออัลลิซินที่เหมาะสม

วิธีเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานในงานวิจัยนี้ จะอ้างอิงตามวิธีของ Takeuchi และคณะ (2000) โดยแปรอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่ออัลลิซินเป็น 1:1 1:2 และ 1:3 และทำการศึกษาตัวอย่างไคโตซาน 2 ตัวอย่างที่มีค่า degree of deacetylation (%DD) แตกต่างกัน 2 ระดับ (ได้มาจากวิธีการเตรียมด้านบน) เป็น 70-85%DD (sample 1) และ 85-100%DD (sample 2) ทำให้มีตัวอย่างที่ทำการศึกษา (treatment) ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1: ตัวอย่างที่ทำการศึกษาในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของไคโตซานต่ออัลลิซิน

Treatment	chitosan:allicin (weight ratio)
Complex 1 (C1)	Sample 1:allicin = 1:1
Complex 2 (C2)	Sample 1:allicin = 1:2
Complex 3 (C3)	Sample 1:allicin = 1:3
Complex 4 (C4)	Sample 2:allicin = 1:1
Complex 5 (C5)	Sample 2:allicin = 1:2
Complex 6 (C6)	Sample 2:allicin = 1:3

ในการทดลองนี้ จะควบคุมให้สภาวะการเกิดคอมเพล็กซ์เป็นสภาวะที่อัลลิซินมีความคงตัวที่สุดคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทิ้งให้เกิดคอมเพล็กซ์อย่างสมบูรณ์ในภาชนะสีขาป้องกันแสงเป็นเวลา 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารประกอบเชิงซ้อนด้วยเครื่อง centrifuge และตรวจวัดปริมาณสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นและคำนวณเป็นร้อยละผลผลิตที่ได้ และปริมาณอัลลิซินที่คงเหลือในสารละลายส่วนบน ด้วยวิธี Spectrophotometric Assay ด้วยปฏิกิริยาของ 4-mercaptopyridine กับ Thiosulfates (Miron *et al.*, 2002) และเลือกอัตราส่วนของอัลลิซินต่อไคโตซานที่เหมาะสมที่สุดจากปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ และปริมาณอัลลิซินที่คงเหลือหลังจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน

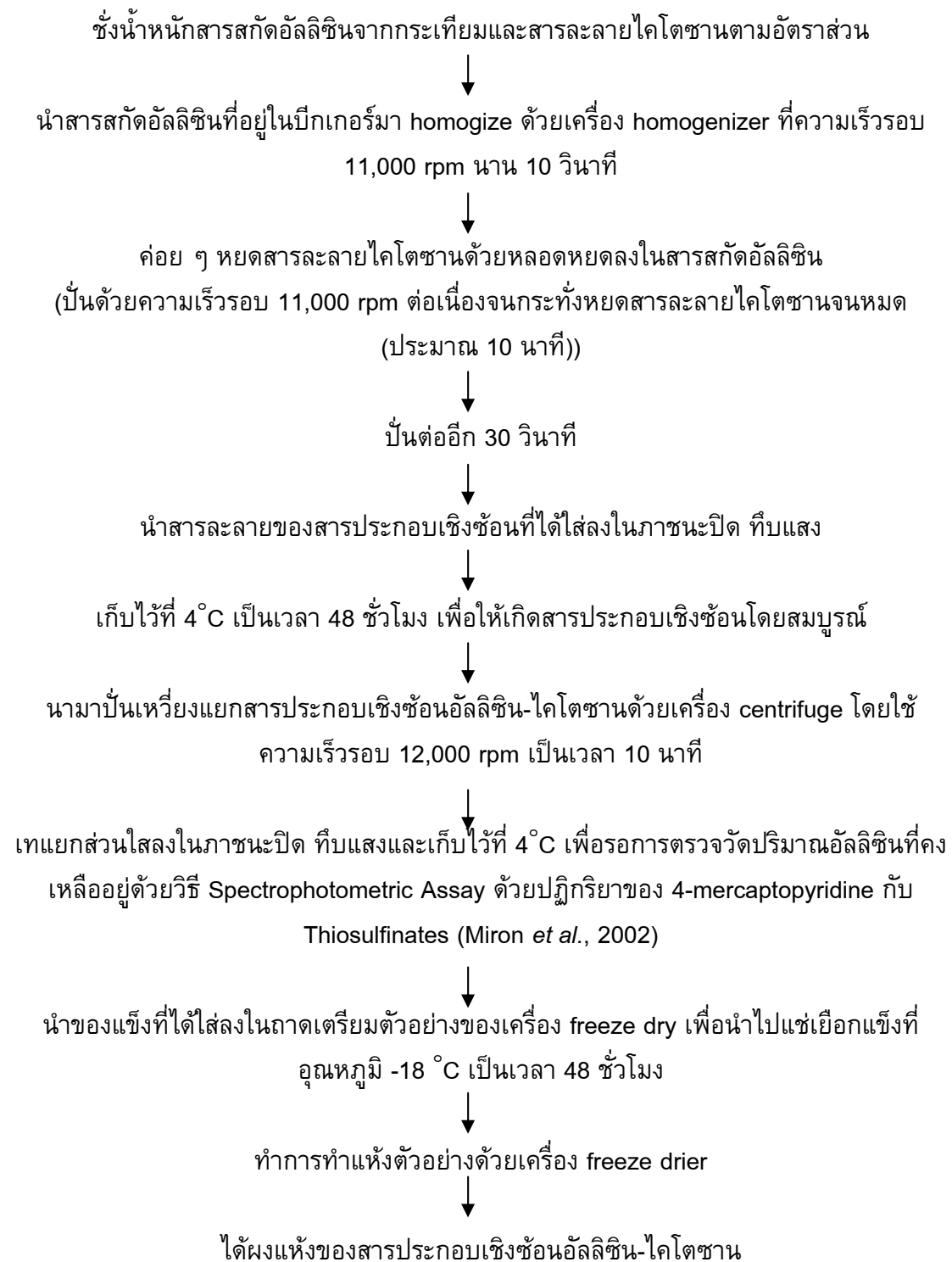
2.1.2 ศึกษาวิธีการทำแห้งสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เหมาะสม

นำตัวอย่างที่ได้ หลังจากการทิ้งไว้ให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนอย่างสมบูรณ์แล้วมาตรวจวัดค่า pH และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid, (°Brix)) จากนั้นนำมาทำแห้งโดยศึกษาวิธีการทำแห้งที่เหมาะสม โดยทำการศึกษาวิธีการทำ

แห้งทั้งหมด 4 วิธี คือ การทำแห้งด้วยเครื่อง spray drier freeze drier vacuum drier และ tray drier โดยมีสภาวะในการทำแห้งด้วยวิธีต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- เครื่อง spray drier (BUCHI 190 Mini Spray Dryer)
 - นำตัวอย่างที่ได้มาปรับให้มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดอยู่ในช่วง 15-30%
 - นำตัวอย่าง feed เข้าเครื่อง spray drier ด้วยอัตราเร็ว 2ml/min และสภาวะของเครื่องที่ใช้มีดังต่อไปนี้
 - Inlet temperature 130 °C
 - Outlet temperature 100 °C
 - Flow indicator 600
- เครื่อง freeze drier (Dura-TOP TMμP/Dura-STOP MP/Dura Dry MP)
 - Pre-freeze ตัวอย่างด้วยเครื่อง freezer ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
 - นำภาดใส่ตัวอย่างเข้าเครื่อง freeze drier และทำแห้งด้วยการระเหิดน้ำแข็งที่อุณหภูมิภายใน -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่าง
- เครื่อง vacuum drier
 - นำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในภาดสแตนเลส เกลี่ยให้มีความหนาไม่เกิน 1 มิลลิเมตร
 - ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่าง
- เครื่อง tray drier
 - นำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงในภาด เกลี่ยให้บาง ๆ
 - ทำแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72-84 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณตัวอย่าง

ซึ่งวิธีในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโทซานที่เหมาะสมที่สุด ที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ดัดแปลงจากวิธีของ Takeuchi และคณะ (2000)) สามารถสรุปและแสดงได้ดังแผนผังด้านล่างดังต่อไปนี้



แผนผังที่ 3 วิธีการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เหมาะสม
(optimum process)

ในการทดลองนี้ จะเลือกสภาวะการทำแห้งที่ให้ร้อยละผลผลิตที่ได้ (%yield) ที่สูงที่สุดเพื่อเตรียมตัวอย่างต่อไป โดยในงานวิจัยขั้นตอนนี้จะใช้การวางแผนการทดลองแบบ CRD และทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความ

แตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002)

2.2 ศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน

นำสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เตรียมได้ทั้งหมด มาทำการตรวจวัดคุณลักษณะด้านต่าง ๆ สมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางเคมีต่าง ๆ ได้แก่

- สีของคอมเพล็กซ์ ด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994)
- รูปร่างของคอมเพล็กซ์โดยใช้วิธี Scanning electron microscopy (SEM) (Gómez-Guillén *et al.*, 2005)
- ลักษณะโครงสร้างของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) (Umemura and Kawai, 2007)
- ค่าความเป็นผลึก (crystallinity) ของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี X-ray Diffraction (XRD) (Wang, Du and Liu, 2004)
- ค่าความสามารถในการละลายน้ำ (Takeuchi *et al.*, 2000)

ในขั้นตอนนี้จะใช้การวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลการทดลองของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002) โดยใช้การวิเคราะห์ทางความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test

2.3 ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน

ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่ผลิตได้ทั้งหมด ต่อเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* *Streptococcus faecalis* และ *Salmonella typhimurium* โดยการทดสอบความไวของจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk diffusion test (Kirby-Bauer) ซึ่งวัดผลโดยการวัดขนาดของ clear zone หรือ zone of inhibition และศึกษาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) และปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ด้วยวิธี Broth dilution method

3. ศึกษาผลของอัลลิซิน โคโคซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

3.1 สูตรและวิธีการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมอัลลิซิน หรือโคโตซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน

ทำการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำโดยอ้างอิงวิธีของ Georgantelis และคณะ (2007b) โดยมีสูตรและส่วนผสมดังตารางที่ปรากฏในตารางด้านล่างนี้ และแปรปริมาณอัลลิซิน โคโตซาน และอัลลิซิน-โคโตซานคอมเพล็กซ์ เป็น 2 ระดับคือ 0.5 และ 1% โดยน้ำหนัก (ตัวอย่างที่ศึกษาต่อน้ำหนักเนื้อแดง) โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารดังกล่าว

ตารางที่ 2 สูตรของไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ส่วนผสม	Control (g)	สูตรที่ 1 (g)	สูตรที่ 2 (g)
เนื้อหมูแดงล้วน	200.00	200.00	200.00
ไขมันหมูแข็ง	18.39	18.39	18.39
น้ำแข็ง	10.00	10.00	10.00
เกลือ	4.60	4.60	4.60
สารอัลลิซิน หรือ โคโตซาน หรือ สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน	-	0.50	1.00

3.2 ศึกษาผลของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ทำการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำตามสูตรด้านบน ทำการศึกษาเบื้องต้นกับตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานทั้งหมดที่ผลิตได้ จำนวน 6 ตัวอย่าง (C1-C6) ที่ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน 0.5 และ 1% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารประกอบเชิงซ้อน โดยทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และตรวจวัดปริมาณเชื้อราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ โดยอ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007) ในการทดลองนี้จะเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่วัดได้ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 ศึกษาผลของอัลลิซิน โคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ในขั้นตอนนี้จะทำการศึกษาผลของการใช้สารอัลลิซิน โคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู

ไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2 และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสารใด ๆ ซึ่งคุณลักษณะทางคุณภาพต่าง ๆ ที่ตรวจวัดมีดังต่อไปนี้

3.3.1 ตรวจวัดคุณลักษณะทางเคมีของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

- ความชื้น (Moisture content) โดยใช้วิธีมาตรฐานของ AOAC (1995)

3.3.2 ตรวจวัดคุณลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

- สีของตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994)
- เนื้อสัมผัส ด้วยเครื่อง texture analyzer (Barbut, 2006)
- ค่าความอุ้มน้ำ (water holding capacity, WHC) (Honikel and Hamm, 1994)

3.3.3 ศึกษาคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ศึกษาคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำโดยใช้แบบสอบถามความชอบแบบ 9-point hedonic scale ทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ โดยทำการทดสอบกับกลุ่มผู้บริโภคที่มีความชอบในการรับประทานไส้กรอกจำนวน 30 คน และทำการทดสอบเพื่อดูอายุการเก็บรักษาทุก ๆ 7 วัน จนกว่าตัวอย่างไส้กรอกจะเสื่อมเสีย โดยดูจากลักษณะปรากฏและคะแนนความชอบโดยรวม ที่ผู้ทดสอบให้

3.3.4 ศึกษาและประเมินอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และ ตรวจวัดปริมาณเชื้อราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ โดยอ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007) โดยทำการตรวจเชื้อทุก ๆ 5 วัน จนกว่าตัวอย่างไส้กรอกจะเสื่อมเสีย

ในการทดลองข้อ 3 นี้จะใช้การวางแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002) โดยใช้การวิเคราะห์ทางความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test

ผลการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1. อัลลีซิน

สารสกัดอัลลีซินจากกระเทียมจะสกัดมาจากกลีบกระเทียมสด ซึ่งวิธีสกัดที่เหมาะสมจะได้มาจากการตัดแปลงวิธีอ้างอิงของ Curtis *et al.* (2004) โดยหลังจากการสกัดน้ำกระเทียมแล้ว จะนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นและกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman NO.4 จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ขณะที่ทำการหมุนเหวี่ยงจะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4 °C การหมุนเหวี่ยงทำเพื่อขจัดส่วนตะกอนที่ไม่ต้องการออก และเก็บตัวอย่างเฉพาะส่วนสารละลายด้านบน ซึ่งสารสกัดอัลลีซินจากกระเทียมที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลว สีเหลืองใส และมีร้อยละผลผลิตที่ได้อยู่ในช่วง 50-52% จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ ไปตรวจวัดปริมาณอัลลีซินที่มีอยู่ในตัวอย่าง ด้วยวิธี Spectrophotometric Assay ด้วยปฏิกิริยาของ 4-mercaptopyridine กับ Thiosulfinates (Miron *et al.*, 2002) ซึ่งจากการทดลองพบว่า มีปริมาณอัลลีซินอยู่ในช่วง 13.5-14.2 mg/ml โดยจะปรับความเข้มข้นให้มีปริมาณอัลลีซินเท่ากับ 13.5 mg/ml ก่อนนำมาผสมกับสารละลายไคโตซานในขั้นตอนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนในการทดลองขั้นต่อไป

1.2. ไคโตซาน

ไคโตซานที่เตรียมในห้องปฏิบัติการ อ้างอิงตามวิธีของ Tolaimate และคณะ (2003) และ Kachanechai และคณะ (2008) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ทำให้ได้ไคโตซานที่มีคุณลักษณะตรงตามต้องการ กล่าวคือ ไคโตซานตัวอย่างที่ 1 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.10×10^6 Dalton และมี %DD อยู่ที่ 78% และไคโตซานตัวอย่างที่ 2 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.02×10^6 Dalton และมี %DD อยู่ที่ 88% ซึ่งสภาวะในการกำจัดหมู่อะเซทิลในขั้นตอน deacetylation เพื่อเปลี่ยนไคตินเป็นไคโตซานจะแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 3 ระยะเวลาในขั้นตอนการกำจัดหมู่อะเซทิลออกจากสายโมเลกุลของไคติน (deacetylation step) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Treatment	Soaking time in 50% by weight NaOH (hr)	Soaking time in 50% by weight NaOH at 90 °C	
		(hr)	DD (%)
Sample 1	72	-	78
Sample 2	72	24	88

ตารางที่ 4 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและ %DD ของไคโตซานที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ

Chitosan Sample	Molecular weight (Dalton)	%DD
Sample 1	1.10×10^6	78
Sample 2	1.02×10^6	88

ตารางที่ 5 ค่าสี (L^* a^* b^*) ของตัวอย่างไคโตซานที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ

Chitosan Sample	Color		
	L^*	a^*	b^*
Sample 1	$87.43^a \pm 0.47$	$-0.02^a \pm 0.01$	$10.98^b \pm 0.18$
Sample 2	$88.98^b \pm 0.12$	$-0.75^b \pm 0.05$	$10.72^b \pm 0.05$

จากการทดลองพบว่า ไคโตซานที่เตรียมได้นั้น มีค่าความสว่าง (L^*) และค่าสีแดง (a^*) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไคโตซานที่มีการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นเวลานานขึ้น จะมีผลทำให้ไคโตซานที่ได้มีสีที่ขาวขึ้น เห็นได้จากค่าความสว่างที่เพิ่มขึ้น และมีค่าความเป็นสีแดงลดลง ($p \leq 0.05$) จากรายงานของ Lertsuriwong และคณะ (2002) พบว่า ไคโตซานที่เตรียมด้วยกระบวนการสกัดโปรตีน (deproteinization) ก่อนสกัดเกลือแร่ (demineralization) จะได้ไคโตซานที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า และมีสีที่ขาวกว่า นอกจากนี้ยังได้มีรายงานของ Tolaimate และคณะ (2003) ได้รายงานว่าการบวนการผลิตไคโตซานที่มีความเหมาะสม มีความสำคัญมากต่อคุณสมบัติของไคโตซาน และกระบวนการที่สามารถผลิตได้ไคโตซานที่มีสายยาวคล้ายคลึงกับไคตินในสภาวะเดิม จะถือว่าเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการผลิตดีและให้ได้ไคโตซานที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการละลายในกรดอินทรีย์ ที่ดีอีกด้วย

2. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

2.1 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

2.1.1 ศึกษาอัตราส่วนของอัลลิซินต่อไคโตซาน และวิธีการทำแห้งสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ที่เหมาะสม

จากการศึกษาเบื้องต้นเพื่อเลือกวิธีการทำแห้งที่เหมาะสม จากวิธีทำแห้งทั้งหมด 4 วิธี ได้แก่ freeze drying, spray drying, vacuum drying และ tray drying โดยใช้ไคโตซานตัวอย่างที่ 2 ที่อัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 พบว่า การทำแห้งทั้ง 4 วิธี ให้ผลของร้อยละผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่แตกต่างกัน อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 66.37, 37.84, 8.02, และ 5.11 ดังนั้นจึงได้ทำการเลือกการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying เพื่อใช้ในการทำแห้งตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานในการทดลองต่อไป ซึ่งนอกจากวิธีนี้จะให้ร้อยละผลผลิตที่สูงที่สุดแล้ว วิธีนี้ยังไม่มีการใช้ความร้อนในการทำให้ตัวอย่างแห้ง ซึ่งจะส่งผลดีไม่ทำให้เกิดการสลายของสารประกอบอินทรีย์ต่าง ๆ

สำหรับวิธีการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานในงานวิจัยนี้ ให้ผลการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ดังแสดงได้จากร้อยละผลผลิตที่ได้ และปริมาณสารอัลลิซินคงเหลือในสารละลายภายหลังการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยสมบูรณ์และการหมุนเหวี่ยงแยกสารประกอบเชิงซ้อน (ตารางที่ 6 และ 7) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (น้ำหนักโมเลกุล 1.10×10^6 Dalton และ 88% DD) ให้ร้อยละผลผลิตของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนสูงที่สุด และสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับสารอัลลิซินได้มากที่สุด (ตารางที่ 6) โดยอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่เหมาะสมคือ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่ออัลลิซินที่ 1:1 ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ปริมาณสารอัลลิซินคงเหลือในสารละลายหลังจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) อย่างสมบูรณ์และผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานออกเรียบร้อยแล้ว

Sample	Allicin:Chitosan (Weight ratio)	Remained Allicin Content (mg/ml)
allicin solution	-	13.50
Complex 1 (C1)	1:1	2.15
Complex 2 (C2)	1:2	2.78
Complex 3 (C3)	1:3	3.12
Complex 4 (C4)	1:1	1.54
Complex 5 (C5)	1:2	2.01
Complex 6 (C6)	1:3	2.93

ตารางที่ 7 Total soluble solid (%), pH และ ร้อยละผลผลิต (%yield) ภายหลังจากทำแห้ง ด้วยวิธี Freeze drying ของตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานทั้ง 6 ตัวอย่าง

Treatment	chitosan:allicin (Weight ratio)	Total Soluble Solid (%)	pH	Yield (%)
Complex 1 (C1)	Sample 1:allicin = 1:1	17.2	4.5	51.98
Complex 2 (C2)	Sample 1:allicin = 1:2	23.5	4.75	46.08
Complex 3 (C3)	Sample 1:allicin = 1:3	26.2	5.5	42.38
Complex 4 (C4)	Sample 2:allicin = 1:1	18.0	4.5	64.98
Complex 5 (C5)	Sample 2:allicin = 1:2	23.6	4.75	48.39
Complex 6 (C6)	Sample 2:allicin = 1:3	26.0	5.5	43.27

จากตารางที่ 7 พบว่า %total soluble solid ของตัวอย่างสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน จะมีค่าเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารสกัดอัลลิซิน ทั้งยังมีผลทำให้ค่า pH มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งการเพิ่มขึ้นดังกล่าวอาจเกิดเนื่องมาจาก pH ของสารละลายอัลลิซิน ที่มี pH สูงกว่า pH ของสารละลายโคโตซาน เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักขึ้น จึงส่งผลต่อ pH ของสารละลายอัลลิซิน-โคโตซานให้เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ร้อยละผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้ จะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารสกัดอัลลิซิน และอัตราส่วนที่ดีที่สุด ที่ให้ร้อยละผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนสูงที่สุดและมีปริมาณอัลลิซินคงเหลือต่ำที่สุด คือ ตัวอย่าง C4 ที่เตรียมจากโคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10⁶ Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1

2.2 ศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน

ในขั้นตอนนี้จะทำการตรวจวัดคุณลักษณะ รูปร่าง คุณสมบัติทางกายภาพ และคุณสมบัติทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เตรียมได้ ซึ่งได้แก่ สีของคอมเพล็กซ์ ด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994) รูปร่างของคอมเพล็กซ์โดยใช้วิธี Scanning electron microscopy (SEM) (Gómez-Guillén *et al.*, 2005) ลักษณะโครงสร้างของ

คอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) (Umemura and Kawai, 2007) ค่าความเป็นผลึก (crystallinity) ของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี X-ray Diffraction (XRD) (Wang, Du and Liu, 2004) และค่าความสามารถในการละลายน้ำ (Takeuchi *et al.*, 2000) โดยผลการทดลองจะแสดงได้ดังต่อไปนี้

2.2.1 สีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ด้วยเครื่อง chroma meter อ้างอิงวิธีของ Macdougall (1994)

สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่ผลิตได้ มีสีเหลืองนวล และมีค่าสีดังแสดงในตารางที่ 8 ซึ่งจะเห็นได้ว่า สารประกอบเชิงซ้อนที่ผลิตได้มีสีที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่าง C4 เป็นตัวอย่างที่มีสีแตกต่างจากสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างอื่นมากที่สุด โดยมีค่าความสว่างสูงที่สุด ในขณะที่มีค่าความเป็นสีแดง และค่าความเป็นสีเหลืองต่ำที่สุด เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินขึ้น พบว่าค่าความสว่างลดลง ค่าความเป็นสีแดงและค่าความเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) ซึ่งเป็นผลมาจากสีของสารละลายอัลลิซินที่สกัดได้ ที่มีสีค่อนข้างเหลือง เมื่อมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักเพิ่มขึ้น จึงมีผลต่อค่าสีโดยตรง ในขณะที่สารละลายไคโตซานเป็นสารละลายใส ไม่มีสี

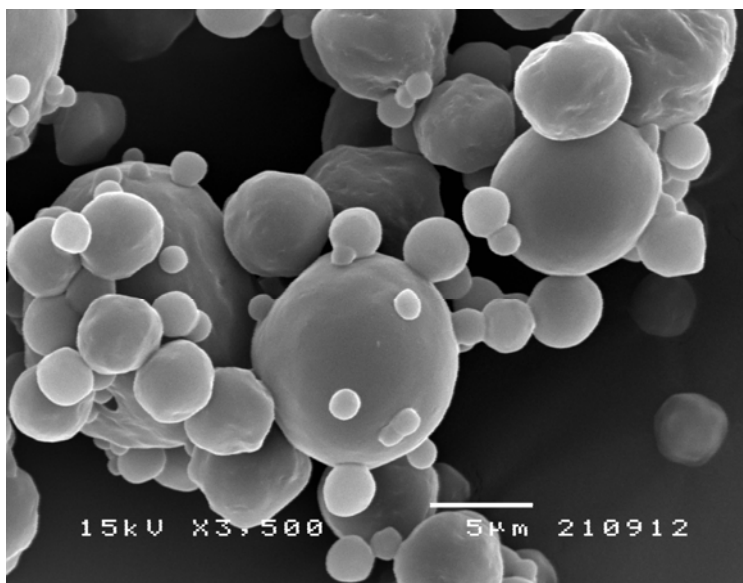
ตารางที่ 8 สีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน (ตัวอย่างที่ 1-6, C1-C6) ที่ผลิตได้

Complex sample	L*	a*	b*
C1	84.22 ^b	0.84 ^c	19.24 ^b
C2	84.48 ^c	0.59 ^b	19.94 ^d
C3	81.00 ^a	2.18 ^f	21.18 ^e
C4	87.30 ^e	-0.47 ^a	16.82 ^a
C5	84.21 ^b	0.98 ^d	19.35 ^c
C6	84.73 ^d	1.12 ^e	19.24 ^b

2.2.2 รูปร่างของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน โดยใช้วิธี Scanning electron microscopy (SEM) (Gómez-Guillén *et al.*, 2005)

รูปร่างของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน จากภาพ scanning electron micrograph (ภาพที่ 1) จะเห็นได้ว่า สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน มีลักษณะเป็นทรงกลม หลายขนาด โดยมีขนาดอยู่ในช่วง 5-15 μm ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Mi และคณะ (2002) และงานวิจัยของ Sankalia และคณะ (2007) ซึ่งพบว่าลักษณะรูปร่างของสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตซาน-อัลจิเนต (chitosan-alginate complexes) มีรูปร่างเป็นทรงกลมเช่นกัน แต่มีขนาดใหญ่กว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่พบในงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Shu และ Zhu (2000) ได้พบว่า ลักษณะรูปร่างของ

สารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง ไคโตซานและsodium tripolyphosphate มีรูปร่างเป็นทรงกลมขนาดใหญ่ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.2-1.5 มิลลิเมตร



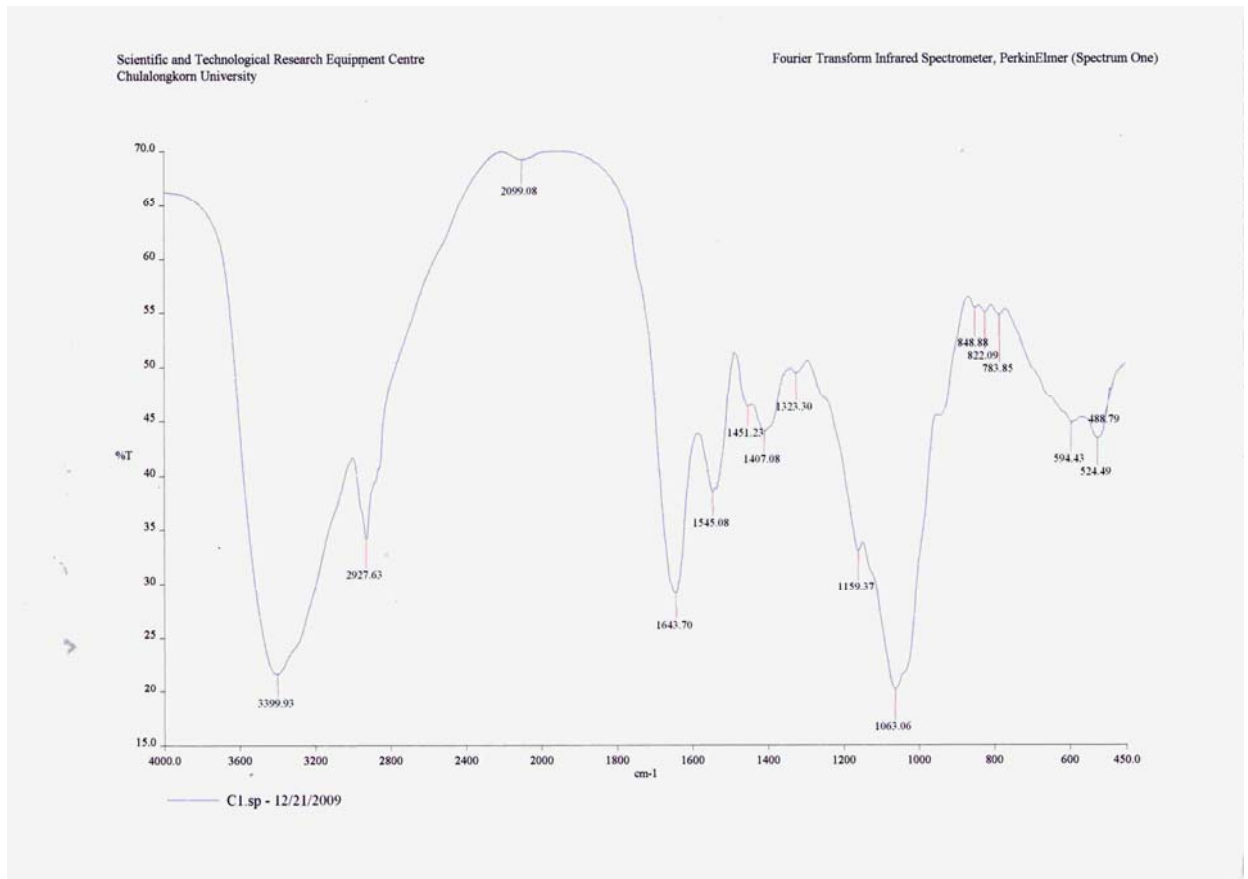
ภาพที่ 1 รูปร่างของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานคอมเพล็กซ์ที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 ($MW=1.02 \times 10^6$ Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 ตรวจวัดด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 3,500 เท่า

2.2.3 ลักษณะโครงสร้างและหมู่ function ของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) (Umemura and Kawai, 2007)

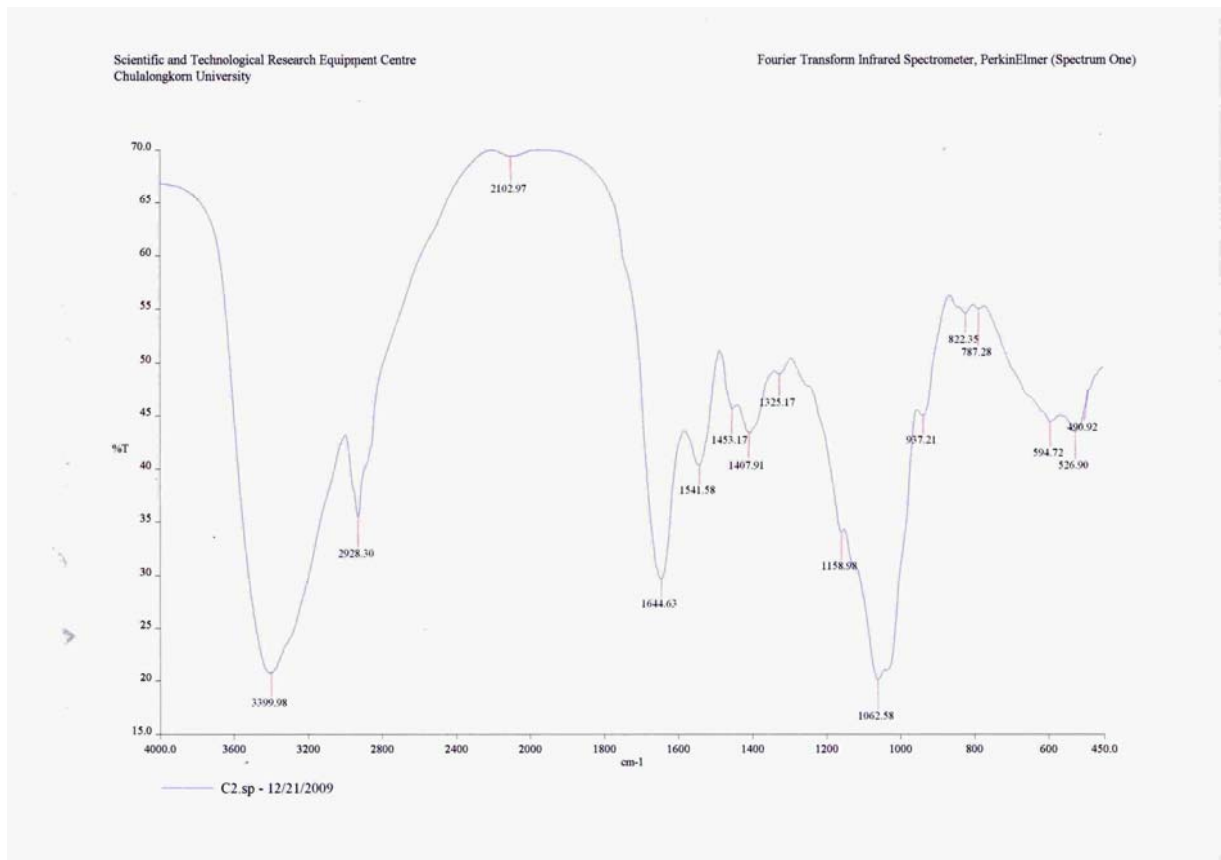
จากการทดลองเพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและหมู่ function ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานแสดงได้ดังภาพที่ 2-7 พบว่า FTIR Spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 (C1-C6) มีลักษณะโดยรวมของ spectra มีความคล้ายคลึงกันมาก มีเพียงบางตำแหน่งของ spectra เท่านั้นที่มีความแตกต่างกันและลักษณะโครงสร้างของ spectra ก็แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ยังพบการ shift ของ spectra ที่ตำแหน่งบนแกน Y ที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้เห็นว่า ลักษณะโครงสร้างและหมู่ function ของสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 6 ตัวอย่าง ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน มีเพียงหมู่ function บางหมู่เท่านั้น ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6) นอกจากนี้ยังพบว่า spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (%DD = 78) และ 2 (%DD = 88) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซิน จะมีผลทำให้มีหมู่ function และโครงสร้างแตกต่างออกไปเล็กน้อย โดยมีหมู่ function เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานกับอัลลิซินที่เท่ากัน (ดังแสดงในตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ลักษณะโครงสร้างและหมู่ function ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ตัวอย่าง C1-C6 ที่ตรวจวัดด้วยวิธี FTIR

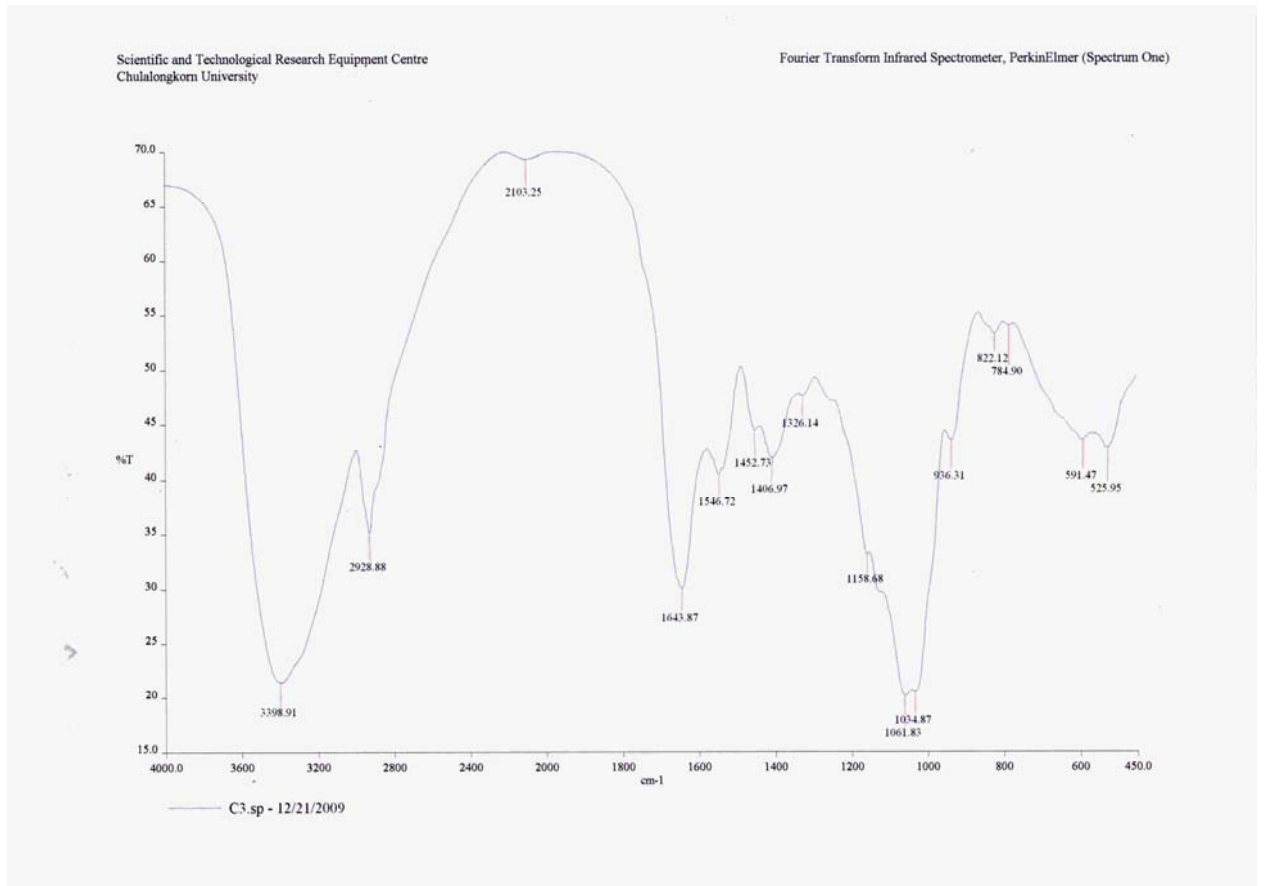
Sample NO.	Possible Structural Units and Functional group
Complex 1	1. alkyl group- hydroxy or possibly amino substituent 2. hydroxyl or amino compound general
Complex 2	1. alkyl group- hydroxy or possibly amino substituent 2. hydroxyl or amino compound general 3. Aliphatic alcohol with carbonyl substitution
Complex 3	1. alkyl group- hydroxy or possibly amino substituent 2. hydroxyl or amino compound general 3. Aliphatic alcohol with carbonyl substitution
Complex 4	1. alkyl group- hydroxy or possibly amino substituent 2. hydroxyl or amino compound general
Complex 5	1. alkyl group general 2. alkyl group- hydroxy or possibly amino substituent 3. hydroxyl or amino compound general 4. Aliphatic alcohol with carbonyl substitution
Complex 6	1. alkyl group- hydroxy or possibly amino substituent 2. hydroxyl or amino compound general



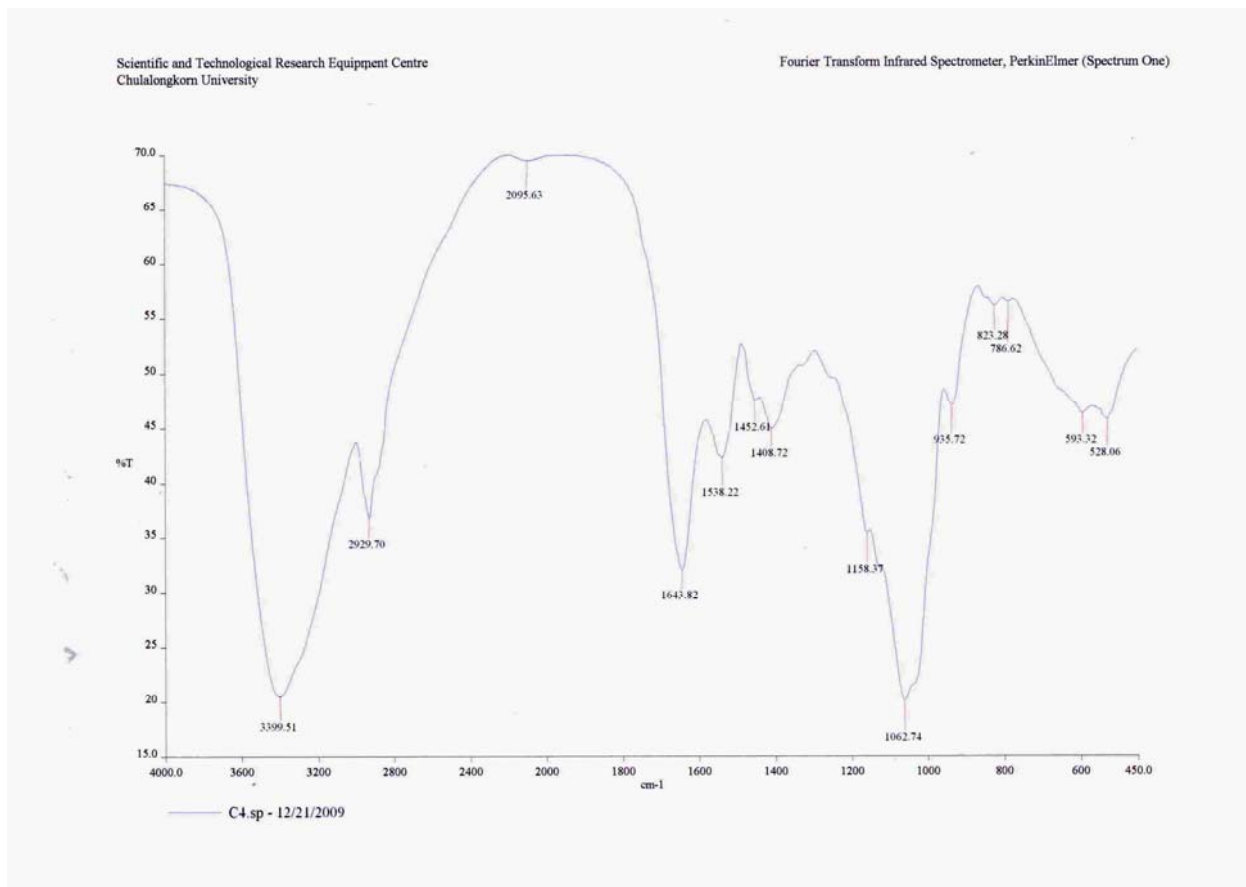
ภาพที่ 2 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เตรียมจากโคโตซาน ตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10⁶ Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 (C1)



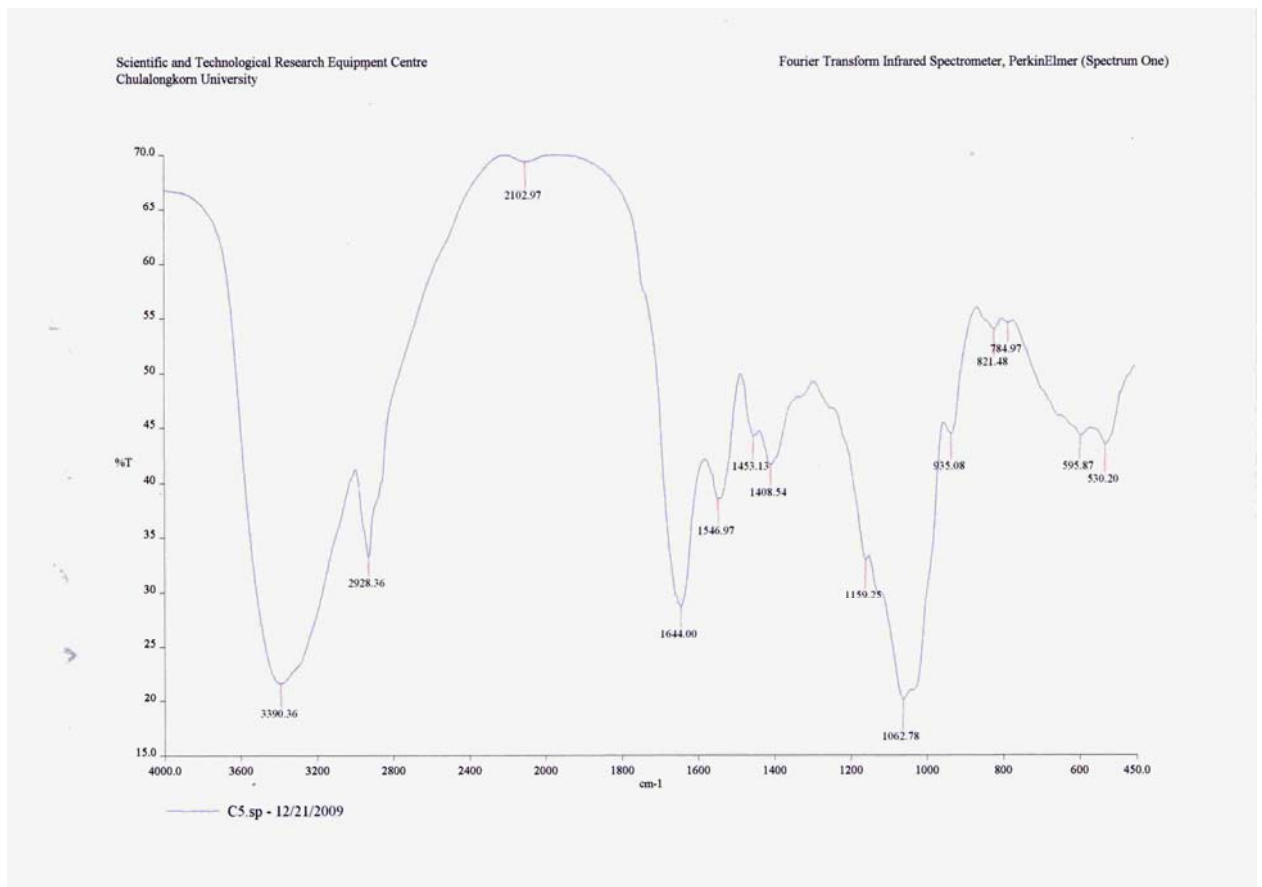
ภาพที่ 3 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เตรียมจากโคโตซาน ตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10⁶ Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:2 (C2)



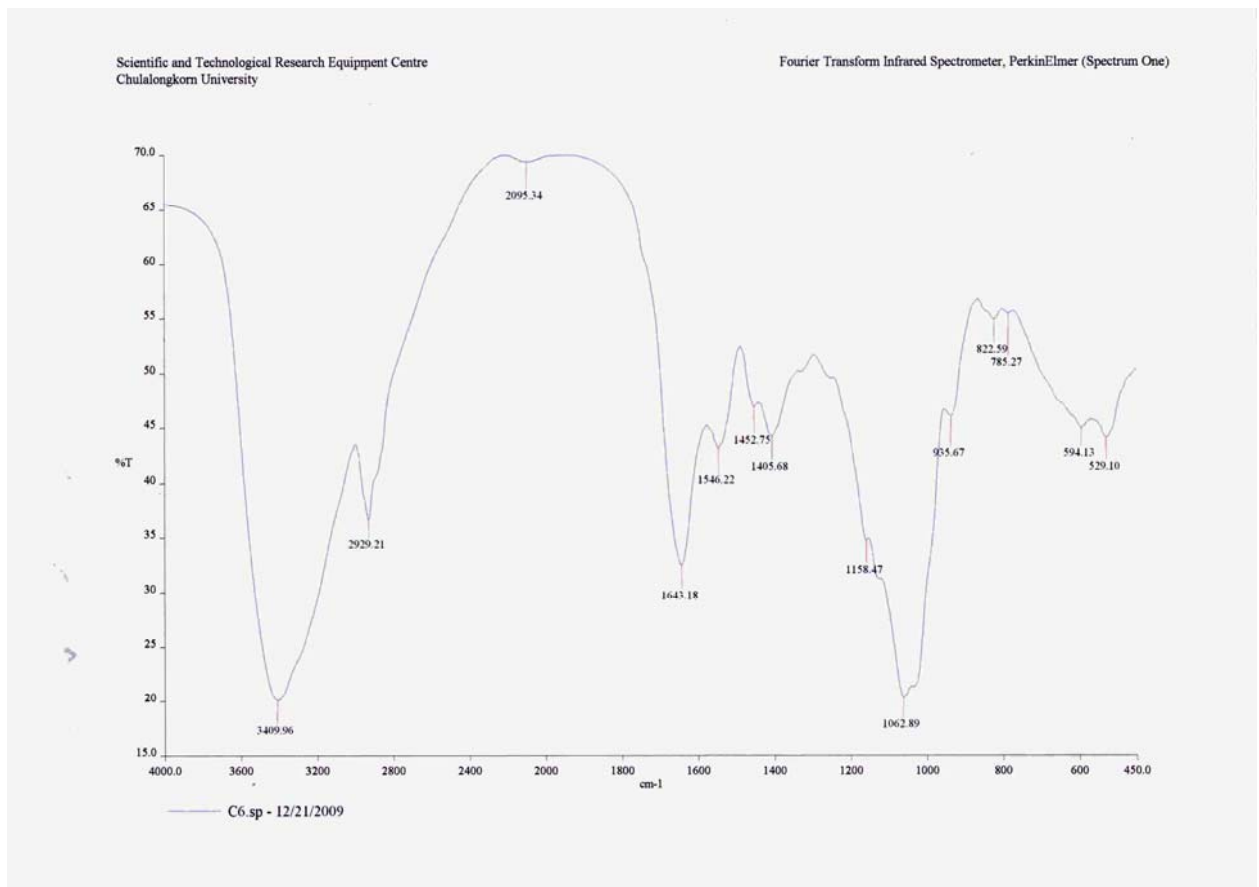
ภาพที่ 4 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เตรียมจากโคโตซาน ตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10⁶ Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:3 (C3)



ภาพที่ 5 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เตรียมจากโคโตซาน ตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10⁶ Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 (C4)



ภาพที่ 6 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่เตรียมจากโคโตซาน ตัวอย่างที่ 2 (MW= 1.02×10^6 Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:2 (C5)



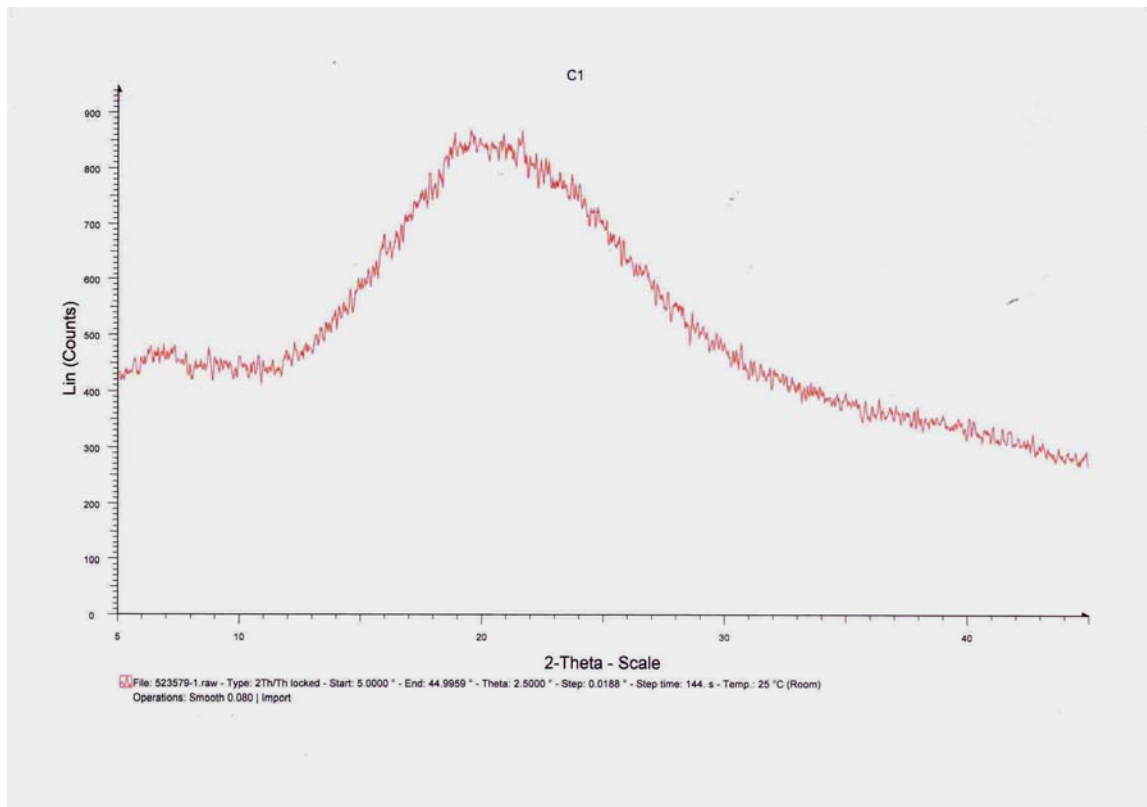
ภาพที่ 7 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซาน ตัวอย่างที่ 2 ($MW=1.02 \times 10^6$ Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:3 (C6)

FTIR-spectra ที่ได้จากการทดลอง พบว่า มีความสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดโดยประจุ (polyelectrolyte complex) ของไคโตซานกับไฮโดรคอลลอยด์ อื่นหลายงานวิจัย อาทิเช่น chitosan-carrageenan polyelectrolytes complex (Hughert *et al.*, 1997), chitosan-carboxymethyl cellulose complex (Rosca *et al.*, 2006), chitosan-alginate polyelectrolyte complex (Sankalia *et al.*, 2007), chitosan-pectin polyelectrolyte complex (Bigucci *et al.*, 2008), chitosan-xanthan polyelectrolyte complex (Argin-Soysal *et al.*, 2009) และงานวิจัยที่ศึกษาสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตซานกับสารอื่น เช่น สารเบตาดีน (Liu *et al.*, 2004) และโคบอลต์ (Ou *et al.*, 2010) ซึ่งทุกงานวิจัยพบว่า ลักษณะ pattern ของ FTIR-spectra ของไคโตซานจะมีลักษณะเฉพาะที่เหมือนกัน ถึงแม้จะใช้เครื่องมือ FTIR ที่แตกต่างกันก็ตาม และเมื่อมีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนขึ้น จะเป็นผลให้ FTIR-spectra ที่ได้รับ เปลี่ยนแปลงไปจาก spectra เดิมของไคโตซาน ซึ่งเมื่อนำ spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 (ดังแสดงด้านบน) มาเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่พบในงานวิจัยอื่น ก็จะเห็นได้ชัดว่า ลักษณะของ pattern ของ สารประกอบ

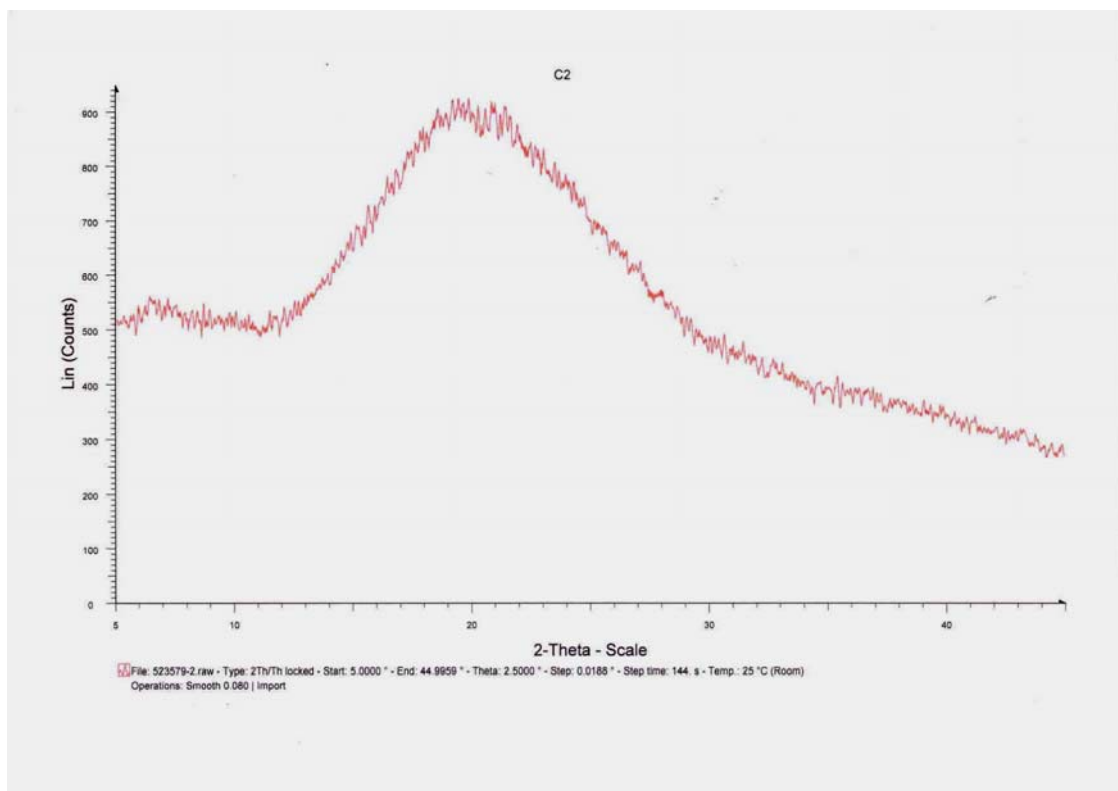
เชิงซ้อน ที่พบเปลี่ยนแปลงไปจาก FTIR-spectra ของไคโตซานอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและหมู่การทำหน้าที่ (functional group) ที่เกิดขึ้นภายหลังการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน และบ่งชี้ได้ว่า ไคโตซานสามารถจับสารอัลลิซินไว้ได้และให้ผลในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหมู่การทำหน้าที่ไปจากเดิม และด้วยเหตุผลนี้เอง จึงทำให้การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการเพิ่มความสามารถและคุณสมบัติเฉพาะของ ไฮโดรคอลลอยด์

2.2.4 ค่าความเป็นผลึก (crystallinity) ของคอมเพล็กซ์ ด้วยวิธี X-ray Diffraction (XRD) (Wang, Du and Liu, 2004)

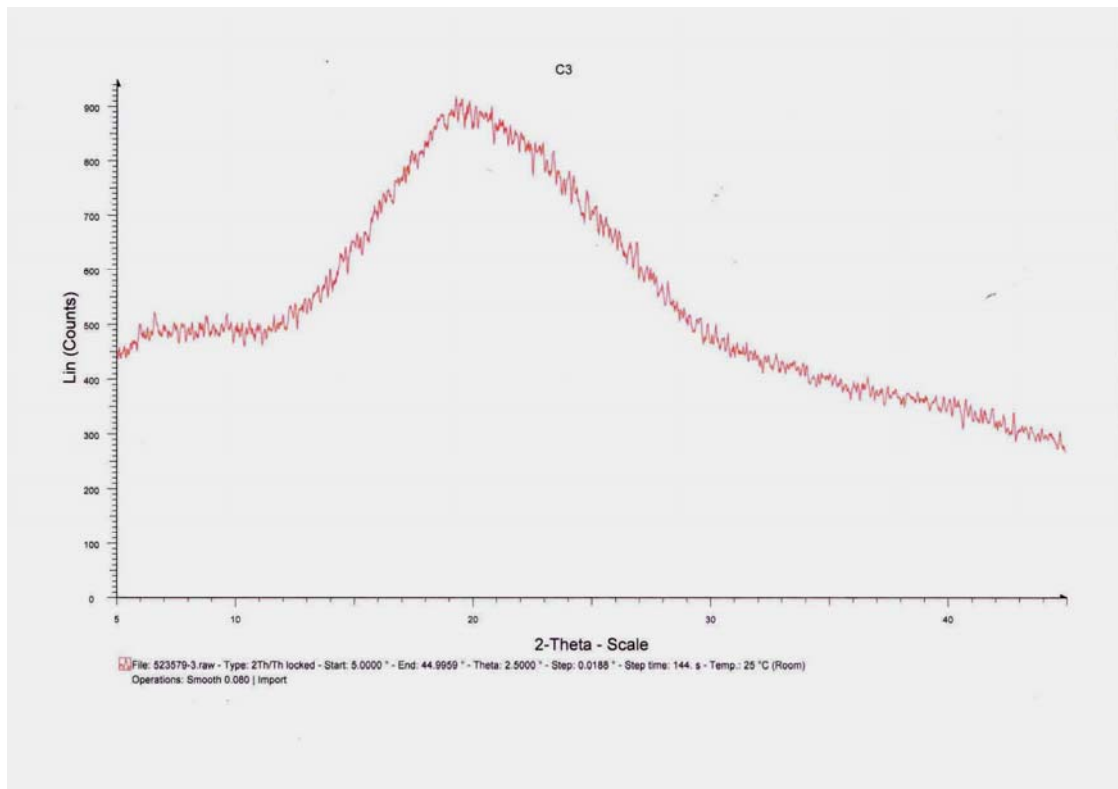
จากผลของ XRD แสดงในภาพที่ 8-13 ทำให้เห็นว่า ลักษณะรูปแบบของ XRD patterns ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน pattern ที่ได้ บ่งบอกถึงลักษณะของผลึกแบบอสัณฐาน (Amorphous crystal) ซึ่งดูได้จากลักษณะของ patterns ที่ค่อนข้างแบนและกว้าง ซึ่งลักษณะรูปร่างของยอด (peak) ของ XRD pattern ที่เกิดขึ้น ก็แตกต่างจาก pattern ของไคโตซานเพียงอย่างเดียว (Ou *et al.*, 2010) ซึ่งจากงานวิจัยของ Ou และ คณะ (2010) กล่าวว่า ลักษณะของไคโตซานจะให้ผลของยอดที่ 2θ แบบแคบ (narrow peak) เป็น 2 ตำแหน่งคือ ที่ 9.85° และ 19.70° แตกต่างอย่างเห็นได้ชัดกับผลการทดลองที่ได้ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ที่ให้ผลของยอดที่มีความกว้างมาก (broad peak) ที่ 2θ เพียงตำแหน่งเดียว และเกิดขึ้นที่ตำแหน่งระหว่าง $20-21^\circ$ ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซิน จะเห็นได้ว่า ยอดของ XRD pattern ของตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-3 (ภาพที่ 8-10) และตัวอย่างที่ 4-6 (ภาพที่ 11-13) มีการเลื่อนเข้าหาตำแหน่งที่ 20° มากขึ้น แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินต่อไคโตซาน จาก 1:1 เป็น 2:1 และ 3:1 ตามลำดับ ไม่ได้ส่งผลให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนเกิดได้ดีขึ้น สารประกอบเชิงซ้อนที่ได้จะแสดงลักษณะของยอดที่เข้าใกล้ตำแหน่งของไคโตซานมากขึ้น และแสดงสมบัติการเป็นไคโตซานมากขึ้น บ่งชี้ได้ว่าการเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซิน ไม่ช่วยให้การทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนได้มากขึ้นนั่นเอง Tolstogusov (1997) ได้กล่าวไว้ว่า การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ดี จะมีอัตราส่วนของสาร 2 ชนิดที่เหมาะสม เพียงอัตราส่วนเดียว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้เช่นกัน ซึ่งจากผลการทดลองที่ผ่านมา ก็สอดคล้องกับผลที่ได้จาก XRD เช่นกัน ซึ่งจะพบว่า สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน จะเกิดได้ดีที่สุดที่สภาวะของ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินต่อไคโตซาน เท่ากับ 1:1 และมีสภาวะการเตรียมที่เหมาะสมดังที่ได้กล่าวไปแล้วด้านบน



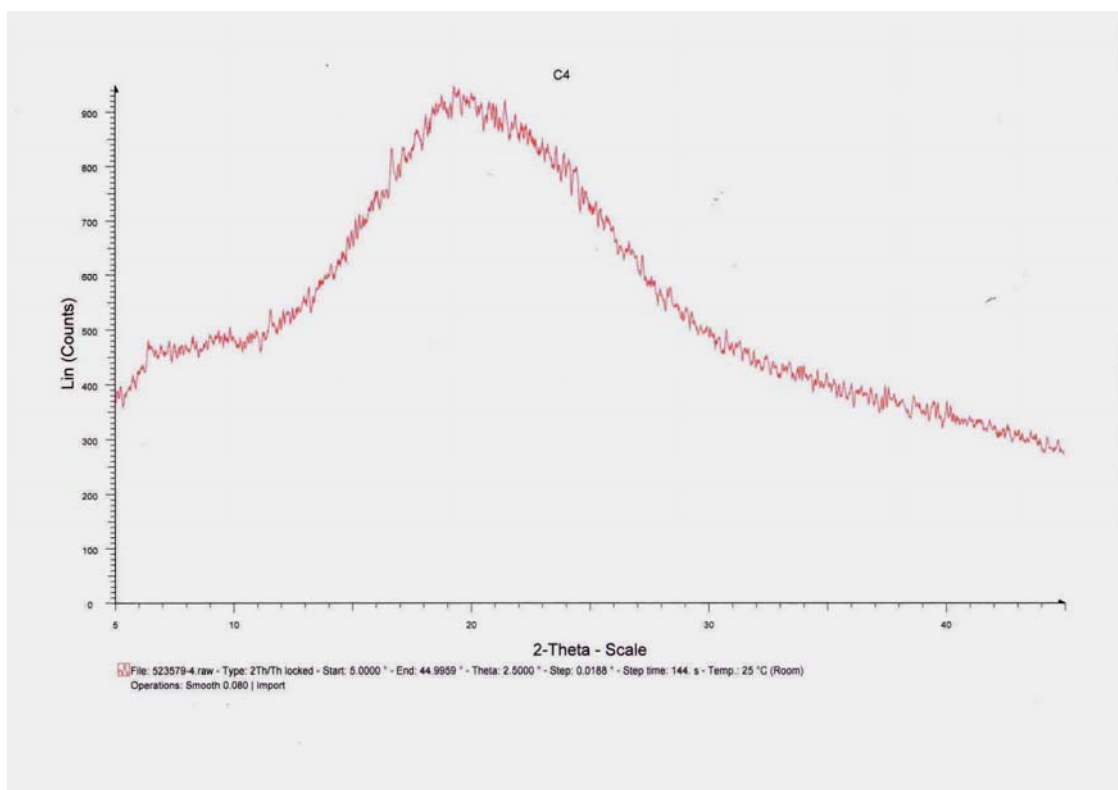
ภาพที่ 8 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เตรียมจากโคโคซาน ตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10⁶ Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโคซานต่ออัลลิซิน 1:1 (C1)



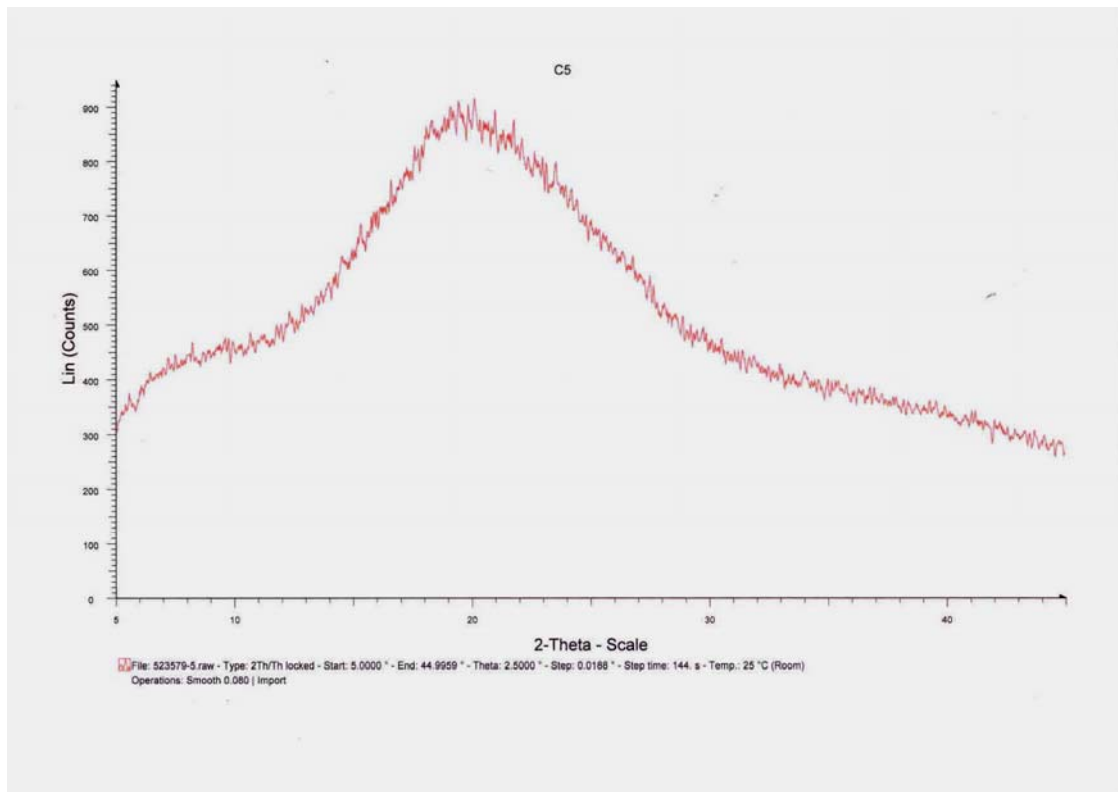
ภาพที่ 9 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เตรียมจากโคโคซาน ตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10⁶ Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโคซานต่ออัลลิซิน 1:2 (C2)



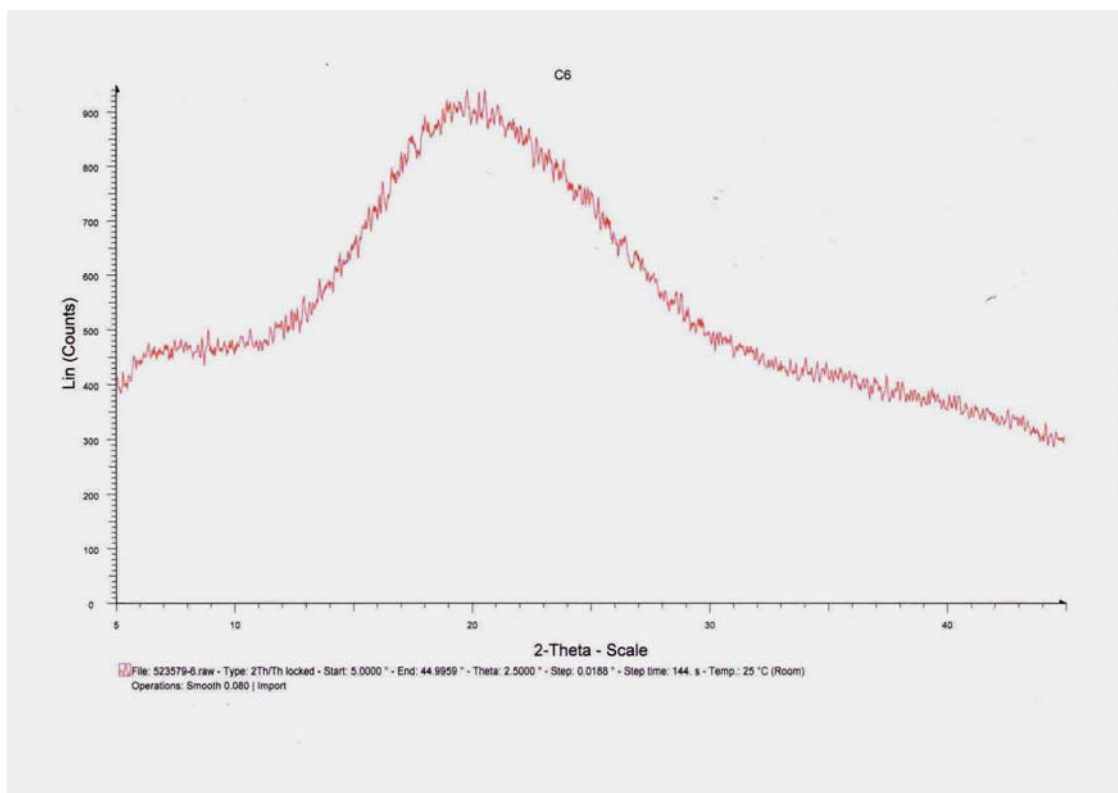
ภาพที่ 10 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เตรียมจากโคโคซาน ตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10⁶ Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโคซานต่ออัลลิซิน 1:3 (C3)



ภาพที่ 11 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เตรียมจากโคโคซาน ตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10⁶ Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโคซานต่ออัลลิซิน 1:1 (C4)



ภาพที่ 12 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เตรียมจากโคโคซาน ตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10⁶ Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโคซานต่ออัลลิซิน 1:2 (C5)



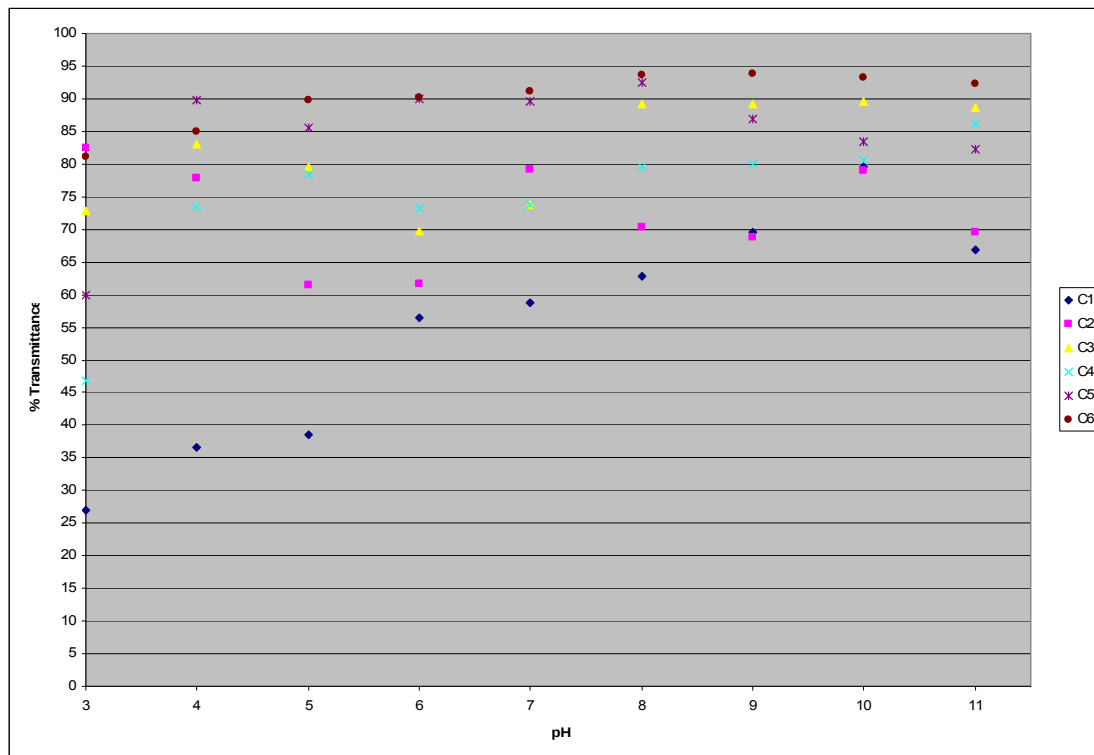
ภาพที่ 13 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานที่เตรียมจากโคโคซาน ตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10⁶ Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนโคโคซานต่ออัลลิซิน 1:3 (C6)

2.2.5 ค่าความสามารถในการละลายน้ำ (Takeuchi *et al.*, 2000)

ค่าความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ที่ตรวจวัดโดยวิธี spectrophotometric assay ที่ pH 3-11 อ้างอิงตามวิธีของ Takeuchi และคณะ (2000) แสดงดังตารางที่ 10 จากผลการทดลองพบว่า ค่าความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานทั้ง 6 ตัวอย่าง มีความแตกต่างกัน โดยตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (C1-C3) จะพบว่ามีค่าความสามารถในการละลายน้ำต่ำกว่าตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อน ที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (C4-C6) อย่างชัดเจน ซึ่งจากภาพที่ 14 จะเห็นได้ว่า กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการละลายน้ำที่ pH 3-11 ของตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ตัวอย่างที่ 1 (C1) จะต่ำกว่าตัวอย่างที่ 2 (C2) 3 (C3) 4 (C4) 5 (C5) และ 6 (C6) ตามลำดับ และแนวโน้มของค่าความสามารถในการละลายน้ำของทุก ๆ ตัวอย่างจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อ pH ลดลง ซึ่งตัวอย่างที่มีความสามารถในการละลายน้ำสูงที่สุดคือ ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 6 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยของ Bigucci และคณะ (2008) ที่ทำการศึกษาการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของไคโตซานกับเพคติน และพบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเพคตินขึ้น จะมีผลทำให้ค่า In vitro swelling degree ที่ pH 2-7 เพิ่มขึ้นเช่นกัน

ตารางที่ 10 ค่าความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ตัวอย่าง C1-C6 แสดงออกในรูปของค่า %Turbidity ที่ pH ต่าง ๆ (pH 3-11)

pH	% Turbidity (%T)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
3	27.07	82.40	72.87	46.87	59.93	81.2
4	36.67	77.83	83.13	73.47	89.80	85.03
5	38.63	61.37	79.63	78.33	85.63	89.80
6	56.37	61.57	69.83	73.23	89.93	90.17
7	58.83	79.17	73.73	73.73	89.60	91.23
8	62.73	70.3	89.27	79.50	92.47	93.60
9	69.6	68.73	89.23	79.90	86.87	93.83
10	79.6	79.00	89.60	80.63	83.50	93.27
11	66.93	69.63	88.70	86.10	82.33	92.37



ภาพที่ 14 การเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการละลายน้ำของตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน (C1-C6) ที่ pH 3-11

2.2.6 ค่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน

จากการทดลองพบว่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 11) โดยเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารละลายอัลลิซินจะเป็นผลให้ค่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานมีค่าสูงขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจาก pH ที่สูงกว่าของสารละลายอัลลิซินก่อนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักขึ้น จึงเป็นผลให้ค่า pH ที่พบมีค่าสูงตามไปด้วย

ตารางที่ 11 ค่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ตัวอย่างที่ 1-6

Sample	pH
C1	5.45a
C2	6.15b
C3	6.55c
C4	5.78a
C5	6.30b
C6	6.42bc

2.3 ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน

ในขั้นตอนนี้จะทำการศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานที่ผลิตได้ทั้งหมด ต่อเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* และ *Salmonella typhimurium* โดยทดสอบความไวของจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk diffusion test (Kirby-Bauer) ซึ่งวัดผลโดยการวัดขนาดของ clear zone หรือ zone of inhibition ซึ่งได้ผลการทดลองเป็นดังแสดงในตารางที่ 12 และทำการศึกษาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งจากผลของ MIC พบว่าสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานให้ผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* โดยให้ผลในการยับยั้งการเจริญได้แต่ไม่สามารถฆ่าทำลายเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวได้จึงไม่สามารถหาปริมาณสารที่น้อยที่สุด ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) ได้ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pranoto และคณะ (2005) ที่พบว่า การเติมน้ำมันกระเทียม (garlic oil) ลงในแผ่นฟิล์มของโคโตซาน มีผลให้สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้ รวมทั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Rao และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผลของโคโตซานฟิล์มต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แบบ intermediate-moisture โดยใช้ Hurdle process ร่วมด้วยนั้น พบว่า โคโตซานมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย

สำหรับความกว้างของ clear zone ที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ตารางที่ 12) สามารถบ่งชี้ได้ว่า ความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานแต่ละตัวอย่าง มีความแตกต่างกัน ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากโคโตซานตัวอย่างที่ 2 (C4-C6) ที่มีค่า %DD ที่สูงกว่า (88%) จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากโคโตซานตัวอย่างที่ 1 (C1-C3) ที่มีค่า %DD อยู่ที่ 78% ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก คุณสมบัติของโคโตซานเองที่มีความสามารถในการละลายในกรดอินทรีย์ที่สูงขึ้น เมื่อมี %DD เพิ่มขึ้น เป็นผลให้มีการเปิดออกของสายโมเลกุล และมีหมู่ที่มีประจุเพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถเกิดพันธะกับสารอื่น ซึ่งในที่นี้คือ อัลลิซิน ได้มากขึ้น ทั้งนี้ อัลลิซินเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียได้สูง จึงเป็นผลให้มีความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์มากขึ้นนั่นเอง (Curtis *et al.*, 2004)

จากผลการทดสอบความไวของจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk Diffusion test นั้น พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานตัวอย่างที่ 4 (เตรียมจากโคโตซานตัวอย่างที่ 2 ที่อัตราส่วนโดยน้ำหนักอัลลิซินต่อโคโตซาน เท่ากับ 1:1) ให้ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ได้ดีกว่าสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างอื่น จึงได้คัดเลือกมาวิเคราะห์หาปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

เพื่อเปรียบเทียบกับอัลลิซิน และโคโตซาน ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นดังในตารางที่ 13 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ค่า MIC ของสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่ 4 ที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* มีค่าน้อยที่สุด (เท่ากับ 6.25 mg/ml) ซึ่งบ่งบอกถึงว่า มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารอัลลิซิน (25 mg/ml) และ โคโตซาน (12.5 mg/ml) สำหรับเชื้อ *S. aureus* จะพบว่า ค่า MIC ของทุก ๆ ตัวอย่างมีค่าเท่ากับ แสดงให้เห็นว่า สารทั้งหมดสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่า *S. aureus* ซึ่งจากผลงานวิจัยของ Jean และคณะ (2001) ก็พบว่า ตัวอย่างโคโตซานสายสั้น (chitooligosaccharides) สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังได้แนะนำด้วยว่า โคโตซานที่มีสายยาว มีน้ำหนักโมเลกุลต้องมากกว่า 10,000 Dalton จึงจะให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ และยังมีน้ำหนักโมเลกุลมาก ยิ่งให้ผลดีขึ้น ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้โคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก (10^6 Dalton โดยประมาณ) ดังนั้น จึงเป็นโคโตซานที่ให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้ดี และจะยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ก่อโรคอีกด้วย (Jean *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2006)

ตารางที่ 12 ความกว้างของ clear zone (mm) ที่ได้จากการทดสอบความไวของจุลินทรีย์ต่อสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disk diffusion test (Kirby-Bauer) ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน

Complex sample	clear zone (mm) against <i>Esherichia coli</i>	clear zone (mm) against <i>Staphylococcus aureus</i>	clear zone (mm) against <i>Streptococcus feacalis</i>	clear zone (mm) against <i>Salmonell typhimurium</i>
C1	11.5	8	-	-
C2	15	7	-	-
C3	15	7	-	-
C4	17	9	-	-
C5	16	9	-	-
C6	15	9	-	-

หมายเหตุ - หมายถึงไม่ยับยั้ง

ตารางที่ 13 ปริมาณสารที่น้อยที่สุดที่ออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ C4 เปรียบเทียบกับสารอัลลิซินและไคโตซาน

Sample	MIC against <i>Escherichia coli</i> (mg/ml)	MIC against <i>Staphylococcus aureus</i> (mg/ml)
allicin	25	12.5
chitosan	12.5	12.5
C4	6.25	12.5

3. ศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

3.1 การเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

การเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานอ้างอิงในงานวิจัยนี้ ได้ดัดแปลงสูตรและวิธีการของ Georgantelis และคณะ (2007b) โดยมีวิธีการตามที่เหมาะสมที่สุด เป็นแผนผังที่ 4 ด้านล่าง ซึ่งวิธีการเตรียมดังกล่าว ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสและความสามารถในการอุ้มน้ำที่ดี

นำสันในหมูมาหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด $\frac{1}{2}$ นิ้ว (เอาแต่เนื้อแดงเท่านั้น) คลุกกับเกลือ (ประมาณ $\frac{1}{2}$ ของสูตร) แล้วนำเข้าตู้เย็นช่องแข็งเป็นเวลา 1 คืน



นำมันหมูแข็งมาปั่นให้ละเอียด แล้วนำเข้าตู้เย็นช่องแข็งเป็นเวลา 1 คืน



ทำการประกอบเครื่องบด แล้วใส่น้ำแข็งลงไปปั่น ประมาณ 30 วินาที เสร็จแล้วให้เทน้ำแข็งออก สะบัดโถปั่นให้มีน้ำติดอยู่น้อยที่สุด

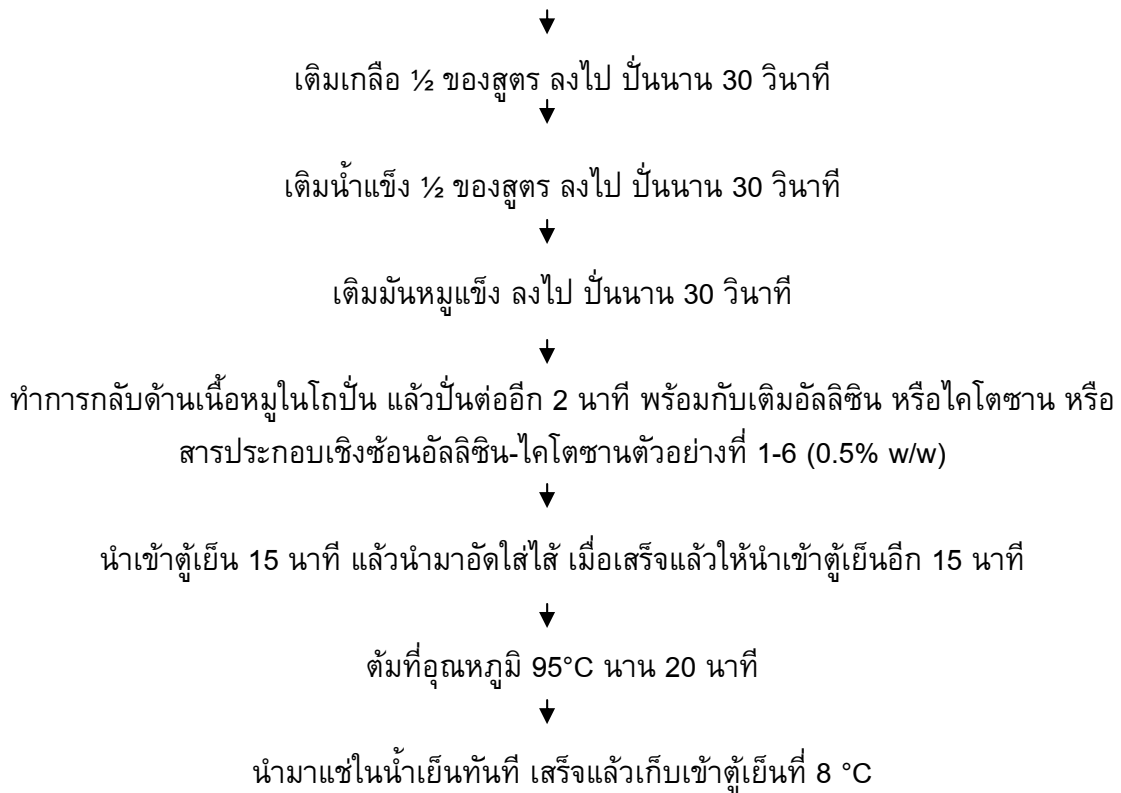


ใส่หมูในข้อที่ 1. ลงไป ทำการปั่นที่ ความเร็วรอบ ≈ 10 นาน 1 นาที



เติมน้ำแข็ง $\frac{1}{2}$ ของสูตร ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที





แผนผังที่ 4 วิธีการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่เหมาะสม ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

3.2 การศึกษาผลของอัลลิซิน โคโคซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซานในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และผลของสารประกอบดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมีและ คุณลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

ในการทดลองนี้ทำการศึกษาผลของอัลลิซิน โคโคซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน โดยในส่วนแรกจะเป็นการทดลองเพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนที่เติมลงในไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่เหมาะสม ซึ่งการทดลองส่วนแรกนี้ ทำเพื่อให้การทดลองในส่วนที่ 2 มีจำนวนหน่วยทดลองในจำนวนที่ไม่มากจนเกินไป และลดการสิ้นเปลืองของสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมไว้ ส่วนการทดลองส่วนที่ 2 จะทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของอัลลิซิน โคโคซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมอีกด้วย

3.2.1 การทดลองส่วนที่ 1

ในการทดลองส่วนแรก จะทำการทดลองเพื่อศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ โดยทำการศึกษากับตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนทั้ง 6 ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 2 ระดับคือ 0.5 และ 1.0%(w/w) ทำให้ได้หน่วยทดลอง (treatment) ดังแสดงในตารางที่ 14 และทำการตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) และปริมาณยีสต์-รา หลังการเตรียมเสร็จเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดและนำมาใช้ต่อในการทดลองส่วนที่ 2 ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ไม่มีผลในการช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์อย่างชัดเจน (ตารางที่ 15) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) และปริมาณยีสต์และรา ของตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน มีค่าน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน สามารถออกฤทธิ์ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ได้เป็นอย่างดี เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนจาก 0.5% โดยน้ำหนักเป็น 1.0% โดยน้ำหนัก พบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจวัดได้ ไม่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด อีกทั้งปริมาณยีสต์และราก็ไม่มีการลดลง ดังนั้นจึงสามารถตัดสินใจเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำมาใช้ได้เป็น 0.5% โดยน้ำหนัก และนำมาใช้ในการศึกษาต่อในการทดลองที่ 2 ต่อไป

ตารางที่ 14 แสดงสูตรของแต่ละหน่วยทดลองที่ศึกษาผลสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานต่อสมบัติด้านต่าง ๆ ของไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

Treatment	Sample explanation	Concentration of Allicin-chitosan complex (%w/w)
1	control	-
2	C1	0.5
3	C1	1.0
4	C2	0.5
5	C2	1.0
6	C3	0.5
7	C3	1.0
8	C4	0.5
9	C4	1.0
10	C5	0.5
11	C5	1.0
12	C6	0.5
13	C6	1.0

ตารางที่ 15 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณเชื้อราและยีสต์หลังเตรียมเสร็จทันทีของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 (C1-C6) ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1%(w/w)

Treatment	Sample Explanation	Total Plate Count (cfu/g)	Yeast and Mold (est. cfu/g)
1	control	1.4×10^2	<60
2	0.5%C1	4.0×10	<10
3	1.0%C1	3.5×10	<10
4	0.5%C2	7.0×10	<10
5	1.0%C2	6.2×10	<10
6	0.5%C3	1.0×10	<10
7	1.0%C3	1.0×10	<10
8	0.5%C4	<10 est.cfu/g	<10
9	1.0%C4	<10 est.cfu/g	<10
10	0.5%C5	7.0×10	<10
11	1.0%C5	6.0×10	<10
12	0.5%C6	1.0×10	<10
13	1.0%C6	1.1×10	<10

3.2.2 การทดลองส่วนที่ 2

ในการทดลองส่วนที่ 2 จะศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี คุณลักษณะทางกายภาพ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ โดยมีหน่วยทดลองที่ศึกษาของการทดลองส่วนที่ 2 เป็นดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ความเข้มข้น (%w/w) ของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เติมลงในไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ในการทดลองส่วนที่ 2

Treatment	Allicin (%)	Chitosan (%)	Allicin-chitosan complex (C1-C6) (%)
1 (control)	-	-	-
2	0.5	-	-
3	-	0.5	-
4-9	-	-	0.5

3.2.2.1 การศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

สำหรับผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ ระหว่างการเก็บรักษาตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานทั้ง 9 ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และ ตรวจวัดปริมาณเชื้อราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ (Kok and Park, 2007) ทุก ๆ 5 วัน จะแสดงในตารางที่ 17 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี TPC ของตัวอย่างควบคุม มีปริมาณมากกว่าตัวอย่างที่มีการเติมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีของสารประกอบดังกล่าว เมื่อทำการเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี TPC ของทุก ๆ ตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้น โดยตัวอย่างควบคุมจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์/รา สูงที่สุด โดยเพิ่มจาก 1.4×10^2 cfu/g เป็น 3.2×10^5 4.2×10^7 และ 6.7×10^7 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ตัวอย่างควบคุมจะเกิดการเสื่อมเสียในอัตราเร็วที่สูงมาก อาจเนื่องมาจากการเก็บรักษาในสภาวะบรรจุสนิทแต่ไม่ได้ใช้ระบบสุญญากาศร่วมด้วย จึงทำให้มีการเสื่อมเสียในอัตราเร็วที่สูงและไม่สามารถรับประทานได้เมื่อเก็บรักษาไว้นานกว่า 10 วัน เนื่องจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่า 10^6 cfu/g ซึ่งอายุการเก็บรักษาของตัวอย่างควบคุมจะอยู่ที่ประมาณ 5-7 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังอาจมีผลของการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในห้องเย็นที่ใช้เก็บรักษาอีกด้วย เนื่องจากเป็นห้องเย็นรวมขนาดใหญ่จึงอาจมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิบ้าง ไม่คงที่ที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลาจึงเป็นผลให้อายุการเก็บรักษาของตัวอย่างควบคุมสั้น ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมอัลลิซิน พบว่า ไม่แตกต่างกันกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากการสลายตัวของอัลลิซินอย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสกับแสงและอุณหภูมิสูง ซึ่งธรรมชาติของสารอัลลิซินจะเป็นสารที่ไม่เสถียร เมื่อถูก catalyze ด้วยเอนไซม์ allianse เกิดการเปลี่ยนสารอัลลิอิน (alliin) ให้เป็น อัลลิซิน (allicin) ภายหลังจากกลีบกระเทียมสัมผัสอากาศและมีแรงบด สับหรือทุบแล้วนั้น สารอัลลิซินก็จะค่อย ๆ สลายตัวลงไปเรื่อย ๆ และลดความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ลง (Ankri and Mirelman, 1999; Yin and Cheng, 2003) ดังนั้น ผลที่ได้จึงสอดคล้องกันกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ระหว่างตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมไคโตซานเพียงอย่างเดียว พบว่า ไคโตซานสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีในระดับหนึ่ง แต่ยังคงดีกว่าสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ซึ่งการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของไคโตซานจะดีกว่าการใช้สารอัลลิซิน และสามารถยับยั้งเชื้อยีสต์และรา ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย สำหรับไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน จะพบว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์และรา ในอัตราที่ต่ำที่สุด และมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานที่สุด (15 วัน) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

ของสารประกอบดังกล่าว และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อยีสต์และราได้ดีกว่าแบคทีเรีย ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองที่ได้จากตัวอย่างไส้กรอกผสมไคโตซานเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้ไคโตซานเพียงอย่างเดียว สามารถในผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ได้ระดับหนึ่ง ซึ่งเมื่อใช้สารประกอบเชิงซ้อนจะให้ผลที่ดีกว่าอย่างชัดเจนและแสดงให้เห็นถึงความสามารถของไคโตซาน ที่สามารถจับสารอัลลิซินไว้ได้ ทำให้สารประกอบเชิงซ้อนที่ประกอบได้ด้วยไคโตซานและอัลลิซินให้ผลในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ซึ่งตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-3 (C1-C3) จะมีอัตราการเพิ่มของเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่า อย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 4-6 (C4-C6) บ่งชี้ให้เห็นว่า ไคโตซานตัวอย่างที่ 1 ที่มี %DD = 78% จะมีความสามารถในการจับกับสารอัลลิซินได้ดีกว่า ไคโตซานตัวอย่างที่ 2 ที่มี %DD = 88% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอย่างไคโตซานที่มี %DD สูงกว่า จะมีความสามารถในการละลายที่ดีกว่า และเป็นผลให้มีหมู่ต่าง ๆ ในปริมาณที่มากกว่าในสายโมเลกุล และมีจำนวนประจุมากกว่า ทำให้สามารถมีความสามารถในการจับกับสารอัลลิซินได้มากกว่าและให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่ 1-3 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด จะพบได้ในตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ตัวอย่างที่ 4 ซึ่งผลที่ได้ในส่วนนี้ ก็เป็นไปตามความคาดหมายและสอดคล้องกับผลการทดลองในส่วนที่ผ่านมา ที่ทำการศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อด้วยวิธี disk diffusion ที่สารประกอบตัวอย่างนี้ให้ผลในการเกิด clear zone ที่กว้างที่สุดแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงที่สุด และให้ค่า MIC ที่ต่ำที่สุดด้วย เมื่อนำมาใช้ในตัวอย่างไส้กรอก จึงให้ผลในการยับยั้งเชื้อและยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีที่สุดนั่นเอง และผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จะพบว่ายับยั้งเชื้อยีสต์และรา ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียสอดคล้องกับงานวิจัยของ Giatrakou และคณะ (2010) ที่พบการยับยั้งของไคโตซานร่วมกับน้ำมันจากไทม์ (thyme) ที่ยับยั้งเชื้อยีสต์และราได้ดีกว่าแบคทีเรียเช่นกัน สำหรับผลงานวิจัยที่พบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Georgantelis และคณะ (2007b) ที่ทำการศึกษาผลของการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และอายุการเก็บรักษาของไส้กรอกหมู fresh sausage ผสมสารสกัดโรสแมรี่ ไคโตซานหรือ แอลฟา-โทโคฟีรอล ที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวก็พบว่า ไคโตซานสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาไส้กรอกได้ยาวนานกว่าตัวอย่างควบคุม แต่ผลที่ดีที่สุดจะพบเมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่ นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิจัยกลุ่มดังกล่าว ที่ทำการทดลองกับตัวอย่างไส้แฮมเบอร์เกอร์เนื้อวัว ซึ่งจะพบว่าการใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่ จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษาได้นานที่สุดเช่นกัน (Georgantelis et al., 2007a)

3.2.2.2 การศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี และคุณลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่เตรียมได้

ไส้กรอกหมูไขมันต่ำทั้ง 9 ตัวอย่างหลังจากเตรียมเสร็จจะนำตัวอย่างที่เตรียมได้ทั้งหมดไปตรวจวัดคุณลักษณะทางเคมีและคุณลักษณะทางกายภาพ ได้แก่ ความชื้น (Moisture content) โดยใช้วิธีมาตรฐานของ AOAC (1995) สีของตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำด้วยเครื่อง chroma meter (Macdougall, 1994) เนื้อสัมผัส ด้วยเครื่อง texture analyzer (Barbut, 2006) และค่าความอ้วนน้ำ (water holding capacity, WHC) (Honikel and Hamm, 1994) ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 18 และ 19 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การเติมสารไม่ว่าจะเป็น อัลลิซิน ไคโตซานหรือ สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานลงในไส้กรอกหมูไขมันต่ำ ส่งผลให้สีของตัวอย่างไส้กรอกทั้งสีที่ผิวของไส้กรอกและสีด้านในเนื้อไส้กรอกมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ค่าความสว่าง (L^*) ค่าความเป็นสีแดง (a^*) และค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) ของทุกหน่วยทดลองที่ศึกษา มีความแตกต่างจากกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การเติมสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินที่เพิ่มสูงขึ้น จะเป็นผลให้ค่าความสว่างเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าความเป็นสีแดงและค่าความเป็นสีเหลืองมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ซึ่งผลนี้เกิดเนื่องมาจากสีของสารอัลลิซิน ไคโตซานหรือสารประกอบเชิงซ้อนที่เติมลงในไส้กรอก มีสีที่อ่อนกว่าเนื้อหมู เป็นผลให้สีของไส้กรอกที่ได้มีสีที่อ่อนลง

สำหรับค่าความสามารถในการอ้วนน้ำและค่าความชื้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมสารอัลลิซิน หรือไคโตซาน หรือประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน โดยค่าความสามารถในการอ้วนน้ำจะต่ำที่สุดในตัวอย่างที่เติมไคโตซาน ($p \leq 0.05$) อาจเนื่องมาจาก pH ที่ต่ำกว่าของสารละลายไคโตซานก่อนทำแห้ง เป็นผลให้เมื่อทำแห้งแล้วเติมลงในตัวอย่างไส้กรอก จะได้ตัวอย่างที่มี pH ต่ำกว่าตัวอย่างอื่น จึงมีความสามารถในการจับกับน้ำต่ำที่สุดสำหรับตัวอย่างไส้กรอกผสมอัลลิซิน จะมีค่าความสามารถในการอ้วนน้ำไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$) ซึ่งอาจเนื่องมาจากลักษณะของอัลลิซินที่มีความสามารถในการดูดน้ำได้ดี จึงสามารถจับกับน้ำได้ดีกว่า และส่งผลให้มีน้ำอยู่ในตัวอย่างในปริมาณมากและเป็นผลให้ตัวอย่างที่ได้มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ค่อนข้างนุ่มกว่าตัวอย่างไส้กรอกอื่น ๆ ด้วย (ตารางที่ 19) ซึ่งเมื่อพิจารณาตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนพบว่า มีค่าความสามารถในการอ้วนน้ำต่ำลงจากตัวอย่างควบคุม ยกเว้นตัวอย่างที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินในปริมาณที่สูงสอดคล้องกับผลการทดลองของตัวอย่างที่ผสมอัลลิซินเพียงอย่างเดียว ซึ่งเมื่อยิ่งเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินต่อไคโตซานในการผลิตสารประกอบเชิงซ้อนจาก 1:1 เป็น 1:2 และ 1:3 ตามลำดับ จะพบว่า ยังมีค่าความสามารถในการอ้วนน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งให้เห็นถึงผลของการอ้วนน้ำที่เพิ่มขึ้นจากสารอัลลิซิน ซึ่งค่าที่ได้ก็สอดคล้องกับค่าความชื้นของตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมสารประกอบเชิงซ้อนที่มีอัตราส่วนอัลลิซินโดยน้ำหนักเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 19) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงความเชื่อมโยงกับการเสื่อมเสีย ก็พบว่า ตัวอย่างที่ยังมีปริมาณน้ำมาก ก็ยังมีอัตราการเสื่อมเสียที่เร็วขึ้น ดังนั้นตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสม

สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานตัวอย่างที่ 4 (C4) ที่พบว่ามีค่าอัตราการเสื่อมเสียที่ต่ำที่สุดนั้น จึงเป็นตัวอย่างที่มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำและค่าความชื้นต่ำที่สุดไปด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาการยอมรับจากคะแนนความชอบของตัวอย่างจากการทดลองความชอบ 9 point hedonic scaling test ก็พบว่า ตัวอย่างดังกล่าวได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบมากกว่า ตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 20)

จากผลการทดลองในตารางที่ 19 พบว่า การเติมอัลลิซิน หรือโคโตซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ไม่มีผลต่อค่า cohesiveness springiness และ adhesiveness ($p > 0.05$) แต่จะส่งผลต่อค่า hardness gumminess และ chewiness อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยตัวอย่างไส้กรอกหมูควบคุมจะมีเนื้อสัมผัสที่นุ่มที่สุด และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างที่มีการเติมสารอัลลิซิน ($p > 0.05$) ซึ่งเมื่อพิจารณาตัวอย่างทั้งหมด พบว่า ตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมโคโตซาน จะมีเนื้อสัมผัสที่แข็งกระด้างที่สุด ดังจะเห็นได้จากค่าความแข็ง (hardness) ที่สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ซึ่งตัวอย่างที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนจะมีความแข็งต่ำลงตามลำดับ โดยตัวอย่างไส้กรอกหมูที่ผสมกับสารประกอบเชิงซ้อนที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้เนื้อสัมผัสเปลี่ยนแปลงมากขึ้น (ตารางที่ 19) ซึ่งเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบตัวอย่างทั้งหมดจะพบว่า ตัวอย่างไส้กรอกหมูผสมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานตัวอย่างที่ 4 มีค่าต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบ texture profile analysis (hardness, cohesiveness, springiness, gumminess, chewiness and adhesiveness) ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$) ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซาน ตัวอย่างที่ 4 ให้ผลที่ดีที่สุด ทั้งในด้านความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และผลที่มีต่อคุณลักษณะทางด้านกายภาพและเคมีต่าง ๆ อีกทั้งเมื่อพิจารณาร่วมกับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส (ตารางที่ 20-22) จะยิ่งพบว่า ตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่ 4 ได้รับการยอมรับมากที่สุด ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่ 4 เป็นตัวอย่างที่ดีที่สุด ที่พบในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 17 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมอัลลิซิน หรือโคโตซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 (C1-C6) ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก โดยตรวจวัดหลังเตรียมเสร็จทันทีและตรวจวัดต่อเนื่องทุก ๆ 5 วัน เป็นเวลา 15 วัน

Treat- ment	Sample explanation	Day 0		Day 5		Day 10		Day15	
		Total Plate Count (cfu/g)	Yeast and Mold (est. cfu/g)	Total Plate Count (cfu/g)	Yeast and Mold (est. cfu/g)	Total Plate Count (cfu/g)	Yeast and Mold (cfu/g)	Total Plate Count (cfu/g)	Yeast and Mold (est. cfu/g)
1	control	1.4×10^2	<60	3.2×10^5	10 cfu/g	4.2×10^7	6.1×10^2	6.7×10^7	8.0×10^2
2	0.5%allicin	1.25×10^2	<10	5.6×10^4	<10	4.0×10^7	<10	6.6×10^7	<10
3	0.5%chitosan	1.2×10^2	<10	2.4×10^4	<10	3.6×10^6	<10	8.5×10^6	<10
4	0.5%C1	5.0×10	<10	2.4×10^4	<10	2.5×10^6	<10	1.2×10^7	<10
5	0.5%C2	7.0×10	<10	2.9×10^4	<10	9.2×10^6	<10	2.4×10^7	<10
6	0.5%C3	2.0×10	<10	5.9×10^4	<10	8.7×10^6	<10	3.3×10^7	<10
7	0.5%C4	1.0×10	<10	2.3×10^3	<10	1.8×10^5	<10	1.8×10^6	<10
8	0.5%C5	6.0×10	<10	1.5×10^4	<10	3.8×10^5	<10	6.1×10^6	<10
9	0.5%C6	1.0×10	<10	7.8×10^4	<10	3.4×10^5	<10	3.2×10^6	<10

ตารางที่ 18 ค่าสีของตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำด้วยเครื่อง chroma meter ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (%) และค่าความชื้น (%) ด้วยวิธีมาตรฐานของ AOAC ของไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมอัลลิซิน หรือไคโตซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 (C1-C6) ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก

Treatment	Sample Explanation	Color (Core)			Color (Peel)			Water Holding Capacity (%)	Moisture Content (%)
		L*	a*	b*	L*	a*	b*		
1	control	71.07a	2.21de	14.91b	69.69a	0.17a	15.56a	90.12cd	70.57ab
2	0.5%allicin	71.22a	1.45a	15.59b	69.12a	0.85c	15.77a	91.95d	72.23b
3	0.5%chitosan	73.94e	1.84b	14.33a	75.04c	0.29ab	14.92a	87.99a	69.01a
4	0.5%C1	71.81abc	2.31e	14.95b	71.33ab	0.70c	15.54a	89.76bc	70.07ab
5	0.5%C2	71.33ab	2.35e	15.02b	69.24a	0.48bc	15.00a	90.90d	71.77b
6	0.5%C3	72.04bcd	1.95bc	14.48a	73.19b	0.53bc	15.11a	91.04d	69.12a
7	0.5%C4	72.85d	1.87b	14.61a	73.06b	0.37b	15.20a	88.52a	69.18a
8	0.5%C5	72.33cd	2.10cd	14.83b	71.19ab	0.65bc	15.23a	89.65bc	70.42ab
9	0.5%C6	72.69d	2.08cd	14.94b	70.92ab	0.58bc	15.63a	90.58cd	69.69ab

ตารางที่ 19 ลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ได้จาก texture profile analysis ด้วยเครื่อง texture analyzer ของไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมอัลลิซิน หรือ โคโตซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 (C1-C6) ที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก

Treatment	Sample Explanation	Hardness (N)	Cohesiveness	Springiness	Gumminess	Chewiness	Adhesiveness
1	control	48.85a	0.35a	7.40a	17.04a	0.11a	0.0008a
2	0.5%allicin	48.35a	0.33a	7.21a	17.39a	0.10a	0.0004a
3	0.5%chitosan	65.84b	0.35a	8.23a	23.95bc	0.22c	0.0004a
4	0.5%C1	48.70a	0.37a	7.94a	17.71a	0.14ab	0.0004a
5	0.5%C2	55.54ab	0.41ab	8.04a	22.63bc	0.18bc	0.0008a
6	0.5%C3	64.47b	0.40ab	7.54a	25.58c	0.20c	0.0008a
7	0.5%C4	50.50a	0.41ab	8.12a	20.64ab	0.17ab	0.0001a
8	0.5%C5	57.15ab	0.39ab	8.01a	22.17bc	0.18bc	0.0004a
9	0.5%C6	55.37ab	0.45b	8.16a	24.68bc	0.20c	0.0004a

3.2.2.3 การศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่เตรียมได้

จากผลการทดลองในข้อ 3.2.2.1 และ 3.2.2.2 พบว่า สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ที่ให้ผลในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ในไส้กรอกหมูไขมันต่ำได้ดีที่สุด และให้ผลทางด้านคุณลักษณะทางเคมีและกายภาพไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม คือ สารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่ 4 (C4) ดังนั้นจึงได้คัดเลือกตัวอย่างนี้มาทำการศึกษาคคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ เปรียบเทียบกันระหว่างตัวอย่างไส้กรอกควบคุม และตัวอย่างไส้กรอกที่ผสม อัลลิซิน หรือโคโคซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนที่ความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก เพื่อเป็นการลดจำนวนตัวอย่างลง ซึ่งจากการทำการทดสอบโดยใช้แบบสอบถามความชอบแบบ 9-point hedonic scale ทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏและความชอบโดยรวมของตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่าง กับกลุ่มผู้บริโภคที่มีความชอบในการรับประทานไส้กรอกจำนวน 30 คน พบว่า ตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมสารประกอบเชิงซ้อน 0.5% โดยน้ำหนัก จะได้รับคะแนนสูงที่สุดในทุก ๆ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส และได้รับคะแนนความชอบโดยรวมอยู่ในระดับชอบเล็กน้อย และเมื่อเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผ่านไปเป็นเวลา 7 วัน พบว่าคะแนนความชอบในทุกคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของทุกตัวอย่าง มีค่าต่ำลง แสดงถึงการยอมรับที่ลดน้อยลง ซึ่งตัวอย่างที่ยังคงมีผลคะแนนความชอบโดยรวมอยู่ในระดับชอบเล็กน้อย คือ ตัวอย่างไส้กรอกผสมสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งจากผลการทดลองส่วนนี้ แสดงให้เห็นว่า สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน มีความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้ และส่งผลให้การเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ อันเนื่องมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่น การเกิดกลิ่นเหม็นเน่า การเกิดเมือก เป็นต้น เกิดได้ช้าลง ทำให้ไส้กรอกมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นได้ ซึ่งเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ผ่านไปเป็นเวลา 15 วัน ก็พบว่า ตัวอย่างไส้กรอกควบคุม ได้รับผลคะแนนต่ำมากที่สุด และได้รับคะแนนความชอบโดยรวมอยู่ในระดับไม่ชอบ แสดงถึงการเสื่อมเสียและการไม่ยอมรับของผู้บริโภคต่อตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้ ระหว่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่เติม อัลลิซิน หรือโคโคซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-โคโคซาน ก็พบว่า คะแนนที่ได้รับของตัวอย่างที่ผสมอัลลิซิน ต่ำกว่า ตัวอย่างที่ผสมโคโคซานและต่ำกว่าตัวอย่างที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อน ตามลำดับ ซึ่งคะแนนความชอบโดยรวมของตัวอย่างไส้กรอกที่มากที่สุดคือ ตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อน โดยมีผลคะแนนอยู่ในระดับเฉย ๆ จากผลการทดลองในตารางที่ 20 21 และ 22 ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของการยอมรับของผู้ทดสอบ และเมื่อทำการเก็บรักษาตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำทั้งหมดเป็นเวลา 15 วัน ก็จะได้เห็นว่า ผู้บริโภคไม่ยอมรับผลิตภัณฑ์ รวมทั้งเมื่อพิจารณาผลการทดลองร่วมกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และยีสต์และรา ก็จะได้เห็นว่า มีปริมาณเกินกว่ามาตรฐานอาหารที่บริโภคได้ (ต้องมีค่าน้อยกว่า 10^6 cfu/g) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่าง

ใส่กรอกหมูไขมันต่ำสามารถมีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่ได้ทำการบรรจุแบบสุญญากาศ ได้เป็นระยะเวลาประมาณ 15 วัน

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ใส่กรอกหมูไขมันต่ำหลังเตรียมเสร็จสิ้น โดยใช้แบบสอบถามความชอบแบบ 9-point hedonic scale

Treatment	Sensory Characteristics				
	Color	Odor	Texture	Appearance	Overall Liking
Control	6.77ab	5.87a	6.20b	6.90a	6.50b
0.5% allicin	6.50a	6.55b	5.30a	6.75a	5.97a
0.5% chitosan	5.73a	5.67a	5.53a	6.77a	5.83a
0.5%allicin-chitosan complex	7.03b	6.53b	6.75b	7.10ab	6.73b

ตารางที่ 21 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ใส่กรอกหมูไขมันต่ำหลังเตรียมเสร็จ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้แบบสอบถามความชอบแบบ 9-point hedonic scale

Treatment	Sensory Characteristics				
	Color	Odor	Texture	Appearance	Overall Liking
Control	5.57	4.34	5.12	4.40	5.45
0.5% allicin	6.35	4.57	5.10	5.27	5.15
0.5% chitosan	5.10	4.33	4.93	6.07	5.37
0.5%allicin-chitosan complex	6.87	5.97	6.65	6.97	6.51

ตารางที่ 22 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำหลังเตรียมเสร็จ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน โดยใช้แบบสอบถามความชอบแบบ 9-point hedonic scale

Treatment	Sensory Characteristics				
	Color	Odor	Texture	Appearance	Overall Liking
Control	3.73	3.20	4.37	3.83	3.87
0.5% allicin	5.32	3.97	4.50	4.71	4.97
0.5% chitosan	5.23	4.12	4.67	4.40	5.02
0.5%allicin-chitosan complex	6.03	4.93	5.27	5.42	5.27

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากผลการทดลองทั้งหมดด้านบนสามารถสรุปได้ว่า ไคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเป็นสารช่วยจับสารสกัดต่าง ๆ ที่ไม่เสถียร เช่น สารอัลลิซินที่สกัดจากกระเทียมได้ ด้วยกระบวนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (polyelectrolyte complexation) ทั้งนี้สภาวะที่เหมาะสมของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนคือ อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซาน (น้ำหนักโมเลกุล 1.02×10^6 dalton และ 88 %DD) ต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 โดยระยะเวลาในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนโดยสมบูรณ์คือ 48 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส จากผลการทดสอบความไวในการออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด พบว่า ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ตัวอย่างที่ 4 ให้ผลที่ดีที่สุด ทั้งในด้านความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และผลที่มีต่อคุณลักษณะทางด้านกายภาพและเคมีต่าง ๆ ของไส้กรอกหมูไขมันต่ำ อีกทั้งเมื่อพิจารณาพร้อมกับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส จะยังพบว่า ตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่ 4 ได้รับการยอมรับมากที่สุด ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนตัวอย่างที่ 4 เป็นตัวอย่างที่ดีที่สุด ที่พบในงานวิจัยนี้ และความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0.5% โดยน้ำหนัก ไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผลิตได้มีอายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เท่ากับ 15 วัน โดยที่ไม่จำเป็นต้องบรรจุแบบสุญญากาศ

ภาคผนวก

-

เอกสารอ้างอิง

- พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข
- คิวาพร คิวเวช 2535. วัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม
การเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม.
- คิวาพร คิวเวช 2546. วัตถุเจือปนอาหาร (เล่ม 1). โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม
การเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.
- Ankri, S., and, Mirelman, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection. 2:125-129.
- Argin-Soysal, S. Kofinas, P., and Lo, Y.M. 2009. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. Food Hydrocolloids. 23: 202–209.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 1995. Official methods of analysis. 13th ed. Washington DC: Association of Official Analysis Chemists.
- Aymerich, T., Picouet, P.A., and Monfort, J.M. 2007. Decontamination technologies for meat products. Meat Science. (In press).
- Barbut, S. 2006. Effects of casein, whey and milk powders on the texture and microstructure of emulsified chicken meat batters. LWT-Food Science and Technology. 39(6): 660-664.
- Bernués, A., Olaizola, A., and Corcoran, K. 2003. Labelling information demanded by European consumers and relationships with purchasing motives, quality and safety of meat. Meat Science. 65: 1095-1106.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., Phatchrat, S., and Tanaka, M. 2003. Chitosan affects transglutaminase-induced surimi gelation. Journal of Food Biochemistry. 27: 53-66.
- Bigucci, F., Luppi, B., Cerchiarac, T., Sorrenti, M., Bettinetti, G., Rodriguez, L., and Zecchi, V. 2008. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. European journal of pharmaceutical sciences. 35: 435–441.

- Busatta, C., Vidal, R.S., Popiolski, A.S., Mossi, A.J., Dariva, C., Rodrigues, M.R.A., Corazza, F.C., Corazza, M.L., Vladimir Oliveira, J., and Can sian, R.L. (In press). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology.
- Curtis, H., Noll, U., Störmann, J., and Slusarenko, A.J. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiological and Molecular Plant Pathology. 65: 79–89.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., and Devere, J. 2004. New preservation technology: possibilities and limitations. International Dairy Journal. 14: 273-285.
- Fernández-López, J., Zhi, N., Aleson-Carbonell, L. Pérez-Alvarez, J.A., and Kuri, V. 2005. Antioxidant and antimicrobial activities of natural extracts: application in beef meatballs. Meat Science. 69: 371-380.
- Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., and Fletouris, D.J. 2007a. Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers. Meat Science. 75: 256–264.
- Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S.A. 2007b. Effect of rosemary extract, chitosan, and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausage stored at 4 °C. Meat Science. 76: 172-181.
- Giatrakou, V., Ntzimani, A., and Savvaidis, I.N. 2010. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. Food Microbiology. 27: 132–136.
- Gómez-Guillén, M.C., Montero, P., Solas, M.T., and Pérez-Mateos, M. 2005. Effect of chitosan and microbial transglutaminase on the gel forming ability of horse mackerel (*Trachurus* spp.) muscle under high pressure. Food Research International. 38: 103-110.
- Grohs, B.M., and Kunz, B. 2000. Use of mixtures for the stabilization of fresh portioned pork. Food Control. 11: 433-436.
- Honikel, K.O., and Hamm, R. 1994. Measurement of water-holding capacity and juiciness. In A.M. Pearson and T.R. Dutson (eds.). Advances in meat research-Volume 9 Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products, pp. 125-161. Glasglow: Blackie Academic and Professional.
- Hugas, M., Garriga, M., and Aymerich, M.T. 2003. Functionality of enterococci in meat products. International Journal of Food Microbiology. 88: 223-233.

- Hugerth, A., Caram-Lelham', N. and Sundeliir, L.O. 1997. The effect of charge density and conformation on the polyelectrolyte complex formation between carrageenan and chitosan. Carbohydrate Polymers. 34: 149-156.
- Jeon, Y.J., Park, P.J., and Kim, S.K. 2001. Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. Carbohydrate Polymers. 44: 71-76.
- Juneja, V.K., Thippareddi, H., Bari, L., Inaysu, Y., Kawamoto, S., and Friedman, M. 2006. Chitosan protects cooked ground beef and turkey against *Clostridium perfringens* spores during chilling. Journal of Food Science. 71(6): M236-M240.
- Kachanechai, T., Jantawat, P. and Pichyangkura, R. 2008. The influence of chitosan on physico-chemical properties of chicken salt-soluble protein gel. Food Hydrocolloids. 22: 74-83.
- Kok, T.N., and Park, J.W. 2007. Extending shelf life of set fish ball. Journal of Food Quality. 30: 1-27.
- Kotula, A.W., Berry, B.W., and Emswiler-Rose, B.S. 1987. Microbiology of restructured meat and poultry products. Advances in meat research-Volume 3 Restructured meat and poultry products, pp. 79-93. New York: AVI Publishing.
- Kim, J.W., and Kyung, K.H. 2003. Antiyeast activity of heated garlic in absence of alliinase enzyme action. Journal of Food Science. 68(5): 1766-1770.
- Lemay, M.J., Choquette, J., Delaquis, P.J., Gariépy, C., Rodrigue, N., and Saucier, L. 2002. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooked and acidified chicken model. International Journal of Food Microbiology. 78: 217-226.
- Lertsuriwong, P., How, N. C., Chandkrachang, S., and Stevens, W.F. 2002. Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan. Journal of Metals, Materials and Minerals. 12(1): 11-18.
- Li, B., Peng, J., Yie, X., and Xie, B. 2006. Enhancing physical properties and antimicrobial activity of Konjac glucomanan edible films by incorporating chitosan and nisin. Journal of Food Science. 71(3): C174-C178.
- Liu, H., Du, Y., Yang, J., and Zhu, H. 2004. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivative complex. Carbohydrate Polymers. 55: 291-297.
- López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C., Pérez-Mateos, M., and Montero, P. 2005. A functional chitosan-enriched fish sausage treated by high pressure. Journal of Food Science. 70(3): M166-M171.
- Macdougall, D.B. 1994. Colour of meat. In A.M. Pearson and T.R. Dutson (eds.). Advances in meat research-Volume 9 Quality attributes and their measurement

- in meat, poultry and fish products, pp. 79-93. Glasglow: Blackie Academic and Professional.
- Marshall, D.L., and Bal'a, M.F.A. 2001. Microbiology of meats. In Y.H. Hui, W.K. Nip, R.W. Rogers, and O.A. Young (eds.). Meat Science and Applications, pp. 149-170. New York: Marcel Dekker.
- Mi, F.L., Sung, H.W., and Shyu, S.S. 2002. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. Carbohydrate Polymers. 48: 61-72.
- Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilchek, M., and Rabinkov, A. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. Analytical Biochemistry. 307: 76-83.
- Muzzarelli, R.A.A., and Rocchetti, R. 1997. Methods for the determination of the degree of acetylation of chitin and chitosan. In R.A.A. Muzzarelli, and M.G. Peter (eds.). Chitin Handbook, pp. 109-119. Italy: Atec Edizioni.
- Natress, F.M., Yost, C.K., and Baker, L.P. 2001. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. 70: 111-119.
- Ngapo, T. M., Martin, J. -F., and Dransfield, E. 2004. Consumer choices of pork chops: results from three panels in France. Food Quality and Preference. 15(4): 349-359.
- No, H.K., Meyers, S.P., Prinyawiwatkul, W., and Xu, Z. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. Journal of Food Science. 72(5): R87-R100.
- Ou, C.Y., Zhang, C.H., Li, S.D., Yanga, L., Donga, J.J., Moa, X.L., and Zenga, M.T. 2010. Thermal degradation kinetics of chitosan-cobalt complex as thermogravimetric analysis. Carbohydrate Polymers. 82: 1284-1289.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. Meat Science. 73: 236-244.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., and Holley, R.A. 2000a. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. Journal of Food Science. 65(5): 768-773.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A., and Holley, R.A. 2000b. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial

- films prepared with chitosan. International Journal of Food Microbiology. 62: 139-148.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K., and Solokhe, V.M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. LWT. 38: 859-865.
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., and Du, Y. 2006. Water-solubility of chitosan and its microbial activity. Carbohydrate Polymers. 63(3): 367-374.
- Rao, M.S., Chander, R., and Sharma, A. 2005. Development of shelf-stable intermediate-moisture meat products using active edible chitosan coating and irradiation. Journal of Food Science. 70(7): M325-M331.
- Resurreccion, A.V.A. 2003. Sensory aspects of consumer choices for meat and meat products. Meat Science. 66: 11-20.
- Rosca, C., Popa, M.I., Lisa G., and Chitanu, G.C. 2005. Interaction of chitosan with natural or synthetic anionic polyelectrolytes. 1. The chitosan–carboxymethylcellulose complex. Carbohydrate Polymers. 62: 35–41.
- Sadler, M.J. 2004. Meat alternatives-market developments and health benefits. Trends in Food Science and Technology. 15: 250-260.
- Sagoo, S.K., Board, R., and Roller, S. 2002. Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeast. Letters in Applied microbiology. 34: 168-172.
- Sallam, Kh.I., Ishioroshi, M., and Samejima, K. 2004. Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. LWT. 37: 849-855.
- Sankalia, M.G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M., and Sutariya, V. B. 2007. Reversed chitosan–alginate polyelectrolyte complex for stability improvement of alpha-amylase: Optimization and physicochemical characterization. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 65: 215–232.
- Sebranek, J.G., and Bacus, J. 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issue? Meat Science. 77: 136-147.
- Sebti, I., Martial-Gros, A., Carnet-Panties, A., Grelier, S., and Coma, V. 2005. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* Contamination. Journal of Food Science. 70(2): M100-M104.
- Shelef, L.A. 1983. Antimicrobial effects of spices. Journal of Food Safety. 6: 29-44.
- Shibasaki, I. 1982. Food preservation with nontraditional antimicrobial agents. Journal of Food Safety. 4: 35-58.

- Shu, X.Z., and Zhu, K.J. 2000. A novel approach to prepare tripolyphosphate:chitosan complex beads for controlled release drug delivery. International Journal of Pharmaceutics. 201: 51–58.
- Sofia, P.K., Prasad, R., Vijay, V.K., and Srivastava, A.K. 2007. Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common foodborne pathogens. International Journal of Food Science and Technology. 42:910-915.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., and Botsoglou, N. (In press.) The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. Food Microbiology.
- Takeuchi, H., Yasuji, T., Yamamoto, H., and Kawashima, Y. 2000. Spray-dried lactose composite particles containing an ion complex of alginate-chitosan for designing a dry-coated tablet having a time-controlled releasing function. Pharmaceutical Research. 17(1): 94-99.
- Terbojevich, M., and Cosani, A. 1997. Molecular weight determination of chitin and chitosan. In R.A.A. Muzzarelli, and M.G. Peter (eds.). Chitin Handbook, pp. 109-119. Italy: Atec Edizioni.
- Theivendran, S., Hettiarachchy, N.S., and Johnson, M. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. Journal of Food Science. 71(2): M39-M44.
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., and Alagui, A. 2003. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. Polymer. 44(26): 7939-7952.
- Tolstoguzov, V.B. 1997. Protein-polysaccharide interactions. In S. Damodaran and A. Paraf (eds.). Food proteins and their applications, pp. 171-198. New York: Marcel Dekker.
- Turgeon, S.L., Schmitt, C., and Sanchez, C. 2007. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. Current Opinion in Colloid & Interface Science. 12(4-5), 166-178.
- Työppönen, S., Petäjä E., and Mattila-Sandholm, T. 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausage. International Journal of Food Microbiology. 83: 233-244.
- Umemura, K., and Kawai, S. 2007. Modification of chitosan by the Maillard reaction using cellulose model compounds. Carbohydrate Polymers. 68: 242–248.
- Vernam, A.H., and Sutherland, J.P. Meat and meat products: Technology, chemistry and microbiology, pp. 121-166. Great Britain: Chapman & Hall.

- Wang, X., Du, Y., and .Liu, H. 2004. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex. Carbohydrate Polymers. 56: 21–26.
- Winterowd, J.G. and Sandford, P.A. 1995. Chitin and chitosan. In M.S. Alistair (ed.), Food polysaccharides and their applications, pp. 441-462. New York: Marcel Dekker.
- Yin, M.C., and Cheng, W.S. 2003. Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. Meat Science. 63: 23-28.
- Zivanovic, S., Chi, S., and Draghorn, A.F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. Journal of Food Science. 70(1): M45-M51.
- Zheng, L.Y., and Zhu, J.F. 2003. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. Carbohydrate Polymers. 54(4): 527-530.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ ตามที่คาดว่าจะได้ในสัญญาโครงการ
 - ชื่อเรื่อง Applications of allicin-chitosan complex as antimicrobial agent in low fat pork sausage and its effect on product quality and shelf life ซึ่งอยู่ระหว่างการเขียนและตรวจแก้ เพื่อส่ง submit ในวารสาร Meat Science หรือ International Journal of Food Science and Technology ต่อไป
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ
 - การเสนอผลงานภาคบรรยาย (Oral presentation) ในงานประชุมวิชาการ The 10th International Hydrocolloids Conference ณ Shanghai Jiao Tong University (SJTU), Shanghai ประเทศจีน ระหว่างวันที่ 19-24 มิถุนายน 2553