## *ส่วนที่ 2* รายงานฉบับสมบูรณ์ (ร่าง) ของโครงการวิจัย (Project)

## โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

### คำนำ

เนื่องมาจากไคโตซาน (chitosan) ที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง เป็นสารที่สกัดได้มาจากสารโพลีเมอร์ธรรมชาติ “ไคติน (chitin)” ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่มากเป็นอันดับสองของโลก และสามารถสกัดได้ง่าย มีวิธีการสกัดไม่ซับซ้อนและปลอดภัย ซึ่งเปลือกกุ้งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตกุ้งปอกเปลือกแช่เยือกแข็งเพื่อส่งออก ซึ่งประเทศไทยมีอยู่มากและมีปัญหาในการกำจัดทิ้ง ดังนั้น หากมีการนำมาศึกษาและสกัดเป็นไคตินหรือไคโตซาน ก็จะเป็นผลดีอย่างมากในการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งได้ และด้วยเหตุผลนี้เอง จึงทำให้การผลิตไคโตซานไม่มีปัญหาในด้านวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการผลิต และสามารถใช้ในการพัฒนาเป็นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป ซึ่งอันที่จริงแล้ว ไคโตซานเป็นสารธรรมชาติที่มีความสามารถในการต่อต้านและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และราหลายชนิดได้เป็นอย่างดี แต่ไคโตซานมีปัญหาในด้านการละลาย ไคโตซานสามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์บางชนิดเท่านั้น อาทิเช่น กรดน้ำส้ม หรือกรดแลคติก เป็นต้น ซึ่งเป็นผลให้ไม่สามารถประยุกต์ใช้ไคโตซานลงในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดที่มี pH เป็นกลางได้ เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปจำพวก ไส้กรอก แฮมและลูกชิ้น เป็นต้น ซึ่งวิธีหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหานี้ได้คือ การตัดสายโมเลกุลของไคโตซานให้มีความยาวสายสั้นลง จะทำให้ได้ไคโตซานที่มีสายสั้น ๆ หรือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีความสามารถในการละลายน้ำดีขึ้น ซึ่งกระบวนการนี้สามารถเพิ่มการละลายได้ดี แต่ก็ทำให้ความสามารถในการยับยั้งหรือต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ลดต่ำลงกว่าความสามารถของไคโตซานเป็นอย่างมาก ดังนั้น หากมีงานวิจัยที่สามารถศึกษาถึงลักษณะโครงสร้าง รวมทั้งความยาวสายที่เหมาะสมของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีความสามารถในการละลายมากพอที่จะประยุกต์ใช้ได้ง่ายในอุตสาหกรรม และยังคงความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีไว้ได้ ก็น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งที่ทำให้ได้สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้จริงในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์แปรรูปได้

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2552 จากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

# บทที่ 1 บทนำ

ในปัจจุบัน ความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้เปลี่ยนแปลงไป โดยผู้บริโภคให้ความสนใจและตระหนักถึงปัญหาสุขภาพที่อาจเกิดเนื่องจากการบริโภคอาหารที่ไม่มีคุณภาพและไม่ถูกต้องตามหลักโภชนาการเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นผลให้ผู้บริโภคตัดสินใจเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูง ปลอดภัย ได้มาตรฐาน และมีคุณประโยชน์ทางด้านโภชนาการ จากรายงานการสำรวจตลาดหลายรายงานได้พบว่า ตลาดของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อสุขภาพและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อินทรีย์มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น และมีอัตราการเติบโตอย่างรวดเร็วในปี 2006 โดยเฉพาะในตลาดต่างประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และกลุ่มประเทศยุโรป (Aymerich, Picouet and Monfort, 2007; Sebranek and Bacus, 2007) ซึ่งผลการรายงานพบว่าผู้บริโภคจะให้ความตระหนักเป็นอย่างมาก เกี่ยวกับความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ และความปลอดภัยในการใช้วัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ รวมทั้งผลต่อเนื่องในระยะยาวต่อสุขภาพ (Resurreccion, 2003; Bernués, Olaizola and Corcoran, 2003; Ngapo, *et al*., 2003; Sadler, 2004) ซึ่งปัจจัยทั้งหมดนี้ เป็นแรงผลักดันให้ผู้ผลิตมีความจำเป็น ที่จะต้องปรับเปลี่ยนแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ให้สอดคล้องต่อความต้องการของกลุ่มผู้บริโภคดังกล่าวที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ

เนื่องมาจากผลิตภัณฑ์ลูกชิ้น เป็นผลิตภัณฑ์ที่คนไทยนิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู ทั้งที่รับประทานเป็นอาหารว่างและเป็นส่วนประกอบในอาหารชนิดอื่น เช่น ก๋วยเตี๋ยว เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ชนิดนี้มักจะพบปัญหาการเน่าเสียอันเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย (spoilage bacteria) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) เป็นผลให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษาสั้น และมีระยะเวลาในการวางจำหน่ายผลิตภัณฑ์ได้ไม่นานเท่าที่ควร ด้วยสาเหตุนี้เอง ทำให้ผู้ผลิตมักจะลักลอบใช้วัตถุกันเสียจำพวกสารเคมีที่กฎหมายห้ามมิให้เติมลงในผลิตภัณฑ์ อาทิเช่น กรดเบนโซอิกและเกลือของกรดเบนโซอิก เพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษานานขึ้น นอกจากนี้สารเคมีหลายชนิดที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม อาทิเช่น สารไน

เตรตและไนไตรต์ (nitrate and nitrite) อาจมีผลข้างเคียงต่อสุขภาพในระยะยาวของผู้บริโภคได้ ดังนั้น การค้นคว้าและพัฒนาสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงจากสารสกัดธรรมชาติ เพื่อช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยทั้งในด้านความปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ และในด้านความปลอดภัยจากวัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมี อีกทั้งยังมีผลดีในการช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้ยาวนานขึ้น และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะที่ดีตรงตามความต้องการของผู้บริโภค จึงเป็นสิ่งจำเป็นและเป็นที่ต้องการอย่างมากในอุตสาหกรรมผลิตลูกชิ้นในประเทศไทย

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อพัฒนาวัตถุกันเสียจากธรรมชาติ (natural preservative) โดยคัดเลือกที่จะศึกษาและพัฒนาไคโตซานซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง เนื่องมาจากไคโตซานมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีมากและสามารถผลิตได้ง่าย วิธีการผลิตไม่ซับซ้อนและมีต้นทุนการผลิตต่ำ เพราะเปลือกกุ้งเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่พบมากในอุตสาหกรรมผลิตกุ้งแช่เยือกแข็งเพื่อส่งออก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะการศึกษาคุณลักษณะของไคโตซานที่เหมาะสมในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู และพัฒนาไคโตซานให้มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ที่ดี โดยจะแก้ไขปัญหาความสามารถในการละลายของไคโตซาน ที่ละลายเฉพาะในตัวทำละลายที่เป็นกรดอินทรีย์ ด้วยการตัดสายโมเลกุลด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เพื่อให้ได้ไคโตซานที่มีความยาวสายสั้นลงและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 30,000 Dalton หรือเรียกว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosacchrides) ซึ่งจะทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility) ที่ดี นอกจากนี้ยังจะศึกษาผลของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมี และอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูที่ผลิตขึ้นอีกด้วย

## วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาชนิดของเอนไซม์ (cellulase, β-amylase และ pectinase) สภาวะและกระบวนการผลิต (อุณหภูมิ เวลา ค่าความเป็นกรดด่างหรือค่า pH และสัดส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต) ที่เหมาะสม ในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคโตซานที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง
2. ศึกษาคุณสมบัติทางภายภาพ (สี) และคุณสมบัติทางเคมี (ระดับในการดึงหมูอะเซททิลออกจากโมเลกุล หรือ degree of deacetylation, DD น้ำหนักโมเลกุลและความชื้น หรือ moisture content, MC) ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้
3. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู
4. ศึกษาผลของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ (สี เนื้อสัมผัส และความสามารถในการอุ้มน้ำหรือ water holding capacity, WHC) คุณสมบัติทางด้านเคมี (ค่า pH และ ปริมาณความชื้น ) และอายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู

# บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

## *เนื้อสัตว์และการเสื่อมเสียด้วยเชื้อจุลินทรีย์*

เนื้อสัตว์เป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่าย (perishable food) ชนิดหนึ่ง เนื่องจากเนื้อสัตว์มีความชื้นสูงถึงร้อยละ 50-75 มีค่า water activity ($A_w$) มากกว่า 0.99 มี pH 5.4-5.6 และมีธาตุอาหารพวกไนโตรเจน แร่ธาตุและไวตามินที่อุดมสมบูรณ์ อีกทั้งยังมีลักษณะทางกายภาพเหมาะสมคือลักษณะโดยทั่วไปของเนื้อมีช่องว่างและโพรงอากาศมากมายที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถแทรกอยู่ได้ 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.*, *Achromobactor spp*.

โดยทั่วไปจุลินทรีย์เป็นสาเหตุใหญ่ประการหนึ่งที่ทำให้เกิดการเหม็นหืน แต่ไม่ค่อยสำคัญมากในเนื้อ เพราะสารประกอบต่างๆ ที่ได้จากการย่อยสลายของไขมัน จะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หลาย ๆ ชนิด โดยเฉพาะสารพวกเปอร์ออกไซด์ (peroxides) ที่เกิดขึ้นระหว่างการออกซิเดชันของกรดไขมัน จะเป็นพิษอย่างยิ่งต่อจุลินทรีย์ และนอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักอีกด้วย และพบว่าเอนไซม์จากแบคทีเรียสามารถย่อยโปรตีนได้ดีกว่า

ดังนั้นกลิ่นและรสต่าง ๆ ที่เกิดจากการย่อยโปรตีนหรือกลิ่นเหม็นเน่า จึงบดบังกลิ่นและรสที่เกิดการกระบวนการเติมออกซิเจนหรือกลิ่นเหม็นหืนจนหมด แต่ถ้าเป็นเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำ ๆ ซึ่งไม่เหมาะกับกระบวนการย่อยโปรตีน กลิ่นและรสที่เกิดจากการเติมออกซิเจนจะเด่นชัดขึ้น

2. เกิดการเหม็นเน่า (putrefaction) เกิดจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ (proteolytic bacteria) เช่น *Proteus sp., Clostridium perfringens, Pseudomonas sp.*จะไปย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนหรือสายเปปไทด์หรือกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในเนื้อสัตว์ ทำให้เกิดเป็นสารที่ระเหยได้ ได้แก่ พวกไฮโดรเจนซัลไฟด์(hydrogen sulphide) เมอร์แคปแตน (mercaptans) อินโดล (indoles) แอมโมเนีย(ammonia) เอมีน(amines)และอื่น ๆ เกิดเป็นกลิ่นเหม็นเน่าขึ้นมา เช่น การเกิด bone-taint หรือ bone-souring ซึ่งมักเกิดกับบริเวณใกล้ ๆ กระดูก ซึ่งได้รับความเย็นไม่เพียงพอ

histidine decarboxylase

histidine ⟶ histamine

3. การเกิดก๊าซและรสเปรี้ยว (gassing and souring) เกิดจากแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการอากาศ(anaerobic bacteria) เช่น พวก lactic acid bacteria ชนิดต่าง ๆ, *Streptococcus faecium*, *Streptpcoccus 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., Achromobactor sp.* ในเนื้อสัตว์ที่แขวนไว้ในห้องเย็นที่มีความชื้นสูง แต่ถ้ามีความชื้นต่ำในห้องเย็นจะพบพวก micrococcus

เช่น *Microbacterium thermosphactum* หรือ *Streptococcus sp.* หรือยีสต์ปะปน เช่น ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกสุกพวกแฟรงค์เฟอร์เตอร์และโบโลญ่า

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่บรรจุแบบสุญญากาศมักไม่ค่อยพบการเน่าเสียในลักษณะนี้ เพราะการปนเปื้อนของ anaerobic bacteria ในธรรมชาติมีน้อยกว่าพวก aerobic bacteria และพวก aerobic bacteria โดยปรกติจะผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรียเหล่านี้จะมีผลยับยั้งการเจริญของพวก anerobic bacteria ด้วย แต่ถ้าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาสภาพสุญญากาศ มีการปนเปื้อนจาก anaerobic bacteria ขึ้น และเก็บรักษาไว้ในชั่วระยะเวลาหนึ่งก็อาจเกิดการเน่าเสียที่สังเกตได้ เป็นเมือกสีขาวคล้ายน้ำนม (whitish liquid) ในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุธรรมดา เมือกของแบคทีเรียจะปรากฏเห็นเป็นรูปลูกปัดเล็ก ๆ ละเอียด แตะดูจะเป็นยางเหนียว และมีกลิ่นเหม็น (off odor) บางครั้งมองเห็นคล้ายยีสต์

5. การเกิดสีต่าง ๆ บนผิวหน้า (discoloration) ของชิ้นเนื้อ เกิดเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่เจริญเติบโตแล้วสร้างเม็ดสีขึ้นมา ทำให้มองเห็นเป็นจุดสีต่าง ๆ เช่น จุดสีแดงจาก *Serratia marcescens* จุดสีฟ้าจาก *Pseudomonas syncyanea* จุดสีน้ำเงินแกมเขียวหรือดำแกมน้ำตาลจาก *Chromobacterium lividum* เป็นต้น

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

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

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

6.3 การเกิดวงแหวนสีเขียว (green ring) คือ การเกิดวงแหวนสีเขียวขึ้นภายในไส้กรอกที่ช่วงความลึก 2-3 มิลลิเมตร จากผิวหน้าของไส้กรอก ปกติแล้วไม่ค่อยพบ สาเหตุที่ทำให้เกิดยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่ามักเกิดกับผลิตภัณฑ์ที่ใช้วัตถุดิบ ซึ่งมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์มาก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายในระหว่างการอบและรมควัน แต่สิ่งที่ได้จากกระบวนการเมตาโบลิซึมของจุลินทรีย์ยังคงอยู่ ได้แก่ เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้น และสามารถออกซิไดซ์เม็ดสีได้ จะเกิดมีปฏิกิริยาต่อไปได้ ประกอบกับสภาพต่าง ๆ เหมาะสม ทำให้ hemochrome เปลี่ยนแปลงไปเป็น verdoheme ทำให้เกิดเป็นวงแหวนสีเขียวขึ้น โดยปกติการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นภายใน 1-2 วัน หลังจากทำไส้กรอกเสร็จ ซึ่งไม่สามารถสังเกตเห็นได้ จนกระทั่งทำการผ่าหรือตัดออกดูภายใน

นอกจากนี้ยังอาจเกิดการซีดจางของสี (color degradation) ได้ เนื่องจากการเก็บที่อุณหภูมิสูงและการที่สุขลักษณะในการผลิตไม่ดี ทำให้มีแบคทีเรียเริ่มต้นสูง และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิสูงแบคทีเรียก็ยิ่งเจริญเติบโตได้ดี และผลิตสารประกอบที่สามารถทำลายเม็ดสีได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus viridescens, Leuconostoc spp*. เป็นต้น

7. การเกิดเชื้อราที่ผิวหน้า โดยทั่วไปเป็นเชื้อราพวก *Cladosporium* ทำให้เกิดจุดสีดำ *Thamnidium, Muco* , หรือ *Rhizopus* ทำให้เกิด " whisker " ที่ผิวหน้าของเนื้อวัว *Penicillium* ทำให้เกิด green patch และ *Sporotrichum* ทำให้เกิดจุดสีขาว มักพบในเนื้อที่ตัดแบ่งครึ่งหรือแบ่งสี่ที่

เก็บรักษาในห้องเย็น ที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียส เพื่อการบ่มเนื้อให้นุ่ม (aging) วัตถุประสงค์ของการบ่มเนื้อเพื่อให้เนื้อมีความนุ่มตามต้องการและมีการผลิตกลิ่นรสเฉพาะขึ้นเรียกว่า “aged flavor” ซึ่งยังไม่มีการสำรวจหรือตรวจหาจุลินทรีย์พวกนี้ในเนื้อว่าทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น หรือมีกลิ่นของเนื้อเพิ่มมากขึ้นอย่างไร แต่การขึ้นราในเนื้อเป็นผลให้ต้องตัดแต่งเนื้อทิ้งไป เมื่อจะนำไปทำผลิตภัณฑ์อื่นต่อไป ตารางที่ 1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

**ตารางที่** 1 จุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เน่าเสีย

| ผลิตภัณฑ์ | จุลินทรีย์ | ชนิดของการเน่าเสีย |
|---|---|---|
| เนื้อสด | *Pseudomonas*<br>*Achromobactor*<br>*Flavobacterium*<br>.....<br>*Lactobacillus*<br>*Microbacterium*<br>*Micrococcus* | มีเมือกเปลี่ยนเป็นสีเขียว มีรงควัตถุที่เรืองแสง<br>มีจุดสีขาว หรือจุดสี ซึ่งเป็นโคโลนีของแบคทีเรีย<br>.....<br>เกิดเมือกหรือลักษณะเหนียว รสเปรี้ยว หรือเน่าเสีย |
| ---------- | ---------- | ---------- |
| | *Achromobacter*<br>*Pseudomonas*<br>*Bacillus*<br>*Lactobacillus* | รสเปรี้ยว |

| | | |
|---|---|---|
| | ..... | ..... |
| เนื้อที่ผ่านการแปรรูป | *Streptococcus* | เกิดก๊าซ ชิ้นเนื้อมีอาการบวม เปลี่ยนเป็นสีเขียว |
| แฮมที่ผ่านการหมักเกลือ | *Clostridium* | |
| | ..... | ..... |
| | *Micrococcus* | มีเมือกตรงผิวหน้า |
| | *Microbacterium* | |
| | *Yeasts* | |
| | ---------- | ---------- |
| ---------- | *Streptococcus* | เกิดเมือก มีจุดสีขาวหรือจุดสี |
| | *Molds* | |
| | ..... | ..... |
| | *Lactobacillus* | มีรสเปรี้ยวเล็กน้อยในเบคอนที่บรรจุโดยระบบสุญญากาศ |
| เบคอน | *Micrococcus* | |
| | *Streptococcus* | |
| | *Micrococcus* | มีเมือกตรงผิวหน้า |
| | *Yeasts* | |
| | ..... | ..... |

| | | |
|---|---|---|
| ---------- | *Lactobacillus* | ผลิตก๊าซในไส้กรอกแฟรงค์เฟอร์เตอร์ที่บรรจุโดยระบบสุญญากาศ |
| ไส้กรอกที่ผ่านการหมักเกลือ | *Leuconostoc*<br>*Micrococcus*<br>…… | สีซีดบริเวณผิว<br>…… |
| ---------- | *Lactobacillus*<br>---------- | สีเปลี่ยนเป็นสีเขียว<br>---------- |
| ไส้กรอกเปรี้ยว | *ราและยีสต์*<br>---------- | มีเมือกและเปลี่ยนสี<br>---------- |
| ---------- | *Lactobacillus* | น้ำหมักมีลักษณะขุ่น |
| ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการหมักโดยเติมน้ำส้มสายชู | ---------- | ---------- |
| ---------- | *สปอร์ของ Bacillus*<br>*สปอร์ของ Clostridium* | จุลินทรีย์พวก thermophillic เจริญเติบโตเนื่องมาจากการทำให้เย็นไม่เพียงพอ และจำนวนจุลินทรีย์ที่เริ่มต้นมีมากเกินไป |
| ผลิตภัณฑ์เนื้อกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อชนิด | | |

| | | |
|---|---|---|
| commercially sterilization<br><br>----------<br><br>ผลิตภัณฑ์เนื้อกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อชนิด semi-preserved หรือ pasteurization | ----------<br><br>*Streptococcus*<br><br>.....<br><br>*Bacillus*<br><br>*Clostridium* | ----------<br><br>มีรสเปรี้ยวและเปลี่ยนสี<br><br>.....<br><br>ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า $10^0$C จะผลิตก๊าซ มีเจลาตินเยิ้มออกมา และมีการเน่าจากการสลายตัวของโปรตีน |

สำหรับการเกิดโรคในจากอาหารเนื่องมาจากเชื้อจุลินทรีย์ มักเกิดมาจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคพวกนี้ปนเปื้อนอยู่ในเนื้อทั้งก่อนและระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งอาจปนเปื้อนมาจากฝุ่นดินและผู้ปรุงประกอบอาหาร ซึ่งบางชนิดสามารถทนความร้อนสูงและเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น 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 แต่ไม่พบบ่อยนักในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีการเติมไนเตรตเพราะสารนี้จะยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อนี้ได้ ความเป็นพิษของ botulism พบว่าเกิดภายหลังจากบริโภคสารนี้เพียงเล็กน้อย 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 กรัมบวก (gram-positive) สามารถสร้างสปอร์ได้ สปอร์ทนความร้อนได้ดี เจริญเติบโตได้ดีในที่ที่ไม่มีอากาศ พบอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นในดิน น้ำและอาหารชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอาหารประเภทโปรตีน

*2. Staphylococcus aureus* (Staphyloenterotoxicosis 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 ภายหลังจากได้รับสารพิษ ผู้ป่วยจะเกิดการบวมพองของผนังลำไส้และกระเพาะ (gastroenteritis หรือ gastrointestinal upset) ขึ้นอยู่กับภูมิต้านทานของร่างกาย ปริมาณของเชื้อที่ร่างกายได้รับ โดยทั่วไปต้องมากกว่า 100,000 โคโลนีต่อกรัม และปริมาณสารพิษ ซึ่งโดยทั่วไปเพียง 1.0 ไมโครกรัม ก็จะทำให้เกิดอาการได้ นอกจากนี้เชื้อนี้ยังสามาถเป็นผลร้ายต่อระบบประสาทได้เช่นเดียวกับกรณีของ botulism ด้วย มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลีย ถ้าเป็นมากก็จะปวดศีรษะ ปวดตามกล้ามเนื้อ และเกิด

การเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตและอัตราการเต้นของชีพจรชั่วคราว ส่วนการตายอันเนื่องมาจากอาหารเป็นพิษแบบนี้นั้น มีเป็นจำนวนน้อย มักจะหายได้ภายใน 2-3 วัน แต่ถ้าเป็นมากก็จะใช้เวลานานกว่านี้ และที่ตายไปนั้นส่วนใหญ่จะมีผลมาจากมีอาการหรือโรคอื่นแทรกอยู่แล้วมากกว่า มักเป็นกับเด็กเล็กหรือผู้สูงอายุ ซึ่งมีความต้านทานต่ำและสุขภาพอ่อนแออยู่ก่อนแล้ว

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

เกิดจากโรงงานมีการสุขาภิบาลที่ไม่ดีพอ โดยเฉพาะมีสุขวิทยาส่วนบุคคลของคนงานไม่ดี มักพบเชื้อนี้ปนเปื้อนมาจากคนงานที่มีโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจ หรือมีบาดแผล ฝี หนองต่าง ๆ

*3. Clostridium perfringens* พบในเนื้อสัตว์หลายชนิด ได้แก่ เนื้อโค สุกร แกะและไก่ ทั้งในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์ เช่น roast beef, luncheon meat, แฮม, corned beef ส่วนใหญ่จะพบในเนื้อที่ผ่านการทำให้สุก และทิ้งไว้ให้เย็นอย่างช้า ๆ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องและไม่ได้อุ่นซ้ำอีกครั้งก่อนรับประทาน ผู้บริโภคจะมีอาการปวดท้องและท้องเสีย ภายหลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณมากกว่า 108 โคโลนีของเซลล์ปกติต่อกรัม เป็นเวลา 8-22 ชั่วโมง หรืออาจจะเกิดเนื่องจากรับประทานอาหารที่มีสปอร์ของเชื้อนี้อยู่ แล้วเกิดการงอกของสปอร์ในอวัยวะที่เกี่ยวกับการย่อยอาหาร (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 ทำให้เนื้อที่ผ่านการทำให้สุกแล้วนั้นเย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส อย่างมิดชิด หรือถ้าเป็นอาหารที่เหลือก็ควรนำมาอุ่นใหม่ให้ความร้อนจนเดือดหรือร้อนจัด เพื่อสามารถทำลายสารพิษที่อาจจะมีอยู่ได้

4. *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคติดเชื้อหรืออาหารเป็นพิษ (foodborne infection) แบคทีเรียนี้สามารถเจริญได้ในร่างกายของผู้บริโภคแล้วผลิตสารพิษ endotoxin ขึ้นภายในเซลล์ ทำให้ผู้ติดเชื้อมีอาการเวียนศีรษะ อาเจียนและท้องเดิน ระยะเวลาของการฟักตัวหรือช่วงเวลาหลังรับเชื้อเข้าไป ถึงปรากฏอาการออกมาจะกินเวลานานกว่า 6 ชั่วโมง มีรายงานว่าการที่จะปรากฏอาการออกมาได้นั้น ผู้ป่วยต้องได้รับเชื้อในปริมาณมากถึงประมาณ 1 ล้านตัว และอาจทำให้ถึงตายได้ถ้าผู้ป่วยเป็นเด็กหรือผู้สูงอายุที่มีสุขภาพอ่อนแอมาก่อนแล้วหรือเป็นโรคอย่างอื่นมาก่อนแล้ว

แบคทีเรียเหล่านี้มักจะพบในเนื้อเยื่อและลำไส้ของสัตว์โดยทั่ว ๆ ไปอยู่แล้ว โดยที่ไม่เป็นอันตรายแต่อย่างใดต่อสัตว์เหล่านั้นเลย การปนเปื้อนมักเกิดกับซากที่ทำการฆ่าแบบสกปรก โดยเฉพาะแบบที่ปฏิบัติกันอยู่โดยทั่วไปในโรงฆ่าสัตว์ประเทศไทยในปัจจุบัน

5. *Yersinia* ที่สำคัญได้แก่ *Y.enterocolitica* และ *Y. peseudotuberculosis* 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, ไอศครีม, 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

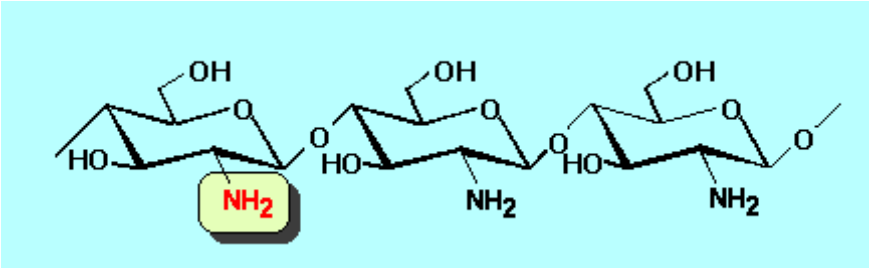
จากการเสื่อมเสียได้ง่ายของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อย่างที่ได้กล่าวไปข้างต้น ทำให้ผู้ผลิตมีความจำเป็นในการใช้เทคนิควิธีต่าง ๆ เพื่อช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ให้ได้มากที่สุด วิธีหนึ่งที่ผู้ผลิตมักเลือกใช้คือ การเติมวัตถุกันเสียหรือสารกันบูดลงในผลิตภัณฑ์เพื่อให้ยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานขึ้น สำหรับชนิดวัตถุกันเสียที่สำคัญที่มีการใช้กันหมายรวมถึง ซอร์เบต เบนโซเอต ไนเตรตและไนไตรต์ โดยวัตถุกันเสียชนิดที่มีการใช้กันมากที่สุดและองค์การอาหารและยารับรองให้ใช้ คือสารประกอบไนเตรตและไนไตรท์ (ศิวาพร, 2535) สารนี้มักเติมลงในอาหารเนื้อสัตว์เพื่อให้เนื้อสัตว์มีสีชมพู/แดงที่คงที่ และเพื่อชะลอการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ *Clostridium botulinum* ซึ่งสามารถผลิตสารพิษ botulinum toxin ที่เป็นอันตรายถึงแก่ชีวิต อาหารที่มักพบว่าใส่สารประกอบเหล่านี้ ได้แก่ เนื้อเค็ม เนื้อแดดเดียว ปลาแดดเดียว ไส้กรอก หมูแฮม เบคอน ซึ่งวัตถุกันเสียเหล่านี้ ได้มีงานวิจัยยืนยันว่า หากรับประทานไปเป็นระยะเวลายาวนาน อาจทำให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพหรือทำให้เกิดโรคในระยะยาวได้ นอกจากนี้ผู้ผลิตบางรายยังมีการใช้วัตถุกันเสียแบบจงใจใช้ผิดประเภท โดยเติมวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหารลงในผลิตภัณฑ์ เช่น ใช้กรดซาลิไซลิคซึ่งห้ามใช้ในอาหารมาใช้เป็นสารกันบูดเพราะกรดซาลิไซลิคทำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ หรือการใช้บอแรกซ์ซึ่งเป็นวัตถุที่ห้ามใช้ในอาหารเช่นกัน บอแรกซ์หรือโซเดียมบอเรต หรือผงกรอบ น้ำประสานทอง หรือเพ่งแซ เป็นสารเคมีที่ไม่มีกลิ่น ผลึกละเอียด สีขาว ละลายน้ำได้ดี ใช้ในอุตสาหกรรมทำแก้วและเป็นสารประสานทองแต่ผู้ผลิตบางรายนำมาใช้เติมในอาหารพวกลูกชิ้น หมูยอ ทอดมัน ไส้กรอก เนื้อบดปรุงรสต่าง ๆ ไก่บด เนื้อปลาขูด ทำให้อาหารเหล่านี้มีความหยุ่น เหนียว กรอบ แต่สารนี้มีอันตรายทำให้กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ อักเสบ 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.) ถ้าใช้สองชนิดร่วมกันให้ใช้ได้ไม่เกิน 125 มก./กก. เป็นต้น ซึ่งการใช้ในปริมาณมากเกินไปอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้โดยที่ผู้บริโภครู้เท่ากันไม่การณ์ เพราะสารประกอบไนไตรต์และไนเตรตจะรวมตัวกับสารประกอบเอมีน (amine) ในอาหารและเกิดเป็นสารประกอบไนโตรซามีน (nitrosamine) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ทำให้เกิดเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ (ศิวาพร, 2546) นอกจากนี้ยังพบการใช้วัตถุเจือปนอาหารที่มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐานเพราะมีราคาถูกกว่าอีกด้วย

### *การประยุกต์ใช้ไคโตซาน (chitosan) จากเปลือกกุ้ง ในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป*

ไคโตซาน เป็นสายโพลีเมอร์ธรรมชาติที่ได้มาจากการสกัดหมู่อะเซททิล (acetyl group, $-CH_3$) ออกจากสายโมเลกุลของไคติน (chitin) โดยไคตินจะพบเป็นโครงสร้างหลักในเปลือกกุ้ง กระดองปูหรือในผิวชั้นนอกของแมลงบางชนิด ซึ่งโครงสร้างของไคตินจะมีความคล้ายคลึงกับเซลลูโลสเป็นอย่างมากและในธรรมชาติไคตินจะมีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส สำหรับโครงสร้างของไคโตซาน (รูปที่ 1) จะประกอบไปด้วยหน่วยย่อยสองชนิด คือ D-glucosamine และ N-acetyl-D-glucosamine ในปริมาณ 70-100 และ 0-30% ตามลำดับ และหน่วยย่อยจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\beta$-1,4 glycosidic ซึ่งหากไคโตซานยิ่งมีปริมาณ N-acetyl-D-glucosamine ในสายโมเลกุลต่ำ ก็จะยิ่งมีความสามารถในการละลายในกรดอินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้น เนื่องมาจากโครงสร้างมีความเป็นผลึกต่ำกว่าและมีหมู่อะมิโน (amino group, $-NH_2$) และหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, -OH) ที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงเพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถแตกตัวได้ดีในกรดอินทรีย์และมีความสามารถในการละลายที่สูงขึ้น (Winterowd and Sandford, 1997) นอกจากนี้คุณสมบัติต่างๆ ของไคโตซานยังสามารถควบคุมให้เป็นไปตามที่ต้องการได้ โดยควบคุมกระบวนการผลิตให้ไคโตซานมีคุณลักษณะภายในอันได้แก่ ปริมาณหมู่อะเซททิลที่มีอยู่ในสายโมเลกุลหรือปริมาณหน่วยย่อย N-acetyl-D-glucosamine ในสายโมเลกุลและน้ำหนักโมเลกุล ให้มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในลักษณะ

ต่าง ๆ ได้ ซึ่งทั้งสองคุณลักษณะนี้จะส่งผลโดยตรงต่อความสามารถในการละลาย ความสามารถในการจับกับน้ำและสารอื่น ๆ ของไคโตซานที่ที่ผลิตได้ ซึ่งคุณสมบัติต่าง ๆ ของไคโตซานก็จะส่งผลต่อไปยังคุณสมบัติของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้อีกด้วย ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นโพลีเมอร์ธรรมชาติสายสั้น ๆ ที่ได้มาจากการตัดสายโมเลกุลของไคโตซานจนมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำลงกว่า 30,000 Dalton และมีหน่วยย่อยเป็นสายสั้นที่เชื่อมกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic สำหรับการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์นั้น ยังไม่มีการผลิตเชิงการค้า เนื่องมาจากยังอยู่ในขั้นตอนงานวิจัยเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อให้ได้ร้อยละผลผลิตสูงและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติที่ดี ซึ่งการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับสารที่ใช้ตัดความยาวสายของโมเลกุลไคโตซาน เช่นการใช้กรด ด่าง หรือเอนไซม์ แต่การตัดสายด้วยเอนไซม์จะให้ผลผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติดีที่สุด แต่ให้ผลผลิตที่ต่ำกว่า




**ภาพที่ 1** โครงสร้างของไคโตซาน (chitosan)

ที่มา: http://www.wellable.com/pro_info.aspx?id=45

จากบทความของ No และคณะ (2007) ได้กล่าวว่า ไคโตซานเป็นโพลีเมอร์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างมาก เพราะไคโตซานมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี อีกทั้งยังให้ผลในการยับยั้งเนื้องอก และมีการพัฒนาไคโตซานเป็นยาที่ช่วยลดปริมาณโคเลสเตอรอลในเลือดได้อีกด้วย ในบทความนี้ยังได้ทำการแจกแจงและสำรวจการประยุกต์ใช้ไคโตซานในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ และผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ที่มีการตีพิมพ์ไว้ในวารสารนานาชาติ ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยจากผลการสำรวจของ No และคณะทำให้ทราบว่า ไคโตซานเป็นสารโพลีเมอร์ธรรมชาติที่มีความสามารถสูงในการออกฤทธิ์ยับยั้งหรือ

ต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้ง แบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในอาหารหลายประเภท อาทิเช่น น้ำผลไม้ ผักและผลไม้ อาหารทะเล ขนมปัง นม เนื้อสัตว์สดและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก เป็นต้น ดังนั้นไคโตซานจึงมีความเป็นไปได้สูงมากที่จะนำมาพัฒนาให้เป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ทดแทนวัตถุกันเสียจากสารเคมี และมีข้อดี คือเป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ จึงทำให้มีความปลอดภัยในอาหารต่อผู้บริโภคมากกว่าการใช้สารเคมี

**ตารางที่ 2** การประยุกต์ใช้ไคโตซานเพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ

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

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

ที่มา: No, Meyers, Prinyawiwatkul and Xu, 2007

ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ การผสมไคโตซานลงในผลิตภัณฑ์ นอกจากจะสามารถต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ได้แล้ว ไคโตซานยังสามารถทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัส และความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity, WHC) ที่ดีขึ้นอีกด้วย (Benjakul, Visessanguan, Phatchrat, and Tanaka, 2003) ดังนั้นไคโตซาน จึงเป็นสารที่น่าสนใจในการศึกษาและนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

วิธีหนึ่งที่ไคโตซานได้รับความสนใจในการศึกษาอย่างแพร่หลายคือ การนำไคโตซานมาผลิตเป็นฟิล์มบริโภค ซึ่งฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี แต่มักมีอายุการเก็บรักษาต่ำและมักเกิดสีเหลือง ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด ซึ่งในปัจจุบันมีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ทำการศึกษาเรื่องฟิล์มของไคโตซาน

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

Outtara และคณะ (2000b) ได้ศึกษาถึงผลของไคโตซานฟิล์มในการลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียที่ผิวของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป เช่น โบโลญ่าแฮมและ พาสตรามี่ (pastrami) และพบว่าฟิล์มของไคโตซานที่ละลายในกรดโพรพิโอนิกให้ผลในการยับยั้งเชื้อ enterobateria และ *Serratia liquifaciens* ได้ดี และสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวที่ 4 องศาเซลเซียสได้ถึง 21 วัน

Pranoto, Rakshit และ Salokhe (2005) ได้ศึกษาถึงผลในการยังยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มจากไคโตซานเมื่อผสมน้ำมันกระเทียม 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 โดยการศึกษานี้พบว่า 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 การยับยั้งยีสต์ที่มักจะทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร (*Saccharomyces exiguous*, *Saccharomyces ludwigii* และ *Torulaspora delbrueckii*) จะได้ผลดีเมื่อมีการใช้ไคโตซานที่อยู่ในรูปของ chitosan glutamate ในปริมาณ 0.005% ร่วมกับ sodium benzoate ในปริมาณ 0.025%

การศึกษาของ Zheng และ Zhu ในปี 2003 พบว่า ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันจะให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Eschericia coli* และ *Staphylococcus aureus* แตกต่างกัน โดยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 300 kDalton จะให้ผลดีในการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Eschericia coli* ได้

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

Georgantelis และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากโรสแมรี่ (rosemary extracts) ร่วมกับไคโตซาน หรือ $\alpha$-tocopherol ในการเป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์และผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกสดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และพบว่าทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ถึง 20 วัน และตัวอย่างที่เก็บได้นานที่สุด พบในผลิตภัณฑ์ที่ผสมไคโตซานร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่

จากการศึกษาของ Juneja และคณะ (2006) ได้พบว่า ไคโตซานสามารถควบคุมการสร้างสปอร์ของ *Clostridium perfringens* ในเนื้อวัวและเนื้อไก่งวงบด ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นได้ โดยปริมาณที่ให้ผลดีที่สุดคือ 3% โดยน้ำหนัก

การศึกษาของ Kok และ Park ในปี 2007 ได้พบว่า อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ set fish ball ที่ทำมาจากการขึ้นรูปซูริมิ (surimi) ด้วยความร้อนด้วยเครื่องเอ็กทรูดเดอร์ (extruder) จะยาวนานขึ้นเมื่อมีการเติมไคโตซาน พร้อมกับกรดน้ำส้มหรือ glucono deltalactone โดยการใช้ไคโตซานละลายในกรดน้ำส้มก่อนผสมลงในผลิตภัณฑ์ก่อนที่จะนำไปขึ้นรูป จะให้ผลในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ถึง 21 วัน โดยที่ยังคงมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์ น้อยว่า 1 log CFU/g

จากงานวิจัยที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้ พบว่าไคโตซานมีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีมากในผลิตภัณฑ์อาหาร อย่างไรก็ดี ผลของปริมาณที่เหมาะสมที่จะเติมในอาหาร รวมไปถึงลักษณะในการผสม หรือการใช้ร่วมกับสารตัวอื่น ๆ ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทต่าง ๆ นั้นยังต้องการการศึกษาที่เจาะลึกถึงความเหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดอีกด้วย

***การประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharide) ในผลิตภัณฑ์อาหารและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ แปรรูป***

สำหรับการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารนั้น ได้มีงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาถึงวิธีการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เหมาะสม และความสามารถของสารดังกล่าวในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

งานวิจัยของ Jeon และ Kim ในปี 2000 ได้พบว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถผลิตได้โดยใช้ระบบต่อเนื่อง 2 ระบบต่อกัน หรือ Continuous dual reactor system โดย reactor แรกคือ column reactor ที่บรรจุด้วย immobilized enzyme (chitosanase) และต่อด้วย ultrafiltration membrane reactor จากสารละลายไคโตซานที่ผ่าน reactor แรกจะถูกตัดสายบางส่วนให้สั้นลงกลายเป็น partially hydrolyzed chitosan จากนั้นก็จะถูกตัดต่อให้กลายเป็น oligosaccharide ใน ultrafiltration membrane reactor ซึ่งการทดลองนี้ได้ศึกษาความเร็วในการไหลของสารละลายไคโตซานเข้าสู่ reactor แรก เป็น 3 5 และ 9 ml/min. และพบว่าความเร็วที่เหมาะสมที่สุดคือ 5 ml/min เนื่องจากไม่มีปัญหาเรื่องการจับเป็นก้อนและอุดตัน membrane และเอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ กล่าวโดยสรุป วิธีเป็นวิธีหนึ่งที่ให้ผลดีในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้อย่างต่อเนื่อง

Choi และคณะ (2001) ได้ศึกษาผลของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 2000-30,000 Dalton และมีปริมาณการสกัดหมู่อะเซททิลออกไป 91.5% ในการต้านเชื้อ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* และ *Streptococcus mutans* โดยพบว่าสารละลายไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้น 0.1% สามารถลด *A. actinomycetemcomitans* ลงได้ 2 log CFU/ml หลังจากสัมผัสกันนาน 30 นาที และลดลงถึง 4.5 log CFU/ml หลังจากทิ้งไว้นานเป็นเวลา 120 นาที แต่สำหรับ *S. mutans* สารละลายไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้น 0.1% สามารถลดได้ 0.5 log CFU/ml หลังจากทิ้งไว้นานเป็นเวลา 120 นาที ซึ่งผลจาก Electron microscope แสดงให้เห็นว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีผลทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อทั้ง 2 ชนิดแตกออกและทำให้เชื้อตายได้

การวิจัยของ Jeon Park และKim ในปี 2001 ได้ศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 3 กลุ่ม ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3 ระดับ คือ สูง กลาง และต่ำ ซึ่งไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในงานวิจัยนี้ ผลิตโดยใช้เอนไซม์ไคโตซานเนสตัดสายโมเลกุลของไคโตซานและแยกขนาดด้วย ultrafiltration membrane ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่าความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีจะต้องมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 Dalton และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่าเชื้อชนิดอื่น และออกฤทธิ์ยับยั้ง lactic acid bacteria อีกด้วย

Kim และคณะ (2003) ได้ศึกษาถึงการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีการเติมหมู่ quaternary ammonium ลงในสายโมเลกุล และศึกษาผลในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus mutans* ซึ่งการศึกษานี้พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีหมู่ดังกล่าวให้ผลในการยั้งยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อลงถึง 80% ในเวลา 5 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลดีกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่มีหมู่ดังกล่าวถึง 8 เท่า

งานวิจัยของ Lim และ Hudson ในปี 2004 ได้พบว่า การผลิตไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ หรือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์นั้น สามารถทำได้โดยตัดความยาวสายของไคโตซานให้สั้นลงโดยที่มีปริมาณหมู่อะเซททิลในสายโมเลกุลต่ำ และจากนั้นยังทำการศึกษาการปรับเปลี่ยนหมู่ในสายโมเลกุลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยพบว่าการเติมหมู่ *O*-acrylamidomethyl ลงที่ตำแหน่ง C-6 หรือคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 6 จะมีผลทำให้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มีความสามารถในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ได้ ดีมาก ซึ่งเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 10 ppm จะสามารถลดปริมาณเชื้อดังกล่าวลงได้ 1.5-2.5 x $10^5$ CFU/ml ในเวลา 20 นาที

Kim และ Rajapakse (2005) ได้รายงานในบทความถึงวิธีในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคโตซานโดยใช้เอนไซม์ว่าสามารถผลิตได้ทั้งแบบ batch และแบบต่อเนื่อง ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้คือ เอนไซม์ไคโตซานเนส (chitosanase) ที่สร้างจากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Bacillus sp.* โดยเอนไซม์ที่ถูกตรึงไว้ (immobilized enzyme) จะให้ผลในการผลิตที่ดีแต่ต้องทำในรูปของ column reactor และหากต้องการให้กระบวนการผลิตเป็นแบบต่อเนื่องก็สามารถทำได้โดยติดตั้ง column

reactor ต่อเนื่องกับ ultrafiltration reactor ซึ่งก็จะทำให้ได้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในปริมาณที่สูง อีกทั้งในรายงานนี้ยังได้กล่าวถึงความสามารถของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ ในด้านการต้านเชื้อจุลินทรีย์ การต้านอนุมูลอิสระ การต้านสารก่อมะเร็งและการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายอีกด้วย สำหรับผลในด้านการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ รายงานนี้ได้กล่าวว่า กลไกในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จะแตกต่างจากไคติน ไคโตซาน เนื่องมาจากไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีปริมาณหมู่อะมิโน (-$NH_2$ group) ในปริมาณที่สูงกว่า ซึ่งหมู่นี้จะสามารถมีผลทำให้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์แตกออก ทำให้เซลล์แตกและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวได้ และนอกจากนี้ยังพบว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ และมีกลไกในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์อีกแบบหนึ่ง คือไคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถขัดขวางกระบวนการ RNA transcription ในกระบวนการสร้าง DNA ของเชื้อแบคทีเรียได้ ทำให้เชื้อดังกล่าวตาย ซึ่งผลทั้งหมดนี้จะขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยตรง ซึ่งหากไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีปริมาณหมู่อะมิโนสูงพร้อมกับมีสายโมเลกุลที่ยาวพอเหมาะ จะมีผลให้เกิดการแตกตัวให้ประจุบวกจากหมู่ดังกล่าวได้มาก และไปเกาะกับผนังของเซลล์ที่มักมีประจุลบของหมู่คาร์บอกซิล (-OH group)โดยเฉพาะเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่า ซึ่งรายงานนี้ได้สรุปว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีจะต้องมีปริมาณระดับการดึงหมู่อะเซททิลออก 85-95% และ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 5-27 kDalton

Qin และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงวิธีการทำให้ไคโตซานละลายน้ำได้โดยการใช้การตัดสายโมเลกุลด้วยเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) และความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานที่ผลิตได้ ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่า ไคโตซานที่ผลิตได้สามารถละลายได้ในน้ำแต่ไม่มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังทำให้เชื้อ *Candida albicans* เจริญเติบโตได้ดีขึ้นอีกด้วย ดังนั้นไคโตซานที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีควรมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า $5x10^4$ Dalton ขึ้นไป แต่ไคโตซานดังกล่าวอาจมีปัญหาในการละลายในน้ำเนื่องมาจากน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูงนั่นเอง

จากการค้นคว้าผลงานวิจัยต่าง ๆ พบว่า ยังไม่มีงานวิจัยใดที่ศึกษาการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด (ไคโตซานเนส เบตา-อมัยเลส และเพคติเนส) เพื่อศึกษาความสามารถในการตัดสายโมเลกุลของไคโตซานที่แตกต่างกันของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว และศึกษาเปรียบเทียบกันถึงปริมาณผลผลิต (% production yield) ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเลือกใช้เอนไซม์ที่ให้ผลดีทั้งด้านผลผลิตและทางด้านต้นทุนการผลิต (production cost) ซึ่งเอนไซม์ไคโตซานเนสจะเป็นเอนไซม์ที่มีราคาแพงที่สุด ซึ่งหากเอนไซม์อีก 2 ชนิดที่ทำการศึกษาสามารถผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ในปริมาณที่อยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ ก็น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทย เนื่องจากจะทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลงอย่างมาก ทั้ง เบตา-อมัยเลสและเพคติเนส เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการตัดพันธะ beta linkage จึงสนใจที่จะนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไคโตซานเนสที่มีราคาแพงมาก และนอกจากนี้ยังจะศึกษาถึงการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป โดยเลือกศึกษาในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคเป็นอย่างมาก ทั้งนี้เพื่อให้ได้องค์ความรู้ที่ครบถ้วนทั้งการผลิตและการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

# บทที่ 3 วิธีวิจัย

1. ศึกษาชนิดของเอนไซม์ (cellulase, β-amylase และ pectinase) สภาวะและกระบวนการผลิต (อุณหภูมิ เวลา ค่าความเป็นกรดด่างหรือค่า pH และสัดส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต) ที่เหมาะสม ในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคโตซานที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง

1.1 วัตถุดิบและสารเคมี

เอนไซม์ cellulase, β-amylase และ pectinase จะซื้อจากบริษัท Sigma Aldrich และสารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จะใช้สารเคมี Analytical grade และจะซื้อจากบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายสารเคมีในประเทศไทย ยกเว้น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH) สำหรับเตรียมไคโตซาน จะใช้สารเคมีระดับ commercial grade ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า 90% โดยจะซื้อจากบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายสารเคมีในประเทศไทยเช่นกัน

1.2 การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

ไคโตซานที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในงานวิจัยนี้ จะเตรียมจากเปลือกกุ้งที่แห้งและสะอาด โดยจะซื้อจากบริษัทผลิตกุ้งปอกเปลือกแช่เยือกแข็ง ที่มีเปลือกกุ้งเป็นวัสดุเหลือทิ้งในกระบวนการผลิต จากนั้นจะนำมาเตรียมให้เป็นไคติน และสกัดหมู่อะเซททิลออกให้เป็นไคโตซาน โดยอ้างอิงวิธีการเตรียมของ Tolaimate และคณะ (2003) และ Kachanechai และคณะ (2008) ดังแสดงในภาพต่อไปนี้

เปลือกกุ้งที่แห้งและสะอาด (ซื้อมาจาก บ.ต้าหมิง เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด จ.สมุทรสาคร)

↓

การแยกเอาโปรตีนออก deprotienization โดยแช่ในสารละลาย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์

เป็นเวลา 12 ชั่วโมงโดยทำ 2 ครั้ง

↓

การแยกเอาแร่ธาตุต่างๆ ออก โดยแช่ในสารละลาย

กรดไฮโดรครอริก ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์

เป็นเวลา 12 ชั่วโมงโดยทำ 2 ครั้ง

↓

ไคติน

↓

การสกัดสีออก โดยแช่ใน 90% ethanol ที่อุณหภูมิ 50 °C

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

↓

การสกัดหมู่อะซิทิลออกจากสายโมเลกุลของไคโตซาน

↓

แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

↓

เมื่อเวลาครบ 72 ชั่วโมงแล้ว ให้แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50% โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิห้อง

เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

↓

ไคโตซาน

**ภาพที่ 1** วิธีการเตรียมไคโตซาน

1.3 ตรวจวัดระดับการดึงหมู่อะเซททิลออกจากสายโมเลกุล หรือ Degree of Deacetylation (DD) โดยวิธี first derivative ultraviolet spectrophotometry ของ Muzzarelli และ Rocchetti (1997) และตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี Gel permeable chromatography (GPC) โดยอ้างอิงวิธีของ Terbojevich และ Cosani(1997)

1.4 ศึกษาสภาวะและกระบวนการผลิต (อุณหภูมิ เวลา ค่าความเป็นกรดด่างหรือค่า pH และสัดส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต) ที่เหมาะสม ในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคโตซานที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง

ในขั้นตอนนี้ ศึกษาสภาวะและกระบวนการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคโตซานด้วยเอนไซม์ cellulase, β-amylase และ pectinase โดยเลือกใช้การผลิตแบบไม่ต่อเนื่อง (batch) และใช้สภาวะในการบ่มที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งกระบวนการผลิตจะทำใน reactor อ้างอิงตามวิธีของ Kim และ Rajapakse (2005) โดยศึกษาหา อุณหภูมิ ค่า pH และ อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต (enzyme:substrate ratio) ที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวัดค่าน้ำหนักโมเลกุลที่ลดลงทุก ๆ 15 นาที จนครบ 285 นาที โดยมีสภาวะที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 3

**ตารางที่ 3** สภาวะ (อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต อุณหภูมิ และ pH) ที่ศึกษาสำหรับเอนไซม์ pectinase β-amylase และ cellulase

| **ชนิดเอนไซม์** | **อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต** | **อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)** | **pH ที่เหมาะสม** |
|---|---|---|---|
| pectinase | 1:1 1:10 1:50 และ 1:100 | 50 °C | 4 และ 5 |
| β-amylase | 1:50 และ 1:100 | 50 °C | 4 และ 5 |
| cellulase | 1:2 1:3 และ 1:4 | 50 °C | 4 และ 4.5 |

2. ศึกษาคุณสมบัติทางภายภาพ (สี) และคุณสมบัติทางเคมี (ระดับในการดึงหมูอะเซททิลออกจากโมเลกุล หรือ degree of deacetylation, %DD น้ำหนักโมเลกุล และความชื้นหรือ moisture content, MC) ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากข้อ 1. จะนำมาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- คุณสมบัติทางภายภาพ ได้แก่ ค่าสี (Macdougall, 1994) โดยเตรียมตัวอย่างไคโตซานผง ใส่ลงในที่ใส่ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์ค่าสีในระบบ CIE L* C* h (ยี่ห้อ Minolta รุ่น CM 3500d)
- คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ ความชื้นหรือ moisture content, MC (AOAC, 1995) ระดับในการดึงหมูอะเซททิลออกจากโมเลกุลหรือ degree of deacetylation, %DD (Muzzarelli and Rocchetti, 1997) และ น้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี Gel permeable chromatography (GPC) โดยอ้างอิงวิธีของ Terbojevich และ Cosani (1997)

ซึ่งในขั้นตอนนี้ จะใช้ลักษณะทางกายภาพ %DD น้ำหนักโมเลกุล และร้อยละผลผลิต หรือ % production yield ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ เป็นเกณฑ์ในการตัดสินใจเลือกเอนไซม์และสภาวะที่ดีที่สุด เพื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าวไปใช้ต่อในขั้นตอนต่อไป และในขั้นตอนนี้ใช้วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้การวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมทางสถิติ SPSS version 11.5 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test

3. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู

ในขั้นตอนนี้ จะทำการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) หรือเป็นวัตถุกันเสียจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู โดยมีวิธีทดลองดังต่อไปนี้

3.1 การเตรียมผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู

ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูที่จะผลิตจะอ้างอิงสูตรและวิธีการผลิตของ Tseng Lui และ Chen (2000) โดยกรรมวิธีการผลิตจะผลิตและอ้างอิงตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช. 304/2547) ซึ่งสูตรและวิธีในการเตรียมลูกชิ้นหมูที่ดีที่สุดในงานวิจัยนี้ แสดงดังต่อไปนี้

**ตารางที่ 4** แสดงสูตรลูกชิ้นหมูพื้นฐานที่ผลิตในงานวิจัยนี้

| ส่วนผสม | เปอร์เซ็น (%) |
|---|---|
| เนื้อหมูแดงล้วน (สันใน) | 86 |
| ไขมันหมูแข็ง | 7 |
| น้ำแข็ง | 4.1 |
| เกลือ | 2 |
| น้ำตาล | 0.5 |
| พริกไทย | 0.2 |
| ซีอิ้วขาว | 0.2 |

<u>กรรมวิธีการผลิตลูกชิ้นหมู</u>

1.นำสันในหมูมาหั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด ½ นิ้ว (เอาแต่เนื้อแดงเท่านั้น) คลุกกับเกลือ (ประมาณ ½ ของสูตร) แล้วนำเข้าตู้เย็นช่องแข็งเป็นเวลา 1 คืน

2.นำมันหมูแข็งมาปั่นให้ละเอียด แล้วนำเข้าตู้เย็นช่องแข็งเป็นเวลา 1 คืน

3.ทำการประกอบเครื่องบด แล้วใส่น้ำแข็งลงไปปั่น ประมาณ 30วินาที เสร็จแล้วให้เทน้ำแข็งออก สะบัดโถปั่นให้มีน้ำติดอยู่น้อยที่สุด

4.ใส่หมูในข้อที่ 1. ลงไป ทำการปั่นที่ ความเร็วรอบ ≈ 10 นาน 1 นาที

5.เติมน้ำแข็ง ½ ของสูตร ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที

6.เติมเกลือ ½ ของสูตร ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที

7.เติมน้ำแข็ง ½ ของสูตร ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที

8.เติมมันหมูแข็ง ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที

9.ทำการกลับด้านเนื้อหมูในโถปั่น แล้วเติมส่วผสมที่เหลือลงไป ปั่นต่ออีก 2 นาที (ตอนนี้สามารถเติมไคโตซานลงไปได้)

10.นำเข้าตู้เย็น 15 นาที แล้วนำมาปั่นให้เป็นลูกกลมๆ ต้มที่อุณหภูมิ 55-60°C นาน 20 นาที พอลูกชิ้นลอยแล้ว ให้ตักออก มาต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที

12.นำมาแช่ในน้ำเย็นทันที เสร็จแล้วเก็บเข้าตู้เย็นที่ 8 °C

3.2 ศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agent)

3.2.1 ทำการศึกษาโดยแปรความเข้มข้นของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่จะผสมลงในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูเป็น 3 ระดับ คือ 0 0.5 และ 1% โดยน้ำหนัก

3.2.2 ตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และ ตรวจวัดปริมาณเชื้อราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ โดยอ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007)

3.2.3 ตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และ ตรวจวัดปริมาณเชื้อราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ โดยอ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007)

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

4. ศึกษาผลของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ (สี เนื้อสัมผัส และความสามารถในการอุ้มน้ำหรือ water holding capacity, WHC) คุณสมบัติทางด้านเคมี (ค่า pH และ ปริมาณความชื้น ) และอายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู

ในขั้นตอนนี้ นำผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูที่ผลิตได้ในข้อ 3. วิเคราะห์ผลของการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อคุณสมบัติทางด้านต่างๆ ของลูกชิ้นหมูได้แก่

- คุณสมบัติทางด้านกายภาพ ได้แก่ สี (Macdougall, 1994) เนื้อสัมผัส (Barbut, 2006) และ ความสามารถในการอุ้มน้ำหรือ water holding capacity (WHC) (Honikel and Hamm, 1994)
- คุณสมบัติทางด้านเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995)
- ความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์ โดยใช้แบบสอบถามความชอบ 9 point-Hedonic scale
- อายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู โดยการบรรจุในถุงพลาสติก PP ทำการปิดผนึกและเก็บรักษาที่อุณหภูมิดังกล่าว

ในขั้นตอนนี้จะศึกษาโดย ตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และ ตรวจวัดปริมาณเชื้อราและยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ โดยอ้างอิงวิธีของ Kok and Park (2007) โดยทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ทุก ๆ 7 วัน

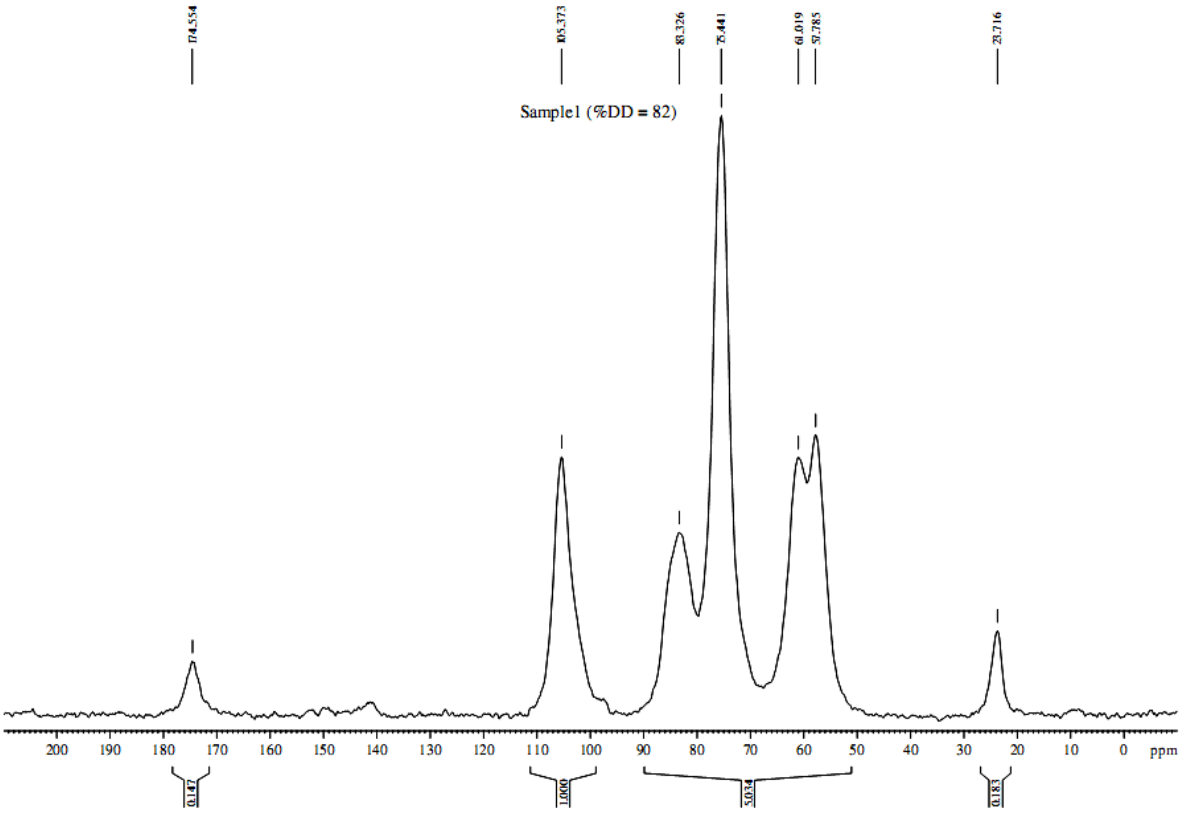
ในการทดลองข้อ 4. นี้จะใช้การวางแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่าง ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS version 11.5 (SPSS, 2002) โดยใช้การวิเคราะห์ทางความแปรปรวนแบบ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของผลการทดลองแต่ละตัวอย่างด้วย Duncan's new multiple range test

# บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

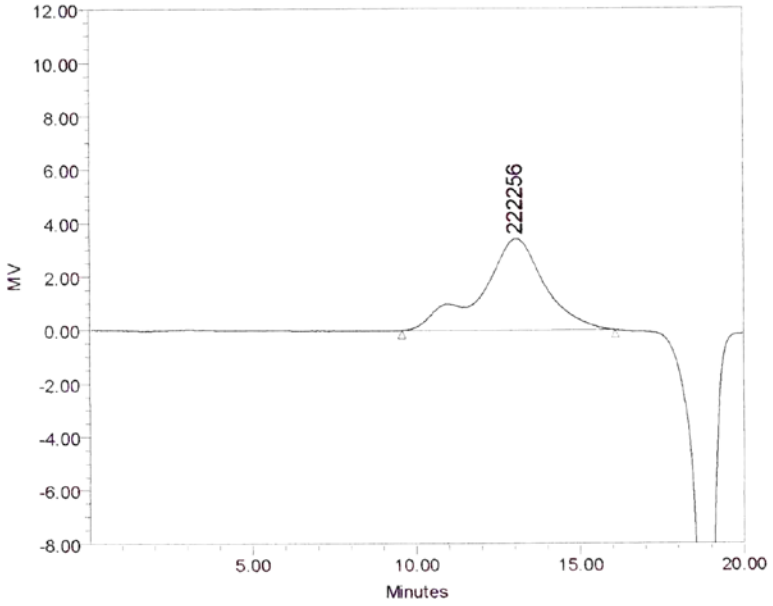
1. **การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง และการตรวจวัดระดับการดึงหมู่อะเซททิลออกจากสายโมเลกุล หรือ Degree of Deacetylation (DD) และตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี Gel permeable chromatography (GPC)**

ไคโตซานที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ ได้ใช้วิธีการเตรียมอ้างอิงวิธีการเตรียมของ Tolaimate และคณะ (2003) และ Kachanechai และคณะ (2008) โดยมีการดัดแปลงเล็กน้อย ซึ่งวิธีการเตรียมโดยละเอียดสามารถแสดงได้ดังภาพที่ 1 (ในส่วนวิธีการทดลอง)

ซึ่งไคโตซานที่ได้มีระดับการดึงหมู่อะเซททิลออกจากสายโมเลกุล ด้วยวิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR) เท่ากับ 82% ดังแสดงในภาพที่ 2 และน้ำหนักโมเลกุล ด้วยวิธี Gel permeable chromatography (GPC) เท่ากับ 74.7 kDalton ดังแสดงในภาพที่ 3



**ภาพที่ 2** ระดับการดึงหมู่อะเซททิลออกจากสายโมเลกุลของไคโตซาน ด้วยวิธี Nuclear Magnetic Resonance (NMR)




| | Mn (Daltons) | Mw (Daltons) | MP (Daltons) | Mz (Daltons) | Mz+1 (Daltons) | Polydispersity |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 128254 | 747227 | 222256 | 3094009 | 5320366 | 5.826167 |

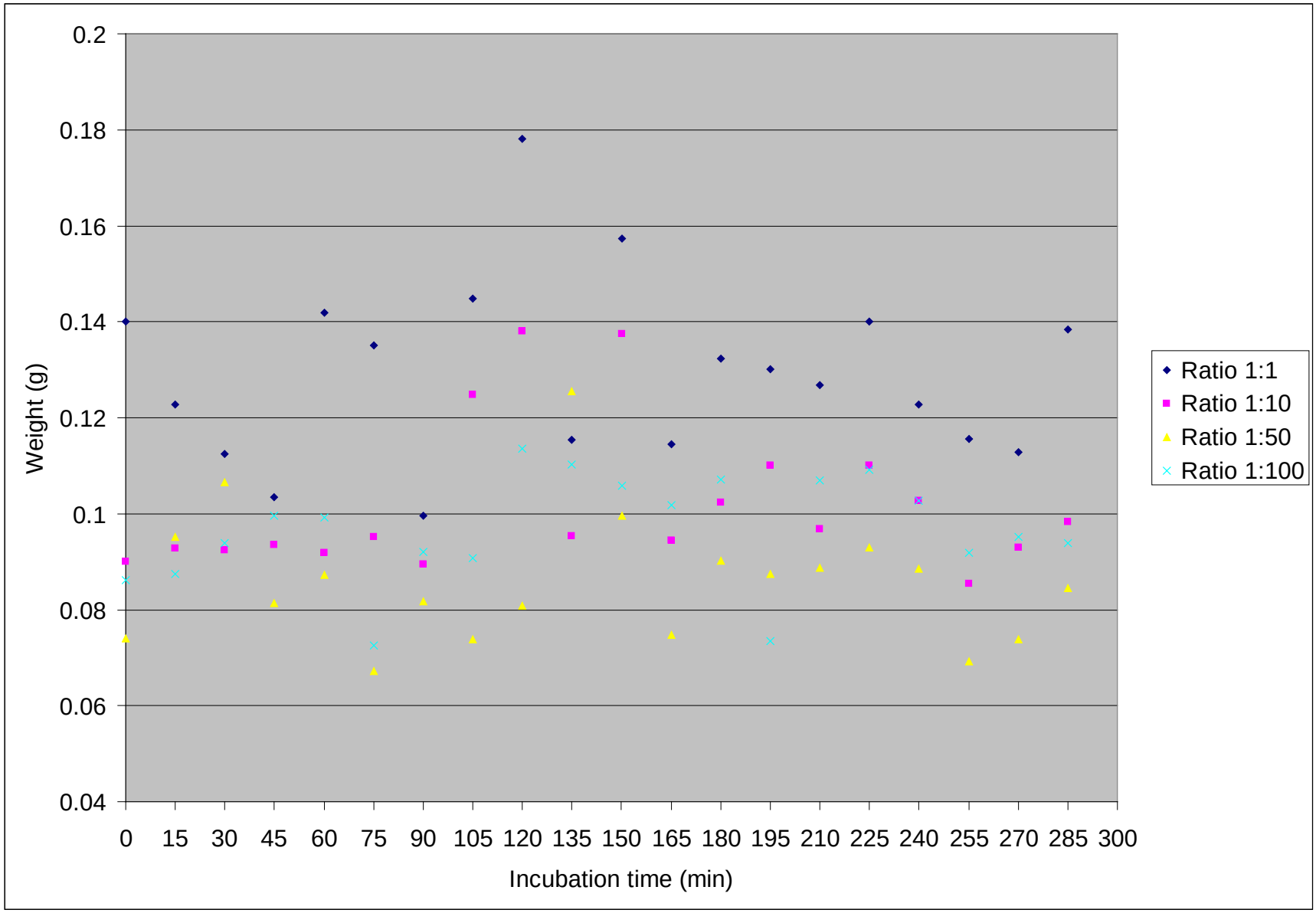
**ภาพที่ 3** น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Gel permeable chromatography (GPC)

2. **การศึกษาสภาวะและกระบวนการผลิต (อุณหภูมิ เวลา ค่าความเป็นกรดด่างหรือค่า pH และสัดส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต) ที่เหมาะสม ในการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคโตซานที่เตรียมจากเปลือกกุ้ง**

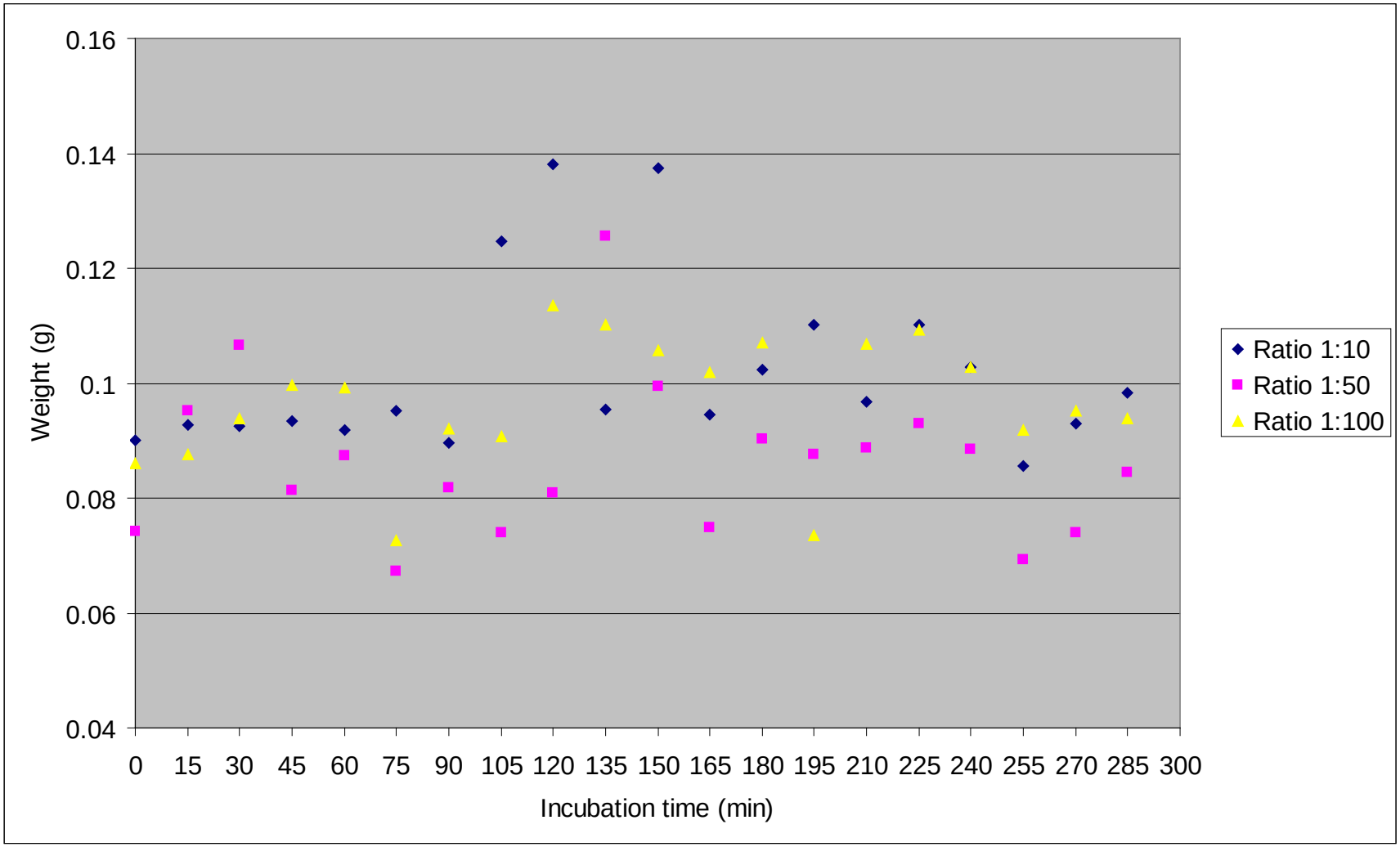
ในการทดลองนี้ศึกษาสภาวะและกระบวนการผลิตที่เหมาะสมต่อการผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากไคโตซานที่ผลิตได้ในข้อ1. โดยจากการศึกษาพบว่าชนิดเอนไซม์ cellulase, β-amylase และ pectinase มีสภาวะการบ่มที่เหมาะสมแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 (ในส่วนวิธีการทดลอง) ซึ่งการผลิตแบบไม่ต่อเนื่อง (batch) โดยใช้สภาวะในการบ่มที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด ทำให้ได้ร้อยละผลผลิต (% yield) ที่แตกต่างกัน

จากตารางที่ 3 (ในส่วนวิธีการทดลอง) จะเห็นได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิดอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน ซึ่ง pH ที่อยู่ในช่วงนี้ เป็น pH ที่ไคโตซานสามารถละลายได้ดี ทำให้เอนไซม์กับ substrate สามารถเกิดปฏิกิริยากันได้อย่างเหมาะสม ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมของทุกเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส

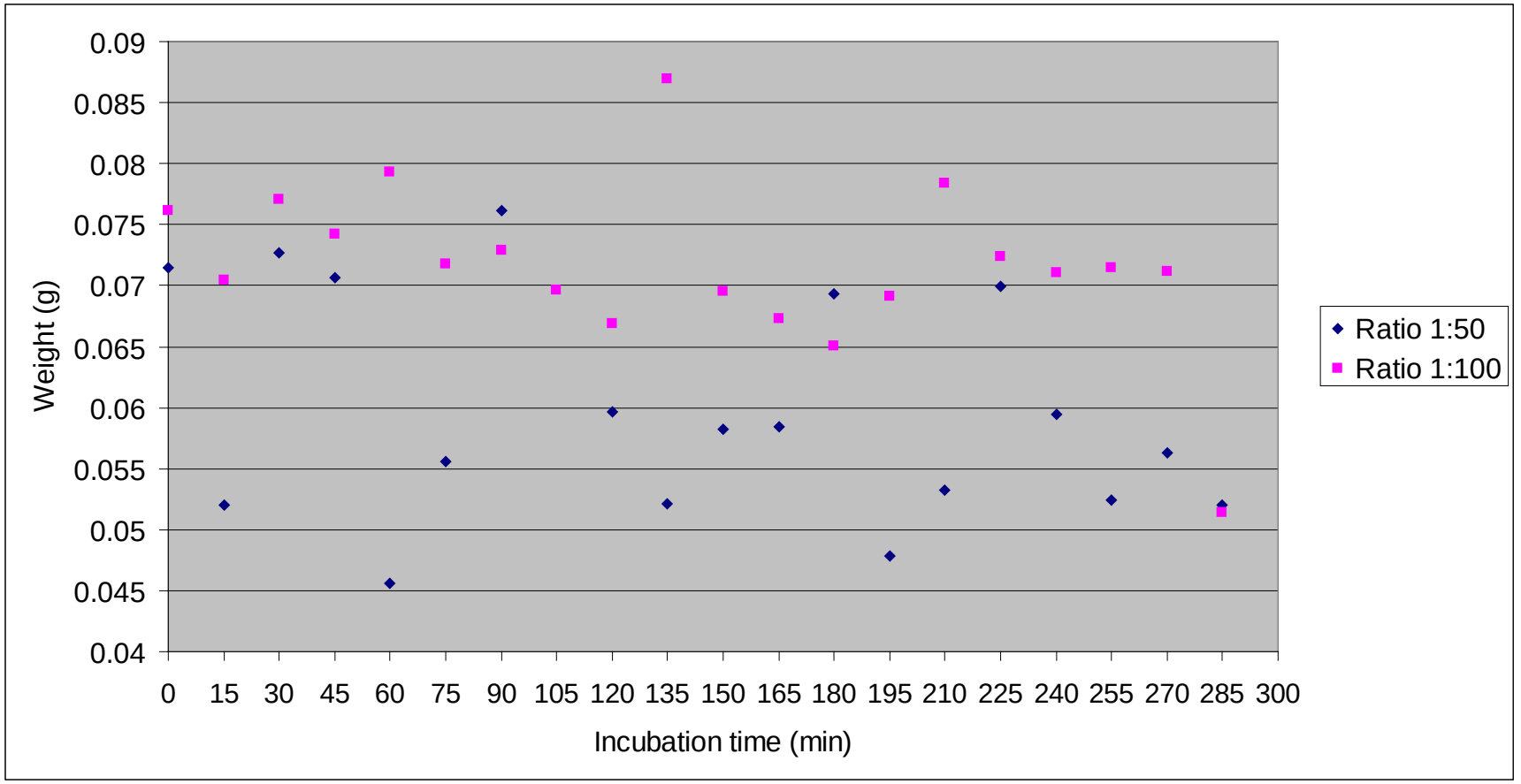
การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักแห้งของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ (ภาพที่ 4-9) มีความแตกต่างกันในทุกสภาวะที่ศึกษา เมื่อพิจารณาที่เอนไซม์ชนิดเดียวกันจะเห็นได้ว่า การเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อสับสเตรต ซึ่งในที่นี้คือ ไคโตซาน นั้น ส่งผลต่อน้ำหนักของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ โดย น้ำหนักแห้งของตัวอย่างจะลดลงเมื่ออัตราส่วนเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจาก การทำงานของเอนไซม์ที่สภาวะที่ไม่เหมาะสม หากสับสเตรตมากเกินพอ จะส่งผลให้อัตราเร็วในการตัดสายของเอนไซม์ลดต่ำลงได้ ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิด จึงมีอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่เหมาะสม สำหรับเอนไซม์ pectinase อัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1:1 สำหรับเอนไซม์ beta-amylase อัตราส่วนที่เหมาะสม คือ 1:50 และสำหรับเอนไซม์ cellulase อัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 1:2 ดังแสดงในภาพที่ 4-9 และ ตารางที่ 4


0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
Weight (g)
0 15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 165 180 195 210 225 240 255 270 285 300
Incubation time (min)
Ratio 1:1
Ratio 1:10
Ratio 1:50
Ratio 1:100

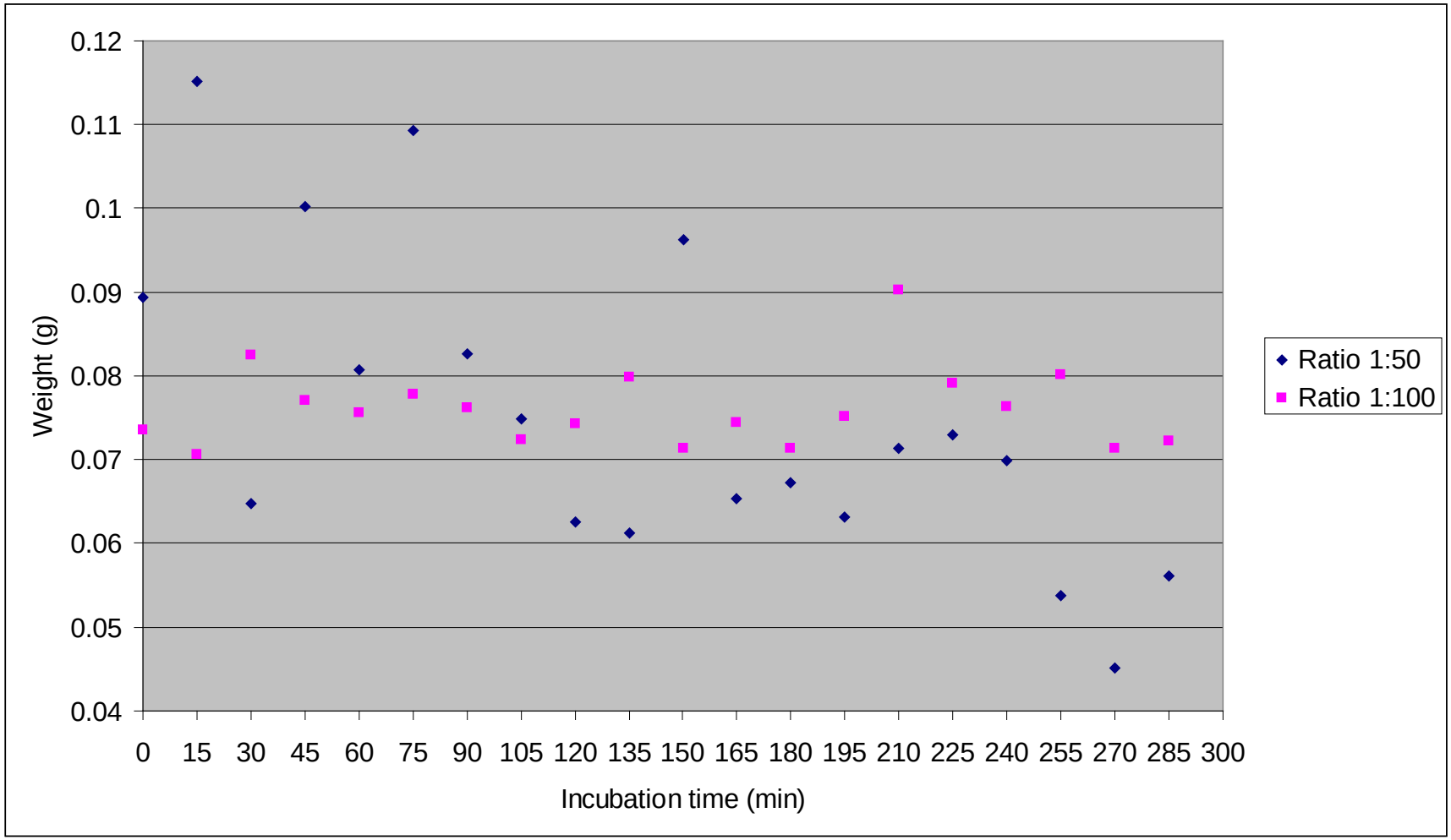
**ภาพที่ 4** การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา (0-285 นาที) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที โดยการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์ pectinase บ่มที่ pH 4 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรตที่ 1:1 1:10 1:50 และ 1:100 ตามลำดับ



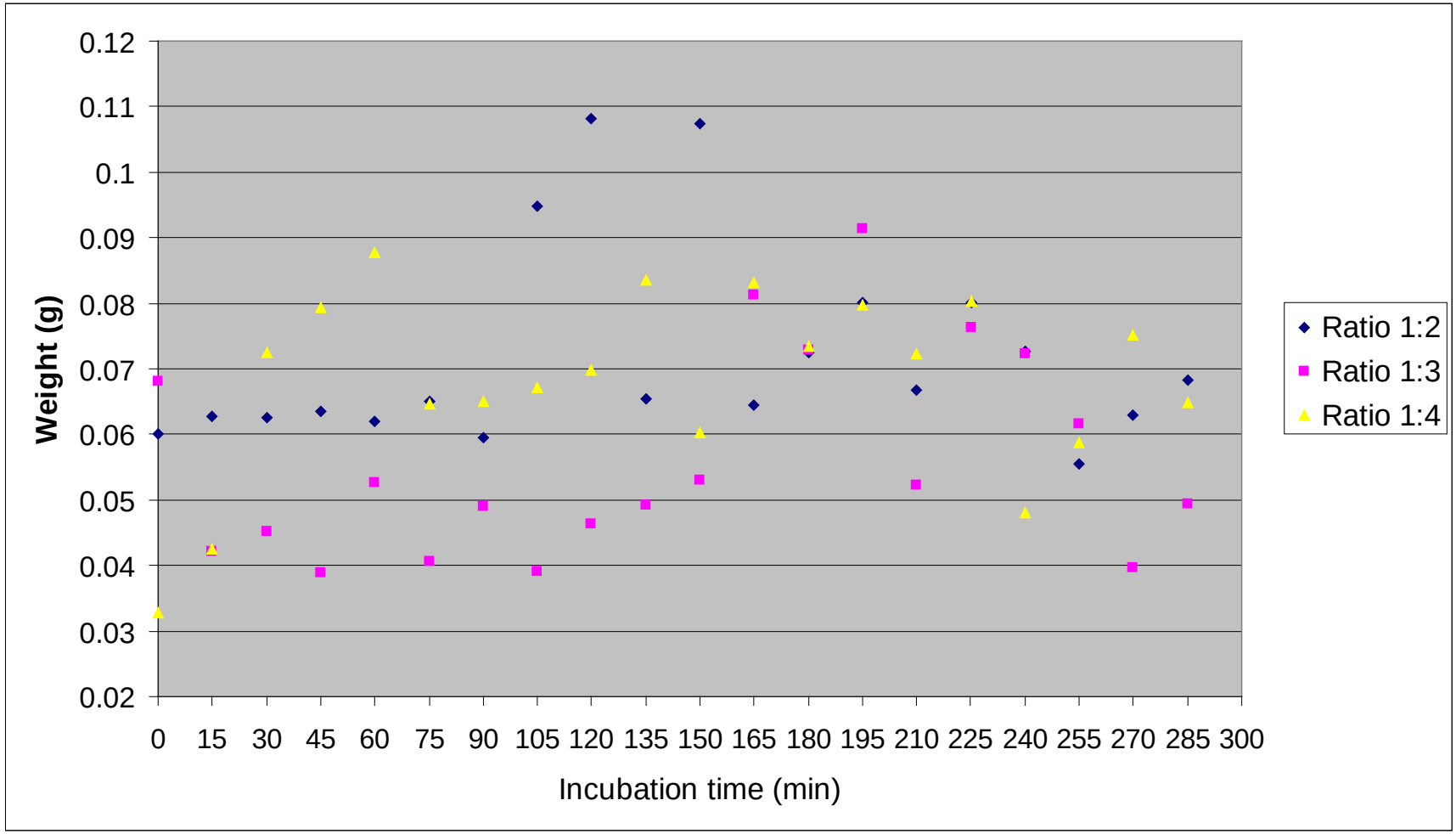
**ภาพที่ 5** การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา (0-285 นาที) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที โดยการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์ pectinase บ่มที่ pH 5 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรตที่ 1:10 1:50 และ 1:100 ตามลำดับ



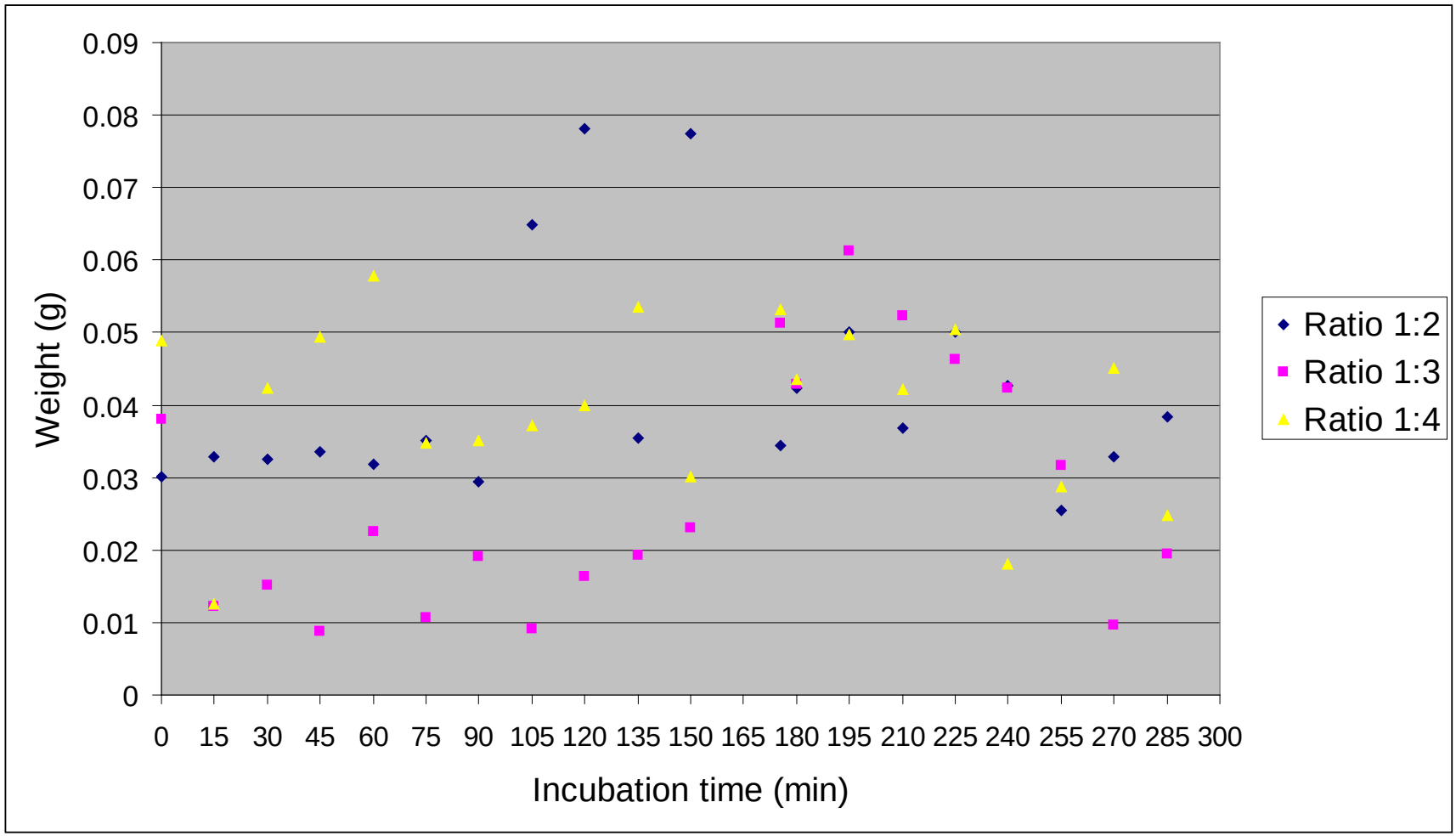
**ภาพที่** 6 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา (0-285 นาที) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที โดยการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์ beta amylase บ่มที่ pH 4 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรตที่ 1:50 และ 1:100 ตามลำดับ



**ภาพที่ 7** การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา (0-285 นาที) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที โดยการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์ beta amylase บ่มที่ pH 5 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรตที่ 1:50 และ 1:100 ตามลำดับ




**ภาพที่** 8 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา (0-285 นาที) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที โดยการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์ cellulase บ่มที่ pH 4 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรตที่ 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ




**ภาพที่** 9 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ในแต่ละช่วงเวลา (0-285 นาที) เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาที โดยการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์ cellulase บ่มที่ pH 4.5 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรตที่ 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ

จากค่าน้ำหนักแห้งของไคโตลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ (ภาพที่ 4-9) นำมาคำนวณร้อยละผลผลิตทั้งหมด พบว่า ร้อยละผลผลิตของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากสภาวะต่าง ๆ มีความแตกต่างกัน ($p \leq 0.05$) ค่า pH และอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรตที่ศึกษา ส่งผลต่อร้อยละผลผลิตที่ได้ ($p \leq 0.05$) เอนไซม์ที่ให้ร้อยละผลผลิตสูงที่สุดคือ เอนไซม์ pectinase รองลงมาคือ beta-amylase และ cellulase ตามลำดับ ซึ่งสภาวะที่ให้ร้อยละผลผลิตสูงสุด คือ สภาวะที่ใช้เอนไซม์ pectinase บ่มที่ pH 4.0 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต 1:1 (ตารางที่ 4) ดังนั้นสภาวะนี้ จึงเป็นสภาวะที่ดีที่สุดในงานวิจัยนี้

**ตารางที่ 5** ร้อยละผลผลิตทั้งหมดของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ pectinase β-amylase และ cellulase ที่สภาวะต่าง ๆ

| Condition | | | %yield |
|---|---|---|---|
| Enzyme | pH | Enzyme:Chitosan | |
| Pectinase | 4.0 | 1:1 | 96.95[a] |
| | | 1:10 | 88.19[a] |
| | | 1:50 | 82.38[ab] |
| | | 1:100 | 90.90[a] |
| Pectinase | 5.0 | 1:10 | 94.14[a] |
| | | 1:50 | 87.13[a] |
| | | 1:100 | 90.01[a] |
| Beta-amylase | 4.0 | 1:50 | 73.07[ab] |
| | | 1:100 | 72.51[ab] |
| Beta-amylase | 5.0 | 1:50 | 65.71[b] |
| | | 1:100 | 61.88[b] |
| Cellulase | 4.0 | 1:2 | 68.99[b] |
| | | 1:3 | 68.85[b] |
| | | 1:4 | 63.55[b] |
| Cellulase | 4.5 | 1:2 | 36.95[cd] |
| | | 1:3 | 35.25[cd] |
| | | 1:4 | 21.55[d] |

[a-d] ตัวอักษรที่แตกต่างในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างของผลเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

3. **ศึกษาคุณสมบัติทางภายภาพ (สี) และคุณสมบัติทางเคมี (ระดับในการดึงหมูอะเซททิลออกจากโมเลกุล หรือ** degree of deacetylation, DD **น้ำหนักโมเลกุลและความชื้น หรือ** moisture content, MC) **ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้**

จากข้อที่ 2 คัดเลือกสภาวะที่ให้ร้อยละผลผลิตสูงที่สุดของเอนไซม์แต่ละชนิดที่สภาวะต่าง ๆ นำมาวิเคราะห์ %DD ด้วยเครื่อง NMR และ น้ำหนักโมเลกุล ด้วยเครื่อง GPC จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ celllulase สามารถตัดสายพันธะไคโตซานได้สั้นที่สุด รองลงมาคือ beta-amylase และ pectinase ตามลำดับ (ตารางที่ 5) โดยเมื่อพิจารณาร้อยละผลผลิตและน้ำหนักโมเลกุลที่ลดลง ทำให้สามารถเลือกสภาวะที่จะนำไปผลิตไคโตโอลิโกแซคคาไรด์สำหรับการทดลองต่อไป 2 สภาวะ ที่ให้ร้อยละผลผลิตมากกว่า 95% คือ

1. สภาวะที่ใช้เอนไซม์ pectinase บ่มที่อุณหภูมิ 4.0 ที่อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต 1:1 หรือตัวย่อที่จะใช้ในรายงานต่อไปคือ P 4.0/1:1

2. สภาวะที่ใช้เอนไซม์ pectinase บ่มที่อุณหภูมิ 5.0 ที่อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสับสเตรต 1:10 หรือตัวย่อที่จะใช้ในรายงานต่อไปคือ P 5.0/1:10

**ตารางที่ 6** %DD และน้ำหนักโมเลกุลของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ ด้วยสภาวะที่ให้ร้อยละผลผลิตมากที่สุดของเอนไซม์แต่ละชนิด

| Condition | | | %DD | Molecular weight (Dalton) **ที่เวลาในการบ่ม 285 นาที** |
|---|---|---|---|---|
| Enzyme | pH | Enzyme:Chitosan | | |
| Pectinase | 4.0 | 1:1 | 98 | 72,064 |
| Pectinase | 5.0 | 1:10 | 97 | 81,565 |
| Beta-amylase | 4.0 | 1:50 | 97 | 81,171 |
| Beta-amylase | 5.0 | 1:50 | 97 | 96,174 |
| Cellulase | 4.0 | 1:2 | 99 | 10,800 |
| Cellulase | 4.5 | 1:2 | 99 | 14,680 |

**ตารางที่ 7** ค่าสี (L* a* b*) ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ ด้วยสภาวะที่ให้ร้อยละผลผลิตมากที่สุดของเอนไซม์แต่ละชนิด

| Condition | | Color | | |
|---|---|---|---|---|
| | | L* | a* | b* |
| Pectinase | pH4.0/ 1:1 | 67.87[a] ± 0.31 | 1.90[c] ± 0.04 | 15.10[a] ± 0.03 |
| Pectinase | pH 5.0/ 1:10 | 50.86[b] ± 0.05 | 3.14[b] ± 0.04 | 11.77[b] ± 0.02 |
| Beta-amylase | pH4.0/ 1:50 | 40. 91[c] ± 0.05 | 4.72[a] ± 0.03 | 12.21[b] ± 0.01 |
| Beta-amylase | pH 5.0/ 1:50 | 48.10[b] ± 0.11 | 4.38[a] ± 0.03 | 11.94[b] ± 0.03 |
| Cellulase | pH4.0/ 1:2 | 47.78[b] ± 0.02 | 4.11[a] ± 0.01 | 12.19[b] ± 0.01 |
| Cellulase | pH 4.5/ 1:2 | 48.70[b] ± 0.01 | 4.84[a] ± 0.03 | 15.47[a] ± 0.02 |

[a-c] ตัวอักษรที่แตกต่างในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างของผลเฉลี่ย ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 6 แสดงค่าสีของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ ด้วยสภาวะที่ให้ร้อยละผลผลิตมากที่สุดของเอนไซม์แต่ละชนิด เอนไซม์ pectinase ให้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่าความสว่าง (L*) สูงสุด และมีสีอ่อนที่สุด และมีสีเหลืองนวล ในขณะที่เอนไซม์ beta-amylase และ cellulase จะให้ตัวอย่างที่มีสีเหลืองน้ำตาล และตัวอย่างดังกล่าวจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Kachanechai และ คณะ (2008) ที่พบว่าเมื่อตัดสายพันธะไคโตซานด้วยเอนไซม์ chitosanase จนมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยลง ส่งผลให้ค่าสีเปลี่ยนแปลงไป ตัวอย่างที่ได้จะมีสีเข้มขึ้น จากสีเหลืองนวลเป็นสีเหลืองน้ำตาล

4. **ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์** (antimicrobial agent) **ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูและศึกษาผลของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ (สี เนื้อสัมผัส และ ความสามารถในการอุ้มน้ำหรือ** water holding capacity, WHC) **คุณสมบัติทางด้านเคมี (ค่า** pH **และ ปริมาณความชื้น ) และอายุการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู**

ในขั้นตอนนี้ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 2 ตัวอย่างคือ P 4.0/1:1 และ P 5.0/1:10 เพื่อเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) หรือเป็นวัตถุกันเสียจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู แปรระดับความเข้มข้นเป็น 2 ระดับ คือ 0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบผลที่ได้กับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

จากผลการทดลองตารางที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 21 วัน โดยไม่ได้บรรจุแบบสุญญากาศ พบว่า ลูกชิ้นหมูควบคุม มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด วิเคราะห์ด้วยวิธี TPC เพิ่มขึ้นทุก ๆ ระยะที่ตรวจวัด และมีปริมาณมากกว่า $10^6$ cfu/g ที่ 14 วันของการเก็บรักษา ซึ่งเกินจากมาตรฐานชุมชนแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างควบคุมมีอายุการเก็บรักษาน้อยกว่า 14 วัน เมื่อประยุกต์ใช้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ลงในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู พบว่า สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานขึ้นเป็น 21 วัน โดยไม่จำเป็นต้องบรรจุแบบสุญญากาศ (ตารางที่ 8) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมจากเอนไซม์ pectinase ที่ pH และอัตราส่วนโดยน้ำหนักแตกต่างกัน ให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในลูกชิ้นหมูได้แตกต่างกัน แต่ทุกตัวอย่างออกฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งจุลินทรีย์จำพวก แบคทีเรีย ยีสต์และรา ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์บ่มที่สภาวะ pH 4.0 และอัตราส่วน 1:1 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนัก เช่นเดียวกันกับไคโตโอลิโกแซคคาไรด์บ่มที่สภาวะ pH 5.0 และอัตราส่วน 1:10 ซึ่งผลของการยับยั้งเชื้อเกิดได้ดี ทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง ในระหว่างเวลาการเก็บรักษาที่ 7 และ 14 วัน และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 21 ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 2 ตัวอย่างให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูได้ ซึ่ง

ผลงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kok และ Park ในปี 2007 ได้พบว่า อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ set fish ball ที่ทำมาจากการขึ้นรูปซูริมิ (surimi) ด้วยความร้อนด้วยเครื่องเอ็กทรูดเดอร์ (extruder) จะยาวนานขึ้นเมื่อมีการเติมไคโตซาน พร้อมกับกรดน้ำส้มหรือ glucono deltalactone โดยการใช้ไคโตซานละลายในกรดน้ำส้มก่อนผสมลงในผลิตภัณฑ์ก่อนที่จะนำไปขึ้นรูป จะให้ผลในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ถึง 21 วัน โดยที่ยังคงมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณยีสต์ น้อยว่า 1 log CFU/g นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Georgantelis และคณะ (2007) ที่ศึกษาผลของสารสกัดจากโรสแมรี่ (rosemary extracts) ร่วมกับไคโตซาน หรือ $\alpha$-tocopherol ในการเป็นสารต้านทานเชื้อจุลินทรีย์และผลในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกสดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และพบว่าทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้ถึง 20 วัน และตัวอย่างที่เก็บได้นานที่สุด พบในผลิตภัณฑ์ที่ผสมไคโตซานร่วมกับสารสกัดโรสแมรี่

ตัวอย่างไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่เลือกมาผสมกับลูกชิ้นหมูนั้น มีน้ำหนักโมเลกุล 72,064 dalton (P4.0/1:1) และ 81,565 dalton (P5.0/1:10) ตามลำดับ ซึ่งจากผลการยับยั้งเชื้อเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของลูกชิ้นหมูผสมตัวอย่างไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Jeon Park และKim ในปี 2001 ที่ศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 3 กลุ่ม ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 3 ระดับ คือ สูง กลาง และต่ำ ซึ่งไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในงานวิจัยนี้ ผลิตโดยใช้เอนไซม์ไคโตซานเนสตัดสายโมเลกุลของไคโตซานและแยกขนาดด้วย ultrafiltration membrane และ พบว่าความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีจะต้องมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10,000 Dalton และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่าเชื้อชนิดอื่น และออกฤทธิ์ยับยั้ง lactic acid bacteria อีกด้วย และงานวิจัยของ Qin และคณะ (2006) ได้กล่าวไว้ว่า ไคโตซานที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีควรมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า $5x10^4$ Dalton ขึ้นไป แต่ไคโตซานดังกล่าวอาจมีปัญหาในการละลายในน้ำ เนื่องมาจากน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้เช่นกัน

สำหรับค่าสีของตัวอย่างลูกชิ้นหมูทั้งสีภายนอก และสีภายในลูกชิ้นหมู พบว่า การผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ส่งผลต่อค่า a* และ b* อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ค่าความสว่าง (L*) ของตัวอย่างแตกต่างกันที่สีผิวของลูกชิ้นเพียงอย่างเดียว การเติมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่ส่งผลต่อค่าความชื้นของลูกชิ้น แต่ส่งผลต่อค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของตัวอย่างลูกชิ้นหมู ($p \leq 0.05$) ทำให้ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำลดต่ำลง การผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตัวอย่าง P 4.0/1:1 ลงในลูกชิ้นหมู ส่งผลให้ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำลดลงมากกว่าการผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตัวอย่าง P 5.0/1:10 และตัวอย่างที่มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างตัวอย่างที่ผสมไคโคโอลิโกแซคคาไรด์คือ ตัวอย่างลูกชิ้นหมูผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ P 5.0/1:10 ที่ความเข้มข้น 1.0% (84.18%)

สำหรับเนื้อสัมผัสของตัวอย่างลูกชิ้นหมูวิเคราะห์ด้วย texture profile analysis ในเครื่อง texture analyzer พบว่า ตัวอย่างที่ผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตัวอย่าง P 4.0/1:1 มีค่าต่าง ๆ ที่วัดได้จาก texture profile ที่เพิ่มสูงขึ้นจากตัวอย่างควบคุม ($p \leq 0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 0.5 เป็น 1.0%โดยน้ำหนัก ยิ่งส่งผลให้ค่าต่าง ๆ ที่วัดได้สูงขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่ ตัวอย่างที่ผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตัวอย่าง P 5.0/1:10 ให้ผลในทางตรงกันข้าม กล่าวคือ มีค่าต่าง ๆ ที่วัดได้ลดต่ำลงกว่าตัวอย่างควบคุม ($p \leq 0.05$) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 0.5 เป็น 1.0 %โดยน้ำหนัก กลับส่งผลให้ค่าต่าง ๆ ที่วัดได้ยิ่งต่ำลง แสดงให้เห็นว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีความสามารถในการดัดแปลงลักษณะเนื้อสัมผัสของลูกชิ้น รวมทั้งค่าความสามารถในการอุ้มน้ำด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกัน ตัวอย่างที่มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำสูง จะมีเนื้อสัมผัสที่นุ่มกว่า และแสดงค่าต่าง ๆ ที่วัดได้จาก texture profile ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ($p \leq 0.05$) ซึ่งไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตัวอย่าง P 5.0/1:10 แสดงความสามารถในการจับกับน้ำ (water binding ability) ที่ดีกว่าตัวอย่าง P 4.0/1:1 เมื่อพิจารณาควบคู่กับคะแนนความชอบที่มีต่อเนื้อสัมผัสของตัวอย่างลูกชิ้นหมู ทดสอบด้วยวิธี 9-point hedonic scaling test พบว่า ผู้บริโภคชอบลักษณะเนื้อสัมผัสของตัวอย่างลูกชิ้นหมูที่ผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มากกว่าตัวอย่างลูกชิ้นหมูควบคุม โดยผู้บริโภคให้คะแนนเฉลี่ยของความชอบที่มีต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของลูกชิ้นหมูผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ตัวอย่าง P 4.0/1:1 และ P 5.0/1:10

ที่ความเข้มข้น 1.0% โดยน้ำหนัก เท่ากับ 7.00 เท่ากันทั้ง 2 ตัวอย่าง และเมื่อพิจารณาคุณลักษณะด้านสี ลักษณะปรากฏ และความชอบโดยรวมก็พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างควบคุมกับตัวอย่างที่ผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (ตารางที่ 11)

**ตารางที่ 8** การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูควบคุม ลูกชิ้นหมูผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharide, COS) ที่เตรียมจากเอนไซม์ pectinase บ่มที่ pH 4 และ 5 เป็นเวลา 285 นาที ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก โดยตรวจวัดหลังเตรียมเสร็จทันทีและตรวจวัดต่อเนื่องทุก ๆ 7 วันเป็นเวลา 21 วัน

| Treat-ment | Sample explanation | Day 0 | | Day 7 | | Day 14 | | Day21 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 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 | ลูกชิ้นหมูควบคุม | $8.9 \times 10^3$ | <10 | $4.4 \times 10^4$ | <10 | $1.7 \times 10^6$ | $4.0 \times 10$ | $7.9 \times 10^7$ | $5.0 \times 10$ |
| 2 | ลูกชิ้นหมูผสมCOS (pH 4, 0.5%w/w) | $8.2 \times 10^2$ | <10 | $8.7 \times 10^3$ | <10 | $1.3 \times 10^5$ | <10 | $4.2 \times 10^5$ | <10 |
| 3 | ลูกชิ้นหมูผสมCOS (pH 4, 1.0%w/w) | $4.9 \times 10^2$ | <10 | $9.0 \times 10$ | <10 | $3.0 \times 10$ | <10 | $7.4 \times 10^2$ | <10 |
| 4 | ลูกชิ้นหมูผสมCOS (pH 5, 0.5%w/w) | $6.2 \times 10^3$ | <10 | $2.2 \times 10^5$ | <10 | $5.5 \times 10^4$ | $1.0 \times 10$ | $2.4 \times 10^6$ | $2.0 \times 10$ |
| 5 | ลูกชิ้นหมูผสมCOS (pH 5, 1.0%w/w) | $4.0 \times 10$ | <10 | <10 est. | <10 | $3.4 \times 10^4$ | <10 | $1.8 \times 10^2$ | <10 |

**ตารางที่ 9** ค่าสี (L* a* b*) ด้วยเครื่อง chroma meter ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (%) และค่าความชื้น (%) ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูควบคุม ลูกชิ้นหมูผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharide, COS) ที่เตรียมจากเอนไซม์ pectinase บ่มที่ pH 4 และ 5 เป็นเวลา 285 นาที ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

| Treat-ment | Sample Explanation | Color (Core) | | | Color (Peel) | | | Water Holding Capacity (%) | Moisture Content$^{ns}$ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | L*$^{ns}$ | a* | b* | L* | a* | b* | | |
| 1 | สูตรควบคุม | 67.37 ± 1.00 | 1.27$^{a}$ ± 0.18 | 14.77$^{b}$ ± 0.15 | 70.08$^{a}$ ± 1.17 | -0.83$^{a}$ ± 0.02 | 14.85$^{bc}$ ± 0.34 | 87.21$^{d}$ ± 0.08 | 72.45 ± 1.55 |
| 2 | สูตรผสม COS (pH 4, 0.5%w/w) | 64.58 ± 1.23 | 1.43$^{abc}$ ± 0.18 | 14.79$^{b}$ ± 0.27 | 71.32$^{b}$ ± 0.25 | -0.21$^{d}$ ± 0.02 | 15.13$^{a}$ ± 0.24 | 78.26$^{b}$ ± 0.06 | 72.15 ± 0.91 |
| 3 | สูตรผสม COS (pH 4, 1.0%w/w) | 65.91 ± 0.79 | 1.62$^{d}$ ± 0.22 | 15.03$^{c}$ ± 0.14 | 70.57$^{ab}$ ± 0.98 | -0.26$^{d}$ ± 0.04 | 14.80$^{bc}$ ± 0.31 | 78.17$^{b}$ ± 0.08 | 71.69 ± 0.69 |
| 4 | สูตรผสม COS (pH 5, 0.5%w/w) | 64.65 ± 1.30 | 1.51$^{cd}$ ± 0.16 | 14.43$^{a}$ ± 0.14 | 69.55$^{a}$ ± 0.97 | -0.50$^{b}$ ± 0.05 | 14.55$^{ab}$ ± 0.34 | 76.06$^{a}$ ± 0.05 | 72.14 ± 0.93 |
| 5 | สูตรผสม COS (pH 5, 1.0%w/w) | 64.24 ± 0.48 | 1.39$^{ab}$ ± 0.03 | 14.85$^{bc}$ ± 0.11 | 70.22$^{a}$ ± 0.43 | -0.38$^{c}$ ± 0.06 | 14.28$^{a}$ ± 0.37 | 84.18$^{c}$ ± 0.53 | 71.15 ± 0.60 |

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) $^{ns}$ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$)

**ตารางที่ 10** ลักษณะเนื้อสัมผัส texture profile วิเคราะห์ด้วยวิธี texture profile analysis ด้วยเครื่อง texture analyzer ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูควบคุม ลูกชิ้นหมูผสมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (chitooligosaccharide, COS) ที่เตรียมจากเอนไซม์ pectinase บ่มที่ pH 4 และ 5 เป็นเวลา 285 นาที ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0% โดยน้ำหนัก

| Treat-ment | Sample Explanation | Hardness (N) | Cohesiveness$^{ns}$ | Springiness | Gumminess | Chewiness | Adhesive force | Fracture force |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ลูกชิ้นหมูควบคุม | $16.98^{c} \pm 0.30$ | $0.28 \pm 0.01$ | $8.36^{a} \pm 0.52$ | $4.81^{b} \pm 0.36$ | $0.041^{bc} \pm 0.002$ | $0.032^{a} \pm 0.007$ | $5.25^{b} \pm 0.75$ |
| 2 | ลูกชิ้นหมูผสม COS (pH 4, 0.5%w/w) | $15.64^{b} \pm 0.99$ | $0.30 \pm 0.03$ | $9.02^{ab} \pm 0.98$ | $4.62^{b} \pm 0.37$ | $0.037^{b} \pm 0.001$ | $0.028^{a} \pm 0.006$ | $4.10^{ab} \pm 0.14$ |
| 3 | ลูกชิ้นหมูผสม COS (pH 4, 1.0%w/w) | $24.43^{d} \pm 1.57$ | $0.31 \pm 0.04$ | $9.41^{b} \pm 0.54$ | $7.69^{d} \pm 0.80$ | $0.065^{d} \pm 0.008$ | $0.077^{c} \pm 0.009$ | $9.49^{c} \pm 0.06$ |
| 4 | ลูกชิ้นหมูผสม COS (pH 5, 0.5%w/w) | $14.69^{b} \pm 0.52$ | $0.32 \pm 0.02$ | $8.14^{a} \pm 0.71$ | $5.55^{c} \pm 0.29$ | $0.045^{c} \pm 0.002$ | $0.051^{b} \pm 0.009$ | $3.20^{a} \pm 0.48$ |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | ลูกชิ้นหมูผสม COS (pH 5, 1.0%w/w) | $12.33^{a} \pm 0.96$ | $0.30 \pm 0.01$ | $8.45^{ab} \pm 0.92$ | $3.76^{a} \pm 0.51$ | $0.025^{a} \pm 0.005$ | $0.031^{a} \pm 0.001$ | $3.01^{a} \pm 0.12$ |

$^{a-d}$ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของตัวอย่าง อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

$^{ns}$ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$)

**ตารางที่ 11** ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูหลังเตรียมเสร็จสิ้น โดยใช้แบบสอบถามความชอบแบบ 9-point hedonic scale

| Treatment | Sensory Characteristics | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Color$^{ns}$ | Odor | Texture | Appearance$^{ns}$ | Overall Liking$^{ns}$ |
| ลูกชิ้นหมูควบคุม | 7.37 | 6.30$^{a}$ | 6.30$^{a}$ | 6.97 | 6.87 |
| ลูกชิ้นหมูผสมCOS (pH 4, 0.5%w/w) | 7.00 | 7.23$^{b}$ | 7.30$^{c}$ | 6.57 | 6.93 |
| ลูกชิ้นหมูผสมCOS (pH 4, 1.0%w/w) | 7.40 | 7.50$^{c}$ | 7.00$^{b}$ | 6.87 | 7.13 |
| ลูกชิ้นหมูผสมCOS (pH 5, 0.5%w/w) | 7.10 | 6.80$^{ab}$ | 6.77$^{a}$ | 6.83 | 7.00 |
| ลูกชิ้นหมูผสมCOS (pH 5, 1.0%w/w) | 7.36 | 6.13$^{a}$ | 7.00$^{b}$ | 6.97 | 6.97 |

จากผลการทดลองทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่า ตัวอย่างไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ให้ร้อยละผลผลิตสูงกว่า 95% และไม่ส่งผลต่อค่าคุณลักษณะทางคุณภาพต่าง ๆ ไม่ทำให้ตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไปจากตัวอย่างควบคุม โดยที่ผู้บริโภคยังให้การยอมรับคือ ตัวอย่างไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ pectinase บ่มที่ pH 5.0 และใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อสับสเตรตเท่ากับ 1:50 เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาการบ่มนาน 285 นาที

# บทที่ 5 สรุปและเสนอแนะ

ไคโตซานที่เตรียมได้มีน้ำหนักโมเลกุล 74.4 kDalton และมี%DD เท่ากับ 82% ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ cellulase คือ 50 °C pH = 4-4.5 β-amylase คือ 50 °C pH = 4 – 5.5และ pectinase คือ 45 - 55 °C pH = 4 – 5 เอนไซม์เพคติเนส ให้ร้อยละผลผลิตสูงสุด และให้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุด ซึ่งส่งผลดีต่อการยับยังเชื้อจุลินทรีย์ การเติมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ pectinase ลงในลูกชิ้นหมูให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ยาวนานถึง 21 วันที่ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่จำเป็นต้องบรรจุแบบสุญญากาศ ตัวอย่างไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ให้ร้อยละผลผลิตสูงกว่า 95% และไม่ส่งผลต่อค่าคุณลักษณะทางคุณภาพต่าง ๆ กล่าวคือไม่ทำให้ตัวอย่างเปลี่ยนแปลงไปจากตัวอย่างควบคุม และผู้บริโภคยังให้การยอมรับคือ ตัวอย่างไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ pectinase บ่มที่ pH 5.0 และใช้อัตราส่วนโดยน้ำหนักของเอนไซม์ต่อสับสเตรตเท่ากับ 1:10 เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาการบ่มนาน 285 นาที (P 5.0/1:10)

# เอกสารและสิ่งอ้างอิง


สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.) มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ลูกชิ้นหมู. มผช. 304/2547. [available online: http://www.tisi.go.th/otop/pdf_file/tcps304_47.pdf].

ศิวาพร ศิวเวชช 2535. วัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม.

ศิวาพร ศิวเวชช 2546. วัตถุเจือปนอาหาร (เล่ม 1). โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.

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.

Choi, B.K., Kim, K.Y., Yoo, Y.J., Oh, S.J., Choi, J.H., and Kim, C.Y. 2001. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus*

*actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. International Journal of Antimicrobial Agents. 18: 553-557.

Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., Georgakis, S.A. 2007. 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.

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.

Jeon, Y.J., and Kim, S.K. 2000. Continuous production of chitooligosaccharides using a dual reactor system. Process Biochemistry. 35: 623-632.

Jeon, Y.J., Park, P.J., and Kim, S.K. 2001. Antimicrobial 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 Pitchyangura, R. 2008. The influence of chitosan on physico-chemical properties of chicken salt-soluble protein gel. Food Hydrocolloids. 22(1): 74-83.

Kim, S.K., and Rajapakse, N. 2005. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. Carbohydrate Polymers. 62: 357-368.

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 poutry products. Advances in meat research-Volume 3 Restructured meat and poultry products, pp. 79-93. New York: AVI Publishing.

Kim, J.Y., Lee, J.K., Lee, T.S., and Park, W.H. 2003. Synhesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activiy against *Streptococcus mutans*. International Journal of Biological Macromolecules. 32: 23-27.

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.

Lim, S.H., and Hudson, S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with fiber-reactive group. Carbohydrate Research. 339: 313-319.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Shahidi, F., Kamil, J., Jeon, Y.J., and Kim, S.K. 2002. Antioxidant role of chitosan in a cooked cod *(Gadus morhua)* model system. Journal of Food Lipids. 9: 57-64.

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.

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.

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.

Tseng, T.F., Lui, D.C. and Chen, M.T. 2000. Evaluation of transglutaminase on the quality of low-salt chicken meat-balls. Meat Science. 55: 427-431.

Vernam, A.H., and Sutherland, J.P. Meat and meat products: Technology, chemistry and microbiology., pp. 121-166. Great Britain: Chapman & Hall.

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.

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.

## ภาคผนวก

-