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

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2554

เรื่อง

ผลของการใช้ไคโตซาน ร่วมกับสารสกัดขิง (*Zingiber officinale* Roscoe) เพื่อเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบด

Effect of Concomitant Utilization of Chitosan and Ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) Extract as Antioxidant and Antimicrobial Agent in Ground Beef Products

คำนำ

ในปัจจุบันตลาดอาหารสุขภาพมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นจากในอดีต เนื่องจากผู้บริโภคตระหนักและให้ความสนใจเกี่ยวกับสุขภาพของตนเองมากขึ้น อาหารเพื่อสุขภาพประเภทต่าง ๆ เป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคให้ความสนใจ แหล่งรวมของสารเคมีที่ให้ผลดีต่อร่างกายมักได้มาจาก พืช ผัก ผลไม้ และสมุนไพรไทย และเป็นที่สนใจในการวิจัยเป็นอย่างมาก สารเจือปนที่ใช้ในอาหารที่มาจากธรรมชาติมีความปลอดภัยในการบริโภคมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของพืช หรือสัตว์บางชนิด จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ สารเจือปนในอาหารที่ได้จากธรรมชาติขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการใช้ เช่น ไคโตซานเป็นสารที่ได้จากเปลือกกุ้งที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เป็นต้น และขิงเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่จับกับอนุมูลอิสระ และเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง

ในปัจจุบันการผลิตอาหารที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับผู้ผลิตอาหารในระดับอุตสาหกรรม จึงได้มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพื่อเป็นวัตถุเจือปนอาหารทดแทนสารเคมี ที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้หากได้รับเป็นระยะเวลายาวนาน อาทิเช่น สารจำพวกวัตถุกันเสีย และวัตถุกันหืน ซึ่งสารเคมีดังกล่าว หากมีการใช้เกินมาตรฐานก็จะเกิดความเป็นพิษต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้น การศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อใช้ทดแทนวัตถุเจือปนอาหารที่เป็นสารเคมี จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและจำเป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารปลอดภัย โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปจากเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ที่สามารถเสื่อมเสียได้อย่างรวดเร็ว

จากรายงานการสำรวจตลาดหลายรายงานได้พบว่า ตลาดของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อสุขภาพ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีความปลอดภัยจากสารเคมี และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์อินทรีย์มีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น และมีอัตราการเติบโตอย่างรวดเร็วตั้งแต่ในปี 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 ที่จะต้องปรับเปลี่ยนแนว

ทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป ให้ปลอดภัยและสอดคล้องต่อความต้องการของกลุ่มผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ ที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปที่ผลิตจากเนื้อวัว มักจะประสบปัญหาหลักในเรื่องการเกิดการเหม็นหืน อันเกิดเนื่องมาจากไขมันในเนื้อวัว และการเสื่อมเสียอย่างรวดเร็วจากเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้ยากต่อการนำไปแปรรูปต่อ และทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมีคุณลักษณะทางด้านคุณภาพที่ด้อยลง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายที่จะพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ จากสารสกัดธรรมชาติ โดยเลือกสารสกัดจากขิง ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มาใช้ร่วมกับไคโตซานที่มีคุณสมบัติที่ดีอย่างยิ่งในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้อีกด้วย โดยศึกษาทั้งกรรมวิธีการผลิตสารสกัดจากขิง กรรมวิธีการผลิตและการผสมไคโตซานร่วมกันสารสกัดกับขิง และสภาวะการเตรียมสารสกัดดังกล่าวที่เหมาะสม เพื่อให้ได้สารสกัดธรรมชาติที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี โดยเลือกใช้เนื้อวัวบดเป็นผลิตภัณฑ์ต้นแบบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) สำหรับทุนอุดหนุนวิจัยทั้งหมดของงานวิจัยนี้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะการผลิตไคโตซานให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสม และมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์สูงที่สุด

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดขิงที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด

3. ศึกษาผลของการประยุกต์ใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดจากขิงที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อวัวบด ที่มีผลต่อคุณลักษณะทางเคมี กายภาพ ประสาทสัมผัส และอายุการเก็บรักษา

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีขอบเขตครอบคลุมถึงการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมไคโตซานและสารสกัดจากขิง เพื่อใช้ร่วมกันในการออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ รวมทั้งศึกษาผลของการใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดจากขิง เพื่อเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อวัวบด และศึกษาผลของการใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดจากขิง ที่มีต่อคุณลักษณะทางด้านกายภาพ เคมี และคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสของเนื้อวัวบด

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เนื่องมาจากไคโตซาน (chitosan) ที่สกัดได้จากเปลือกกุ้ง เป็นสารที่สกัดได้มาจากสารโพลีเมอร์ธรรมชาติ “ไคติน (chitin)” ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่มากเป็นอันดับสองของโลก และสามารถสกัดได้ง่าย มีวิธีการสกัดไม่ซับซ้อนและปลอดภัย ซึ่งเปลือกกุ้งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตกุ้งปอกเปลือกแช่เยือกแข็งเพื่อส่งออก ซึ่งประเทศไทยมีอยู่มากและมีปัญหาในการกำจัดทิ้ง ดังนั้นหากมีการนำมาศึกษาและสกัดเป็นไคตินหรือไคโตซาน ก็จะเป็นผลดีอย่างมากในการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งได้ และด้วยเหตุผลนี้เอง จึงทำให้การผลิตไคโตซานไม่มีปัญหาในด้านวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการผลิต อีกทั้งไคโตซานยังมีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา และยังสามารถเป็นสารต้าน

อนุมูลอิสระได้อีกด้วย ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ทั้งนี้ ไคโตซานยังมีข้อจำกัดบางอย่างในด้านคุณสมบัติการละลาย กล่าวคือไม่สามารถละลายได้ในน้ำ แต่สามารถละลายได้ในกรดอินทรีย์บางชนิด ซึ่งทำให้การประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด รวมทั้งผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ไม่สามารถทำได้ ดังนั้น จึงต้องมีการปรับปรุงคุณสมบัติภายในของไคโตซาน อันได้แก่น้ำหนักโมเลกุล และระดับหมู่อะเซททิลในสายโมเลกุล (%) รวมทั้งการใช้ไคโตซานร่วมกันกับโปรตีน หรือสารสกัดธรรมชาติชนิดอื่นเพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้ไคโตซานได้โดยมีความสามารถในการละลายที่ดี และยังคงความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระไว้ได้ สารสกัดจากขิงเป็นสารสกัดจากธรรมชาติชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี และสามารถออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่ไม่ดีนัก ดังนั้น หากมีการนำไคโตซานและสารสกัดจากขิง มาใช้ร่วมกัน ก็น่าจะให้ผลเสริมฤทธิ์กันเป็นอย่างดีในการใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปได้

เอกสาร และทบทวนวรรณกรรม

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Meat Product)

ความหมายของ "ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ตามที่เข้าใจโดยทั่วไป หมายถึง สิ่งที่ทำขึ้นมาหรือได้จากเนื้อสัตว์ เช่น ปลาทูน่ากระป๋อง หมูทอดกระเทียม ไก่ย่าง เนื้อเค็มตากแห้ง เนื้อสวรรค์ หมูทุบ หมูหยอง ปลายอ กุนเชียง ลูกชิ้น แหนม หมูยอ ไส้กรอก กุ้งหวาน ปลาต้มเค็ม กุ้งแห้ง กะปิ ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาจ่อม”

แต่ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับ 243) พ.ศ. 2544 ซึ่งมีผลใช้บังคับตั้งแต่วันที่ 27 กันยายน 2544 เป็นต้นไปนั้น ได้กำหนดความหมายเป็นการเฉพาะที่แตกต่างจากความเข้าใจโดยทั่วไป ซึ่งหมายถึงผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่ไม่ใช่อาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง อาหารในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท (เช่น กระป๋อง ขวดแก้วที่มียางรองด้านในที่ฝา ซองอลูมิเนียมฟอยล์) ได้แก่ ลูกชิ้น ไส้กรอก แหนม หมูยอ กุนเชียง และผลิตภัณฑ์ที่มีกระบวนการผลิตทำนองเดียวกันที่บรรจุในภาชนะพร้อมจำหน่าย

การปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ (สุมลฑา, 2545)

การปนเปื้อนของเนื้อสัตว์นั้นเกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอนตั้งแต่ก่อนสัตว์ตาย การฆ่า ไปจนถึงผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พร้อมรับประทาน ความหมายของการปนเปื้อนหมายถึงการพบบางสิ่งที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์เนื้อ และทำให้ผลิตภัณฑ์บริโภคไม่ได้ หรือไม่ปลอดภัยต่อการบริโภคอาจมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนจากสารเคมี ยาปฏิชีวนะ และเชื้อจุลินทรีย์ เนื้อสัตว์จัดเป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่าย (perishable food) เนื่องจากมีความชื้น หรือค่าวอเตอร์แอกติวิตีซึ่งหมายถึงปริมาณน้ำอิสระในอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด ในเลือดยังมีสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ เช่น กลูโคสที่ตกค้างอยู่ตามเซลล์ต่าง ๆ ประกอบกับมีลักษณะทางกายภาพที่เหมาะสม เช่น กล้ามเนื้อมีช่องว่าง และโพรงอากาศมากมายที่ทำให้จุลินทรีย์อาศัยอยู่ได้จากคุณลักษณะดังกล่าวจึงทำให้เนื้อสัตว์เกิดการเสื่อมเสียโดยมีสาเหตุจากจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ เนื้อสัตว์มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนทางเคมีได้ตั้งแต่ระหว่างการเลี้ยงสัตว์ ก่อนฆ่า โดยการปนเปื้อนด้วยสารเคมี ยาปฏิชีวนะ ฮอร์โมน ยาฆ่าแมลง และกำจัดศัตรูพืช รวมทั้งสารเร่งการเจริญ สารเร่งเนื้อแดง แม้แต่ในระหว่างการผลิตผลิตภัณฑ์ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อนจากวัตถุเจือปนต่าง ๆ ได้ การเปลี่ยนแปลงบางประการเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของเนื้อได้ เช่น การเกิดปฏิกิริยา

ออกซิเดชันของไขมันจัดเป็นสาเหตุที่ทำให้เนื้อสัตว์เสื่อมเสียประการหนึ่งเช่นกัน การเสื่อมเสียแบ่งเป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรสชาติ และกลิ่น การเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ (ตารางที่ 1) (ชัยณรงค์, 2529)

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เน่าเสีย

ชนิดของจุลินทรีย์	**ลักษณะของการเสื่อมเสีย**	**ผลิตภัณฑ์**
Pseudomonas *Acenetobacter*	เกิดเมือก เนื้อเปลี่ยนเป็นสีเขียว และมีรสเปรี้ยว	เนื้อสด
Pseudomonas	เกิดเมือก หรือลักษณะเหนียว รสเปรี้ยว กลิ่นผิดปกติ หรือเน่าเสีย	เนื้อที่ห่อและเก็บในที่เย็น
Lactobacillus *Leuconostoc* *Microbacterium*	เกิดเมืองบนผิวด้านนอกของเปลือกหุ้มไส้กรอก การเปลี่ยนแปลงสีของไส้กรอกเกิดสีเขียว เกิดก๊าซและรสเปรี้ยวใต้ปลอกของไส้กรอก	ไส้กรอก
Steptococcus *Leuconostoc* *Proteus* *Bacillus* *Pseudomonas*	กลิ่นเปรี้ยวและเกิดการเน่าเสีย ผิวหน้าของเบคอนเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีลักษณะเป็นยาง เมื่อทิ้งไว้นานจะเห็นเป็นเมือกปรากฏชัดเจน เกิดกลิ่นซัลเฟอร์ในเบคอน	เบคอนและแฮม

ที่มา: Anon. (1995)

วัตถุเจือปนอาหาร (Food Additive) (จิรารัตน์, 2554)

สารซึ่งปกติไม่ได้ใช้บริโภคเป็นอาหาร หรือไม่ได้ใช้เป็นส่วนประกอบหลัก (ingredients) ของอาหารไม่ว่าสารนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม การเติมสารนั้นอย่างตั้งใจลงในอาหารเพื่อวัตถุประสงค์ด้านเทคโนโลยี (รวมทั้งประสาทสัมผัส) ในการผลิต การแปรรูป การปฏิบัติ การบรรจุ การขนส่ง หรือการเก็บรักษาอาหาร ซึ่งมีผลหรือคาดว่าจะมีผล (โดยทางตรงหรือทางอ้อม) โดยตัวของสารนั้นเอง หรือผลพลอยได้ของสารนั้นในการเป็นส่วนหนึ่งของอาหารนั้น หรือมีผลต่อคุณลักษณะของอาหารนั้น

ทั้งนี้ไม่รวมถึงสารปนเปื้อน (Contaminants) หรือสารที่เติมไปในอาหารเพื่อรักษาหรือปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการ เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่ (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 119, 2532)

1. ชนิดของวัตถุเจือปนอาหาร และการนำมาใช้ประโยชน์

วัตถุเจือปนในอาหารนับว่ามีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมเป็นอย่างยิ่ง ไม่ว่าจะเป็นการช่วยยืดอายุการเก็บ ช่วยให้อาหารมีคุณภาพคงที่ใกล้เคียงกับวัตถุดิบ หรือช่วยปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ หรือเป็นการให้ส่วนประกอบที่จำเป็นแก่ผลิตภัณฑ์อาหารที่เตรียมไว้เพื่อบุคคลที่ต้องการอาหารพิเศษ วัตถุเจือปนในอาหารมีอยู่มากมาย สามารถแบ่งตามหน้าที่เฉพาะการใช้ประโยชน์ ได้แก่ วัตถุกันหืน (antioxidant) สารเสริมฤทธิ์วัตถุกันหืน (antioxidant synergist) สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) วัตถุให้ความหวานที่ไม่ใช่น้ำตาล (non-nutritive และ low calorie sweeteners) วัตถุปรุงแต่งกลิ่นรส (flaorenhancers) สารปรับปรุงเนื้อสัมผัสอาหาร (stabilizers thickeners และ emulsifer) ในการศึกษานี้เน้นคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเชื้อจุลินทรีย์ จึงยกกลไกการทำงานของวัตถุเจือปนของวัตถุกันหืน และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้

1.1 วัตถุกันหืน

สารที่ใช้เพื่อชะลอการเสียของอาหาร อันเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งลักษณะของการเสียเนื่องจากปฏิกิริยารวมถึงการเสื่อมคุณภาพของอาหาร การหืน อาหารมีสีผิดปกติ กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารเปลี่ยนแปลงไป คุณค่าทางอาหารลดลง และบางครั้งอาจมีสารที่เป็นอันตรายต่อร่างกายเกิดขึ้นด้วย เป็นต้น

เมื่อเติมวัตถุกันหืนลงไปในอาหารที่มีไขมัน และน้ำมันเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย วัตถุกันหืนจะไปทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ ทำให้ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นแบบลูกโซ่หยุดชะงักไปด้วย หรือเมื่ออนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ทำปฏิกิริยากับวัตถุกันหืน ที่เติมลงไปจะเหลืออนุมูลของวัตถุกันหืน ซึ่งเกิดปฏิกิริยา ได้ช้ากว่าอนุมูลอิสระมาก และเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่คงตัวดังสมการ

$$ROO\bullet + AH \longrightarrow ROOH + A\bullet \quad \text{หรือ}$$

$$RO + AH \longrightarrow ROH + A\bullet \quad \text{หรือ}$$

$$RO\bullet + AH \longrightarrow RH + A\bullet \text{หรือ}$$

$A\bullet + A\bullet \longrightarrow A_2$ หรือ

$ROO\bullet + A\bullet \longrightarrow ROOA$

จากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้วัตถุกันหืนสามารถช่วยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นในไขมัน หรือน้ำมัน หรือผลิตภัณฑ์ที่มีไขมัน และน้ำมันเป็นองค์ประกอบได้ วัตถุกันหืนที่นิยมใช้กันทั่วไปในอาหาร ได้แก่ บีเอชเอ (Butylated Hydroxy Anisol, BHA) บีเอชที (Butylated Hydroxy Toluene, BHT) ทีบีเอชคิว (Tertiary Butyl Hydro Quinone, TBHQ) โพรพิลแกลเลต (Propyl Gallate, PG) แอลคอร์บิล พาร์มิเทค (ascorbyl parmitate) ไอโซแอสคอร์บิค และโซเดียมไฮโซแอสคอร์เบต (isoascorbie และ isoascorbate) และโทโคฟีรอล (tocopherol) เป็นต้น

1.2 สารต้านเชื้อจุลินทรีย์

สารเคมีที่เติมลงในอาหารเพื่อป้องกัน หรือชะลอการเสื่อมเสียของอาหาร อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ซึ่งอาจจะเป็นรา ยีสต์ หรือแบคทีเรีย สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ หรือวัตถุกันเสีย ที่ใช้จะไปชะงักการเจริญเติบโต หรือทำลายจุลินทรีย์ต่างๆ โดยมีผลต่อ

1.2.1 ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ วัตถุกันเสียที่ใช้อาจมีผลทำให้ความสามารถในการให้อาหารแทรกซึมผ่านผนังเซลล์เสียไป หรือมีการเกิดการฉีกขาดที่ผนังเซลล์เกิดขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้จุลินทรีย์ตาย

1.2.2 การทำงานของเอนไซม์ วัตถุกันเสียจะไปชะงักประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์หยุดชะงักการเจริญเติบโต หรือตายได้

1.2.3 กลไกทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ วัตถุกันเสียที่ใช้จะไปทำลาย หรือมีผลต่อสารที่มีความสำคัญในด้านพันธุกรรม เช่น ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ เป็นต้น ทำให้ขบวนการบางเซลล์หยุดชะงัก หรือผิดปกติไป ซึ่งเป็นวิธีการลดปริมาณจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาได้ ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์

1. ความเข้มข้นของสารต้านเชื้อจุลินทรีย์
2. ชนิด จำนวน อายุ และประวัติของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร
3. อุณหภูมิ

4. สมบัติทางเคมี และกายภาพของอาหาร เช่น ส่วนประกอบของอาหารความเป็นกรดด่างของอาหาร ความชื้น ความตึงผิว (Surface Tension) และลักษณะการเป็นคอลลอยด์ของอาหาร เป็นต้น

1.2.4 สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ

1. ควรมีความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์ได้มากกว่าที่จะเพียงชะงักการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2. ควรทำลายจุลินทรีย์ชนิดที่เจริญในอาหารได้ โดยเฉพาะประเภทที่ทำให้อาหารเป็นพิษ

3. ไม่ควรจะถูกทำให้ประสิทธิภาพลดลงโดยอาหาร หรือองค์ประกอบของอาหารหรือผลิตผลพลอยได้ สารต้านเชื้อจุลินทรีย์จากขบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์

4. ถ้าหากเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ประเภทที่ทำลายจุลินทรีย์ได้ ควรจะถูกเปลี่ยนสภาพให้เป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย หรือสามารถถูกทำให้สลายตัวได้ด้วยกรรมวิธีที่ใช้ในการแปรรูปอาหารได้

5. สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในอาหารนั้น ควรจะไม่เป็นสาเหตุทำให้จุลินทรีย์เกิดการดื้อยาขึ้น

สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ กรดเบนโซอิค และเบนโซเอต (benzoic acid หรือ benzoate) ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และเกลือซัลไฟท์ (sulfur dioxide และ sulfite) สารประกอบไนไตรต์ และไนเตรต (nitrite และ nitrate) กรดซอร์บิค และเกลือซอร์เบต (sorbic acid และ sorbate) เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณการใช้สารกันหืน และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์

ชื่อและกลุ่มหน้าที่ในอาหาร	**ชนิดของอาหาร**	**ปริมาณสูงสุดที่ใช้ได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)**
โซเดียมไนไตรต **กลุ่มหน้าที่:** วัตถุกันเสีย	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	500 คำนวณโซเดียมไนเตรต

โซเดียมไนไตรท์	- คุกเคียวชอพมีต คุกเคียวพอร์กโซลเดอร์ คุกเคียวแฮม และลันชันมีต - คอร์นบีฟที่ผ่านกรรมวิธีแคนนิ่ง	125 คำนวณโซเดียมไนไตรท์ 50 คำนวณโซเดียมไนไตรท์
บีเอชเอ และบีเอชที **กลุ่มหน้าที่:** วัตถุกันหืน	ผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันและน้ำมัน	200
กรดแอสคอร์บิล พาล์มิเทต	ผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันและน้ำมัน	200
กรดแอล-แอสคอร์บิก	คุกเคียวชอพมีต คุกเคียวพอร์กโซลเดอร์ คุกเคียวแฮม และลันชันมีต	500

ที่มา: ดัดแปลงจาก กองสุขาภิบาลอาหาร กรมอนามัย (2543)

วัตถุเจือปนที่ใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งข้อดีของการใช้สารเคมีสังเคราะห์คือ มีความคงตัว และมีประสิทธิภาพสูง แต่มีผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคเมื่อผู้ผลิตมีการใช้วัตถุเจือปนในปริมาณมากเกินกว่าที่กฎหมายกำหนด และมีการสะสมในร่างกายหากมีการบริโภคผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ใช้วัตถุเจือปนที่ได้จากการสังเคราะห์เป็นประจำซึ่งจะส่งผลเสียต่อระบบร่างกายในระยะยาว (ธิติรัตน์, 2553) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วัตถุเจือปนที่มีแหล่งที่มาจากธรรมชาติ โดยได้ทำการคัดเลือกวัตถุดิบจากธรรมชาติสองชนิด คือ ไคโตซาน เป็นตัวแทนของสารต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากเป็นสารที่สกัดได้จากเปลือกกุ้งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมกุ้งแช่เยือกแข็ง มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ และขิงเป็นตัวแทนของสารต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากขิงเป็นวัตถุดิบที่หาง่าย และเป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี

1. ไคโตซาน

ไคโตซาน (poly [ß - (1→4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]) หรืออนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลของไคติน หรือที่เรียกว่าปฏิกิริยา Deacetylation โดยแช่ไคตินในสารละลายด่างเข้มข้น เป็นโพลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทั้งหมด และน้ำที่มีค่า pH เป็นกลาง หรือด่าง แต่สามารถละลายในกรดอ่อน (Hayes *et al*., 1977) ไคโตซานมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในวงการต่างๆได้มากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงอุตสาหกรรมอาหารสัตว์สำหรับ สุกร ไก่ ปลา กุ้ง และสุนัข เป็นต้น ทางด้านการแพทย์ เช่น ทำ

ผ้าปิดแผล ผ้าก๊อต ช่วยให้แผลหายเร็ว ด้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ด้านการเกษตร เพิ่มผลผลิต ของพืชสวน พืชไร่ และปศุสัตว์ เช่น เร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ (ลิลา, 2544) ซึ่งคุณสมบัติของไคโตซานนั้นขึ้นอยู่กับระดับการกำจัดหมู่อะซิติล และน้ำหนักโมเลกุล กล่าวคือ เมื่อไค-โตซานมีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลเกินกว่า 60 % ขึ้นไป การกระจายไคโตซานในกรดอินทรีย์จะเพิ่มมากขึ้นทำให้มีความสามารถในการรับโปรตรอนจากสารละลายได้เพิ่มขึ้นซึ่งช่วยในการละลายดีขึ้น เพราะมีสมบัติของประจุบวกเพิ่มขึ้น ฉะนั้นไคโตซานจึงสามารถละลายได้ดีขึ้นในกรดต่างๆ เช่น กรด-น้ำส้ม กรดแลคติก และกรดอินทรีย์อื่นๆ (อัธยา, 2536) นอกจากนี้ยังพบว่า ไคโตซานจากเปลือกกุ้งที่มีระดับการกำจัดหมู่อะซิติลสูงๆ เช่น 95 - 98% DD มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้จาก 5 วัน เป็น 9 วัน (Tsai *et al*., 2002) ทั้งนี้ยังพบว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะมีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง และน้ำหนักโมเลกุลสูง (Chen *et al*., 2007) เนื่องจากไคโตซานมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระค่อนข้างต่ำ แต่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี จึงได้มีการนำสารสกัดจากพืชที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูง เช่น สารสกัดโรสแมรี่ และสารสกัดมินท์ มาใช้ร่วมกับไคโตซานเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Kanatt *et al*., 2008)

1.1 การผลิตไคติน

กระบวนการผลิตไคตินจากเปลือกของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Crustacean shell waste) มีขั้นตอนพื้นฐานอยู่ 3 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 การแยกโปรตีน (deproteinization) ขั้นตอนที่ 2 การแยกแร่ธาตุ (demineralization) และขั้นตอนที่ 3 การแยกเม็ดสี (decoloration) ซึ่งขั้นตอนที่ 1 และ 2 สามารถสลับลำดับก่อนหลังได้ อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตไคตินที่ต้องการนำโปรตีนที่สกัดได้กลับมาใช้ประโยชน์ จำเป็นจะต้องเริ่มจากขั้นตอนการแยกโปรตีนออกจากเปลือกของสัตว์เหล่านี้ก่อนขั้นตอนการแยกแร่ธาตุ เนื่องจากโปรตีนที่ได้จะมีปริมาณและคุณภาพที่ดีกว่า (Johnson and Peniston, 1982)

1.2 การผลิตไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

การสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้งเริ่มจากการแยกโปรตีน (Deproteination) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ แยกแร่ธาตุ (Demineralization) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ แยกสี (Decoloration) ด้วย 95% เอทานอล จากนั้นดึงหมู่อะซิทิลออกจากสายโมเลกุล

(Deacetylation) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (50% โดยน้ำหนัก) (ดัดแปลงจาก Tolaimate et al., 2003; Kachanechai *et al*., 2008)

1.3 การต้านอนุมูลอิสระของไคโตซาน

การแบ่งกลุ่มของไคโตซานแบ่งได้จากกลุ่มเอมีนบนสายโซ่ไคโตซาน คุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ การจับประจุของโลหะ และการต้านอนุมูลอิสระ ขึ้นอยู่กับการกำจัดหมู่อะซิติล (DD) กลุ่มเอมีนจะมีค่า pKa อยู่ในช่วง 6.2 - 6.8 ซึ่งจะแสดงประจุบวกภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ปัจจุบันไค-โตซาน และอนุพันธ์ได้รับความสนใจต่อคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมี reactive oxygen species (ROS) และ hydroxylradical (•OH) โดยง่ายต่อการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ (free radical) กลไกการกำจัดอนุมูลอิสระเกิดขึ้นโดย •OH ทำปฏิกิริยากับอะตอมของไฮโดรเจนในไคโตซานแล้วรวมตัวกลายเป็นสารประกอบที่มีความคงตัว กิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระของไคโตซานต่อ •OH มีได้หลายปฏิกิริยาได้แก่ (Yazdani *et al*., 1992)

1. กลุ่มไฮดรอกซิลในโพลีแซกคาไรด์สามารถทำปฏิกิริยากับ •OH โดยปฏิกิริยา H-abstraction

2. •OH สามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มอะมิโน (NH_2) แล้วได้เป็นสารประกอบคงตัว

3. กลุ่มอะมิโน (NH_2) รวมกลุ่มกันเป็นกลุ่มแอมโมเนียม (NH_3^+) ทำปฏิกิริยากับ •OH โดยการให้ไฮโดรเจนทำปฏิกิริยากับ •OH

1.4 การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซาน

1.4.1 โครงสร้างผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์

ผนังเซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วย โครงสร้าง 2 ส่วน คือ ผนังเซลล์ที่อยู่นอกสุดและเซลล์เมมเบรน (Cell membrane) อยู่ถัดมา ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นโครงสร้างที่แข็งแรง โดยมีชั้นของเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดเอ็นอะเซทิลกลูโคซาไมน์ (N-acetylglucosamine) และกรดเอ็นอะทิลมิวรามิก (N-acetylmuramic) ที่สลับโมเลกุลกันเป็นส่วนแกน และมีตัวเชื่อมกับโมเลกุลเป็นเตตระเพปไทด์ (Tetrapeptide) และเพนตาไกลซีน (Pentaglycine) จากโครงสร้างของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม

1. แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive bacteria) มีชั้นเพปทิโดไกลแคน เพียงชั้นเดียวมีความหนาประมาณ 15.0 – 80.0 นาโนเมตร มีกรดไทโคอิก (Trihoic acid) และกรดไทคูโรนิค (Teichuronic acid)

2. แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) มีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อน ประกอบด้วยชั้นของเพปทิโดไกลแคน อยู่ชั้นในสุด หนาประมาณ 2.0 นาโนเมตร และหุ้มด้วยชั้นของลิโพพอลิแซกคาไรด์ (Lipopolysaccharide) และลิโพโปรตีน (Lipoprotein)

1.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซาน คือ

1. เชื้อจุลินทรีย์ (Microbial factor)

ไคโตซานมีคุณสมบัติในการยับยั้ง เชื้อรา แบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ และออกฤทธิ์ต้านเชื้อราทั้งในรูปของการสร้างสปอร์ (Sporulation) และการงอกของสปอร์ (Spore germination) และไคโตซานที่มีคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์สูงจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าแกรมบวก (Chung *et al*., 2004) ขณะที่บางการศึกษารายงานว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีความอ่อนแอมากกว่า บางทีอาจเนื่องมาจากชั้นผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ (Zhong *et al*., 2008) คุณสมบัติการต้านเชื้อราของไคโตซานจะดียิ่งขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดสูง (Roller and Covill, 1999) นอกจากชนิดของจุลินทรีย์แล้วอายุเซลล์ของจุลินทรีย์มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน

2. ปัจจัยภายในไคโตซาน (Intrinsic factor)

ความหนาแน่นของประจุบวก ไคโตซานที่มี DD สูง (97.5%) แสดงว่ามีความหนาแน่นของประจุบวกสูงจึงมีความสามารถในการต้านเชื้อ *staphylococcus aureus* ได้ดีกว่าไคโตซานที่มี DD ปานกลาง (83.7%) (Kong *et al*., 2008)

น้ำหนักโมเลกุล (Mw) การศึกษาความสัมพันธ์ของการต้านเชื้อจุลินทรีย์กับน้ำหนักโมเลกุลนั้นพบว่าไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้นมีผลทำให้การยับยั้งเชื้อ *E. coli* ลดลง ขณะที่การวิจัยอื่นพบว่าไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลสูงมีคุณสมบัติสูงกว่าน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Tikhonov *et al*., 2006)

การจับโลหะ (Chelating) ไคโตซานมีคุณสมบัติในการจับกับโลหะในสภาวะที่เป็นกรด ได้แก่ Ni^{2+} Zn^{2+} Co^{2+} Fe^{2+} Mg^{2+} และ Cu^{2+} ประจุของโลหะจะไปจับกับผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ส่งผลให้ไคโตซานมีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Rabea *et al*., 2003)

1.5 ประโยชน์ และการประยุกต์ใช้ไคโตซาน

1.5.1 การแพทย์

ไคโตซานไม่ก่อให้เกิดการต่อต้านจากร่างกาย ไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อคน ไคโตซานได้รับการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในทางการแพทย์ เช่น ใช้ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพ ต่อต้านมะเร็ง ช่วยลดสารพิษ และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นอันตรายอย่างเชื้อซัลโมเนลลา เนื่องจาก ไคโตซานเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ สามารถเข้าได้กับร่างกายมนุษย์ จากการศึกษาในต่างประเทศ พบว่าสามารถย่อยสลายได้ภายในสัตว์ เนื่องจากมีเอนไซม์หลายชนิดสามารถย่อยสลายได้ นอกจากนี้ไคโตซานยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพบางชนิดด้วย

1.5.2 ช่วยบำบัดน้ำเสีย

มีประโยชน์ช่วยตรึงเอนไซม์ในการทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์รวมทั้งสามารถจับของแข็งแขวนลอยได้ดี และจับกับอะตอมของโลหะหนัก

1.5.3 การเกษตร

นำมาเคลือบผิวผลผลิตทางการเกษตรเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา และป้องกันแมลงกัดกิน ไคโตซานสามารถก่อตัวเป็นฟิล์มบาง ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น เคลือบผิวเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลผลิตทางการเกษตร และเมล็ดพันธุ์ และยังมีการนำเอาอนุพันธ์ของไคติน และไคโตซานไปเป็นสารต่อต้านเชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรียบางชนิด ซึ่งมันสามารถทำงานได้อย่างกว้างขวาง เช่น ยับยั้งโรคโคนเน่าจากเชื้อรา โรคแอนแทรกโนส และโรคอื่นๆ

1.5.4 พัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

ผสมกับพลาสติกเพื่อช่วยให้สามารถย่อยสลายได้ง่าย นอกจากนี้ยังนำมาทำเป็นฟิล์มถนอมอาหารที่สามารถรับประทานได้โดยไม่เป็นอันตราย บทบาทที่สำคัญทางด้านสิ่งแวดล้อมของไคโตซานคือการบำบัดน้ำเสีย มีความสามารถในการจับกับของแข็งแขวนลอยได้ดี และจับกับอะตอมของโลหะหนักรวมทั้งมีการนำไปจับกับสารกัมมันตรังสีอย่างพลูโตเนียม และยูเรเนียมด้วย

1.5.5 ด้านสิ่งทอ

นำมาเคลือบเส้นใยผ้าเพื่อลดกลิ่นเหงื่อ และกลิ่นอับชื้น และต้านเชื้อรา แบคทีเรียอีกด้วย อุตสาหกรรมเส้นใย กระดาษ สิ่งทอ มีการใช้ไคโตซาน เช่น ใช้ทำภาชนะบรรจุที่ย่อยสลายได้ใน

ธรรมชาติ ทำฟิล์มถนอมอาหารที่สามารถรับประทานได้ ใช้ในการผลิตผ้าที่ย้อมสีติดทนนาน ใช้ในกระบวนการผลิตกระดาษ ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพสูง ทนทานต่อการฉีกขาด หรือผลิตกระดาษที่ซับหมึกได้ดีเพื่อการพิมพ์ที่ต้องการคุณภาพสูง

1.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไคโตซาน

1.6.1 การใช้ไคโตซานในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

Sayas-Bara *et al.* (2011) ศึกษาผลิตภัณฑ์เบอร์เกอร์โดยการเติมไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และต่ำที่ความเข้มข้นต่างกัน พบว่าไคโตซานมีผลต่อความเป็นกรดด่าง และสีของผลิตภัณฑ์เบอร์เกอร์ โดยขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุล และความเข้มข้นของไคโตซาน ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ทำให้ผลิตภัณฑ์คงความเป็นสีแดง และลดจำนวนจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เบอร์เกอร์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

Soultos *et al.* (2008) ศึกษาผลของการเติมไคโตซานเพียงอย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับไนไตรท์ (150 ppm) ต่อคุณสมบัติทางจุลินทรีย์ เคมี กายภาพ และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าการเติมไคโตซานมีผลต่อการยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ขณะที่ไนไตรท์ไม่ช่วยในการป้องกันไส้กรอกจากการเน่าเสีย เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานทำให้อัตราการเกิดออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกหมูลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยตัวอย่างที่เติมไคโตซาน และไนไตรท์พบว่ามีค่า malondialdehyde ต่ำที่สุด ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าตัวอย่างที่เติมทั้งไคโตซาน และไนไตรท์ร่วมกันได้รับการยอมรับมากกว่าตัวอย่างอื่น

1.6.2 การใช้ไคโตซานผลิตเป็นฟิล์มเคลือบบริโภคได้ (edible film) (Shahidi *et al.*, 1999)

ฟิล์มเคลือบบริโภคได้ และสารเคลือบจากไคโตซานมีคุณสมบัติในการยืดอายุการเก็บ และคงความสดของผลิตภัณฑ์อาหาร เหตุผลในการนำไคโตซานมาใช้ คือ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ

Wong *et al.* (1992) และ Butler *et al.* (1996) พบว่าไคโตซานมีความสามารถในการป้องกันการแพร่ผ่านของออกซิเจนได้ดี แต่ให้ผลในทางตรงข้ามกับคุณสมบัติการซึมผ่านของไอน้ำ แต่หากมีการใช้ไคโตซานร่วมกับวัตถุดิบที่เป็นไขมันซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะสามารถเพิ่มความสามารถในการต้านการซึมผ่านของน้ำได้ดีขึ้น

1.6.3 คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

ผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์มีความไวต่อการเกิดกลิ่นหืน และกลิ่นรสผิดปกติอื่นๆ เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันชนิดไม่อิ่มตัว Warmed-over flavor (WOF) เป็นกลิ่นที่เกิดขึ้นหลังจากการนำผลิตภัณฑ์ที่แช่เย็นมาอุ่นร้อน ในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่จะเกิดกลิ่นดังกล่าวหลังจากการเก็บรักษาซึ่งจะสูญเสียกลิ่นรสตามธรรมชาติของเนื้อสัตว์ ผลของการใช้ไคโตซานต่อความคงตัวของออกซิเดทีฟในเนื้อวัว เมื่อเติมไคโตซาน 1% ทำให้ค่า TBA ลดลง 70% หลังจากเก็บไว้นาน 3 วัน เมื่อเติมสาร N-carboxylmethylchitosan ความเข้มข้น 5,000 ppm ในเนื้อบด พบว่ามีค่า TBA 93% และเมื่อใช้ N,O-carboxylmethylchitosan (NOCC) แลคเตต อะซิเตต และเกลือไพโรลิดีนคาร์บอกซิเลต ความเข้มข้น 500-3,000 ppm พบว่ามีค่า TBA เป็น 46.7 69.9 43.4 และ 66.3% ตามลำดับ กลไกการยับยั้งมีความสัมพันธ์กับการจับกับเหล็กซึ่งปล่อยออกจากโปรตีนในเลือดจากเนื้อสัตว์ระหว่างกระบวนการให้ความร้อน และเมื่อเติม N-carboxylmethylchitosan ในเนื้อหมู ความเข้มข้น 3,000 ppm พบว่ามีปริมาณเพียงพอต่อการป้องกันการเกิดกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์ (Georgantelis *et al*., 2007)

1.6.4 คุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์

ปัจจุบันได้มีการศึกษากลไกการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซาน และอนุพันธ์ และสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลไก คือ

1. การจับกันของประจุบวกของไคโตซานกับกรดซาลิไซลิกในฟอสเฟอร์ลิปิด ซึ่งจะไปยับยั้งการเคลื่อนที่ของสารภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์

2. การแพร่ของไคโตซานเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ และป้องกันการเจริญเติบโตของเซลล์โดยเข้าไปป้องกันการเปลี่ยนจาก DNA ไปเป็น RNA

Kanatt *et al.* (2008) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีความเสี่ยงทั้งการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และการเกิดออกซิเดชัน จึงจำเป็นต้องใช้สารกันบูดที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ และต้านอนุมูลอิสระ จากงานวิจัยนี้ได้นำสารสกัดจากมิ้นท์ และไคโตซานมาใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ มิ้นท์มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ขณะที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และจุลินทรีย์ก่อโรค ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ คือ 0.05% มิ้นท์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของซาลามี่ค๊อกเทลหมูได้

2. ขิง (*Zingiber officinale* Roscoe)

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขิง (Ginger)

ขิงมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber officinale Roscoe* มีชื่อวงศ์ *Zingiberaceae* และมีชื่อสามัญว่า Ginger มีชื่อที่เรียกในประเทศไทยหลายชื่อ ขิงแกลง ขิงแดง (จันทบุรี) ขิงเผือก (เชียงใหม่) สะเอ (แม่ฮ่องสอน) ขิงบ้าน ขิงแครง ขิงป่า ขิงเขา ขิงดอกเดียว (ภาคกลาง) เกีย (จีนแต้จิ๋ว) ขิงเป็นพืชล้มลุก มีลำต้นใต้ดินซึ่งมีลักษณะคล้ายมือหรือที่เรียกว่า “เหง้า” เปลือกเหง้ามีสีเหลืองอ่อน แต่เนื้อภายในมีสีเหลืองอมเขียว ขิงจัดเป็นพืชตระกูลเดียวกับข่า ขมิ้น กระวาน เร่ว ขิงอ่อนมีสีขาวออกเหลือง (ภาพที่ 1) มีรสเผ็ดและกลิ่นหอม ยิ่งแก่ยิ่งมีรสเผ็ดร้อน ลำต้นบนดินมีลักษณะเป็นกอสูงประมาณ 90 เซนติเมตร ก้านใบเป็นกาบหุ้มซ้อนกัน ใบเป็นใบเดี่ยวออกสลับเรียงกันเป็นสองแถว มีรูปร่างคล้ายใบไผ่ ปลายใบเรียวแหลม ดอกมีสีขาวออกเป็นช่อบนยอดที่แยกออกมาจากลำต้นซึ่งไม่มีใบที่ก้านดอก ดอกมีลักษณะเป็นทรงพุ่มปลายดอกแหลม มีเกล็ดอยู่รอบๆดอกจะแซมออกมาตามเกล็ด ผลมีลักษณะกลมแข็ง (กรมวิชาการเกษตร, 2525) ขิงมีคุณค่าทางโภชนาการดังแสดงในตารางที่ 3

2.2 ส่วนประกอบและคุณค่าทางอาหารของขิง

สรรพคุณทางยาของขิง

เหง้า : รสหวานเผ็ดร้อน ขับลม แก้ท้องอืด จุกเสียด แน่นเฟ้อ คลื่นไส้อาเจียน แก้หอบ
ต้น : รสเผ็ดร้อน ขับลมให้ผายเรอ แก้จุกเสียด แก้ท้องร่วง
ใบ : รสเผ็ดร้อน แก้ฟกช้ำ แก้นิ่ว แก้ขัดปัสสาวะ แก้โรคตา ฆ่าพยาธิ
ดอก : รสเผ็ดร้อน แก้โรคประสาทซึ่งทำให้ใจขุ่นมัว ช่วยย่อยอาหาร แก้ขัดปัสสาวะ
ราก : รสหวานเผ็ดร้อนขม แก้แน่น แก้เสมหะ แก้บิด เจริญอาหาร
ผล : รสหวานเผ็ด บำรุงน้ำนม แก้ไข แก้คอแห้ง เจ็บคอ เป็นอายุวัฒนะ

ภาพที่ 1 เหง้าขิงแก่ อายุประมาณ 12 เดือน

ที่มา: Hashim *et al.* (2011)

ตารางที่ 3 คุณค่าทางโภชนาการของขิงแก่

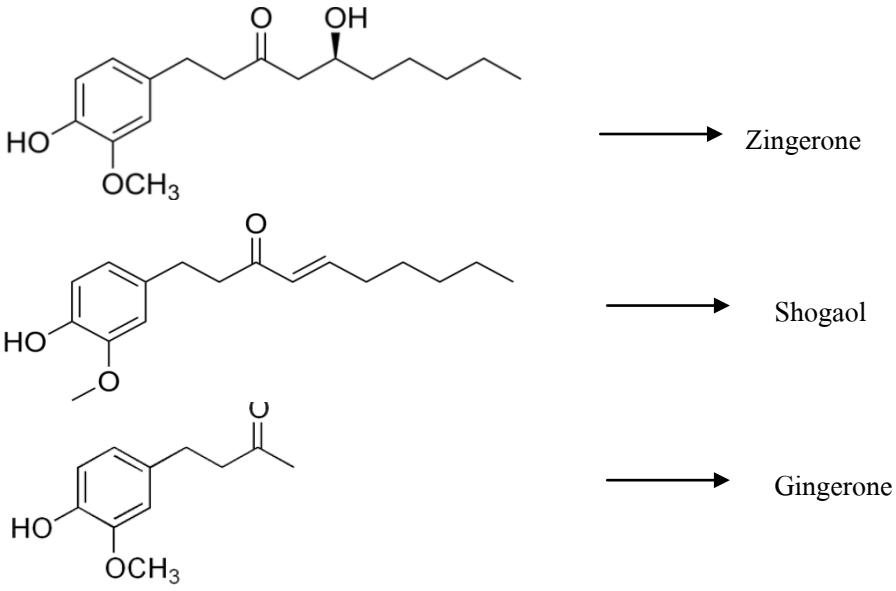
สารอาหาร	ปริมาณที่พบในส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม
พลังงาน (กิโลแคลลอรี)	28
น้ำ (กรัม)	93.5
โปรตีน (กรัม)	0.4
ไขมัน (กรัม)	0.6
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	5.2
เส้นใยหยาบ (กรัม)	0.8
เถ้า (กรัม)	0.3
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	18.0
เหล็ก (มิลลิกรัม)	1.2
วิตามินเอ (RE)	2.0
วิตามินซี (มิลลิกรัม)	1.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก สำนักโภชนาการ กระทรวงสาธารณสุข (2554)

2.3 สารสกัดจากขิง

สารสกัดขิงมีส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย (essential oil) อยู่ประมาณ 1-3% ขึ้นอยู่กับวิธีปลูก และช่วงการเก็บรักษา ในน้ำมันประกอบด้วยสารเคมี คือ ซิงจิเบอรีน (Zingiberene) ซิงจิเบอรอล (Zingiberol) ไบซาโบลีน (Bisabolene) และแคมฟีน (Camphene) และสารสกัดขิงมีน้ำมัน (Oleoresin) ในปริมาณสูงเป็นส่วนที่ทำให้ขิงมีกลิ่นฉุน และมีรสเผ็ด ส่วนประกอบที่สำคัญ ได้แก่ จินเจอรอล (gingerol) โวกาออล (shogaol) ซิงเจอโรน (zingerone) (ภาพที่ 2)

กลิ่นฉุนของขิงประกอบด้วยสาร Zingerone Shagaol และ Gingerol องค์ประกอบหลักที่เป็นน้ำมัน คือ Cineol Borniol Geraniol Linalool และ Famasene สาร Oleoresin ได้จากขิงที่บดแล้วสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น อะซิโตน แอลกอฮอล์ หรือปิโตรเลียม อีเทอร์ แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออก สารสกัดที่ได้จะมีสีเข้ม หรือสีน้ำตาลแกมเขียว เป็นสารประเภทกึ่งของแข็งประกอบด้วย น้ำมันหอมระเหย 28 มิลลิลิตร จากขิง 100 กรัม เอนไซม์ที่แยกได้จากสารสกัดขิงมีชื่อว่า zingibain (Greenberg and Winnick, 1940).



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกในขิง

ที่มา: Young *et al*. (2002)

2.3.1 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

มีงานวิจัยที่พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระประเภทสารประกอบฟีนอลิกจากการสังเคราะห์ เป็นสารที่ระเหย และสลายตัวง่าย ซึ่งเป็นพิษต่อปอด และตับ กฎหมายในการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์มีความเข้มงวด และผู้บริโภคมีทัศนคติที่ดีต่อสารต้านอนุมูลอิสระที่มาจากธรรมชาติมากขึ้น สารสกัดจากขิงชะลอการเกิดกลิ่นหืนในเนื้อหมูบด (salted pork patties) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ ประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากขิงจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และจะมีค่าสูงสุดที่ pH เท่ากับ 7.0 และสารสกัดมีความเข้มข้นต่ำ ในสารสกัดขิงจะพบสาร Shogaol และ Zingerone ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง (Nain *et al*., 2009)

2.3.2 คุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์

สารสกัดจากขิงสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ *Escherichia coli Streptococcus faecalis Salmonella typhimurium Staphyloccous aureus Pseudomonas aeruginosa Bacillus cereus Clostridium perfringens* ในเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Salzer, 1982) การใช้สารสกัดจากขิงในเนื้อวัวบดจะช่วยลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (psychorotrophic) ในสภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ 5-7

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ในผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารสกัดจากขิงเท่ากับ 6.8 cfu/g ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีจำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ 8.2 cfu/g (Negbenebor *et al*., 1995) Azzouz and Bullerman (1982) พบว่าการเพิ่มประสิทธิภาพด้านการต้านเชื้อราของสารสกัดจากขิงทำได้โดยใช้ร่วมกับสารเคมีทางการค้าในปริมาณต่ำ และการใช้ร่วมกับเทคนิคเฮอร์เดิล (hurdles) เช่น อุณหภูมิ (33ºC) pH (5.0) และ water activity (0.99) พบว่าเชื้อราชนิด *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* มีการเจริญเติบโตลดลง อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของสารต้านเชื้อรานั้นขึ้นอยู่กับค่า water activity (Holmquist *et al*., 1983).

3. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสารสกัดจากขิง

ขิง (*Zingiber officinale Roscoe*) มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าในขิงมีสารที่มีโครงสร้างเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอยู่มากกว่า 50 ชนิด ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม จิงเจอรอล (gingerol) และ diarylheptanoids ในงานวิจัยนี้จะศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มจิงเจอรอล ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีกลุ่มแอลคิล (alkyl group) อยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 10 12 หรือ 14 โดยคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบกลุ่มจิงเจอรอลสามารถวัดค่าด้วยวิธี 1) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity 2) Oil Stability Index (OSI) และ 3) 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Masuda *et al*., 2004) สารต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง และโรคหลอดเลือดหัวใจ (Kikuzaki *et al.,* 1994) สารจินเจอรอลช่วยขัดขวางการเกิดออกซิเดชันในกรดลิโนเลอิก ยืดอายุการเก็บรักษาของเนื้อสัตว์ (Ziauddin *et al*., 1995) หมูแห้ง และไส้กรอกเนื้อหมัก (AI-Jalay *et al.,* 1987)

Shirin and Jamuna (2010) ศึกษาส่วนประกอบทางเคมี และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในเหง้าขิง (*Zingiber officinale*) องค์ประกอบที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ทำการวิเคราะห์ได้แก่ โพลีฟีนอล วิตามินซี เบต้าแคโรทีน ฟลาโวนอยด์ และแทนนิน วิธีที่ใช้ในการวัดค่า เช่น Free radical scavenging activity Reducing power และ Total antioxidant activity โดยมีตัวทำละลายเป็น เอทานอล เมทานอล อะซิโตน 80% เมทานอล และ 80% เอทานอล ผลในด้านของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี reducing power และ DPPH - free radical scavenging activity สรุปได้ดังนี้ 80% เมทานอล > 80% เอทานอล > เมทานอล > เอทานอล >น้ำ 30 ˚C > น้ำ100 ˚C > อะซิโตน

Tsai *et al*. (2012) เมื่อหมักเนื้อส่วนหน้าอกของเป็ดเทศด้วยสารสกัดขิง (GE) จากการทดลองได้นำเนื้อส่วนหน้าอกของเป็ดเทศมาหมักด้วย GE ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน วัดค่าวันที่ 0 1 3 7 และ 14 ของการหมัก พบว่าตัวอย่างที่หมักด้วย GE มีค่าความเป็นกรดด่างสูง

กว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่า TBARS ต่ำกว่า ($p < 0.05$) ตัวอย่างที่หมักด้วย GE สำหรับผลของ SDS–PAGE และ western blot พบว่า ไตติน ไมโอซิน และ อัลฟา-แอกตินินถูกสลายได้เร็วในตัวอย่างที่หมักด้วย GE และยังสลายส่วนประกอบของสาร troponin-T ที่น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30 และ 32 kDa จากผลการวิจัยพบว่าการหมักด้วยสารสกัดขิงไม่เพียงพอต่อการชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน แต่ช่วยเพิ่มการย่อยสลายโปรตีนของเนื้อส่วนหน้าอกของเป็ดเทศ

Anandh and Lakshmanan (2012) ผลิตภัณฑ์เนื้อส่วนกระเพาะของกระบือรมควันเตรียมโดยการใส่สารสกัดจากขิง 5.0% เพื่อช่วยให้เนื้อมีความนุ่มขึ้น วัดค่าทางเคมีกายภาพต่างๆ จุลินทรีย์ และคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ใส่สารสกัดจากขิงมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใส่สารสกัดจากขิง โดยค่า pH ปริมาณความชื้น ค่า TBA ค่า tyrosine ยีสต์และราทั้งหมด และ จำนวน staphylococcal จะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น จากข้อมูลเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และคะแนนทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บรักษา 15 วัน ในบรรจุภัณฑ์พลาสติกประเภท LDPE เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4. งานวิจัยที่ศึกษาการใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดจากธรรมชาติ

4.1 เติมในผลิตภัณฑ์โดยตรง (Direct addition)

Sweetie *et al*. (2008) ศึกษาไคโตซานร่วมกับสารสกัดจากมิ้นท์ (CM) เพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ซาลามีหมู พบว่า CM มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระโดยแสดงเป็นค่า IC_{50} เท่ากับ 17.8 μg/ml ซึ่งมีค่าน้อยกว่าสารสกัดมิ้นท์เพียงอย่างเดียว (23.6 μg/ml) นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดี สำหรับอายุการเก็บรักษา CM ช่วยยืดอายุการเก็บจากปกติสองสัปดาห์ เมื่อเติม CM ทำให้มีอายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์เมื่อเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 0-3 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Georgantelis *et al*. (2006) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้สารสกัดโรสแมรี ไคโตซาน และอัลฟาโทโคฟีรอล ที่ใช้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกัน ซึ่งมีผลต่อลิปิดออกซิเดชัน และความคงตัวของสีในผลิตภัณฑ์เบอร์เกอร์เนื้อแช่เยือกแข็ง แล้ววัดปฏิกิริยาการเกิดลิปิดออกซิเดชันโดยศึกษาทั้งขั้นต้น (conjugation dienes และ peroxide value) และขั้นที่สอง (malondialdehyde) ร่วมกับการตรวจวัดทางสายตา และเครื่องมือวัดสี ของไคโตซานที่ใช้เพียงอย่างเดียว และแบบใช้ร่วมกับโรสแมรี และอัลฟาโทโคฟีรอล พบว่ามี

คุณสมบัติการต้านออกซิเดทีฟดีที่สุดเมื่อใช้ไคโตซานร่วมกับโรสแมรี แต่จะให้ผลต่างออกไปเมื่อใช้โรสแมรี หรืออัลฟาโทโคฟีรอลเพียงอย่างเดียวโดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

Kanatt *et al.* (2008) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีความเสี่ยงทั้งการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ และการเกิดออกซิเดชัน จึงจำเป็นต้องใช้สารกันบูดที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ และต้านอนุมูลอิสระ จากงานวิจัยนี้ได้นำสารสกัดจากมิ้นท์ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี แต่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ไม่ดีนัก ในขณะที่ไคโตซานเพียงอย่างเดียวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ดีนัก แต่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีเยี่ยม ดังนั้นจึงนำไคโตซาน และมิ้นท์มาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และพบว่าการเติมสารสกัดไคโตซาน กับสารสกัดมินต์ไม่รบกวนการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซาน และมิ้นท์มีผลในการต้านแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ คือ 0.05% มิ้นท์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของซาลามี่ค๊อกเทลหมูได้

Giatrakou *et al*. (2010) ศึกษาการใช้ไคโตซานร่วมกับไทม์เพื่อทำหน้าที่เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุให้กับผลิตภัณฑ์เคบับไก่พริกไทพร้อมปรุง (RTC) บรรจุแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ตัวอย่างที่ศึกษาประกอบด้วย A (control samples, untreated) A–CH (chitosan; 1.5% v/w) A–T (thyme essential oil; 0.2% v/w) และ A–CH–T (chitosan; 1.5% v/w และ thyme essential oil; 0.2% v/w) พบว่าตัวอย่าง A–CH–T สามารถต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าตัวอย่าอื่น ตัวอย่าง A–CH และ A–CH–T มี pH ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม การทดสอบทางประสาทสัมผัส (taste attribute) ตัวอย่าง A–CH, A–T และ A–CH–T ช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมเป็น 4 และ 6 วันตามลำดับ

4.2 การชุบ (Dipping)

Petrou *et al*. (2012) ศึกษาการยืดอายุเนื้ออกไก่ด้วยการชุบด้วยไคโตซานร่วมกับน้ำมันออร์ริกาโน โดยมีไคโตซานความเข้มข้น 1.5% (w/v) และน้ำมันออร์ริกาโน 0.25% (v/w) แล้วเก็บภายใต้บรรจุภัณฑ์แบบ MAP พบว่าสารละลายดังกล่าวมีผลต่อเชื้อจุลินทรีย์ (mesophilic) lactic acid bacteria (LAB) เช่น *Brochothrix thermosphacta Enterobacteriaceae Pseudomonas spp*. ยีสต์ และเชื้อรา ระหว่างช่วงเวลาการเก็บรักษา ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (MDA values) ของตัวอย่างควบคุม และตัวอย่าง

เนื้อไก่ที่ผ่านการชุบพบว่ามีค่าต่ำกว่า 0.5 mg MDA/kg และเมื่อทดสอบการยอมรับของผู้ทดสอบพบว่าเนื้ออกไก่ที่ชุบด้วยไคโตซานร่วมกับน้ำมันออร์ริการโน พบว่าตัวอย่างมีอายุการเก็บนานถึง 21 วัน

4.3 ฟิล์มเคลือบบริโภคได้ (Edible film)

การประยุกต์ใช้ฟิล์มไคโตซานที่เติมน้ำมันหอมระเหยในเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการ ได้แก่ โหระพา ผักชี และออร์ริกาโน เมื่อใช้ร่วมกับไคโตซานจะช่วยยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia colli* O157:H7 จากงานวิจัยพบว่าพืชที่มีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์เรียงตามลำดับ ดังนี้ ออร์ริกาโน > ผักชี > โหระพา ผลิตภัณฑ์โบโลญาที่ใช้ฟิล์มไคโตซาน หรือใช้ร่วมกับออร์ริกาโนทำให้มีคุณสมบัติในการลดการแพร่ผ่านของไอน้ำ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มความยืดหยุ่นของแผ่นฟิล์ม (Zivanovic *et al*., 2004)

Beverlya *et al*. (2007) นำฟิล์มเคลือบบริโภคได้จากไคโตซานมาเพื่อประเมินคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ *Listeria minocytogenes* (LM) บนพื้นผิวของผลิตภัณฑ์เนื้อวัวอบพร้อมบริโภค (RTE) โดยนำตัวอย่างจุ่มลงในสารละลายไคโตซาน (น้ำหนักโมเลกุลสูง และต่ำ) ซึ่งละลายกับกรดอะซิติก และกรดแลกติก ที่ความเข้มข้น 0.5 หรือ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อทำการประเมินทางด้านจุลินทรีย์พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เคลือบด้วยไคโตซานจะสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria minocytogenes* ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และไคโตซานที่ละลายกับกรดอะซิติกจะสามารถลดจำนวนเชื้อ *Listeria minocytogenes* ได้ดีกว่าในกรดแลกติก

Vargas *et al*. (2011) เตรียมฟิล์มเคลือบบริโภคได้จากไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกับน้ำมันดอกทานตะวัน แล้วนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์แฮมเบอร์เกอร์หมู ฟิล์มไคโตซานจะไปเพิ่มเมทไมโอโกลบิน (MtMb) ของแฮมเบอร์เกอร์ระหว่างการแช่เย็นโดยเฉพาะไคโตซานในสารละลายกรดแลกติก เมื่อใช้ไคโตซานร่มกับน้ำมันดอกทานตะวันทำให้เมทไมโอโกลบิน (MtMb) ของแฮมเบอร์เกอร์ลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่เคลือบเฉพาะไคโตซานอย่างเดียว ฟิล์มไคโตซานมีผลในการลดจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างระหว่างการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามคุณสมบัติสำคัญของฟิล์มไคโตซานคือมีความสามารถในการแพร่ผ่านของออกซิเจนปานกลางช่วยป้องกันและลดผลกระทบอันไม่พึงประสงค์ต่อผลิตภัณฑ์ (การเกิดเมทไมโอโกลบิน)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 เปลือกกุ้งจาก บริษัท ต้าหมิง เอนเตอร์ไพร้ซ์ จำกัด ตำบลโคกขาม อำเภอเมืองสมุทรสาคร จังหวัดสมุทรสาครจังหวัดสมุทรสาคร

1.2 ขิง *(Zingiber officinale Roscoe.)* ที่มีอายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 12 เดือนซื้อจากตลาดสี่มุมเมือง จังหวัดปทุมธานี

2. สารเคมี

2.1 กรดไฮโดรคอริก

2.2 เอทานอล

2.3 โฟลิน-ซีโอเคาทูล (Folin-Ciocalteu reagent)

2.4 โซเดียมคาร์บอเนต

2.5 โซเดียมไฮดรอดไซด์

2.6 โซเดียมอะซิเตต

2.7 เฟอร์รัสซัลเฟต

2.8 เฟอร์โรซีน

2.9 กรดแกลลิก

2.10 กรดอะซิติก

2.11 2,2-ไดฟีนิล-1-ไพคริล-ไฮดราซิล (2,2 Dipheney-1Pioryllhydrazyl, DPPH)

2.12 เอนไซม์เพ็คติเน็กซ์ (Pectinex®)

2.13 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

2.14 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ไขมัน

2.15 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์เส้นใย

3. อุปกรณ์ และเครื่องมือในสกัดสารสกัดขิง

3.1 เครื่องกลั่นระเหยระบบสูญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) (บริษัท SIBATA)

3.2 เครื่องชั่งละเอียด (Presica XT 220A, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

3.3 เครื่องปั่นผสม (Blender)

3.4 เครื่องเขย่าอัตโนมัติ

3.5 กรวยกรองบุชเนอร์

3.6 เครื่องกวนสาร

3.7 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

3.8 ขวดสีน้ำตาล, ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์

3.9 เครื่องแก้ว และอุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการเคมี, จุลินทรีย์ และแปรรูป

4. อุปกรณ์ และเครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

4.1 เครื่องวัดค่าสีสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น CM – 3500d (บริษัท Minolta , ประเทศญี่ปุ่น)

4.2 เครื่องวัดปริมาณการดูดกลืนแสง UV – VIS recording spectrophotometer รุ่น UV –160A (บริษัท Shimadzu, ประเทศญี่ปุ่น)

4.3 เครื่องวัดค่าวอเตอร์แอคติวิตี (Water activity : a_w) Thermoconstanter (บริษัท Novasina, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

5. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

5.1 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Cyberscan รุ่น 510 (บริษัท ยู แอนด์ วี โฮลดิ้ง, ประเทศไทย)

5.2 เตาเผาเถ้า (CarboliteELF 11/14, ประเทศอังกฤษ)

5.3 เครื่องย่อยหาโปรตีน (Kjeltec System 1026 Distilling Unit, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

5.4 เครื่องมือชุดวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Avanti 2050 Soctec Auto Extraction Unit, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

5.5 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Memmert (บริษัท ไซแอนติฟิค โปรโมชั่น จำกัด, ประเทศเยอรมนี)

6. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ค่าคุณภาพทางจุลินทรีย์

6.1 อุปกรณ์เครื่องแก้วในการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

6.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave – steam sterilizer) ยี่ห้อ Tuttnauer รุ่น 3850M (Laborgerateborse GmbH, ประเทศเยอรมนี)

6.3 เครื่องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Kottermann รุ่น D – 3162 ประเทศเยอรมนี

6.4 เครื่องบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Binder รุ่น BD 115 ประเทศเยอรมนี

6.5 เครื่องฆ่าเชื้อด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Binder รุ่น FD 115 ประเทศเยอรมนี

6.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง ยี่ห้อ Tuttnaver รุ่น 3850 M ประเทศสหรัฐอเมริกา

6.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น D-91126 ประเทศเยอรมนี

6.8 เครื่องชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ตำแหน่ง Sartorius รุ่น BA 210 ประเทศเยอรมนี

6.9 เครื่องกวนสาร (บริษัท Fisher scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

6.10 เครื่องตีป่นอาหาร Stomacher lab-blender 400 รุ่น BA 7021 ประเทศอังกฤษ

6.11 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

6.12 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

6.13 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ยี่ห้อ Merck ประเทศเยอรมนี

7. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการประมวลผลข้อมูล

7.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล

7.2 โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 12.0, SPSS Inc., Thailand

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมไคโตซานให้มีคุณสมบัติเหมาะสมในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์

การเตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง (ดัดแปลงจาก Tolaimate *et al.,* 2003; Kachanechai *et al.,* 2008) โดยเป็นเปลือกกุ้งที่แห้ง และสะอาด โดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ต้าหมิง เอ็นเตอร์ไพรส์ จำกัด (จังหวัดสมุทรสาคร) โดยนำเปลือกกุ้ง 10 กรัม มาทำการแยกโปรตีน (Deproteination) โดยการแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างเปลือกกุ้งให้สะอาด จากนั้นแยกแร่ธาตุ (Demineralization) โดยแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างเปลือกกุ้งให้สะอาด จากขั้นตอนนี้จะได้เป็นไคติน นำไคตินที่ได้มาทำการสกัดแยกสีออก (Decoloration) โดยนำไคตินมาแช่ใน เอทานอล 95% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างให้สะอาด นำไปปั่นด้วยเครื่อง Waring Blender (รุ่น 8011 BU, สหรัฐอเมริกา) เพื่อลดขนาดอนุภาคของไคตินก่อน ทำการดึงหมู่อะซิติลออกจากสายโมเลกุล (Deacetylation) โดยการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 50% โดยน้ำหนัก ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ล้างให้สะอาดจนมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ผึ่งให้แห้งได้ไคโตซานที่มี Degree of Deacetylation (%DD) ที่ 85-100% แล้วนำไคโตซานที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์ค่าคุณภาพต่างๆ ดังนี้

1.1.1 คำนวณร้อยละผลผลิตที่ได้ (%Yield)

$$\%Yield = [(น้ำหนักสุดท้าย/น้ำหนักเริ่มต้น) \times 100]$$

1.1.2 น้ำหนักโมเลกุล ด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) รุ่น Water 600E โดยอ้างอิงวิธีของ Terbojevich and Cosani (1997) ดังแสดงในภาคผนวก ข

1.1.3 ร้อยละของการกำจัดหมู่อะซิติล Degree of Deacetylation (%DD) ด้วยเครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR) รุ่น Bruker Biospin DPX-300 โดยอ้างอิงวิธีของ Muzzarelli and Rocchetti (1997) ดังแสดงในภาคผนวก ข

1.2 ผลิตไคโตซานให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์ และต้านอนุมูลอิสระ

นำไคโตซานที่ผลิตได้จากข้อ 1.1 มาทำการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนสทางการค้า (เพ็คติเน็กซ์, Pectinex®) มีสิ่งทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 โดยเตรียมสารละลายไคโตซาน ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์เพ็คติเน็กซ์ต่อไคโตซานในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในอ่างเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เก็บตัวอย่างที่เวลา 30 60 90 120 150 180 210 240 270 และ 300 นาที ทำการยุติการทำงานของเอนไซม์โดยการนำไคโตซานไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการตกตะกอนไคโตซานด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ลงในสารละลายที่ได้ปริมาณ 10% โดยน้ำหนัก จากนั้นนำของแข็งที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 93 ล้างด้วยน้ำกลั่นจนไคโตซานที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 เก็บตัวอย่างส่วนที่เป็นของแข็งแล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไคโตซานที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพต่างๆ ดังนี้

1.2.1 คำนวณร้อยละผลผลิตที่ได้ (%Yield)

$$\%Yield = [(น้ำหนักสุดท้าย/น้ำหนักเริ่มต้น) \times 100]$$

1.2.2 น้ำหนักโมเลกุล ด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC) รุ่น Water 600E โดยอ้างอิงวิธีของ Terbojevich and Cosani (1997)

1.2.3 วิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไคโตซาน ด้วยวิธี Disc diffusion (ดัดแปลงจากวิธีของ Ponce *et al.*, 2003)

การทดสอบนี้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งโดยใช้อาหาร Nutrient Agar (NA) เริ่มจากปิเปตแบคทีเรีย (*E. coli S. aureaus S. feacalis* และ *S. typhimurium*) โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์เทียบกับ McFarland 0.5 turbidity ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ กระจายให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ วางแผ่น paper disc ของสารละลายไคโตซานลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (เตรียมแผ่น paper disc สำหรับทดสอบโดยตัดกระดาษกรองให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) หยดสารละลายไคโตซานลงบนแผ่น paper disc 10 ไมโครลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น (inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

1.2.4 วิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (ดัดแปลงจาก Chien *et al*., 2007)

เตรียมสารละลาย 0.2-1.0% ไคโตซาน 100 มิลลิลิตร โดยนำไคโตซานน้ำหนัก 0.02 0.04 0.08 และ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดอะซิติกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เพื่อละลายไคโตซาน จากนั้นเติม 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีปริมาตรรวมเป็น 100 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.0 แล้วทำการวิเคราะห์โดยผสมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร กับตัวอย่างไคโตซานที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 4.0 มิลลิลิตร บ่มในที่มืด 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณ %scavenging effect เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 4 สิ่งทดลองที่ทำการศึกษาในการตัดสายพันธะไคโตซานด้วยเอนไซม์เพคติเนสทางการค้า (Pectinex®)

สิ่งทดลอง	เวลา (นาที)
T1	0
T2	30
T3	60
T4	90
T5	120
T6	150
T7	180
T8	210
T9	240
T10	270
T11	300

ในการทดลองนี้วางแผนแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 12.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคัดเลือกเวลาที่เหมาะสมในการตัดสายพันธะ และที่มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อจุลินทรีย์สูงสุด

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากขิง และศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

เหง้าขิงแก่ *(Zingiber officinale* Roscoe) ที่มีอายุการเก็บเกี่ยวอยู่ประมาณ 8-12 เดือนซื้อจากตลาดสี่มุมเมือง จังหวัดปทุมธานี นำมาเตรียมตัวอย่างทันที หรือเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และใช้ในระยะเวลาไม่เกิน 6 เดือน ตามวิธีการทดลองในภาพด้านล่าง ปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ

2.1 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด

2.1.1 น้ำกลั่น

2.1.2 เอทานอล 50%

2.1.3 เอทานอล 99.8%

2.2 ระยะเวลาในการสกัด

2.2.1 ระยะเวลาในการสกัด 12 ชั่วโมง

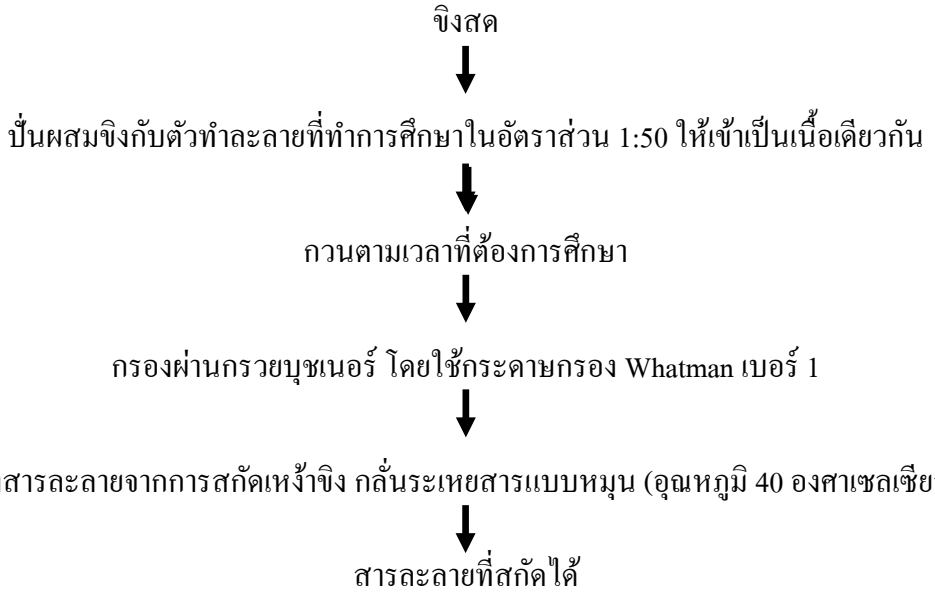
2.2.2 ระยะเวลาในการสกัด 24 ชั่วโมง

2.2.3 ระยะเวลาในการสกัด 36 ชั่วโมง

2.3.4 ระยะเวลาในการสกัด 48 ชั่วโมง

ทำการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากขิงแก่ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างวัตถุดิบต่อตัวทำละลายเป็น 1: 50 โดยน้ำหนัก ตัวทำละลายที่ทำการศึกษา ได้แก่ น้ำกลั่น เอทานอล 50% และ เอทานอล 99.8% (Shirin and Jamuna, 2010) และระยะเวลาในการสกัดแบ่งออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง เลือกตัวอย่างที่ดีที่สุดจากปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด DPPH radical-scavenging activity และ Ferrous ion chelating ability

(Chan *et al*., 2008) โดยจัดแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3 x 4 ในแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ การสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากขิง ดังภาพที่ 7 ทำการทดลองซ้ำ 2 ครั้ง



ภาพที่ 3 กระบวนการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากเหง้าขิง

2.3 วิเคราะห์คุณภาพของสารสกัดขิงที่สกัดได้

สารละลายที่สกัดได้จากขิงเก็บไว้ในขวดสีชา นำมาวิเคราะห์คุณภาพทันที หรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอนำมาวิเคราะห์

2.3.1 คำนวณร้อยละผลผลิตที่ได้ (%Yield) (Maisuthisakul *et al*., 2007)

$$\%Yield = [(W_1/W_2) \times 100]$$

กำหนดให้ W_1 คือ น้ำหนักสารสกัดหลังจากระเหยตัวทำละลายออก และW_2 คือ น้ำหนักแห้งของตัวอย่างขิงสด

2.3.2 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Kim and Lee, 2002)

ทำการวิเคราะห์โดยดัดแปลงวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ตามวิธีของ Kim and Lee, (2002) โดยนำสารสกัดมา 125 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500 ไมโครลิตร แล้วเติม Folin-Ciocalteu reagent 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 6 นาที หลังจากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 7 ปริมาตร 1250 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตรวางไว้ที่

อุณหภูมิห้อง นาน 90 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ทำการวัดค่าเช่นเดียวกันนี้สารสกัดละ 3 ครั้ง นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก แล้วคำนวณค่าเป็นมิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง

2.3.3 วิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity (Chen *et al.,* 2008)

วิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity (DPPH) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chen *et al.* (2008) คือ นำสารสกัดมาเจือจางด้วยเอทานอล ให้มีความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำสารสกัดแต่ละความเข้มข้นมา 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DPPH ที่มีความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (% radical scavenging activity) โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงควบคุม (control OD) หาได้จากการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้นแต่ใช้เอทานอลแทนตัวอย่าง นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณ ดังสูตร

$$\% \text{ DPPH Radical Scavenging Activity} = (A - B)/A \times 100$$

กำหนดให้ A เป็นค่าการดูดกลืนแสงควบคุม (ซึ่งประกอบด้วยสารทั้งหมด ยกเว้นตัวอย่างสารสกัดขิง) และ B เป็นค่าการดูดกลืนคลื่นแสงจากตัวอย่าง

2.3.4 วิเคราะห์ความสามารถในการจับกับเฟอรัสไอออน (Ferrous ion chelating ability) (Chan *et al*., 2008)

วิเคราะห์ความสามารถในการจับกับเฟอรัสไอออน โดยดัดแปลงวิธีของ Chan *et al*., 2008 นำสารสกัด 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณเป็น % Ferrous ion chelating ability โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงควบคุม (control OD) ได้มาจากการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้นแต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง และคำนวณ ดังสูตร

% Ferrous ion chelating ability = (A – B)/A x 100

กำหนดให้ A เป็นค่าการดูดกลืนแสงควบคุม (ซึ่งประกอบด้วยสารทั้งหมดยกเว้นตัวอย่างสารสกัดขิง) และ B เป็นค่าการดูดกลืนคลื่นแสงจากตัวอย่าง

2.3.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดขิงด้วยเครื่อง Gas Chromatograph-Mass Spectrometer (GC-MS)

หลังจากคัดเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการสกัดสารสกัดจากขิงโดยพิจารณาจากคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ นำสารสกัดขิงที่ได้มาทำการระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) นำสารสกัดขิงมาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยทำการฉีดวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดตัวอย่างด้วยเครื่อง Gas Chromatograph - Mass Spectrometer (GC-MS) [รุ่น QP 5050A บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น] โดยฉีดตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ในปริมาตร 1 ไมโครลิตร Split ratio 1:7 และอุณหภูมิ ของ injection port เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ในการวิเคราะห์นี้ใช้คอลัมน์ชนิด DB-5 capillary column (60 m x 0.25 mm; film thickness 0.25 μm) โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์เป็นแบบ Temperature program (oven temperature) เป็นดังนี้คือ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (คงที่ 2 นาที) แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 150 องศาเซลเซียส (อัตราการเพิ่ม 3 องศาเซลเซียส/นาที) จากนั้นจึงเพิ่มอุณหภูมิเป็น 250 องศาเซลเซียส (อัตราการเพิ่ม 15 องศาเซลเซียส/นาที เป็นเวลา 3 นาที) ใช้เวลาในการวิเคราะห์ทั้งสิ้น 35 นาที โดยมีฮีเลียมเป็นแก๊สพา (Carrier gas) อัตราการพา (Flow rate) 1.2 มิลลิลิตร และใช้อุณหภูมิ interface (detector) ที่ 250 องศาเซลเซียส โดยใช้พลังงานในการทำให้เป็นอิออน 70 อิเล็คตรอนโวลต์ แล้วทำการตรวจชนิดองค์ประกอบที่แยกได้ โดยรายงานในรูปของ Total Ion Chromatogram (TIC) แล้วเปรียบเทียบแมสสเปคโตรแกรมขององค์ประกอบที่แยกได้แต่ละชนิดกับแมสสเปคโตรแกรมจากการฉีดเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน และแมสสเปคโตรแกรมของสารมาตรฐานที่มีอยู่ในฐานข้อมูล (WILEY 7 และ NIST 12, 21 database)

ในขั้นตอนนี้ จะเลือกสภาวะที่ดีที่สุดในการสกัดขิง โดยดูจากร้อยละผลผลิตและคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3 x 4 ในแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 12.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ศึกษาผลของการใช้ไคโตซาน ร่วมกับสารสกัดจากขิงเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อวัวบด

ในการทดลองนี้ศึกษาผลการใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดจากขิงเพื่อทดแทนการใช้วัตถุเจือปนสังเคราะห์ในเนื้อวัวบด โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ที่ไม่เติมสารทั้งสองชนิด) และตัวอย่างที่เติมบีเอชที (BHT) ซึ่งเป็นสารกันหืนทางการค้า

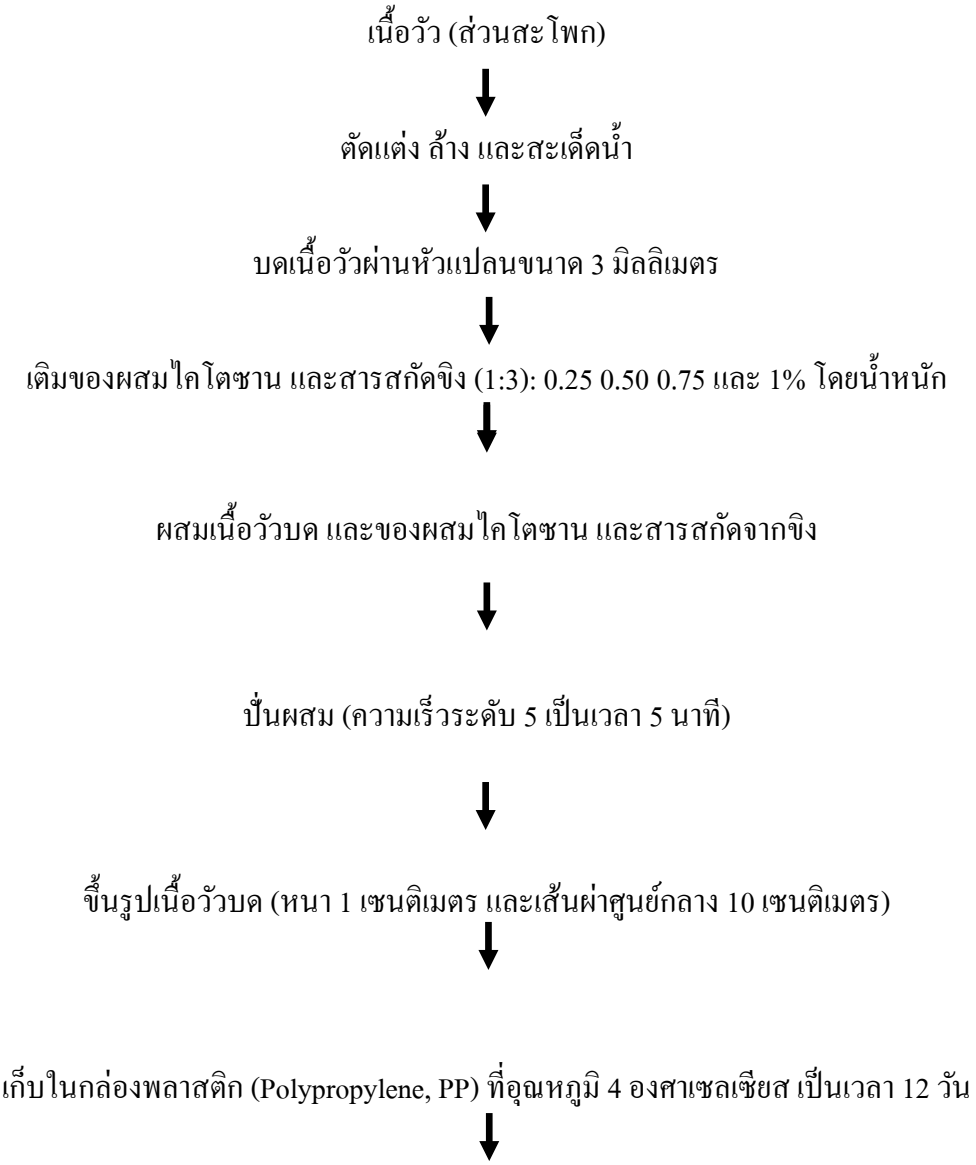
3.1 ศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่อสารสกัดจากขิงที่เหมาะสม โดยไคโตซานเตรียมได้จากการนำไคโตซาน 1% ละลายในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 1% และสารสกัดจากขิงที่ได้จากข้อ 2 มาระเหยตัวทำละลายแล้ว โดยอัตราส่วนที่ศึกษา คือ 1:1 1:2 1:3 2:1 2:2 2:3 3:1 3:2 และ 3:3 โดยน้ำหนัก โดยให้น้ำหนัก 1 ส่วนของไคโตซานและสารสกัดขิงคือ 5 กรัม ดังนั้นในอัตราส่วนที่ต่างกันจะมีจำนวนของสารสกัดโดยน้ำหนักที่แตกต่างกัน เทสารละลายไคโตซานลงในสารสกัดขิงช้า ๆ กวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Magnetic stirrer หลังจากผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงแล้วนำมาวัดความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity และวิธี Ferrous ion chelating ability (Chan *et al*., 2008) ดังแสดงในภาคผนวก ง จากนั้นเลือกสภาวะที่มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) สูงที่สุด มาทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ในขั้นตอนนี้ จะเลือกอัตราส่วนระหว่างไคโตซานและสารสกัดขิงที่เหมาะสมที่สุด โดยพิจารณาจากคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 12.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.2 การศึกษาความเข้มข้นของของผสมระหว่างไคโตซานและสารสกัดจากขิงที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อวัวบด และศึกษาผลการใช้ที่มีต่อคุณลักษณะทางคุณภาพด้านต่างๆ

เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 3.1 แล้วนำมาศึกษาความเข้มข้นของของผสมโดยแบ่งความเข้มข้นออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 0.25 0.5 0.75 และ 1% โดยน้ำหนัก ทำการเปรียบเทียบเนื้อวัวบดที่เติมของผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ กับเนื้อวัวบดที่ไม่เติมสารทั้งสองชนิด และเนื้อวัวบดที่

เติมบีเอชที (BHT) ความเข้มข้น 200 mg/kg การเตรียมเนื้อวัวบดอ้างอิงวิธีการเตรียมของ Mansour และ Khalil (2000) ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กรรมวิธีการเตรียมเนื้อวัวบด

ที่มา: ดัดแปลงจาก Mansour and Khalil (2000)

วิเคราะห์ค่าทางเคมีโดยประมาณ (Proximate analysis) (AOAC, 2000) ของเนื้อวัวบดก่อนนำมาทดลองดังแสดงในภาคผนวก ก และนำเนื้อวัวบดที่ผลิตได้ซึ่งมีการเติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วมาทำการตรวจวัดค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.2.1 คุณลักษณะด้านเคมี

3.2.1.1 วิเคราะห์ค่า Thiobarbituric acid number (TBA) (ดัดแปลงจาก Mansour and Khalil, 2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก

3.2.1.2 วิเคราะห์ค่า pH (Khalil, 2000) ดังแสดงในภาคผนวก ก

3.2.2 คุณลักษณะด้านกายภาพ

3.2.2.1 สี (Macdougall, 1994) ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.2.2.2 เนื้อสัมผัส (ค่าความแข็ง) ด้วยเครื่อง LLOYD รุ่น TA500 ประเทศเยอรมนี (Barbut, 2006) โดยมีวิธีการเตรียมตัวอย่าง และการวัดค่า ดังแสดงในภาคผนวก ข

3.2.3 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาในเนื้อวัวบด

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาโดยตรวจวัดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ด้วยวิธี Total Plate Count (TPC) และตรวจวัดปริมาณเชื้อรา และยีสต์ในผลิตภัณฑ์หลังเตรียมเสร็จ โดยทำการสุ่มตัวอย่างทุก 3 วัน ร่วมกับการตรวจสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ดังนี้

3.2.3.1 ตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (BAM, 2002) ดังแสดงในภาคผนวก ค

3.2.3.2 ตรวจวัดปริมาณเชื้อรา และยีสต์ทั้งหมด (BAM, 2002) ดังแสดงในภาคผนวก ค

ในขั้นตอนนี้ จะเลือกความเข้มข้นของของผสมระหว่างไคโตซานและสารสกัดขิงที่เหมาะสมที่สุดใน โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านต่างๆ ในเนื้อวัวบด และการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (CRD) โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน

และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 12.0 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็นสามส่วน ส่วนที่หนึ่งเป็นการศึกษากระบวนการผลิตไคโตซานจากไคตินให้มีความบริสุทธิ์ และคุณภาพสูง แล้วทำการศึกษาคุณสมบัติของไคโตซาน กิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระที่วัด และกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ ส่วนที่สองเป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดขิงเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ส่วนที่สามเป็นการนำไคโตซาน และสารสกัดขิงที่ผลิตได้มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบด และศึกษาประสิทธิภาพความเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อวัวบด

1. ศึกษาสภาวะการผลิตไคโตซานให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสม และมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์สูงที่สุด และมีร้อยละผลได้สูงสุด

1.1 การสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้ง

การสกัดไคโตซานจากเปลือกกุ้งเริ่มจากการแยกโปรตีน (Deproteination) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ แยกแร่ธาตุ (Demineralization) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์ แยกสี (Decoloration) ด้วย 95% เอทานอล จากนั้นดึงหมู่อะซิทิลออกจากสายโมเลกุล (Deacetylation) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (50% โดยน้ำหนัก) สุดท้ายจะได้ไคโตซานที่ร้อยละผลได้เท่ากับ 79% ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 100% และน้ำหนักโมเลกุล 438 kDa (ภาพที่ 5 และ 6)

จากการวิจัย การผลิตไคโตซานจากไคตินของเปลือกกุ้งตามวิธีของ Tolaimate *et al.*(2003) และ Kachanechai *et al.* (2008) พบว่า ไคโตซานที่ผลิตได้มีร้อยละการดึงหมู่อะซิติล เท่ากับ 100 เนื่องจากในขั้นตอนการดึงหมู่อะซิติลโดยการแช่ไคตินจากเปลือกกุ้งในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (40 – 50%) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า ทำให้หมู่อะซิติลทั้งหมดถูกดึงออกจากโพลิเมอร์ (Muzzarelli, 1977) และจากการจัดกลุ่มไคโตซานของ Kachanechai *et al.* (2008) ได้ทำการแบ่งกลุ่มไคโตซานตามน้ำหนักโมเลกุลที่ผลิตได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ ไคโตซานที่มีน้ำหนักโลกุลสูง (MW>1,000 kDa) น้ำหนักโมเลกุลปานกลาง (100 kDa<MW<1,000 kDa) และน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (MW<100 kDa) โดยไคโตซานที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 438 kDa จึงจัดได้ว่าเป็นไคโตซานที่อยู่ในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง

Tsai *et al*. (2002) ได้ทำการศึกษากระบวนการผลิต และคุณสมบัติของไคโตซานจากร้อยละการดึงหมู่อะซิติล (%DD) โดยทำการแบ่งกลุ่มไคโตซานตามร้อยละการดึงหมู่อะซิติล ได้แก่ ไคโตซานที่มีร้อยละการดึงหมู่อะซิติลต่ำ (47-53%) ร้อยละการดึงหมู่อะซิติลกลาง (74-76%) และร้อยละการดึงหมู่อะซิติลสูง (95-98%) ดังนั้นไคโตซานที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้จึงจัดเป็นกลุ่มของไคโตซานที่ร้อยละการดึงหมู่อะซิติลสูง คือ มีร้อยละการดึงหมู่อะซิติล เท่ากับ 100

ภาพที่ 5 ไคตินจากเปลือกกุ้ง

ภาพที่ 6 ไคโตซานจากไคตินจากเปลือกกุ้งหลังผ่านกระบวนการผลิต

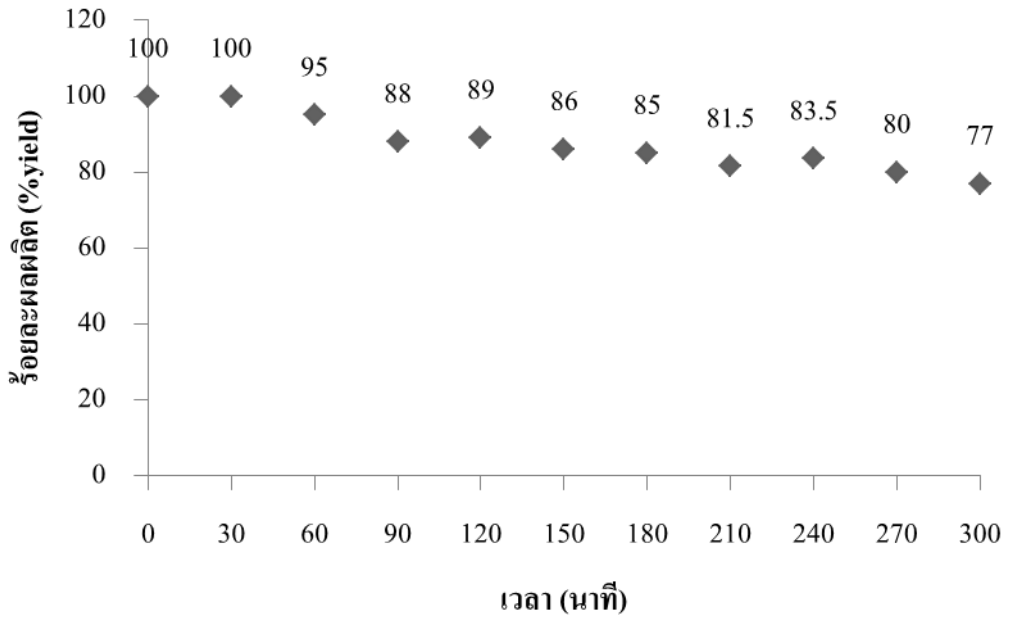
1.2 การศึกษาการผลิตไคโตซานให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ

ในขั้นตอนนี้ศึกษาการผลิตไคโตซานให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการวิเคราะห์ ร้อยละผลผลิต (%yield) น้ำหนักโมเลกุล (Mw) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Disc diffusion test และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดังแสดงผลการทดลองดังต่อไปนี้

1.2.1 ร้อยละผลผลิต (%yield)

ร้อยละผลผลิต (%yield) ของไคโตซานหลังตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนสทางการค้า (Pectinex®) ด้วยสภาวะที่เหมาะสมดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น พบว่า ร้อยละผลผลิตของไคโต

ซานที่เวลาการตัดสายพันธะ 30 นาที มีร้อยละผลผลิต เท่ากับ 100% และร้อยละผลผลิตของไคโตซานจะค่อยๆ ลดลงตามเวลาการตัดสายพันธะ ดังนี้ ที่เวลา 60 90 120 150 180 210 240 270 และ 300 นาที มีร้อยละผลผลิต ดังนี้ 95 88 89 86 85 81.5 83.5 80 และ 77% ตามลำดับ (ภาพที่ 7) เนื่องจากเมื่อเวลาการตัดสายพันธะเพิ่มขึ้นทำให้ไคโตซานที่ผลิตได้ (ภาพที่ 6) มีน้ำหนักโมเลกุลลดลง โดยในขั้นตอนการล้างไคโตซานให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลางนั้นทำให้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำหลุดลอดออกไป และไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ จากการศึกษาของ Sashiwa *et al*. (2003) ที่ได้มีการใช้เอนไซม์ เช่น ไลเปส เฮมิเซลลูเลส เซลลูเลส และเพคติเนส ในการผลิตเอ็นอะซิติลไคโตโอลิโกแซคคาไรด์พบว่า ปัจจัยของการใช้เอนไซม์ และสภาวะในการผลิตที่แตกต่าง มีผลทำให้ค่าร้อยละผลผลิตที่ได้แตกต่างกัน โดยการใช้เอนไซม์เพคติเนสจะทำให้ได้ร้อยละผลผลิตค่อนข้างสูง



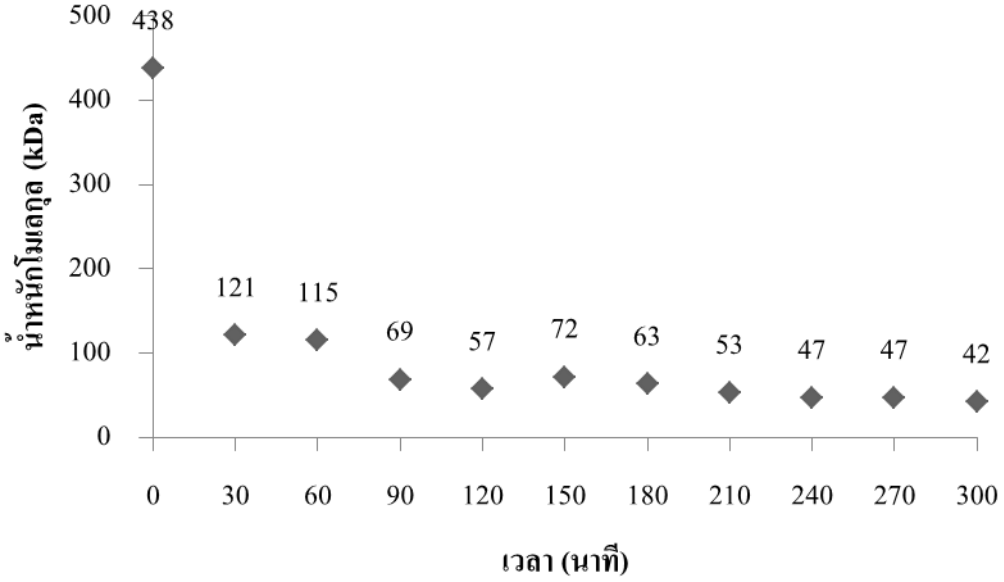
ภาพที่ 7 ร้อยละผลผลิตของไคโตซานที่ตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่ค่าความป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 1:1 โดยน้ำหนัก

1.2.2 น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ตัดสายพันธะด้วยไคโตซาน ด้วยเครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC)

จากการศึกษาสภาวะในการผลิตไคโตซานให้มีน้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระโดยการตัดสายพันธะไคโตซานด้วยเอนไซม์เพคติเนสทางการค้า (Pectinex®) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่อเอนไซม์ เท่ากับ 1:1 เมื่อเก็บตัวอย่างทุก 30 นาที จนครบ 300 นาที พบว่าไคโตซานที่ผลิตได้มีร้อยละผลผลิตอยู่ในช่วง 80-100% โดยเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับไคโตซานส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานลดลงโดยลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ผลิตได้จะอยู่ในช่วง 42-438 kDa โดยการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์ช่วง 30 นาทีแรกน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานลดลงมากกว่า 3 เท่าของไคโตซานเดิม คือจาก 438 kDa เป็น 121 kDa จากนั้นจะค่อยๆ ลดลง เมื่อเวลาในการตัดสายพันธะ 300 นาที ไคโตซานที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำสุดที่ 42 kDa โดยสามารถอธิบายได้ว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้นจะสัมพันธ์ตรงกับความเข้มข้นของซับสเตรท และอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มไปมากกว่าจุดที่เอนไซม์อิ่มตัวด้วยซับสเตรท (ปราณี, 2547)

น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ได้นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยดังเช่น เวลา อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารละลายของปฏิกิริยาการดึงหมู่อะซิติล (Tolaimate *et al*., 2000) โดยจากผลการวิจัยนี้มีปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ เวลาในการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส พบว่าเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์เพคติเนสกับไคโตซานมีผลต่อน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซาน ดังแสดงในภาพที่ 8 นั่นคือ การตัดสายพันธะของไคโตซานที่เวลา 30 และ 60 นาที ทำให้ได้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 121 kDa และ 115 kDa ตามลำดับ ซึ่งจัดเป็นไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลระดับปานกลาง และไคโตซานที่ตัดสายพันธะด้วยเวลา 90 120 150 180 210 240 270 และ 300 นาที มีน้ำหนักโมลกุล เท่ากับ 69 57 72 63 53 47 47 และ 42 kDa ตามลำดับ จัดเป็นไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลระดับต่ำ โดยจากผลการวิจัยจะเห็นว่าเมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นส่งผลให้ไคโตซานที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลลดลงซึ่งแปรผันตรงกับเวลาในการทำปฏิกิริยานั่นคือ น้ำหนักโมเลกุลเริ่มต้นของไคโตซาน เท่ากับ 438 kDa และน้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจะค่อยๆ ลดลงจนเหลือ 42 kDa ที่ระยะเวลาการทำปฏิกิริยา 300 นาที

ดังนั้นจากผลการวิจัยข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มเวลาในการตัดสายพันธะไคโตซานจาก 30 จนถึง 300 นาที มีผลทำให้น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ผลิตได้มีแนวโน้มลดลงตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu *et al*. (2006) อ้างอิงโดย เปรมกมล (2553) ที่ได้เตรียมไคโตซานจากเปลือกกุ้ง และพบว่าเมื่อเวลาในการเตรียมเพิ่มขึ้น น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานจะมีค่าลดลง และนอกจากนี้เปรมกมล (2553) รายงานว่าการยืดระยะเวลา และการใช้อุณหภูมิสูง ทำให้ไคโตซานมีขนาดโมเลกุลเล็กลง และเกิดการเสื่อมสลายของสายพอลิเมอร์ไคโตซานให้มีขนาดสั้นลง ส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลลดลงเช่นกัน



ภาพที่ 8 น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานที่ตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 อัตราส่วนเอนไซม์ต่อไคโตซานเป็น 1:1 โดยน้ำหนัก

1.2.3 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไคโตซาน ด้วยวิธี Disc diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซาน โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) และ *Streptococcus feacalis* (*S. feacalis*) และเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* (*E. coli*) และ *Salmonella. typhimurium* (*S. typhimurium*) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ได้แก่ น้ำกลั่น และสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 1% ดังแสดงใน ตารางที่ 5 โดยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำถึง

121 kDa จะสามารถยับยั้งเชื้อ *S. feacalis* (7.50 ± 1.4 มม.) ได้ดี ($p>0.05$) และเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลงถึง 63 และ 47 kDa จะให้ผลในการต้านเชื้อ *S. aureaus* (7.75 ± 0.7 มม.) และ *E. coli* (7.50 ± 0.0 มม.) ดีที่สุด แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำลงส่งผลให้ไคโตซานมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีขึ้นทำให้ไคโตซาน สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureaus* และ *E. coli* ได้ดีขึ้น (Li *et al*., 2007) และให้ผลในทางตรงข้ามกับ *S. feacalis* เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม นั่นคือเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลง ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. feacalis* จะมีแนวโน้มลดลง และเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลงถึงจุดหนึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. feacalis* จะคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *S. feacalis* จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีชั้นเพปทิโดไกลแคน เพียงชั้นเดียว ทำให้ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล และร้อยละการดึงหมู่อะซิติลสูง ซึ่งมีความหนาแน่นของประจุบวกสูง และประจุบวก (cation) ของไคโตซานทำให้เกิดการจับกับกรดเซียอะลิก (Sialic acid) ในฟอสโฟลิปิด (phospholipids) ทำให้เกิดการยับยั้งการเคลื่อนที่ของสารในเชื้อจุลินทรีย์ และทำให้เชื้อตายในที่สุด (Shahidi, 1999)

สำหรับเชื้อ *S. typhimurium* ในงานวิจัยนี้พบว่า สารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้น 1% ในทุกน้ำหนักโมเลกุลไม่สามารถยับยั้งเชื้อชนิดนี้ โดย Helander *et al*. (2001) ได้อธิบายไว้ว่า การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์เกิดขึ้นจากแบคทีเรียแกรมลบมีความไวต่อไคโตซานซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยในกรณีของ *S. typhimurium* ได้มีการตั้งสมมุติฐานไว้ว่า อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้สามารถทนต่อไคโตซานได้ดีกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ เนื่องจากไคโตซานมีความเป็น polycationic ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่าค่า pKa (pH 6.3) โดยมีโอกาสที่ประจุบวกของไคโตซานจะไปจับกับเซลล์ของเชื้อ *S. typhimurium* น้อยลง ดังนั้น ไคโตซานที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆไม่ว่าจะเป็นน้ำหนักโมเลกุลปานกลาง (115-121 kDa) หรือน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (42-69 kDa) ที่ผลิตได้จากการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส ต่างก็ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. typhimurium* ได้

นอกจากนี้สามารถอธิบายได้อีกว่า ไคติน ไคโตซาน และอนุพันธ์ มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา (Yalpani *et al*., 1992) โดยไคโตซานที่มีความเข้มข้น 1-1.5% มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (Wang, 1992) Chang *et al*. (1989) พบว่าไคโตซานที่ความเข้มข้น 0.05 หรือมากกว่าเพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สอดคล้องกับงานวิจัยนี้เนื่องจากไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67 kDa ความเข้มข้น 1% สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด และ Takahashi *et al*. (2008) รายงานว่าไคโตซานที่มีร้อยละการกำจัดหมู่อะซิติลสูง ทำให้มีประจุบวกมากเป็นสาเหตุในการ

ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *S. aureus* ซึ่งประจุบวกดังกล่าวของไคโตซานจะเข้าไปจับกับประจุลบของเซลล์เมมเบรนของเชื้อจุลินทรีย์ และไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า 300 kDa มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (Hafdani and Sadeghinia, 2011)

ผลจากการวิจัยในครั้งนี้พบว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 42 kDa ที่มีความเข้มข้น 1% ในสารละลายกรดอะซิติก 1% สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wong *et al*. (1992) ที่ได้รายงานไว้ว่าไคโตซานที่มีความเข้มข้น 1% และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* โดยน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำลงส่งผลให้ไคโตซานมีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีขึ้นส่งผลให้ ไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีขึ้น (Li *et al*., 2007) Chung *et al*. (2004) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก และแกรมลบ พบว่าไคโตซานที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์สูงจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก โดย Shahidi (1999) อธิบายกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานไว้ 2 กลไก คือ 1) การแพร่ผ่านของไคโตซานเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ แล้วไปขัดขวางการเจริญเติบโตของเซลล์โดยไคโตซานจะเข้าไปป้องกันการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอ และ 2) การจับกันระหว่างประจุบวกของไคโตซาน และประจุลบของเซลล์เมมเบรนในเชื้อจุลินทรีย์

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของผลการวิเคราะห์ความต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานที่ตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส ทดสอบด้วยวิธี Disc diffusion

สิ่งทดลอง	MW (kDa)	แกรมบวก		แกรมลบ	
		Staphylococcus aureus	*Streptococcus feacalis*	*Escherichia coli*	*Salmonella typhimurium*
น้ำกลั่น	-	-	-	-	-
กรดอะซิติก 1%	-	-	-	-	-
T1	438	$6.00^{c} \pm 0.0$	$6.50^{c} \pm 0.0$	$6.75^{b} \pm 0.7$	-
T2	121	$7.00^{ab} \pm 1.4$	$7.50^{a} \pm 1.4$	$7.25^{ab} \pm 0.7$	-
T3	115	$6.75^{bc} \pm 0.7$	$7.00^{ab} \pm 1.4$	$7.25^{ab} \pm 0.7$	-
T4	69	$7.00^{ab} \pm 1.4$	$7.00^{ab} \pm 0.0$	$7.00^{ab} \pm 0.0$	-
T5	57	$7.00^{ab} \pm 0.0$	$7.25^{ab} \pm 0.0$	$7.00^{ab} \pm 0.0$	-
T6	72	$7.50^{ab} \pm 0.0$	$7.00^{ab} \pm 0.7$	$7.00^{ab} \pm 0.0$	-
T7	63	$7.75^{a} \pm 0.7$	$7.00^{ab} \pm 0.0$	$7.50^{a} \pm 0.0$	-
T8	53	$7.00^{ab} \pm 0.0$	$6.75^{ab} \pm 0.7$	$6.75^{b} \pm 0.7$	-
T9	47	$7.50^{ab} \pm 1.4$	$6.50^{bc} \pm 0.0$	$7.25^{ab} \pm 0.7$	-
T10	47	$7.75^{a} \pm 0.7$	$6.75^{ab} \pm 0.7$	$7.00^{ab} \pm 0.0$	-
T11	42	$7.25^{ab} \pm 0.7$	$7.00^{ab} \pm 0.0$	$7.25^{ab} \pm 0.7$	-

หมายเหตุ $^{a-c}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละตัวอย่าง ในแนวตั้งเดียวกันที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

"-" หมายถึง ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้

จากการวิจัยนี้ที่ได้ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ซึ่งได้จากการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส (Pectinex®) โดยสรุปพบว่าไคโตซานที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี คือ ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 63-69 kDa ซึ่งมีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน จึงทำการคัดเลือกไคโตซานที่เหมาะสมที่ทำหน้าที่เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ จากการพิจารณาร่วมกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดังแสดงในขั้นตอนการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

1.2.4 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

ผลการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากงานวิจัยนี้โดยใช้ไคโตซานที่ผลิตจากการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส ซึ่งมีร้อยละการดึงหมู่อะซิติล เท่ากับ 100 มีค่า %scavenging effect อยู่ในช่วง 16-24% โดยที่ผลการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kanatt *et al.* (2008) ที่กล่าวไว้ว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไคโตซานที่มีร้อยละการดึงหมู่อะซิติล (%DD) อยู่ในช่วง 72-82 % มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (%scavenging effect) ค่อนข้างต่ำ คือ มีค่าน้อยกว่า 10% ซึ่งได้ผลไปในทางเดียวกับ Anraku *et al.* (2011) ที่ได้ทำการศึกษาในไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (100 kDa) และมีร้อยละการดึงหมู่อะซิติล เท่ากับ 90

จากการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไคโตซานด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity โดยนำไคโตซานละลายในสารละลายกรดอะซิติก ที่มีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.0 ที่ความเข้มข้นไคโตซาน 0.2 0.4 0.8 และ 1.0 % ทำการวัดกิจกรรมการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity นำค่าที่ได้มาคำนวณ %scavenging effect ดังแสดงในตารางที่ 6 พบว่าสารละลายไคโตซานที่ความเข้มข้นของไคโตซาน เท่ากับ 1.0% เวลาในการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส 90 นาทีมี %scavenging effect สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) มีค่า เท่ากับ 24.02 ± 2.85 และมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 69 kDa จากการศึกษาพบว่าไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 70-100 kDa มีค่า % scavenging effect ค่อนข้างสูง และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานจะทำให้ % scavenging effect เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chien *et al.* (2007) ที่ศึกษาการต้านอนุมูล

อิสระของไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันพบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานจะทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นด้วย

ตารางที่ 6 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (%scavenging effect) ด้วยวิธี DPPH ของไคโตซานที่ถูกตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส

ตัวอย่าง	MW (kDa)	% Scavenging effect
T1	438	$16.47^{c} \pm 0.74$
T2	121	$16.67^{c} \pm 0.92$
T3	115	$19.12^{b} \pm 0.61$
T4	69	$24.02^{a} \pm 0.85$
T5	57	$20.78^{ab} \pm 0.31$
T6	72	$21.37^{ab} \pm 1.00$
T7	63	$19.16^{b} \pm 0.78$
T8	53	$20.59^{ab} \pm 0.31$
T9	47	$22.94^{ab} \pm 1.22$
T10	47	$21.77^{ab} \pm 0.73$
T11	42	$22.29^{ab} \pm 0.89$

หมายเหตุ $^{a-c}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละตัวอย่าง ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการวิจัยนี้ได้ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน พบว่าไคโตซานที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้ดี เมื่อ

พิจารณาจากค่าการขจัดอนุมูลอิสระ (%scavenging effect) คือ ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 69 kDa ซึ่งเป็นไคโตซานที่ทำการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 90 นาที

ไคโตซานที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระดีที่สุด คือ ไคโตซานที่ทำการตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพคติเนส และมีอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์และไคโตซาน เป็น 1:1 โดยน้ำหนัก มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการตัดสายพันธะ 90 นาที (T4) ซึ่งทำให้ได้ไคโตซานที่มีน้ำหนัก 69 kDa มีความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ และต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และมีน้ำหนักโมเลกุลที่มีความสามารถในการละลายในกรดอินทรีย์ได้ดี

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากขิง และศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

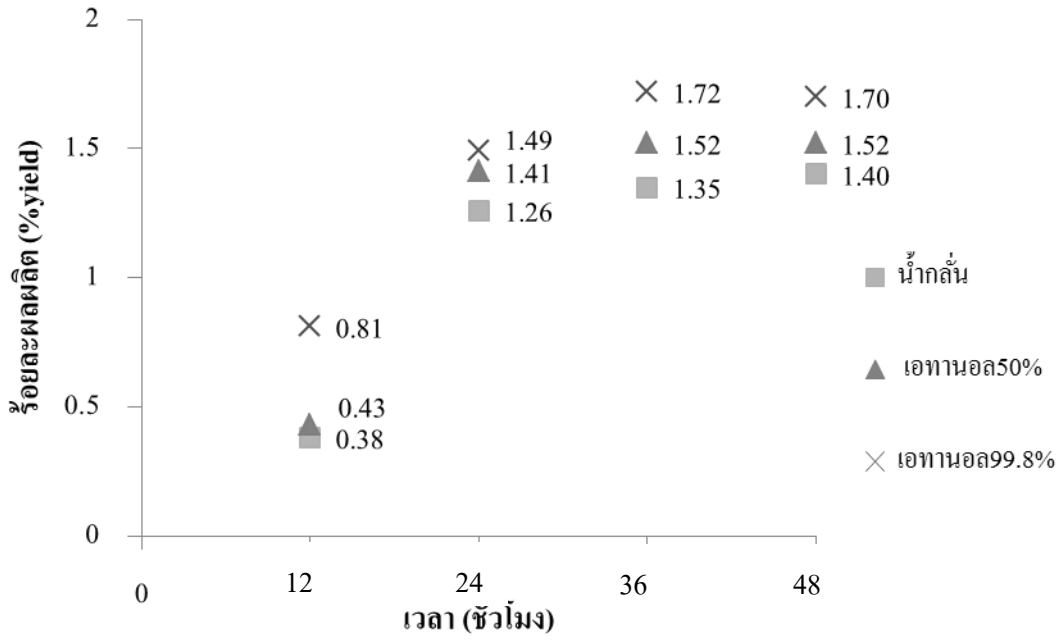
จากการคัดเลือกขิงแก่ *(Zingiber officinale* Roscoe) โดยควบคุมตัวอย่างที่อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 8-12 เดือน นำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ พบว่า องค์ประกอบที่สำคัญในขิงสด ประกอบด้วย ความชื้น 89.17% โปรตีน 1.16% เยื่อใย 0.80% และไขมัน 0.60% ทั้งนี้องค์ประกอบดังกล่าวอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อายุการเก็บเกี่ยว สายพันธุ์ และสภาพการเพาะปลูก เป็นต้น (Macleod and Pieris, 1984; Salmon *et al*, 2012)

เมื่อนำขิงแก่ข้างต้นมาทำการสกัดโดยปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดประกอบด้วย น้ำกลั่น เอทานอล 50% เอทานอล 99.8% และระยะเวลาในการสกัด คือ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการคำนวณร้อยละผลผลิต วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดย Folin-Ciocalteu colorimetric method (Kim and Lee, 2002) DPPH radical scavenging activity และ Ferrous ion chelating ability (Chan *et al*., 2008) ได้ผลการทดลองดังแสดงดังต่อไปนี้

2.1 ร้อยละผลผลิต (%yield)

จากการสกัดสารสกัดขิงด้วยการแช่ในตัวทำละลาย (น้ำกลั่น เอทานอล 50% และ เอทานอล 99.8%) ที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างสารสกัดที่เวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 9) พบว่า การสกัดขิงที่ใช้เอทานอล 99.8% เป็นตัวทำละลายที่เวลาในการสกัด 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง มีร้อยละผลผลิตสูงกว่าสารสกัดขิงที่สกัดด้วย เอทานอล 50% และน้ำกลั่น ตามลำดับ โดยมีร้อยละผลผลิตของสารสกัด เท่ากับ 0.81 1.49 1.72 และ1.70% ตามลำดับ เอทานอล 50% มีร้อยละผลผลิต

ของสารสกัด เท่ากับ 0.43 1.41 1.52 และ 1.50 ตามลำดับ และน้ำกลั่น มีร้อยละผลผลิตของสารสกัดเท่ากับ 0.37 1.25 1.38 และ 1.41 ตามลำดับ สารสกัดขิงที่มีเอทานอล 99.8% เป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ให้ร้อยละผลผลิตสูง และมีค่าไม่แตกต่างกับสารสกัดขิงที่ใช้เวลาการสกัด 48 ชั่วโมง ($p>0.05$) เนื่องจากเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญที่มีขั้ว (polar active component) (รัตนา, 2550) ซึ่งสารประกอบที่ต้องการในขิงส่วนใหญ่เป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มฟีนอลิกซึ่งเป็นสารประกอบที่มีขั้ว โดยจากการวิจัยจะเห็นว่าตัวทำละลายที่เป็นเอทานอล 99.8% และเอทานอล 50% มีร้อยละผลผลิตสูงกว่าตัวทำละลายที่เป็นน้ำกลั่น เนื่องจากเอทานอลมีความเป็นขั้วใกล้เคียง และเหมาะสมกับสารในกลุ่มที่สกัดออกมาจากขิง โดยกฤติกา (2547) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบร้อยละผลผลิตจากวิธีที่ใช้ในการสกัดสารสกัดจากพืชวงศ์ขิง ประกอบด้วย การกลั่นด้วยไอน้ำ การต้มกลั่น ปิโตรเลียม อีเทอร์ เอทานอล และการสกัดกากที่เหลือต่อด้วยเอทานอล พบว่า ขิงที่สกัดด้วยเอทานอลมีร้อยละผลผลิตสูงที่สุดเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ โดยถ้าเปรียบเทียบกับพืชวงศ์ขิงชนิดอื่นๆ เช่น ข่า ขมิ้นชัน กระชาย และเร่วหอม พบว่า ขิง และขมิ้นชัน มีร้อยละผลผลิตสูงที่สุด



ภาพที่ 9 ร้อยละผลผลิต (%yield) ของสารสกัดขิงที่มีตัวทำละลายเป็น น้ำกลั่น เอทานอล 50% และเอทานอล 99.8% ที่ใช้เวลาการสกัดต่างกัน

2.2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดย Folin-Ciocalteu fluorimetric method

ผลการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด โดย Folin-Ciocalteu fluorimetric method (Kim and Lee, 2002) ในสารสกัดขิงด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น เอทานอล 50% และ เอทานอล 99.8% และเก็บตัวอย่างสารสกัดที่เวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าการสกัดขิงที่ใช้เอทานอล 99.8% เป็นตัวทำละลายที่เวลาในการสกัด 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด สูงกว่าสารสกัดขิงที่สกัดด้วย เอทานอล 50% และน้ำกลั่น ตามลำดับ โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งของสารสกัด เท่ากับ 17.31 17.17 17.59 และ 16.82 ตามลำดับ เอทานอล 50% มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด เท่ากับ 16.27 17.03 17.24 และ 16.30 ตามลำดับ และน้ำกลั่น มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัด เท่ากับ 15.47 15.12 16.17 และ 16.48 ตามลำดับ สารสกัดขิงที่มีเอทานอล 99.8% เป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูง ($p \leq 0.05$)

การออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากขิง โดยสารประกอบฟีนอลิกจะปลดปล่อยประจุบวกซึ่งจะไปยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระในไขมัน โดยสารประกอบฟีนอลิกจะไปกำจัดอนุมูลอิสระดังกล่าว (Kahkonen *et al*., 1999) Hinneburg *et al*. (2006) ได้ทำการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดขิงพบว่ามีค่าเท่ากับ 23.5 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม จากงานวิจัยพบว่าสารสกัดขิงที่สกัดได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในช่วง 15.12-17.59 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่ต่ำที่สุด คือ สารสกัดขิงที่มีตัวทำละลายเป็นน้ำกลั่น มีค่าเท่ากับ 15.12 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม และสารสกัดขิงที่มีเอทานอล 99.8% เป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสูง ($p>0.05$) มีค่าเท่ากับ 17.59 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม ทั้งนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์ขิงที่ใช้ ภูมิประเทศ ภูมิอากาศในการปลูกขิง กระบวนการที่ใช้ในการสกัด และตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดขิง (Shirin and Jamuna, 2010) ซึ่งสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดขิงจากงานวิจัยนี้พบว่าอยู่ในช่วง 0.8-42.1 มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kahkonen *et al*. (1999) ที่ได้ทำการรวบรวมข้อมูลไว้

การศึกษาสภาวะในการสกัดสารสกัดจากขิงที่มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูง คือสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีค่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 17.59 มิลลิกรัมสมมูลย์ต่อกรัม สอดคล้องกับการศึกษาของ กฤติกา (2548) ที่ได้เปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดใน

สารสกัดจากขิงที่สกัดด้วย เอทานอล กากที่เหลือสกัดต่อด้วยเอทานอล และปิโตรเลียม อีเทอร์ โดยมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 24.02 23.55 และ 9.55 มิลลิกรัมสมมูลย์ต่อกรัม ตามลำดับ โดยสารสกัดขิงที่มีเอทานอลเป็นตัวทำละลายมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด

ตารางที่ 7 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดจากขิง (มิลลิกรัมสมมูลย์กรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักแห้ง) ที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน (น้ำกลั่น เอทานอล 50% และเอทานอล 99.8%) และเวลาการสกัดต่างกัน

เวลา (ชม.)	ตัวทำละลาย		
	น้ำกลั่น	เอทานอล 50%	เอทานอล 99.8%
12	$15.47^{c} \pm 0.26$	$16.27^{c} \pm 0.32$	$17.31^{b} \pm 0.12$
24	$15.12^{d} \pm 0.32$	$17.03^{bc} \pm 0.21$	$17.17^{b} \pm 0.27$
36	$16.17^{c} \pm 0.32$	$17.24^{b} \pm 0.30$	$17.59^{a} \pm 0.37$
48	$16.48^{bc} \pm 0.26$	$16.30^{c} \pm 0.32$	$16.82^{bc} \pm 0.31$

หมายเหตุ $^{a-d}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละตัวอย่าง ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2.3 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity

ผลจากการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical-scavenging activity (Chen *et al.,* 2008) ในสารสกัดขิงด้วยตัวทำละลาย น้ำกลั่น เอทานอล 50% และเอทานอล 99.8% และเก็บตัวอย่างสารสกัดที่เวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าการสกัดขิงที่ใช้เอทานอล 99.8% เป็นตัวทำละลายที่เวลาในการสกัด 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง มี %scavenging effect สูงกว่าสารสกัดขิงที่สกัดด้วย เอทานอล 50% และน้ำกลั่น ตามลำดับ โดยมี %scavenging effect ของสารสกัด เท่ากับ 56.06 57.35 58.25 และ 57.11ตามลำดับ เอทานอล 50% มี %scavenging effect ของสารสกัด เท่ากับ 50.68 51.52 53.16 และ 54.32 ตามลำดับ และน้ำกลั่น มี

%scavenging effect ของสารสกัด เท่ากับ 48.21 49.89 50.05 และ 50.68 ตามลำดับ สารสกัดขิงที่มีเอทานอล 99.8% เป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ให้ %scavenging effect สูงสุด ($p \leq 0.05$)

จากการวัดความสามารถในการทำปฏิกิริยากับ DPPH radical ซึ่ง DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว จึงเป็นสาร (substrate) ที่ใช้ในการประเมินความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Duh *et al*., 1999) และ Stoilova *et al*. (2007) ได้กล่าวว่า สารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชประกอบด้วยสารประกอบฟีนอลิก โดยมีความสามารถในการให้อะตอมของไฮโดรเจนหรือ อิเล็กตรอน และจับกับอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ทดสอบความสามารถของสารสกัดจากขิงในการให้อะตอมของไฮโดรเจนซึ่งผลการวิจัยนี้พบว่า %scavenging effect ของสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด ($p > 0.05$) คือ 58.25% และสารสกัดขิงที่สกัดด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มี %scavenging effect น้อยที่สุด ($p \leq 0.05$) คือ 48.21% ซึ่งเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอลิกดังได้อธิบายไว้ในข้างต้นแล้ว

เมื่อพิจารณา % Scavenging effect ของสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด ($p > 0.05$) คือ 58.25% ร่วมกับปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดข้างต้นพบว่าในสารสกัดขิงที่สภาวะดังกล่าว (เอทานอล 99.8%, 36 ชั่วโมง) มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ ส่งผลให้สารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดขิงสามารถจับกับอนุมูลอิสระ (DPPH) ได้ดี จึงเป็นผลให้สารสกัดขิงมี %scavenging effect สูงที่สุด

ตารางที่ 8 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (% scavenging effect) ของสารสกัดขิงที่สกัดด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน (น้ำกลั่น เอทานอล 50% และเอทานอล 99.8%) และเวลาการสกัดต่างกัน

เวลา (ชม.)	ตัวทำละลาย		
	น้ำกลั่น	เอทานอล 50%	เอทานอล 99.8%
12	$48.21^{d} \pm 1.78$	$50.68^{cd} \pm 1.38$	$56.06^{abc} \pm 2.12$
24	$49.89^{cd} \pm 1.21$	$51.52^{bcd} \pm 0.24$	$57.35^{ab} \pm 1.69$
36	$50.05^{cd} \pm 1.61$	$53.16^{abcd} \pm 2.01$	$58.25^{a} \pm 1.06$
48	$50.68^{cd} \pm 0.76$	$54.32^{abcd} \pm 0.79$	$57.11^{ab} \pm 1.14$

หมายเหตุ: $^{a-d}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละตัวอย่าง ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2.4 ความสามารถในการจับกับอิออนของเหล็ก (Ferrous ion chelating ability)

การวัดความสามารถในการจับกับเหล็กอิออนเป็นผลของการเข้าทำปฏิกิริยากับอิออนของเหล็กของสารสกัดขิงที่สกัดได้แสดงใน ตารางที่ 9 พบว่าขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% ที่เวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง มี % chelating effect เท่ากับ 8.84 16.90 21.67 และ18.24 ตามลำดับ ขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 50% มี % chelating effect เท่ากับ 6.79 6.81 7.09 และ 8.87 ตามลำดับ และขิงที่ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย มีค่า % chelating effect เท่ากับ 3.15 3.61 6.41 และ 6.06 ตามลำดับ โดยสรุปสภาวะในการสกัดสารสกัดจากขิงที่ทำให้ได้ค่า %chelating effect สูงที่สุด ($p>0.05$) คือ เอทานอล 99.8% และใช้เวลาในการสกัด 36 ชั่วโมง มีค่า %chelating effect เท่ากับ 21.67% ซึ่งเมื่อพิจารณาตัวทำละลายทั้งหมดที่ศึกษาพบว่าขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% มีประสิทธิภาพดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 50% และ น้ำกลั่น ตามลำดับ โดยพิจารณาจาก ร้อยละผลผลิต และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shirin and Jamuna (2010) ได้ทำการศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดขิง ประกอบด้วย อะซิโตน เมทานอล เอทานอล เมทานอล 80% เอทานอล 80% น้ำที่อุณหภูมิ 30 และ 100 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาจากคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เมทานอล

เอทานอล มีประสิทธิภาพในการสกัด และมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระดีกว่าน้ำทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 100 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 9 ความสามารถในการจับกับเหล็กอิออน (% Chelating effect) ของสารสกัดขิงที่สกัด ด้วยตัวทำละลายแตกต่างกัน (น้ำกลั่น เอทานอล 50% และเอทานอล 99.8%) และเวลาการสกัดต่างกัน

เวลา (ชม.)	ตัวทำละลาย		
	น้ำกลั่น	เอทานอล 50%	เอทานอล 99.8%
12	$3.15^{c} \pm 0.25$	$6.79^{c} \pm 0.50$	$8.84^{bc} \pm 0.51$
24	$3.61^{c} \pm 0.76$	$6.81^{c} \pm 0.98$	$16.90^{ab} \pm 0.60$
36	$6.41^{c} \pm 0.70$	$7.09^{bc} \pm 0.56$	$21.67^{a} \pm 1.36$
48	$6.06^{c} \pm 0.86$	$8.87^{bc} \pm 0.45$	$18.24^{ab} \pm 1.04$

หมายเหตุ: $^{a-c}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละตัวอย่าง ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2.5 องค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดขิงด้วยวิธี Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

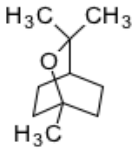
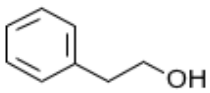
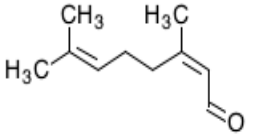
จากการวิเคราะห์องค์ประกอบ ทางเคมีของสารสกัดขิงที่มีเอทานอล 99.8% เป็นตัวทำละลาย เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง GC-MS ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น QP 5050A ประเทศญี่ปุ่น ทั้งนี้สามารถสรุปองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดจากขิงดังแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 10

ผลการวิเคราะห์พบว่าองค์ประกอบหลักในสารสกัดขิงที่ได้จากการศึกษานี้จัดอยู่ในกลุ่มของ Sesquiterpenes (เซสควิเทอร์พีน) ซึ่งได้แก่ Zingiberene (33.71%) alpha-Farnesene (15.45%) beta-Sesquiphellandrene (12.57%) beta-Bisabolene (5.62%) Curcumene (3.64%) Germacrene (2.05%) และสารในกลุ่ม Monoterpenoid (โมโนเทอร์พีนอยด์) ซึ่งได้แก่ Geranial (11.65%) Citral (7.03%) 1,8-Cineole (2.37%) ตามลำดับ โดยซิงจิเบอร์รีน ซึ่งเป็นสารประกอบหลักที่มีอยู่ในขิง และมีรายงานวิจัยพบว่าสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Peng *et al*., 2012)

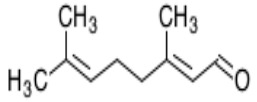
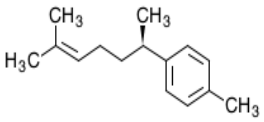
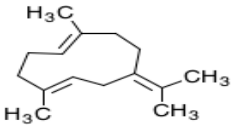
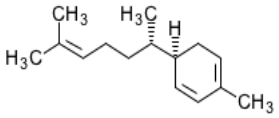
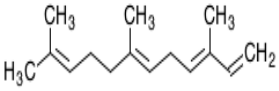
Ali *et al*. (2008) ศึกษาสารประกอบในขิง พบว่าในสารสกัดขิงประกอบด้วยสารประกอบกลุ่มโมโนเทอร์ปีนอยด์ (Monoterpenoids) ประกอบด้วย เบต้า-เพลแลนดรีน (beta-Phellandrene) ไซนิโอล (Cineol) เจอราเนียล (Geranial) เคอร์คูมีน (Curcumene) ซิตรอล (Citral) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoid) และ บอนีโอล (Borneol) สารประกอบกลุ่มเซสควิเทอร์ปีนอยด์ (Sesquiterpenoid) ได้แก่ อัลฟา-ซิงจิเบอร์รีน (alpha-Zingiberene) ประมาณ 30-70% เบต้า-เซสควิฟิลแลนดรีน (bata-Sesquiphellandrene) ประมาณ 15-20% อัลฟา-ฟาร์เนซีน (alpha-Farnesene) และซิงจิเบอร์รอล (Zingiberol)

สารสกัดจากขิงประกอบด้วย องค์ประกอบทางเคมี เช่น เซสควิเทอร์ฟีน (Sesquiterpenes) ได้แก่ ซิงจิเบอร์รีน (Zingiberene) Balakrishnan (2004) รายงานว่าซิงจิเบอร์รีน และเซสควิฟิลแลนดรีน สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเคอร์คูมีน (Curcumene) ในระหว่างการเก็บรักษา และสารประกอบที่สำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะในสารสกัดจากขิง ได้แก่ อัลฟา-ฟาร์เนซีน (alpha-Farnesene) เบต้า-เพลแลนดรีน (bata-Phellandrene) และ บอนีโอล (Borneol) เป็นต้น (Song *et al*., 2003)

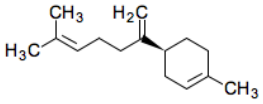
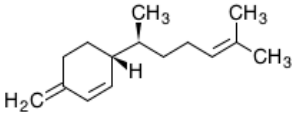
ตารางที่ 10 % relative peak area ของสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง GC-MS

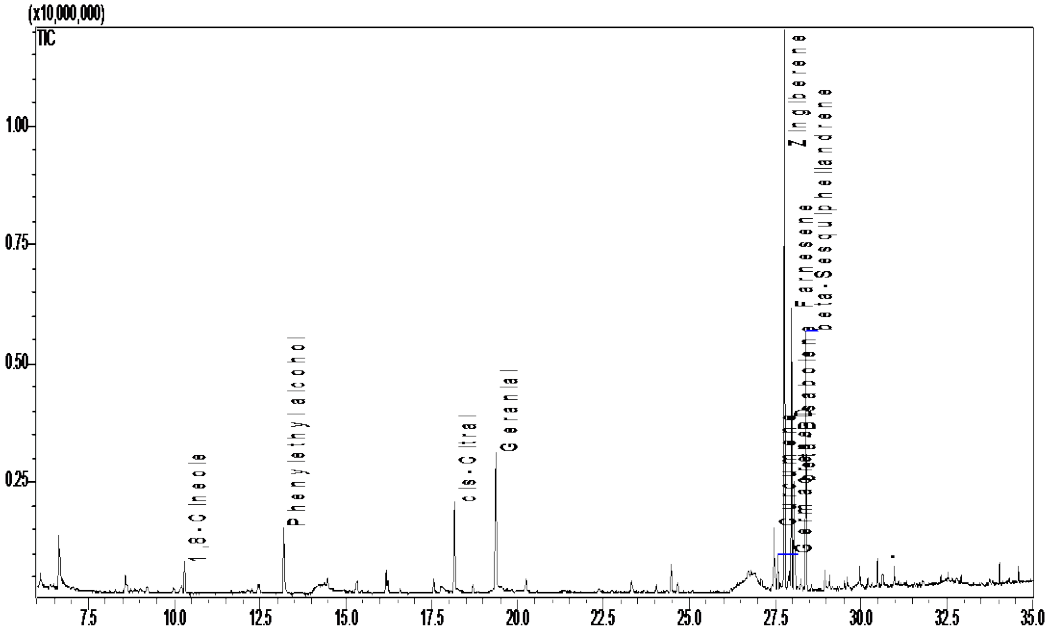
สารประกอบ	กลุ่มของสารประกอบ	% relative peak area	โครงสร้างทางเคมี
1,8-Cineole	monoterpenoid	2.37	
Phenylethyl alcohol	-	5.28	
cis-Citral	monoterpenoid	7.03	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

สารประกอบ	กลุ่มของสารประกอบ	% relative peak area	โครงสร้างทางเคมี
Geranial	monoterpenoid	11.65	
Curcumene	sesquiterpene	3.08	
Germacrene	sesquiterpene	2.05	
Zingiberene	sesquiterpene	33.71	
alpha-Farnesene	sesquiterpene	15.45	

ตารางที่ 10 (ต่อ)

สารประกอบ	กลุ่มของสารประกอบ	% relative peak area	โครงสร้างทางเคมี
beta-Bisabolene	sesquiterpene	5.62	
beta-Sesquiphellandrene	sesquiterpene	12.57	



ภาพที่ 10 Volatile compounds ในสารสกัดขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดขิงที่เหมาะสม และมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด จากการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี วิเคราะห์ปริมาณฟี

นอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-ciocalteau phenol test (Kim and Lee, 2002) DPPH radical scavenging activity และ Ferrous ion chelating ability (Chan *et al*., 2008) คือ ขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำสารสกัดขิงที่ได้มาทำการศึกษาผลของการประยุกต์ใช้สารสกัดจากขิงร่วมกับไคโตซานในเนื้อวัวบด

3. การศึกษาผลของการประยุกต์ใช้ไคโตซาน และสารสกัดขิงในเนื้อวัวบด

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารสกัดจากขิงให้มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด พบว่า ประสิทธิภาพของตัวทำละลายที่ดีสามารถเรียงตามลำดับได้ ดังนี้ เอทานอล 99.8% เอทานอล50% และน้ำกลั่น ตามลำดับ ดังนั้น สภาวะที่ใช้ในการสกัดขิง คือ สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง และนำสารสกัดที่ได้ไปทำการศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่อสารสกัดจากขิง

3.1 ศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่อสารสกัดจากขิงที่เหมาะสม

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่เหมาะสม และมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากวิธี DPPH radical scavenging activity และวิธี Ferrous ion chelating ability (ตารางที่ 14) โดยมีการแปรอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง เท่ากับ 1:1 1:2 1:3 2:1 2:2 2:3 3:1 3:2 และ 3:3 โดยน้ำหนัก จากผลการวิจัยพบว่าอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน และสารสกัดขิงมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 4.5 และอัตราส่วนของสารทั้งสองชนิดมีผลต่อทำให้ค่า %scavenging effect แตกต่างกัน (ตารางที่ 11) โดยของผสมที่มีอัตราส่วนเป็น 1:1 มีค่า %scavenging effect ต่ำสุด เท่ากับ 41.21% และของผสมที่มีอัตราส่วน 1:3 มีค่า %scavenging effect สูงสุด เท่ากับ 84.41% ซึ่งจากผลการวิจัยข้างต้น พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของสารสกัดจากขิงส่งผลให้ของผสมระหว่างไคโตซานและสารสกัดจากขิงมีค่า %scavenging effect เพิ่มขึ้น เนื่องจากสารสำคัญในสารสกัดจากขิงเป็นสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีผลทำให้สารสกัดจากขิงมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง (Shirin and Jamuna, 2010) อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน และสารสกัดขิงยังส่งผลต่อค่าการจับกับอิออนของเหล็ก ดังแสดงในตารางที่ 14 โดยของผสมที่มีอัตราส่วนเป็น 1:1 มีค่า %Chelating effect ต่ำสุด เท่ากับ 6.84% และของผสมที่มีอัตราส่วน 1:3 มีค่า %Chelating effect สูงสุด เท่ากับ 18.92% จากผลการวิจัยดังกล่าวพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของไคโตซานมีผลทำให้ของผสมมีค่า %Chelating effect เพิ่มขึ้น เพราะไคโตซานมีคุณสมบัติในการจับ

เหล็กไอออนเมื่อเพิ่มอัตราส่วนจึงทำให้ประจุบวกของไคโตซานจับกับอิออนของเหล็กเพิ่มขึ้น (ขวัญสุดา, 2547)

ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง ซึ่งผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity พบว่าที่อัตราส่วนของไคโตซาน และสารสกัดจากขิง เท่ากับ 1:3 โดยน้ำหนัก มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง ($p>0.05$) เท่ากับ 84.41% เนื่องจากเป็นการใช้สารทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดจากมิ้นท์ พบว่ามีค่า %scavenging effect สูงกว่าเมื่อใช้ไคโตซาน หรือสารสกัดจากใบมิ้นท์เพียงอย่างเดียว (Kanatt *et al*., 2008)

ตารางที่ 11 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดขิงที่อัตราส่วนต่างๆ

Chitosan : Ginger extract	pH	Antioxidant activity	
		% Scavenging effect	% Chelating effect
1:1	4.5	$41.21^{f} \pm 1.41$	$6.84^{e} \pm 0.68$
1:2	4.5	$48.21^{e} \pm 1.29$	$8.27^{d} \pm 0.29$
1:3	4.5	$84.41^{a} \pm 0.27$	$16.61^{a} \pm 0.52$
2:1	4.5	$55.87^{c} \pm 1.29$	$9.78^{d} \pm 0.69$
2:2	4.5	$58.40^{c} \pm 1.06$	$10.15^{d} \pm 0.96$
2:3	4.5	$84.13^{a} \pm 0.32$	$17.65^{a} \pm 0.41$
3:1	4.5	$51.60^{d} \pm 0.63$	$12.45^{c} \pm 1.38$
3:2	4.5	$61.13^{bc} \pm 1.24$	$14.05^{b} \pm 1.62$
3:3	4.5	$78.41^{b} \pm 0.31$	$18.92^{a} \pm 0.74$

หมายเหตุ: $^{a-d}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละตัวอย่าง ในแนวตั้งที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่เหมาะสม และมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระพบว่าที่อัตราส่วน 1:3 มีค่า %scavenging effect และ %chelating effect สูง ($p>0.05$) เท่ากับ 84.41 และ 16.61% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากของผสมที่อัตราส่วน 2:3 ดังนั้นจึงเลือกของผสมไคโตซาน และสารสกัดขิงที่อัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนัก เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบดเพื่อศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป เนื่องจากเป็นอัตราส่วนที่ต่ำที่สุดที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง

3.2 การศึกษาความเข้มข้นของของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อวัวบด

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของเนื้อวัวบด (ส่วนสะโพก) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ก่อนเติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าตัวอย่างเนื้อวัวบดมีองค์ประกอบทางเคมี ดังนี้ ความชื้น 77.05% โปรตีน 16.84% ไขมัน 3.51% เถ้า 0.96% คาร์โบไฮเดรต 1.64% จากงานวิจัยของ Delgado *et al*. (2005) ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่า ปริมาณไขมัน (3.00%) ขณะที่ FAO, 2007 รายงานว่าเนื้อวัวมีปริมาณเถ้า (1.20%) และความชื้น (75.00%) ใกล้เคียงกับเนื้อวัวที่ใช้ผลิตเป็นเนื้อวัวบดในงานวิจัยนี้

3.2.1 คุณลักษณะทางเคมี

3.2.1.1 ค่า Thiobarbituric acid number (TBA)

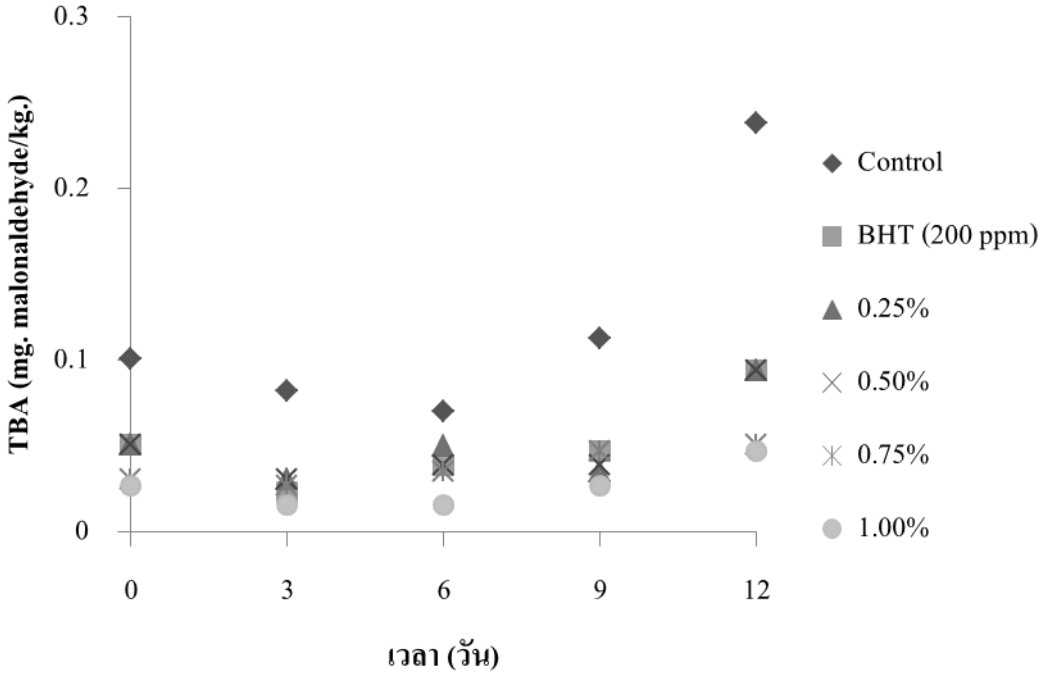
จากการศึกษาความเข้มข้นของของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงในเนื้อวัวบดโดยแปรความเข้มข้นเป็น 4 ระดับ คือ 0.25 0.50 0.75 และ 1% เทียบกับตัวอย่างควบคุม ได้แก่ เนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง และเนื้อวัวบดที่เติมวัตถุกันหืนสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 200 ppm เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าความเข้มข้นของของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงส่งผลต่อ ค่า TBA ดังแสดงในภาพที่ 11 เนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงมีแนวโน้มของค่า TBA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ โดยมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 12 ของการเก็บรักษา เท่ากับ 0.24 mg malonaldehyde/kg เนื้อวัวบดที่เติม BHT มีค่า TBA เพิ่มขึ้น

อย่างช้าๆ และมีค่าอยู่ในช่วง 0.05-0.09 mg malonaldehyde/kg ตลอดการเก็บรักษา โดยเนื้อวัวบดที่เติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิง มีค่า TBA เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แต่มีลักษณะเป็นการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ โดยเฉพาะในวันที่ 3 ถึงวันที่ 12 ของการเก็บรักษา เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมดังกล่าว และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของของผสมขึ้น พบว่าเนื้อวัวบดมีค่า TBA ลดลง โดยเนื้อวัวบดที่เติมของผสมความเข้มข้น 0.25% มีค่า TBA สูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆ โดยมีค่า TBA ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เท่ากับ 0.05 0.03 0.05 0.04 และ 0.09 mg malonaldehyde/kg ตามลำดับ และเนื้อวัวบดที่เติมของผสมความเข้มข้น 1.00% มีค่า TBA ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่า TBA เท่ากับ 0.03 0.02 0.02 0.03 และ 0.05 mg malonaldehyde/kg จากผลการวิจัยพบว่าความเข้มข้นของของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงมีผลต่อค่า TBA นั่นคือ ของผสมมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเนื้อวัวบด จึงทำให้เนื้อวัวบดมีค่า TBA ต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของของผสม

โดยค่าที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คือ ค่า TBA ซึ่งเป็นการวัดการเสื่อมเสียของไขมัน หรือน้ำมันจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยวัดเป็นจำนวนมิลลิกรัมของสาร malonaldehyde ในตัวอย่าง 1 กิโลกรัม ในการวิเคราะห์ค่า TBA เป็นการวัดการเพิ่มขึ้นของสารประกอบสีแดง (TBA reagent) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่าง 2-thiobarbituric acid (TBA) และ malonaldehyde ซึ่งเป็น secondary product ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยเฉพาะไขมันไม่อิ่มตัวสูง ซึ่งถูกเร่งปฏิกิริยาโดยฮีโมโปรตีน (hemoprotein) จากเหล็กกลุ่มนอนฮีม (non-heme iron) (Mansour and Khalil, 2000) จากผลการวิจัยตลอดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเนื้อวัวบดที่มีการเติมของผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ จะมีค่า TBA ที่แตกต่างจากเนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) แต่ค่า TBA ไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อวัวบดที่มีการเติม BHT ซึ่งเป็นวัตถุกันหืนทางการค้า พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ค่า TBA เพิ่มขึ้น และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของของผสมมีผลทำให้ค่า TBA ลดลง นั่นคือ ของผสมไคโตซาน และสารสกัดขิงมีคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Khalil and Mansour (1998) ที่กล่าวว่าระหว่างเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 วัน พบว่ามีค่า TBA เพิ่มขึ้นในทุกตัวอย่าง แต่ค่า TBA จะเพิ่มขึ้นช้าลงเมื่อผลิตภัณฑ์นั้นมีการเติมสารสกัดขิง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Mansour and Khalil (2000) ที่มีผลการวิจัยสนับสนุนประสิทธิภาพของสาร

ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้

Shahidi *et al.* (1999) ได้อธิบายกลไกการป้องกันการเกิดกลิ่นผิดปกติ (WOF)ในเนื้อสัตว์ คือ ไคโตซานจับกับเหล็กอิสระที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากโปรตีนในเม็ดเลือดระหว่างกระบวนการให้ความร้อน โดย Li *et al.* (1996) พบว่าการเติม N, O Carboxymethylchitosan (NOCC) ความเข้มข้น 3000 ppm ในเนื้อหมูปรุงสุก ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวเพียงพอสำหรับการยับยั้งการเกิดกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิง เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการชะลอการเกิดกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบดได้ โดยเนื้อวัวบดที่เติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก สามารถชะลอการเกิดกลิ่นหืนได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม



ภาพที่ 11 ค่าเฉลี่ยของค่า TBA ของเนื้อวัวบด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

3.2.1.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเนื้อวัวบดที่เติมของผสมระหว่างไคโตซานและสารสกัดจากขิง โดยมีอัตราส่วน 1:3 โดยน้ำหนัก ที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.50 0.75 1.00% และ

ตัวอย่างเนื้อวัวบดที่มีการเติมวัตถุกันหืนสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 200 ppm ระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน จากผลการวิจัยในตารางที่ 12 พบว่าตัวอย่างที่ไม่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง มีค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างจากเนื้อวัวบดที่เติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิง ในวันที่ 9 และ 12 ของการเก็บรักษา โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.53 และ 6.36 ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างของของผสมที่ความเข้มข้น 0.25 0.50 0.75 1.00% และตัวอย่างเนื้อวัวบดที่มีการเติม BHT มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ใกล้เคียงกัน คือ อยู่ในช่วง 5.2-5.6 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ซึ่งเนื้อวัวที่ดีควรมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.6-5.8 นั่นคือเมื่อมีการเติมของผสมทำให้สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อวัวบดให้มีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างต่ำระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ตารางที่ 12 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเนื้อวัวบดที่ผสมของผสมไคโตซานและสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ตัวอย่าง	pH				
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	$5.33^{Ca} \pm 0.01$	$5.24^{Db} \pm 0.04$	$5.20^{Dcd} \pm 0.04$	$5.53^{Ba} \pm 0.01$	$6.36^{Aa} \pm 0.01$
BHT	$5.26^{Bbd} \pm 0.00$	$5.26^{Bb} \pm 0.01$	$5.17^{Cd} \pm 0.01$	$5.20^{Cd} \pm 0.01$	$5.48^{Ac} \pm 0.03$
0.25%	$5.27^{Dcd} \pm 0.01$	$5.31^{Ca} \pm 0.01$	$5.23^{Eabc} \pm 0.01$	$5.36^{Bb} \pm 0.01$	$5.42^{Ad} \pm 0.01$
0.50%	$5.28^{Cbc} \pm 0.01$	$5.32^{Ba} \pm 0.00$	$5.27^{Da} \pm 0.01$	$5.26^{Dc} \pm 0.01$	$5.56^{Ab} \pm 0.01$
0.75%	$5.24^{Ce} \pm 0.01$	$5.34^{Ba} \pm 0.00$	$5.25^{Cab} \pm 0.01$	$5.26^{Cc} \pm 0.01$	$5.50^{Ac} \pm 0.01$
1.00%	$5.29^{Cb} \pm 0.00$	$5.32^{Ba} \pm 0.00$	$5.22^{Ebc} \pm 0.01$	$5.26^{Dc} \pm 0.01$	$5.53^{Ab} \pm 0.00$

หมายเหตุ $^{A-E}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวนอนที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

$^{a-d}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3.2.2 คุณลักษณะด้านกายภาพ

3.2.2.1 ค่าสีในระบบ CIE (L* C* h)

เมื่อพิจารณาค่าสีในระบบ CIE (L* C* h) ของเนื้อวัวบด ที่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงในปริมาณ 0.25 0.50 0.75 และ 1.00% เทียบกับตัวอย่างควบคุม ได้แก่ เนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง และเนื้อวัวบดที่เติมวัตถุกันหืนสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 200 ppm ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าความเข้มข้นของของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงมีผลต่อค่าสี โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นทำให้ค่าความสว่าง (Lighness, L*) ค่าความเข้มสี (Chroma, C*) และค่ามุมของสี (hue angle, h) เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาค่าความสว่าง (L*) ของเนื้อวัวบดที่เติมสารสกัดจากขิง เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อวัวบดชุดควบคุม พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิง ส่งผลให้ค่า L* เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 13 โดยมีค่าเท่ากับ 49.71 49.10 51.27 และ 51.03 ตามลำดับ และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นการเปลี่ยนแปลงค่า L* ของเนื้อวัวบดที่เติมของผสมดังกล่าวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกับเนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสม จากการวิจัยนี้สรุปได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงในเนื้อวัวบด ทำให้ค่าความสว่าง (L*) เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 13 ค่าความสว่าง (L*) ของเนื้อวัวบดที่ผสมของผสมไคโตซานและสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ตัวอย่าง	L*				
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	47.38^{Dd}±0.19	49.82^{Ab}±0.06	48.54^{Be}±0.06	47.81^{Ce}±0.24	50.17^{Acd}±0.57
BHT	51.57^{Aa}±0.06	49.99^{Bb}±0.59	50.36^{Ba}±0.08	51.43^{Ab}±0.73	50.64^{Bc}±0.99
0.25%	49.71^{ABc}±0.05	49.14^{CDc}±0.11	49.39^{BCd}±0.24	48.94^{Dd}±0.44	49.96^{Ad}±0.32
0.50%	49.10^{Dc}±0.53	48.83^{Dc}±0.34	50.01^{Cb}±0.12	52.21^{Aa}±0.32	51.46^{Bb}±0.21
0.75%	51.27^{Bab}±0.59	50.84^{Ba}±0.08	50.16^{Cb}±0.26	52.40^{Aa}±0.59	52.27^{Aa}±0.17
1.00%	51.03^{Bb}±0.14	50.05^{Cb}±0.12	49.77^{Dc}±0.02	49.59^{Dc}±0.12	51.47^{Ab}±0.30

หมายเหตุ $^{A-E}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวนอนที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

$^{a-d}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาค่าความเข้มสี (C*) ดังตารางที่ 14 พบว่าเนื้อวัวบดชุดควบคุมและเนื้อวัวบดที่เติมของผสมระหว่างไคโตซานและสารสกัดจากขิง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยค่า C* เริ่มต้นของทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วง 25.00 - 27.00 และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อวัวบดเพิ่มขึ้น พบว่าค่า C* ของเนื้อวัวบดทุกตัวอย่างมีแนวโน้มลดลง ($p \leq 0.05$) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นจากการที่ไมโอโกลบินเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยที่เหล็กอิออนในรูปเฟอร์รัสอิออน (Fe^{2+}) เปลี่ยนเป็นเฟอร์ริกอิออน (Fe^{3+}) เกิดเป็นเมทไมโอโกลบินซึ่งทำให้เนื้อวัวบดมีความเข้มของสีแดงลดลง และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ตารางที่ 14 ค่าความเข้มสี (C*) ของเนื้อวัวบดที่ผสมของผสมไคโตซานและสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ตัวอย่าง	C*				
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	25.80^{Abc}±0.38	23.79^{Cd}±0.48	24.52^{Bc}±0.42	22.81^{Dcd}±0.29	23.35^{Da}±0.85
BHT	26.89^{Aa}±0.16	26.05^{Bb}±0.48	24.83^{Cbc}±0.42	23.14^{Dc}±0.37	22.43^{Eb}±0.85
0.25%	25.71^{Bc}±0.14	26.41^{Ab}±0.15	25.32^{Ba}±0.28	23.55^{Cb}±0.10	22.40^{Db}±0.92
0.50%	27.11^{Aa}±0.43	27.06^{Aa}±0.36	25.44^{Ba}±0.21	21.80^{De}±0.51	23.22^{Cab}±0.34
0.75%	26.11^{Ab}±0.41	25.66^{Bc}±0.22	25.04^{Cab}±0.45	22.60^{Dd}±0.29	23.10^{Eab}±0.90
1.00%	26.12^{Abc}±0.12	26.12^{Ab}±0.11	24.90^{Bbc}±0.10	24.28^{Ca}±0.30	22.94^{Dab}±0.34

หมายเหตุ $^{A-E}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวนอนที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

$^{a-d}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาค่ามุมของสี (h) พบว่าเนื้อวัวบดชุดควบคุม และเนื้อวัวบดที่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 15) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของของผสม ตัวอย่างเนื้อวัวบดมีค่า h เริ่มต้นของทุกตัวอย่างอยู่ในช่วง 49.0-53.00 คืออยู่ในช่วงสีแดงถึงสีเหลือง ตามลำดับ (ภาพผนวกที่ ข1) และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเนื้อวัวบดเพิ่มขึ้นพบว่าค่า h ของเนื้อวัวบดทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) นั่นคือเนื้อวัวบดจะมีความเป็นสีแดงน้อยลง และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเหลืองมากขึ้น เนื่องจากเนื้อวัวบดมีการเปลี่ยนแปลงสีจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน

จากผลการวิจัยพบว่า ระหว่างการเก็บรักษาเนื้อวัวบดชุดควบคุม และเนื้อวัวบดที่เติมสารสกัดจากขิง ที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน มีการเปลี่ยนแปลงค่าสี โดยค่า L* C* และ h มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่าสีในระหว่างการเก็บรักษาอาหารนั้นอาจเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน หรือการสลายตัวของรงควัตถุ (Dias *et al*., 1994) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mansour and Khalil (2000) ซึ่งศึกษาการเติมสารสกัดจากขิงในเนื้อวัวบด (ground beef patties) พบว่าเนื้อวัวบดมีความเป็นสีแดงสูงกว่าตัวอย่างควบคุม เนื่องจากความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขิงทำหน้าที่ในการชะลอการเกิดเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น เนื้อวัวบดมีสีแดงลดลง

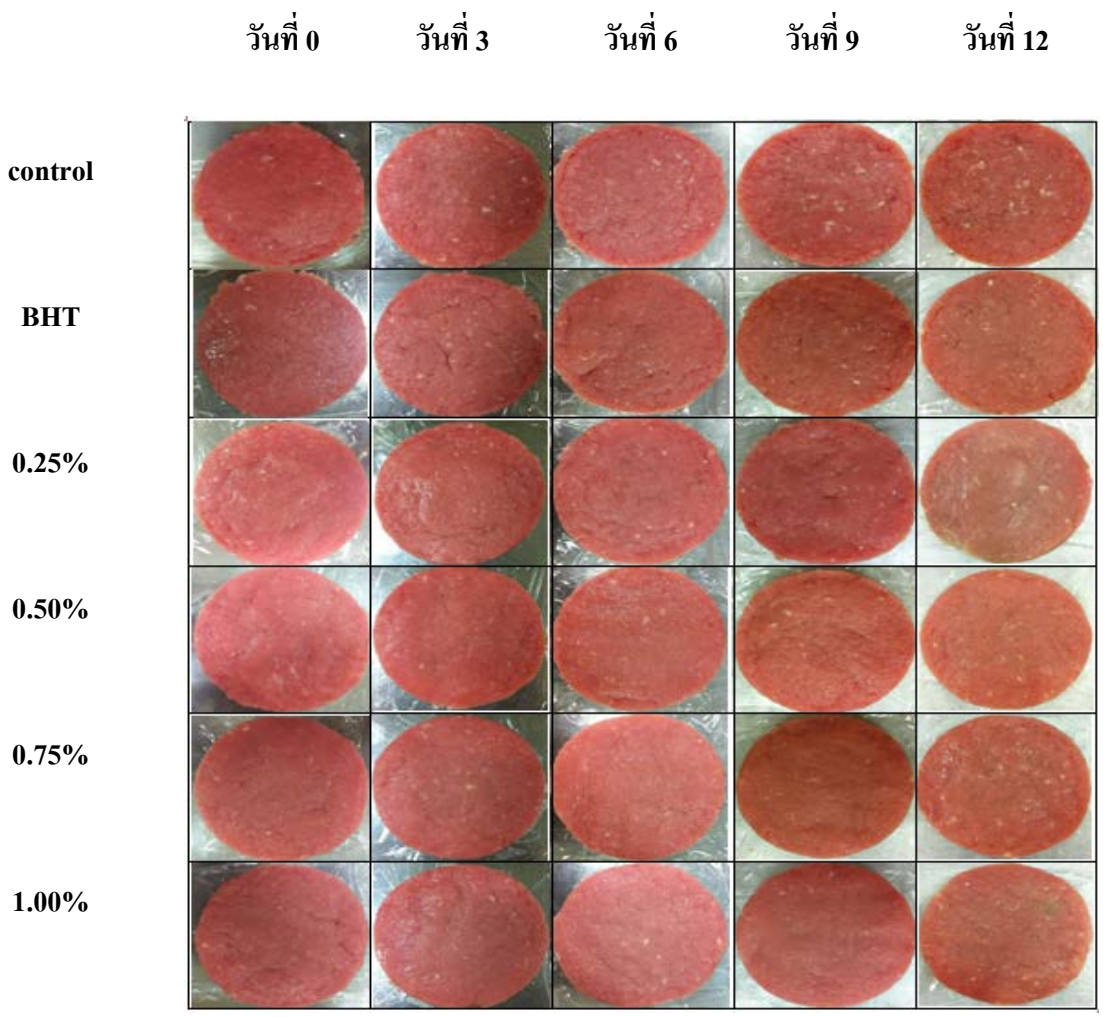
ตารางที่ 15 ค่ามุมของสี (h) ของเนื้อวัวบดที่ผสมของผสมไคโตซานและสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ตัวอย่าง	h				
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	49.23^{Bd}±0.12	49.22^{Be}±0.23	50.62^{Ac}±0.40	51.31^{Ac}±0.22	50.57^{Ac}±0.88
BHT	51.77^{BCb}±0.24	50.77^{Cd}±0.42	51.75^{BCb}±0.68	53.68^{Aa}±0.28	52.01^{Bb}±0.59
0.25%	52.10^{Cc}±0.21	51.21^{Dc}±0.09	51.85^{BCb}±0.20	53.39^{Aab}±0.43	51.77^{Cb}±0.19
0.50%	50.54^{Ca}±0.82	51.16^{BCc}±0.29	50.76^{Cc}±0.46	52.96^{Ab}±0.98	51.72^{Bb}±0.37
0.75%	52.81^{Ca}±0.87	52.96^{BCa}±0.15	53.37^{ABCa}±0.62	53.82^{Aa}±0.33	53.54^{ABa}±0.33
1.00%	52.88^{Ba}±0.27	52.24^{Cb}±0.32	53.57^{Aa}±0.19	53.69^{Aa}±0.35	53.45^{Aa}±0.41

หมายเหตุ $^{A-E}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวนอนที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

$^{a-d}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อวัวบดเมื่อเติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ในภาพที่ 12 เนื้อวัวบดเริ่มต้น (วันที่ 0) ที่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง มีความเป็นสีแดงน้อยกว่าเนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง และเนื้อวัวบดที่เติม BHT ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเข้มสี (C*) ที่วัดได้จากเครื่องมือ เนื่องจากของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดขิงที่เติมนั้นมีความเป็นกรด (pH 4.5) ในเนื้อสัตว์มีฮีโมโกลบินซึ่งมีองค์ประกอบของเหล็ก (Fe^{2+}) และไคโตซานมีคุณสมบัติในการจับกับโลหะเหล็ก ที่มีอยู่ในฮีโมโกลบินของเนื้อวัวบด ไคโตซานที่มีประจุบวกจึงเข้าไปจับกับเหล็ก จึงทำให้โปรตีนในเนื้อวัวเสียสภาพ มีผลต่อรงควัตถุที่อยู่ในเนื้อวัว อีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้สีของเนื้อวัวบดเกิดการเปลี่ยนแปลงคือ การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ทำให้สีของเนื้อวัวบดเมื่อเติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เกิดการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยจากผลการวิจัยสรุปได้ว่าเนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมมีการเปลี่ยนแปลงของสีมากที่สุด รองลงมาเป็นเนื้อวัวบดที่เติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยที่เนื้อวัวบดที่เติมของผสมที่ความเข้มข้น 1% มีการเปลี่ยนแปลงสีตลอดการเก็บรักษาน้อยที่สุด เนื่องจากสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงสีในเนื้อวัวบดดังที่กล่าวข้างต้นนั้น เมื่อเติมของผสมซึ่งมีคุณสมบัติเป็นทั้งสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ จึงช่วยในการชะลอการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อวัวบดตลอดอายุการเก็บรักษา



ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของเนื้อวัวบดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

3.2.2.2 เนื้อสัมผัสของเนื้อวัวบด

ผลจากการเติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเนื้อวัวบดชุดควบคุม ได้แก่ เนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสม และเนื้อวัวบดที่เติมวัตถุกันหืนสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 200 ppm เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ต่อค่าความแข็ง (Hardness) ดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่าเนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสม และเนื้อวัวบดที่เติม BHT มีค่าความแข็งน้อยกว่าเนื้อวัวบดที่เติมของผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ค่าความแข็งของเนื้อวัวบดทุกตัวอย่างเพิ่มขึ้น เนื่องจากเนื้อวัวบดในงานวิจัยนี้มีปริมาณไขมันต่ำ และมีปริมาณโปรตีนที่ให้ความคงตัวสูง ทำให้เกิดแรงยึดระหว่างชิ้นเนื้อในตัวอย่างเนื้อวัวบดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ โดยสามารถอธิบายได้ด้วยการเกิดเจลที่

อุณหภูมิต่ำของเนื้อสัตว์ (cold-set gelation) ซึ่งโปรตีนในเนื้อสัตว์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Protein aggregation) เกิดพันธะเคมีอย่างอ่อนๆ และเกิดโครงสร้างเจลขึ้น ซึ่งการเกิดเจลสามารถเกิดขึ้นได้เมื่ออุณหภูมิต่ำลง และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายที่ลดลง (Sato *et al*., 1995)

ตารางที่ 16 ค่าความแข็ง (Hardness) ของเนื้อวัวบดที่ผสมของผสมไคโตซานและสารสกัดขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ตัวอย่าง	Hardness (N)				
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	$0.34^{Cb} \pm 0.05$	$0.56^{Ba} \pm 0.03$	$0.58^{Ba} \pm 0.04$	$0.70^{Ac} \pm 0.07$	$0.73^{Ac} \pm 0.06$
BHT	$0.38^{Eb} \pm 0.05$	$0.61^{Da} \pm 0.03$	$0.66^{Ca} \pm 0.04$	$0.92^{Ba} \pm 0.07$	$0.9^{A}6^{a} \pm 0.02$
0.25%	$0.35^{Eb} \pm 0.08$	$0.61^{Da} \pm 0.03$	$0.67^{Ca} \pm 0.04$	$0.79^{Bbc} \pm 0.06$	$0.83^{Ab} \pm 0.05$
0.50%	$0.38^{Cb} \pm 0.05$	$0.56^{Ba} \pm 0.03$	$0.61^{Ba} \pm 0.04$	$0.74^{Aab} \pm 0.04$	$0.76^{Ab} \pm 0.07$
0.75%	$0.48^{Ea} \pm 0.02$	$0.59^{Da} \pm 0.03$	$0.66^{Ca} \pm 0.04$	$0.78^{Bbc} \pm 0.06$	$0.80^{Ab} \pm 0.01$
1.00%	$0.40^{Eab} \pm 0.08$	$0.60^{Ca} \pm 0.03$	$0.57^{Ca} \pm 0.04$	$0.74^{Bbc} \pm 0.06$	$0.82^{Ab} \pm 0.01$

หมายเหตุ $^{A-E}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวนอนที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

$^{a-d}$ หมายถึง ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่กำกับด้วยตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3.2.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาในเนื้อวัวบด

3.2.3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อวัวบด (BAM, 2002)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของเนื้อวัวบดที่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเนื้อวัวบดชุดควบคุม ได้แก่ เนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง และเนื้อวัวบดที่เติมวัตถุกันหืนสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 200 ppm เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าเนื้อวัวบดมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 4.20×10^{4}-9.75×10^{6} cfu/g เนื้อวัวบดที่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้น 0.50 0.75 และ 1.00% ในวันที่ 9 ของการเก็บรักษา มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.16×10^{5} 1.62×10^{5} และ 2.00×10^{5} ตามลำดับ ในขณะที่เนื้อวัวบดชุดควบคุม และเนื้อวัวบดที่เติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดขิงที่ความเข้มข้น 0.25% มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ ซึ่งมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 1.93×10^{6} 1.15×10^{6} และ 2.20×10^{6} cfu/g เมื่อพิจารณาเกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ และภาชนะสัมผัสอาหารของอาหารพร้อมปรุงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536) กำหนดให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ต้องไม่เกิน 1.0×10^{6} cfu/g จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าตัวอย่างเนื้อวัวบดที่เติมของผสมที่ความเข้มข้น 0.50 0.75 และ 1.00% สามารถชะลอการเติบโตเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดทำให้เนื้อวัวบดมีอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tsai *et al*. (2002) ที่ได้ศึกษาไคโตซานจากเปลือกกุ้งที่มีค่าการกำจัดหมู่อะซีติลสูงๆ เช่น 95-98% DD มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียได้ดี โดยสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้จาก 5 วัน เป็น 9 วัน (ตารางที่ 17) และจากงานวิจัยนี้การใช้ไคโตซานที่มีค่าการกำจัดหมู่อะซิติล 100% ร่วมกับสารสกัดจากขิงสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของเนื้อวัวบดได้จาก 6 วัน เป็น 9 วัน ที่ความเข้มข้น 0.50% โดยน้ำหนัก

ตารางที่ 17 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดของเนื้อวัวบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน

ตัวอย่าง	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g)				
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	6.20×10^4	8.65×10^4	1.05×10^5	1.93×10^6	9.75×10^6
BHT	5.20×10^4	1.89×10^5	2.45×10^5	1.15×10^6	6.35×10^6
0.25%	7.50×10^4	7.00×10^4	1.25×10^5	2.20×10^6	6.65×10^6
0.50%	6.65×10^4	4.45×10^4	5.42×10^4	1.16×10^5	1.15×10^6
0.75%	5.45×10^4	9.10×10^4	9.60×10^4	1.62×10^5	1.79×10^6
1.00%	5.20×10^4	1.26×10^5	1.70×10^5	2.00×10^5	1.95×10^6

3.2.3.2 ปริมาณเชื้อรา และยีสต์ทั้งหมดในเนื้อวัวบด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อรา และยีสต์ทั้งหมดของเนื้อวัวบดที่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับเนื้อวัวบดชุดควบคุม ได้แก่ เนื้อวัวบดที่ไม่เติมของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง และเนื้อวัวบดที่เติมวัตถุกันหืนสังเคราะห์ (BHT) ความเข้มข้น 200 ppm เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน (ตารางที่ 18) พบว่าเนื้อวัวบดทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษามีปริมาณเชื้อรา และยีสต์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 3.25×10^1-6.78×10^2 cfu/g เมื่อพิจารณาเกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ และภาชนะสัมผัสอาหารของอาหารพร้อมปรุงของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536) กำหนดให้ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์ต้องไม่เกิน 500 cfu/g ผลจากการวิจัยพบว่าเนื้อวัวบดทุกตัวอย่างมีปริมาณเชื้อรา และยีสต์ทั้งหมดไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนด เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน

ตารางที่ 18 ปริมาณเชื้อรา และยีสต์ทั้งหมดของเนื้อวัวบดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน

ตัวอย่าง	ปริมาณเชื้อรา และยีสต์ทั้งหมด (CFU/g)				
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12
Control	5.00×10^1	5.80×10^1	1.80×10^2	3.30×10^2	6.78×10^2
BHT	4.55×10^1	4.80×10^1	1.50×10^2	2.90×10^2	5.11×10^2
0.25%	3.95×10^1	4.55×10^1	1.25×10^2	1.60×10^2	2.34×10^2
0.50%	3.55×10^1	3.65×10^1	5.15×10^1	1.20×10^2	2.00×10^2
0.75%	3.45×10^1	3.55×10^1	4.35×10^1	7.15×10^1	1.00×10^2
1.00%	3.25×10^1	3.55×10^1	4.65×10^1	6.35×10^1	1.35×10^2

จากการศึกษาความเข้มข้นของของผสมระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิงที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อวัวบด พบว่าการใช้ไคโตซาน และสารสกัดจากขิง ที่มีความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถชะลอการเสื่อมเสียของเนื้อวัวจากเชื้อจุลินทรีย์ และชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเนื้อวัวบดอย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการดัดแปลงกระบวนการผลิตไคโตซานจากไคตินจากเปลือกกุ้งให้มีความบริสุทธิ์และคุณภาพสูง จากวิธีของ Tolaimate et al. (2003) และ Kachanechai et al. (2008) ทำให้ได้ไคโตซานที่มีร้อยละผลได้ 79% ระดับการกำจัดหมู่อะซิติล 100% น้ำหนักโมเลกุล 438 kDa มีปริมาณโปรตีนและเกลือแร่ต่ำ ไคโตซานหลังจากตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์เพ็กติเน็กซ์ (Pectinex®) ด้วยสภาวะ pH 4.5 อุณหภูมิ 50 °C เก็บตัวอย่างตั้งแต่ 0 - 300 นาที พบว่าให้ร้อยละผลได้ 80 – 100% น้ำหนักโมเลกุล 42 – 438 kDa ค่าการกระจายตัวของโพลิเมอร์ (Polydispersity) ของไคโตซานที่ผลิตได้พบว่าเป็นการกระจายตัวแบบ most probable distribution (IUPAC, 2009) แสดงถึงการกระจายตัวของโมเลกุลที่สม่ำเสมอ โดยไคโตซานที่บ่มด้วยระยะเวลาต่างกันจะมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันโดยลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาบ่มเพิ่มขึ้น และส่งผลให้มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกัน จากการศึกษาความสามารถการต้านอนุมูลอิสระของไคโตซาน พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซาน และการลดลงของน้ำหนักโมเลกุล ส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แสดงออกในรูป %scavenging effect เพิ่มสูงขึ้น โดยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 69 kDa ที่ความเข้มข้น 1% ให้ค่า %scavenging effect สูงที่สุด เท่ากับ 24.02 ± 2.8 ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2007) ที่ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระของไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของไคโตซานจะทำให้ความสามารถการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นด้วย สำหรับการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมในเชื้อจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ S. aureaus S. feacalis E. coli และ S. typhimurium พบว่าการตัดสายพันธะไคโตซานส่งผลให้น้ำหนักโมเลกุลลดลงโดยไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำถึง 121 kDa จะสามารถยับยั้งเชื้อ S. feacalis ได้ดีที่สุด และเมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดลงถึง 63 kDa จะให้ผลในการต้านเชื้อ S. aureaus และ E. coli ได้ แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์เมื่อน้ำหนักโมเลกุลลดต่ำลง ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำลงส่งผลให้ไคโตซานมีสมบัติในการละลายน้ำดีขึ้นส่งผลให้ไคโตซานสามารถยับยั้งเชื้อ S. aureaus และ E. coli ได้ดีขึ้น (Li et al., 2007) โดยตัวอย่างที่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด คือ ไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุล 63 kDa โดยสรุปจากผลการศึกษานี้ทำให้เห็นว่าไคโตซานที่มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ และเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีควรมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 63-69 kDa

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดขิงเพื่อให้ได้สารสกัดที่มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดประกอบด้วย น้ำกลั่น 50% เอทานอล 99.8% เอทานอล และระยะเวลาในการสกัด คือ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

DPPH radical scavenging activity และ ferrous ion chelating ability จากการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดขิงพบว่าตัวอย่างขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% ที่เวลา 36 ชั่วโมง มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด คือ 1.79 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสด รองลงมา คือ ตัวอย่างขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 50% เวลา 36 ชั่วโมง มีค่า เท่ากับ 1.70 มิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อกรัมน้ำหนักสด การทำปฏิกิริยากับ DPPH ของสารสกัดจากขิงมีความสัมพันธ์กับตัวทำละลาย และระยะเวลาในการสกัด โดยสภาวะที่มีค่า % Scavenging effect สูงที่สุด คือ ขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 58.25% รองลงมาได้แก่ เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 57.35% และ 57.11% ตามลำดับ ขิงที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมี % Scavenging effect น้อยที่สุดในทุกช่วงเวลา และการวัดความสามารถในการจับอิออนเหล็ก สภาวะในการสกัดที่มีค่า % Ferrous chelating สูงที่สุด คือ ขิงที่สกัดด้วยสุดเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 21.67% รองลงมาได้แก่ ขิงที่สกัดด้วยเอทานอล 50% เวลา 36 ชั่วโมง มี % Ferrous chelating เท่ากับ 17.09% และขิงที่สกัดด้วยน้ำกลั่นมีน้อยที่สุดมี % Ferrous chelating น้อยที่สุดในทุกช่วงเวลา จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดขิงที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด จากการศึกษาสภาวะที่เหมาสมในการสกัดขิงให้มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด พบว่าตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพสามารถเรียงจากมากไปน้อย ดังนี้ เอทานอล 99.8% > เอทานอล 50% > น้ำกลั่น และเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแล้วส่งผลให้สารสกัดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด คือ 36 ชั่วโมง ดังนั้น สภาวะที่ใช้ในการสกัดขิง คือ สกัดด้วยเอทานอล 99.8% เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จากการศึกษาอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่อสารสกัดจากขิงที่เหมาะสม ได้แก่ 1:1 1:2 1:3 2:1 2:2 2:3 3:1 3:2 และ 3:3 โดยน้ำหนัก คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวัดด้วยวิธีการทำปฏิกิริยากับ DPPH พบว่าตัวอย่างไคโตซานต่อสารสกัดขิงที่อัตราส่วน 1:3 และ 2:3 มีค่า % Scavenging effect สูงที่สุด คือ 84.41% และ 84.13% ตามลำดับ และอัตราส่วนที่มีค่าน้อยที่สุดคือ 1:1 มีค่าเท่ากับ 41.21% และจากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณสารสกัดขิงจะมีผลทำให้ค่า %Scavenging effect มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากขิงมีคุณสมบัติเด่นการต้านอนุมูลอิสระสูง (93.33%) และเมื่อวัดคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Ferrous ion chelating ability พบว่าตัวอย่างที่อัตราส่วน 3:3 มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 18.92% รองลงมาคือ 2:3 และ 1:3 โดยมีค่าเท่ากับ 17.65% และ 16.61 ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าเมื่อพิจารณาค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารผสมไคโตซาน และสารสกัดขิง ที่อัตราส่วน 1:3 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดีที่สุดเนื่องจากมีค่าการทำปฏิกิริยากับ DPPH และค่าการจับกับเฟอร์รัสไอออนดีที่สุด (84.13% และ 17.65%) จึงเลือกสารผสมไคโตซาน และสารสกัดขิงที่อัตราส่วน 1:3 เพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบด

ซึ่งจากการศึกษาผลของการประยุกต์ใช้ไคโตซานร่วมกับสารสกัดจากขิงที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีในเนื้อวัวบด อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจาก

ขิงที่เหมาะสม ซึ่งมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด คือ อัตราส่วนระหว่างไคโตซาน และสารสกัดจากขิง เท่ากับ 1:3 โดยน้ำหนัก พบว่ามีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ (%scavenging effect) เท่ากับร้อยละ 84.41 และความสามารถในการจับกับเหล็กอิออน (%chelating ability) เท่ากับร้อยละ 16.61 เมื่อนำของผสมดังกล่าวมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในเนื้อวัวบด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เนื้อวัวบดที่เติมของผสมไคโตซาน และสารสกัดจากขิงความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำกว่า 10^6 cfu/g โดยสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของเนื้อวัวบดจาก 6 วัน เป็น 9 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

เอกสาร และสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2525. **ขิง**. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

จิรารัตน์ เทศะศิลป์. 2554. **แนวทางการใช้วัตถุเจือปนอาหารและกฎหมายที่เกี่ยวข้อง**. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพฯ.

ธิติรัตน์ ปานม่วง. 2553. **วัตถุเจือปนอาหาร.** แหล่งที่มา: http://www.cugateway.chula.ac.th/node/19, 27 เมษายน 2555.

นิจศิริ เรืองรังสี. 2547. **สมุนไพรไทย**. บีเฮลท์ตี้, กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2544. **หลักการแปรรูปอาหารเบื้องต้น**. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2545. **เคมีอาหาร.** โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

พนิดา รัตนปิติกรณ์. 2541. **การพัฒนาฟิล์มเคลือบบริโภคได้ชนิดฟิล์มประกอบสำหรับเคลือบผลิตภัณฑ์ปลาเส้น**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพ็ญขวัญ ชมปรีดา. 2536. **การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส**. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เพ็ญศรี จูงศิริวัฒน์, จินตนา ภูติวรนาถ, สมพิศ ชูแสงจันทร์, นารถตยา ชมนารถ และเทพฤทธิ์ ทับบุญมี. 2546. **ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2547. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนลูกชิ้นเนื้อวัว**. มผช. 305/2547.

วิไล รังสาดทอง. 2543. **เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร**. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชัน จำกัด. กรุงเทพฯ.

สุมลฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** โรงพิมพ์มหาวิทยาลัย-ธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529. **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์.** วัฒนาพานิช. กรุงเทพฯ.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.** โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต. กรุงเทพฯ.

ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ. 2546. **เรื่องน่ารู้ไคติน-ไคโตซาน.** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ

Al-Jalay, B., G. Blank, B. Mcconnell and M. Al-Khayat. 1987. Antioxidant Activity of Selected Spices Used in Fermented Meat Sausage. **Journal of Food Protection**. 50: 25–27.

Agustini, T. W. and S. Sedjati. 2007. The effect of chitosan concentration and storage time on the quality of salted – dried anchovy (*Stolephorus heterolobus*). **Journal of Coastal Development.** 10: 63-71.

Anandh, M. A. and V. Lakshmanan. 2012. Storage stability of smoked buffalo rumen meat product treated with ginger extract. **Journal of Food Science and Technology**. 10: 1-6.

AOAC. 2000. **Official Methods of Analysis.** 18th ed.,The Association of Official Analyical Chemists Arlington, Virginia.

Azzouz, M. A. and L. B. Bullerman. 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. **Journal of Food Protocal**. 45: 1298–1301.

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: 660-664.

Beverlyaa, R. L., M. E. Janesa, W. Prinyawiwatkulaa and K. N. Hong. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**. 25: 534-537.

Chan, E.W.C., Y. Y. Lim, S. K. Wong, S. P. Tan, F. S. Lianto and M. Y. Yong. 2009. Effects of different drying methods on antioxidant properties of leaves and tea of ginger species. **Food Chemistry**. 113:166-172.

Chan, E. W. C., Y. Y. Lim, L. F. Wong, F. S. Lianto, S. K. Wong, K. K. Lim, C. E. Joe and T. Y. Lim. 2008. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. **Food Chemistry**. 109: 477-483.

Chien, P. J., F. Sheu, W. T. Huang and M. S. Su. 2007. Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice. **Food Chemistry**. 102: 1192-1198.

Chung, Y.C., Y. P. Su, C. C. Chen, G. Jia, H. L. Wang, J. C. G. Wu and J. G Lin. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacologica Sinica**. 25: 932–936.

Dimitrios, B. 2006. Source of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**. 17: 505-512.

Du, Y., Y. Zhao, S. Dai and B. Yang. 2009. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 10: 103-107.

Garg, V. and S.K. Mendiratta. 2006. Studies on tenderization and preparation of enrobed pork chunks in microwave oven. **Meat Science**. 74: 718–726.

Georgantelis, D., G. Blekas, P. Katikou, I. Ambrosiadis and D.J. Fletouris. 2007. 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.

Giatrakou, V., A. Ntzimani and I. N. Savvaidis. 2010. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. **Food Microbiology**. 27: 132-136.

Greenberg, D. M. and T. Winnick. Plant proteases: I. Activation-inhibition reactions. **Journal of Biological Chemistry**. 135: 761-773.

Hafdani, F. N and N. Sadeghinia. 2011. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. **World Academy of Science, Engineering and Technology**. 74: 257-261.

Harish Prashanth, K. V. and R. N. Tharanathan. 2007. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential an overview. **Trends in Food Science & Technology**. 18: 117–131.

Hashim, M. M., D. Mingsheng, M. F. Iqbal and C. Xiaohong. 2011. Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. **Phytochemistry**. 72(6): 458-464.

Holmquist, G. U., H.W. Walker and H. M. Stahr. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Food Science**. 48: 778–782.

Kanatt, S. R., R. Chander and A. Sharma. 2008. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**. 107: 845–852.

Kong, M., X. G. Chen, C. S. Liu, L. J. Yu, Q. X. Ji, Y.P. Xue, D. S. Cha and H. J. Park. 2008. Preparation and antibacterial activity of chitosan microspheres in a solid dispersing system. **Frontiers of Materials Science in China.** 2: 214–220.

Mcdougall, 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 product, pp. 79-93. Glasglow: Blackie Academic and Professional.

Mansour, E. H. and A. H. Khalil. 2000. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their application to ground beef patties. **Food Chemistry**. 69: 135-141.

Masuda, Y., H. Kikuzaki, Masashi Hisamoto, Nobuji Nakatani. 2004. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. **Biofactors Oxford England.**

Nain, N., S. S. Ahlawat, N. Khanna and S. K. Chhikara. 2009. Properties and utility of commonly used natural spices– A Review. **Agricultural Research Communication Centre.** 30(2): 108 – 119.

Negbenebor, C., Y. Balami and J. Igene. 1995. Yield and storage stability of patties from pre-rigor beef previously dipped in potassium sorbate and ginger solutions. **International Journal of Food Science and Technology**. 30(1): 65-70.

Pasanphan, W., Buettner, G. R., and Chirachanchai, S. 2010. Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. **Carbohydrate Research**, 345: 132-140.

Petrou, S., M. Tsiraki, V. Giatrakou and I. N. Savvaidis. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. **International Journal of Food Microbiology**.1: 1-8.

Prior, R. L., H. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D., Huang, B. Ou and R. Jacob. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity ($ORAC_{FL}$) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 51: 3273-3279.

Rabea, E.I., M. E. T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe and W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**. 4: 1457–1465.

Roller, S. and N. Covill. 1999. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**. 47: 67–77.

Sajomsang, W., S. Tantayanon, W. Tangpasuthadol and W. H. Daly. 2009. Quaternization of N-aryl chitosan derivatives: synthesis, characterization, and antibacterial activity. **Carbohydrate Research**. 344:2502-2511.

Salzer, U.J. 1982. Antimicrobial action of some spice extracts and mixtures. **Fleischwirtschaft**. 62: 885-887.

Sayas-Barberá, E., J. Quesada, E. Sánchez-Zapata, M. Viuda-Martos, F. Fernández- López and J. A. Pérez-Alvarez. 2011. Effect of the molecular weight and concentration of chitosan in pork model burgers. **Meat Science**. 88: 740-749.

Shirin, A. P. R. and J. Prakash. 2010. Chemical composition and antioxidant properties of ginger root (Zingiber officinale). **Journal Of Medicinal Plants**. 4(24): 2674-2679.

Soultos, N., Z. Tzikas, A. Abrahim, D. Georgantelis, and I. Ambrosiadis. 2008. Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sausages. **Meat Science**. 80: 1150-1156.

Shahidi, F., J. K. V. Arachchi and Y. J. Jeon. 1999. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**. 10: 37-51.

Shimada, K., K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the anti-oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 40: 945–948.

Tikhonov, V. E., E. A. Stepnova, V. G. Babak, I. A. Yamskov, J. Palma-Guerrero, H. B. Jansson, L. V. Lopez-Llorca, J. Salinas, D. V. Gerasimenko, I. D. Avdienko and V. P. Varlamov. 2006. Bactericidal and antifungal activities of a low molecular weight chitosan and its N-/2(3)-(dodec-2-enyl) succinoyl/-derivatives. **Carbohydrate Polymers**. 64: 66–72.

Tsai, L. L., N. J. Yen and R. G. R. Chou. 2012. Changes in Muscovy duck breast muscle marinated with ginger extract. **Food Chemistry**. 130: 316-320.

Vargasa, M., A. Albors and A. Chiralt. 2011. Application of chitosan-sunflower oil edible films to pork meat hamburgers. **Food Science**. 1: 39 – 43.

Zhang, D and C. Quantick. 1997. Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during post-harvest storage of Litchi (*Litchi Chinensis Sonn*.). **Postharvest Biological Technology**. 12: 195-202.

Ziauddin, K.S., D.N. Rao and B.L. Amla. 1995. Effect of lactic acid, ginger extract and sodium chloride on quality and shelf life of refrigerated buffalo meat. **Journal of Food Science and Technology**. 32: 126–128.

Zhong, Z.M., R. G. Xing., S. Liu, L. Wang, S. B. Cai and P. C. Li. 2008. Synthesis of acyl thiourea derivatives of chitosan and their antimicrobial activities in vitro. **Carbohydrate Research**. 343: 566–570.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (Total Phenolic Content)

2.1 สร้างกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (แกน X) และความเข้มข้นของกรดแกลลิก (แกน Y) โดยความเข้มข้นของกรดแกลลิกอยู่ในช่วง 4-14 ไมโครกรัม ได้กราฟมาตรฐานดังภาพผนวกที่ 1

2.2 ปิเปตสารสกัด 125 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นอยู่ 500ไมโครลิตร

2.3 เติมสารโฟลิน-ซีโอเคาทูล 125 ไมโครลิตร ปล่อยไว้ 6 นาที

2.4 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 7 ปริมาตร 1250ไมโครลิตร

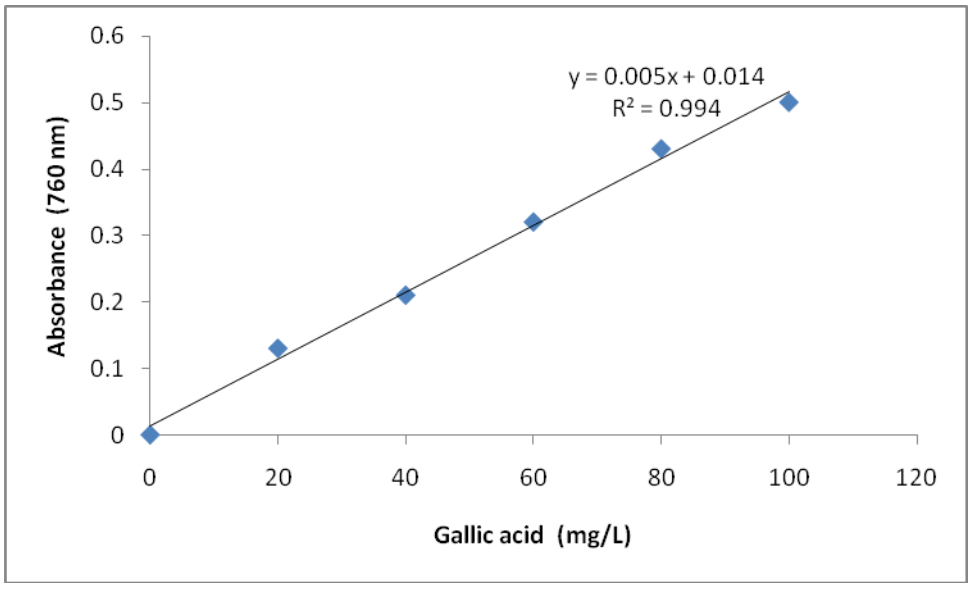
2.5 เติมน้ำกลั่น 1000 ไมโครลิตร

2.6 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงทันที ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

2.7 วัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงควบคุมโดยทำตามขั้นตอน 2.2-2.6 แต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด

2.8 วิธีการคำนวณ

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดคำนวณได้โดยแทนค่าความยาวคลื่นที่วัดได้ลงในสมการจากกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร และความเข้มข้นของกรดแกลลิก

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข
ฉบับที่ 119 (พ.ศ.2532)
เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร (ฉบับที่ 2)

โดยที่เป็นการสมควรแก้ไขนิยามของวัตถุเจือปนอาหารเพื่อให้ครอบคลุมถึงการใช้วัตถุอื่นกับอาหารด้วย

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 6(1)(2)(5)(6)(7)(9) และ (10) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

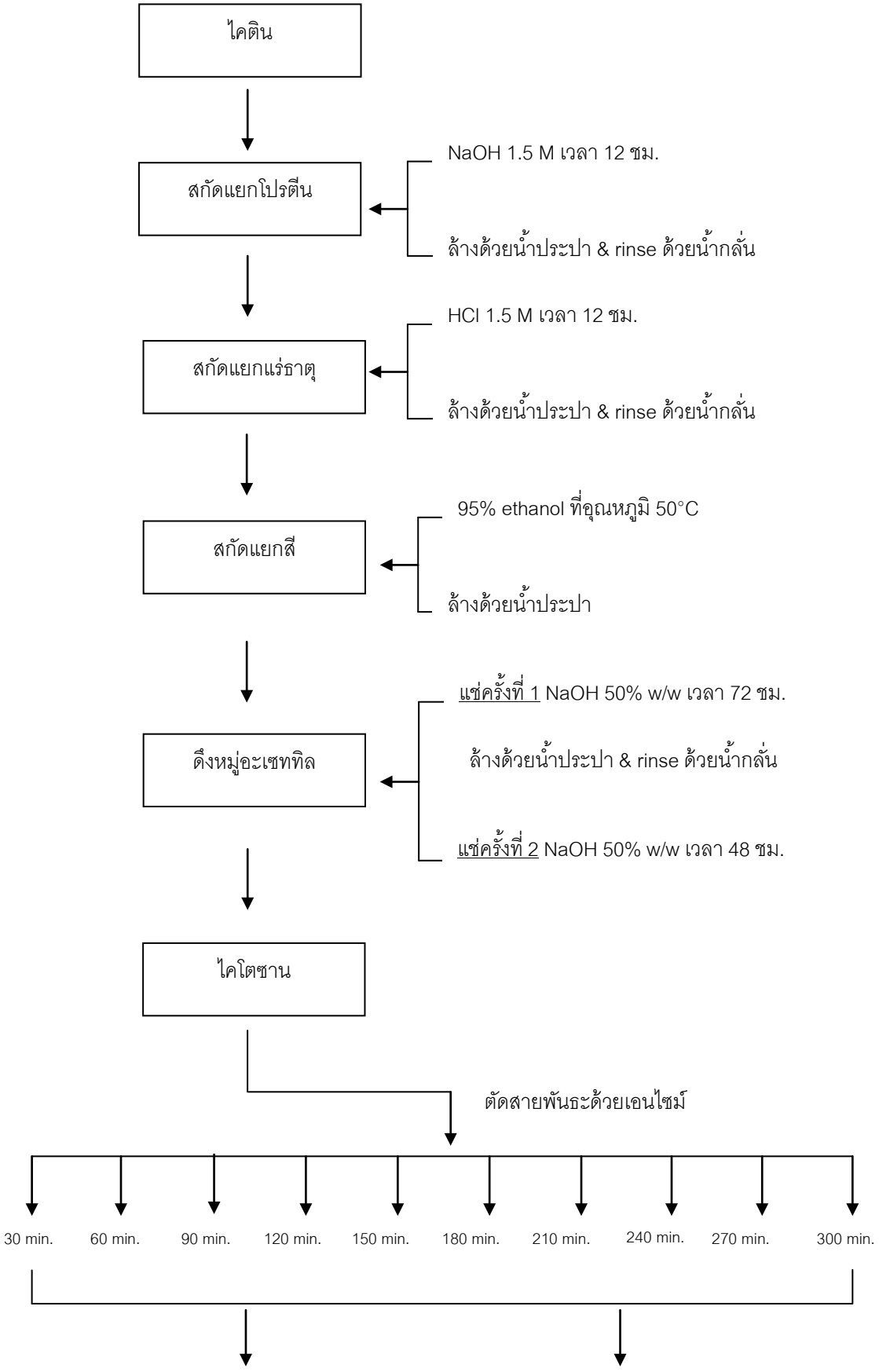
ข้อ 1 ให้ยกเลิกความในข้อ 3 แห่งประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 84 (พ.ศ.2527) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร ลงวันที่ 25 ธันวาคม พ.ศ.2527 และให้ใช้ความต่อไปนี้แทน

"ข้อ 3 วัตถุเจือปนอาหาร หมายความว่า วัตถุที่ตามปกติมิได้ใช้เป็นอาหารหรือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร ไม่ว่าวัตถุนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนในอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การบรรจุ การเก็บรักษา หรือการขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพหรือมาตรฐานหรือลักษณะของอาหาร และให้หมายความรวมถึงวัตถุที่มิได้ใช้เจือปนในอาหาร แต่ใช้รวมอยู่กับอาหารเพื่อประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นด้วย"

ประกาศฉบับนี้ ให้ใช้บังคับตั้งแต่วันถัดจากวันประกาศในราชกิจจานุเบกษาเป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 8 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2532

ชวน หลีกภัย
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข


ไคติน
สกัดแยกโปรตีน
NaOH 1.5 M เวลา 12 ชม.
ล้างด้วยน้ำประปา & rinse ด้วยน้ำกลั่น
สกัดแยกแร่ธาตุ
HCl 1.5 M เวลา 12 ชม.
ล้างด้วยน้ำประปา & rinse ด้วยน้ำกลั่น
สกัดแยกสี
95% ethanol ที่อุณหภูมิ 50°C
ล้างด้วยน้ำประปา
ดึงหมู่อะเซททิล
แช่ครั้งที่ 1 NaOH 50% w/w เวลา 72 ชม.
ล้างด้วยน้ำประปา & rinse ด้วยน้ำกลั่น
แช่ครั้งที่ 2 NaOH 50% w/w เวลา 48 ชม.
ไคโตซาน
ตัดสายพันธะด้วยเอนไซม์
30 min.
60 min.
90 min.
120 min.
150 min.
180 min.
210 min.
240 min.
270 min.
300 min.

Antioxidant (DPPH) **Antimicrobial (Disc diffusion)**

ภาพที่ 8 แสดงขั้นตอนการศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ และการต้านอนุมูลอิสระ

ภาพที่ 9 เครื่อง Gel Permeation Chromatography (GPC)

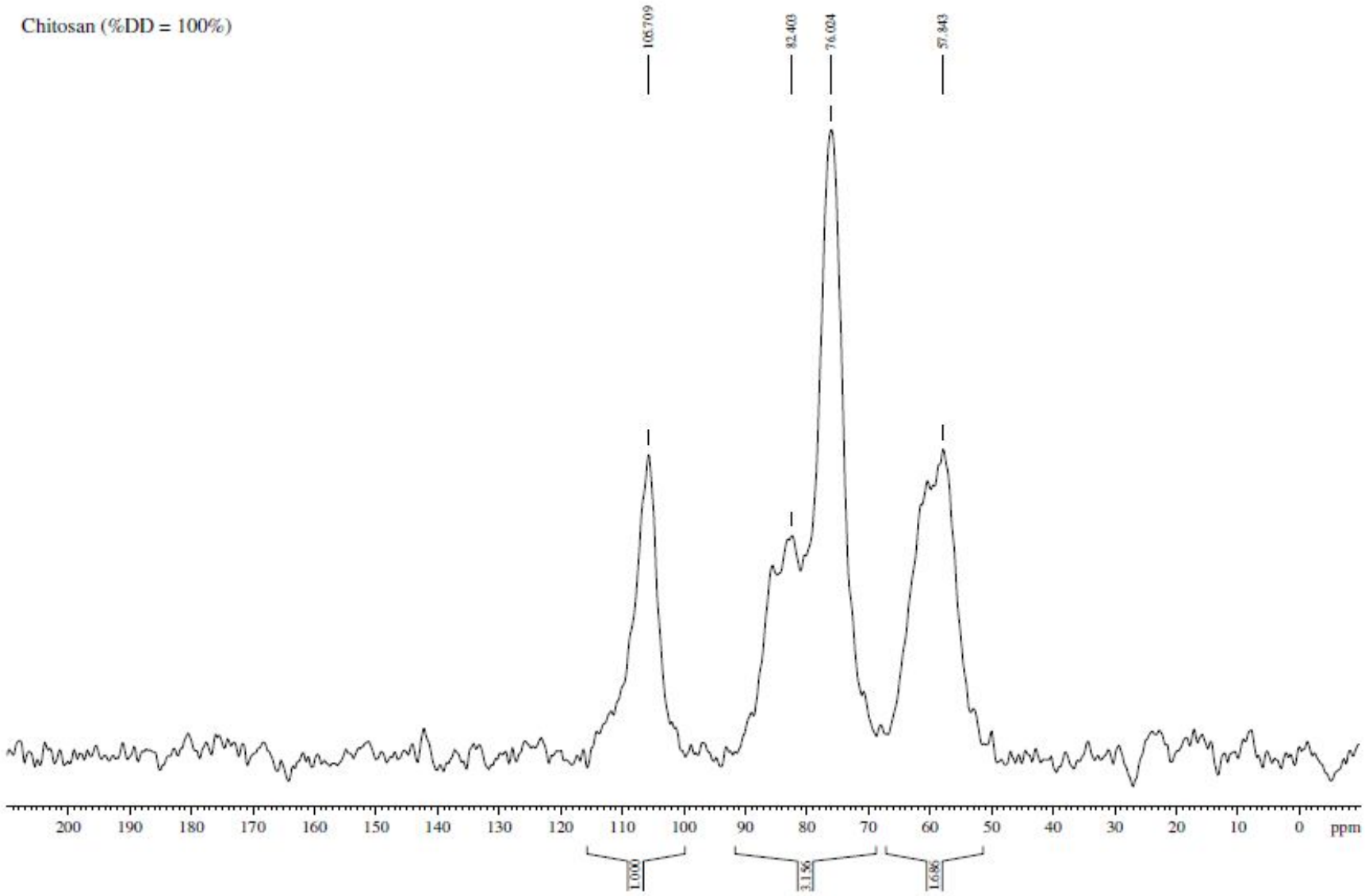
ภาพที่ 10 เครื่อง Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

ผลการวิเคราะห์ค่า Degree of Deacetylation ของไคโตซานด้วยเครื่อง NMR

แสดงผลในรูปของ Chromatogram ที่เครื่องประมวลผลได้

และผลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานด้วยเครื่อง GPC

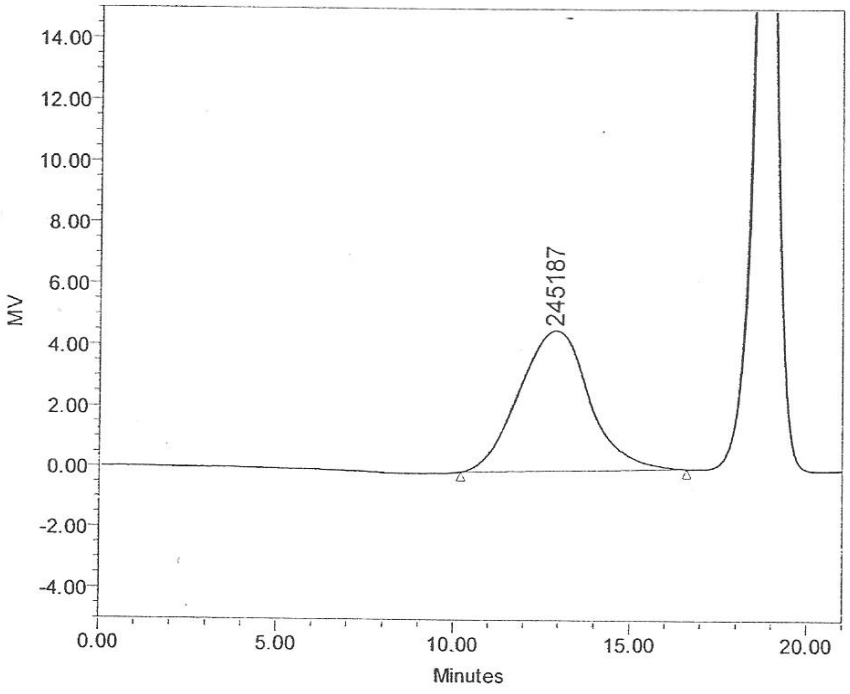
แสดงผลในรูปของ Chromatogram ที่เครื่องประมวลผลได้


Chitosan (%DD = 100%)
105.709
82.403
76.024
57.843
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm
1.000
3.156
1.686

Empower2 software

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	chitosan	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	11	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_5
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	3/1/2011 1:06:01 PM Asia/Bangkok
Run Time:	23.5 Minutes	Date Processed:	3/1/2011 1:34:20 PM Asia/Bangkok

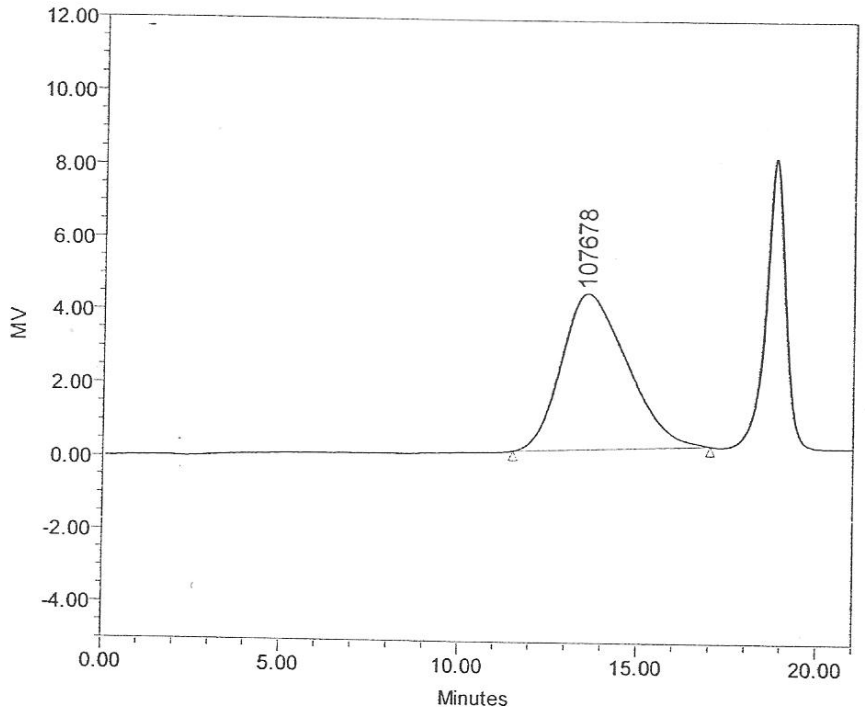


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	121935	438336	245187	1081257	1917482	3.594839

Empower 2 Software

SAMPLE INFORMATION

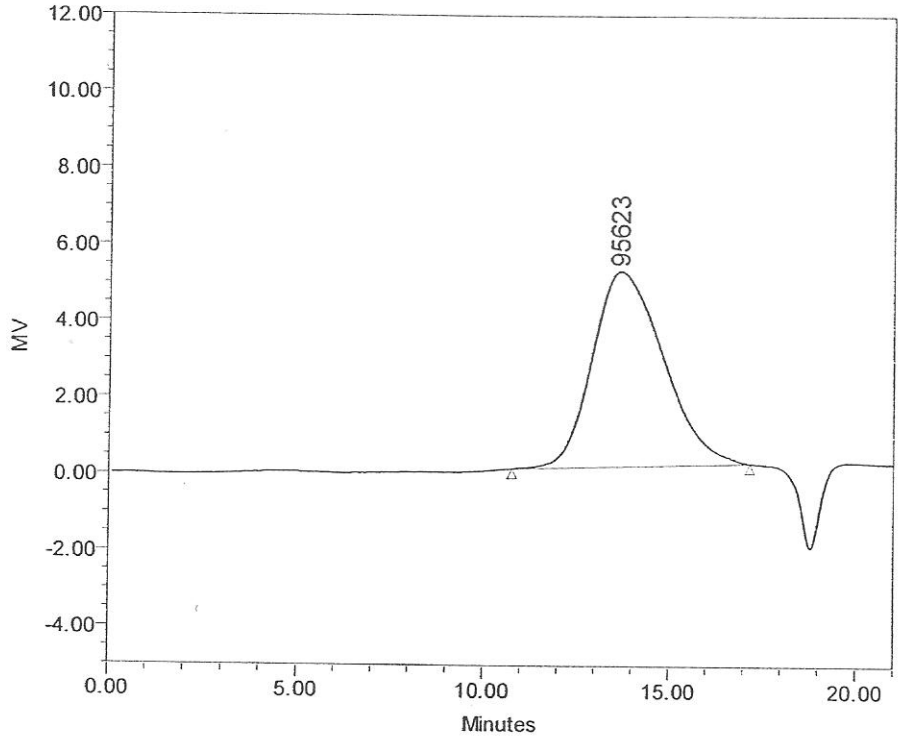
Sample Name:	CS 30	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	7	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_6
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	3/29/2011 9:42:35 AM Asia/Bangkok
Run Time:	25.0 Minutes	Date Processed:	3/29/2011 10:27:42 AM Asia/Bangkok



	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	42183	120876	107678	242101	387028	2.865519

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS 60	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	8	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_6
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	3/29/2011 10:09:29 AM Asia/Bangkok
Run Time:	25.0 Minutes	Date Processed:	3/29/2011 10:37:18 AM Asia/Bangkok

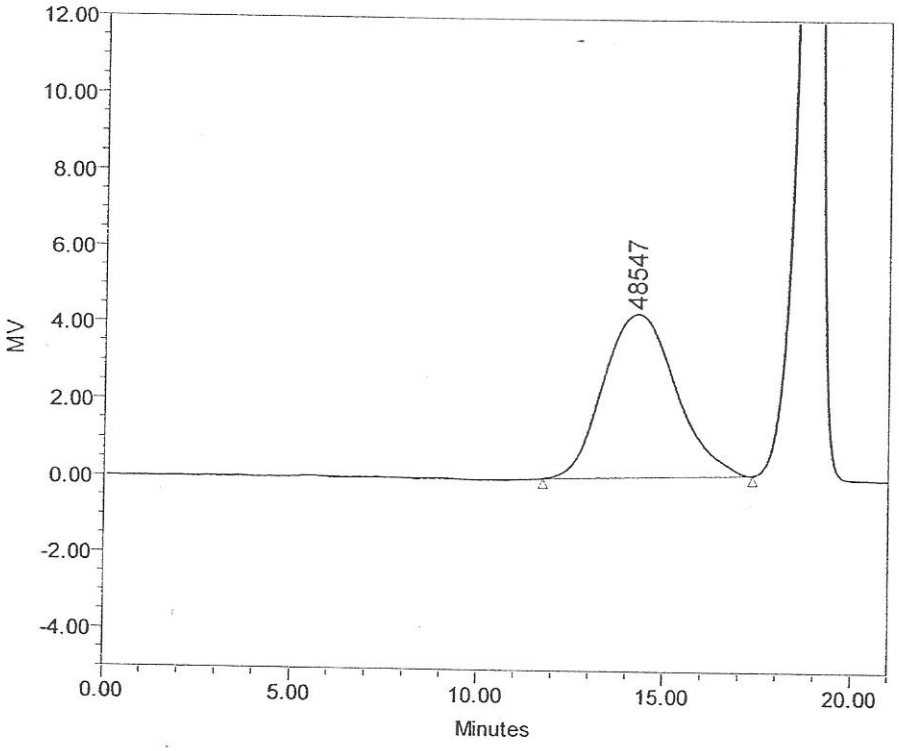


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	36358	115207	95623	298522	746953	3.168632

Empower 2 SOFTWARE

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS90	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	1:A,1	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_7
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	4/19/2011 10:50:18 AM Asia/Bangkok
Run Time:	23.0 Minutes	Date Processed:	4/19/2011 2:06:58 PM Asia/Bangkok

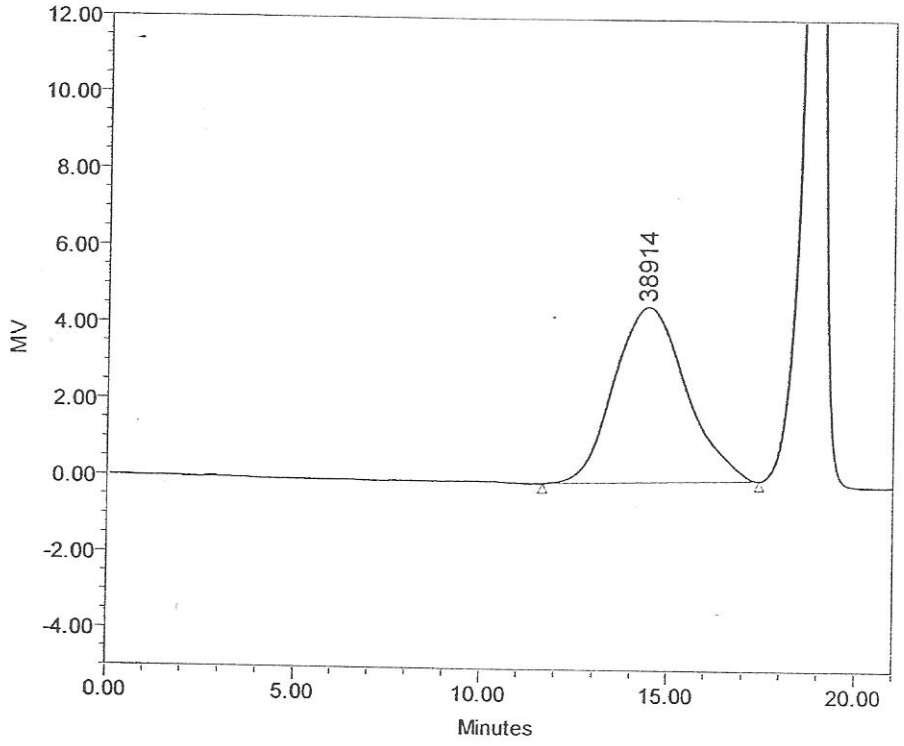


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	23557	69252	48547	153554	268620	2.939725

Empower 2 software

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS120	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	1:A,2	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_7
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	4/19/2011 11:14:43 AM Asia/Bangkok
Run Time:	23.0 Minutes	Date Processed:	4/19/2011 2:07:10 PM Asia/Bangkok

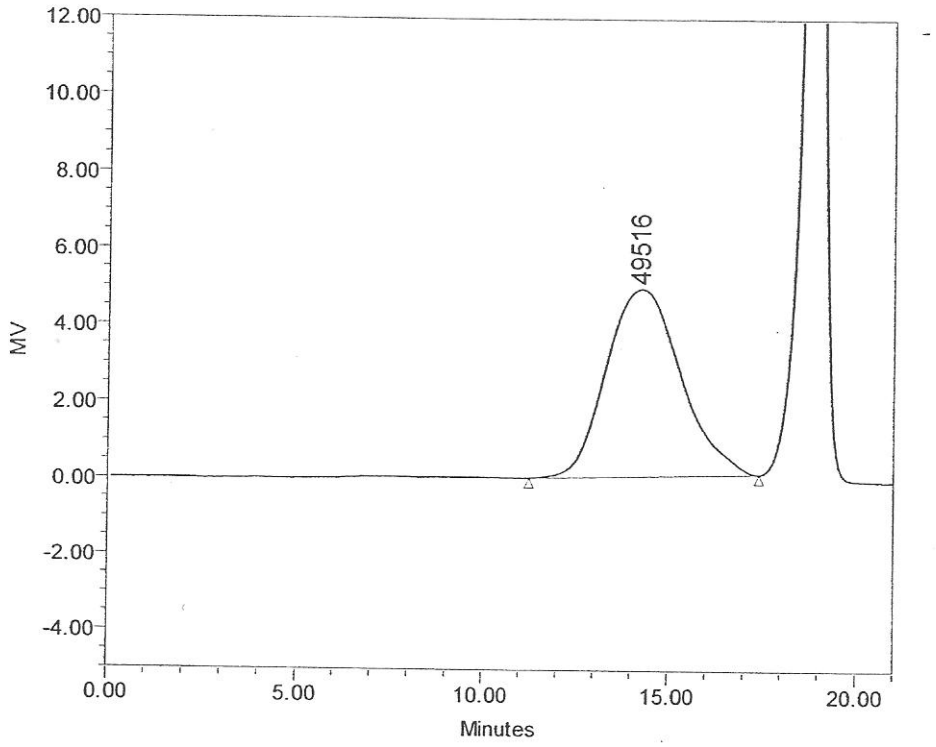


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	19017	56898	38914	133495	255478	2.991999

Empower 2 Software

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS150	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	1:A,3	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_7
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	4/19/2011 11:39:11 AM Asia/Bangkok
Run Time:	23.0 Minutes	Date Processed:	4/19/2011 2:07:19 PM Asia/Bangkok

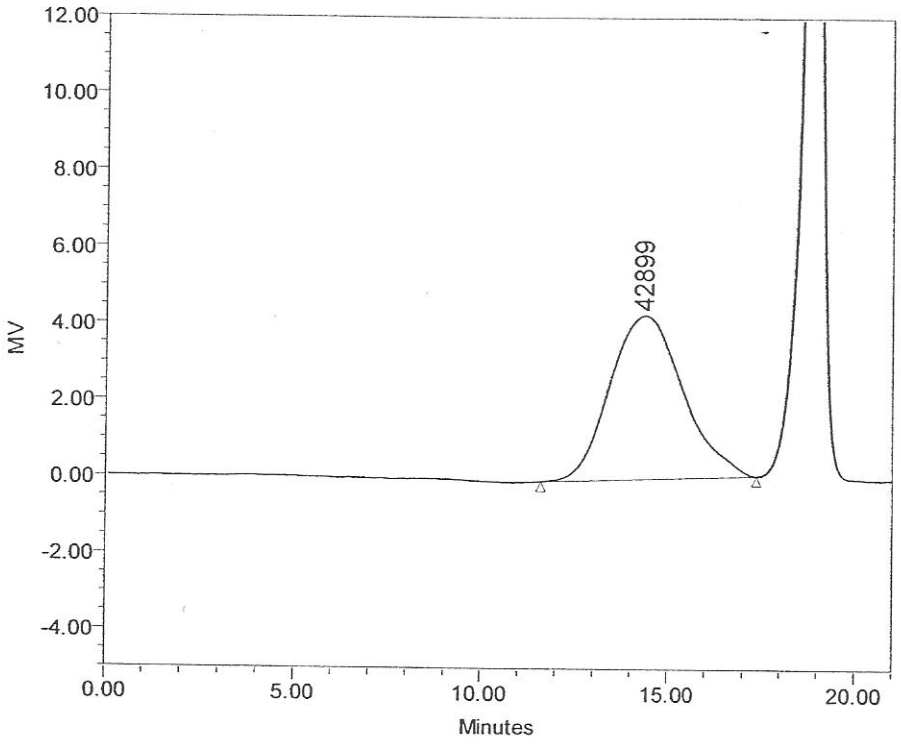


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	22732	72421	49516	182057	396903	3.185889

Empower2 software

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS180	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	1:A,4	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_7
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	4/19/2011 12:03:36 PM Asia/Bangkok
Run Time:	23.0 Minutes	Date Processed:	4/19/2011 2:07:27 PM Asia/Bangkok

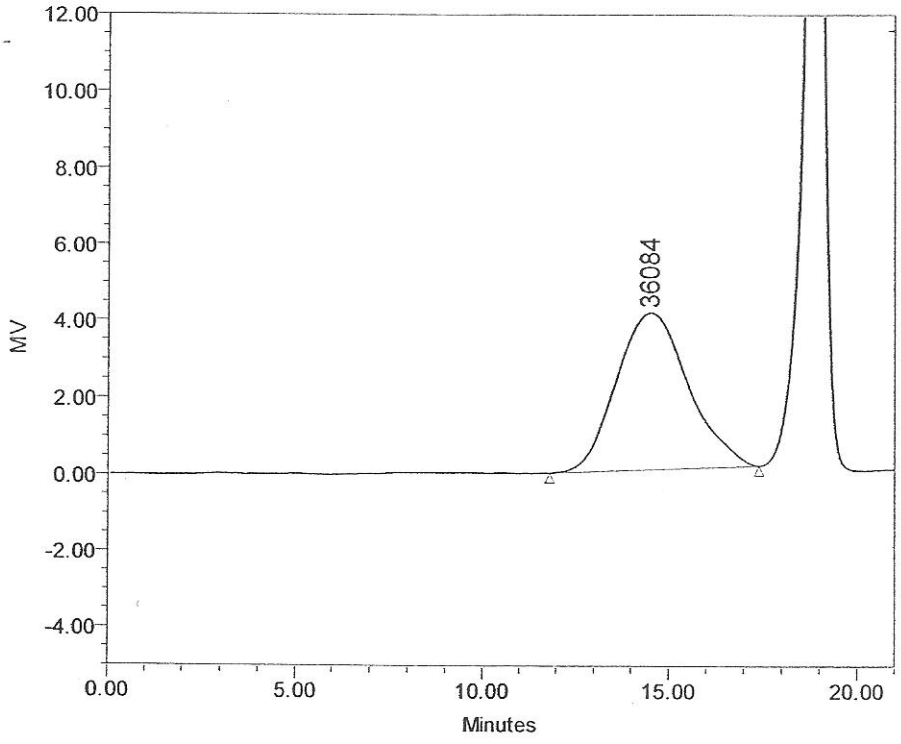


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	20656	62636	42899	143523	264244	3.032360

Empower2 software

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS210	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	1:A,5	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_7
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	4/19/2011 12:28:02 PM Asia/Bangkok
Run Time:	23.0 Minutes	Date Processed:	4/19/2011 2:07:35 PM Asia/Bangkok

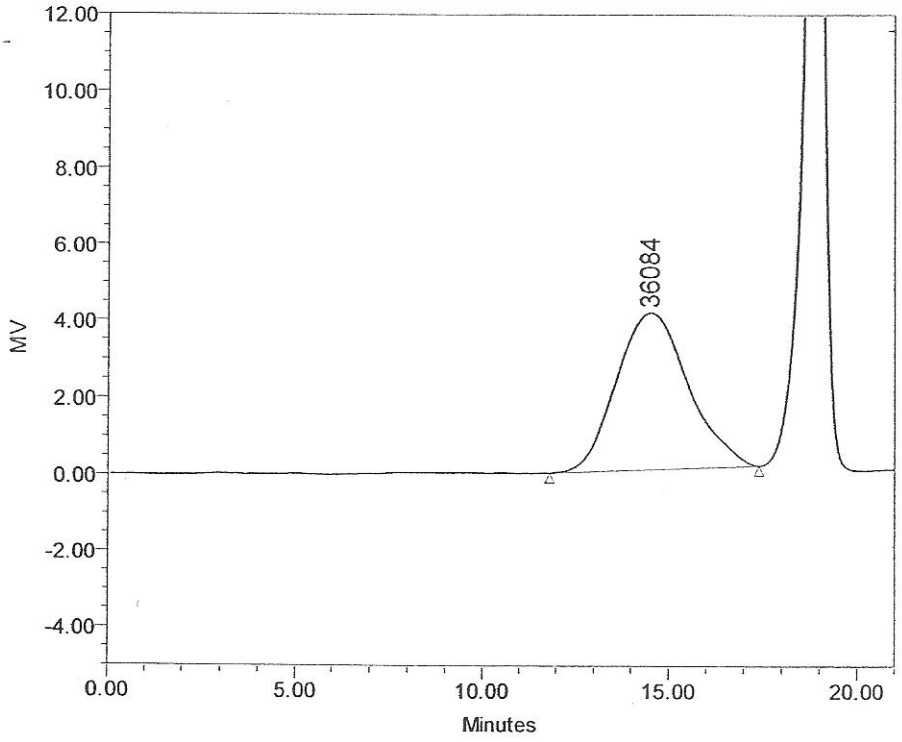


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	18112	52904	36084	119294	213246	2.920899

Empower2

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS210	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	1:A,5	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_7
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	4/19/2011 12:28:02 PM Asia/Bangkok
Run Time:	23.0 Minutes	Date Processed:	4/19/2011 2:07:35 PM Asia/Bangkok

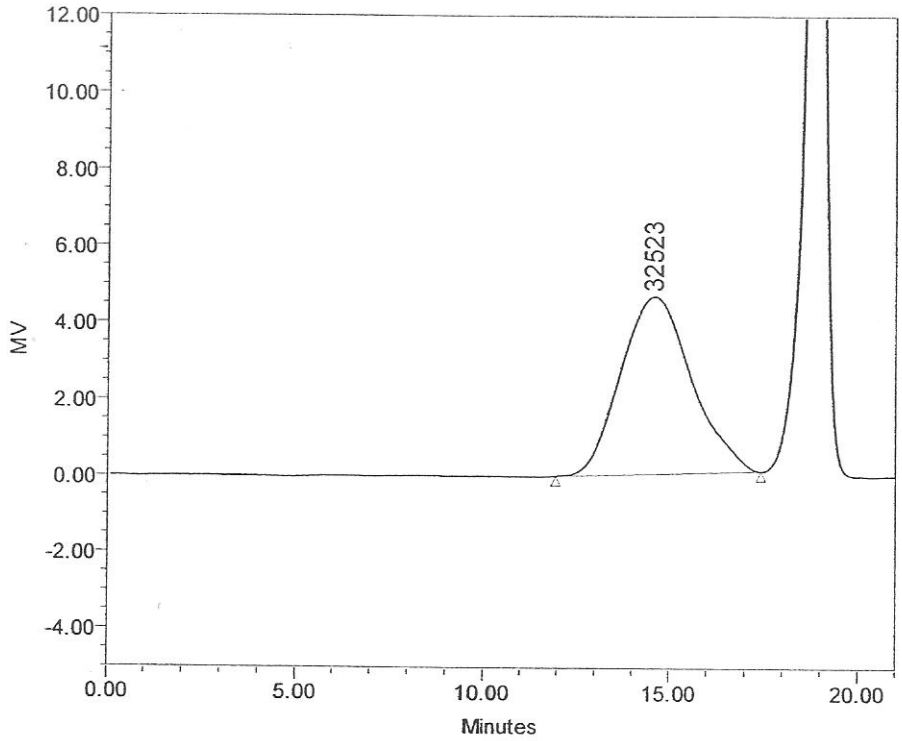


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	18112	52904	36084	119294	213246	2.920899

Empower2 Software

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS270	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	1:A,7	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_7
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	4/19/2011 1:16:51 PM Asia/Bangkok
Run Time:	23.0 Minutes	Date Processed:	4/19/2011 2:07:53 PM Asia/Bangkok

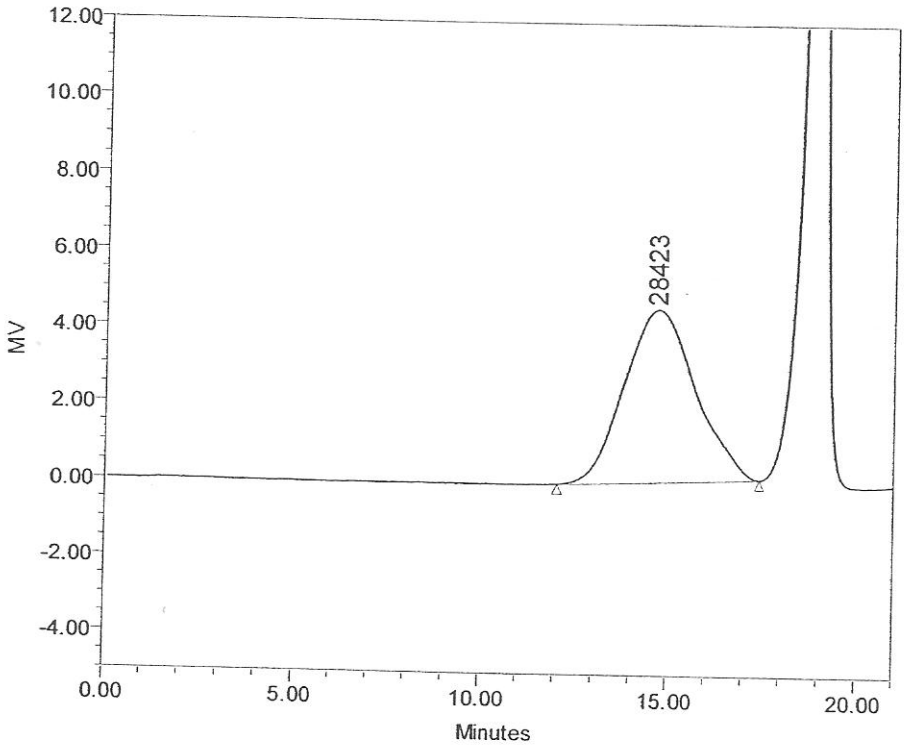


	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	16724	47297	32523	103207	179378	2.828109

Empower2 Software

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CS300	Acquired By:	System
Sample Type:	Broad Unknown	Acq. Method Set:	GPC_F06
Vial:	1:A,8	Processing Method:	Y2011_F06_acetate_7
Injection #:	1	Channel Name:	410
Injection Volume:	20.00 ul	Date Acquired:	4/19/2011 1:41:16 PM Asia/Bangkok
Run Time:	23.0 Minutes	Date Processed:	4/19/2011 2:08:01 PM Asia/Bangkok



	Mn (Daltons)	Mw (Daltons)	MP (Daltons)	Mz (Daltons)	Mz+1 (Daltons)	Polydispersity
1	14999	42112	28423	96282	176017	2.807659

ภาคผนวก ข

1. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ด้วยเครื่อง GPC: Gel Permeation Chromatography รุ่น Water

600E (ขอความอนุเคราะห์ใช้เครื่องมือจาก ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแหล่งชาติ, MTEC)

ทำการเตรียมตัวอย่างโดย ชั่งไคโตซานที่บดแล้ว 10 mg ละลายในสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยครื่องเขย่าจนแน่ใจว่าไคโตซานละลายหมด (ประมาณ 12-14 ชั่งโมง) หลังจากนั้นเติมโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 2.5มิลลิลิตร แล้วกวนสารต่ออีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อเตรียมตัวอย่างไคโตซานที่ละลายใน โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ จนไคโตซานละลายหมดแล้ว ให้ดูดตัวอย่างด้วยกระบอกฉีดยาชนิดแก้วขนาด 25 ไมโครลิตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง Gel Permeation Chromatography รุ่น Water 600E อ่านค่า และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลจากโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยเจ้าหน้าที่จะเป็นผู้คำนวณค่า

2. การวิเคราะห์ค่า Degree of Deacetylation (%DD) ด้วยเครื่อง NMR: Nuclear Magnetic Resonance รุ่น Bruker Biospin DPX-300 (ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแห่งชาติ, MTEC)

เตรียมตัวอย่างไคโตซานที่บดแล้ว 5 กรัมแล้วส่งวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโกปี (Nuclear Magnetic Resonance Laboratory) ณ ศูนย์เทคโนโลยีและวัสดุแหล่งชาติ (MTEC) อุทยานวิทยาศาสตร์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี

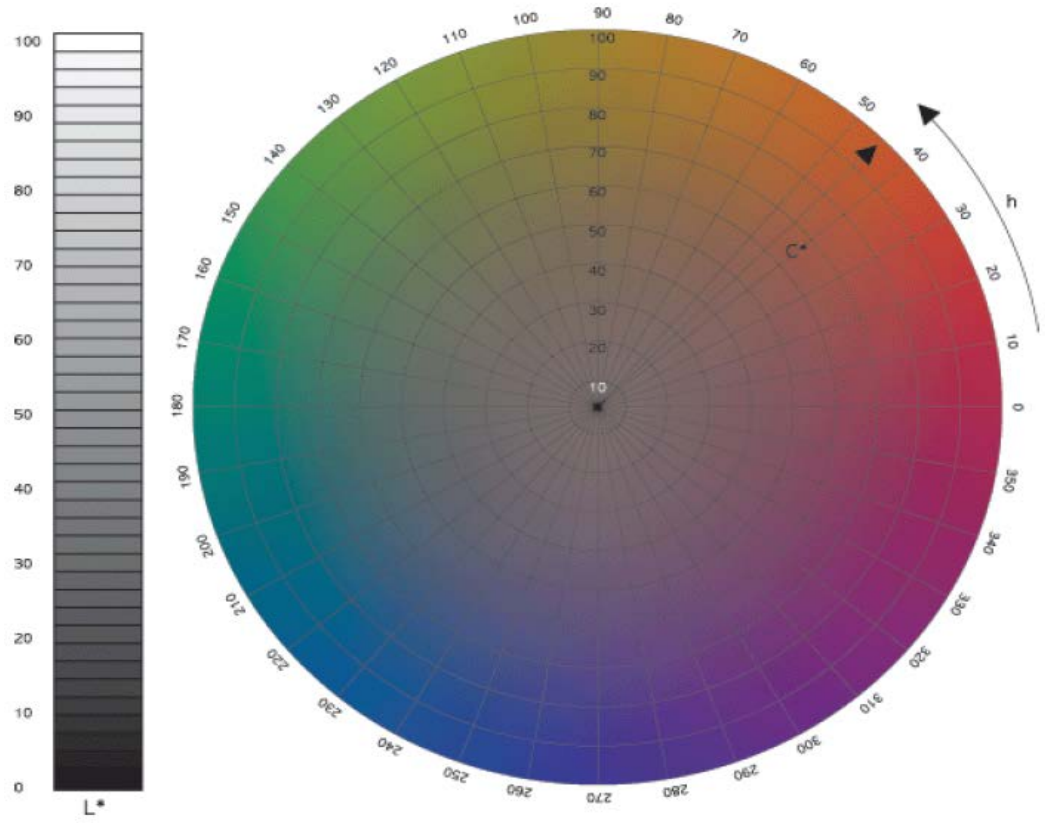
3. วิเคราะห์ค่าสีในระบบ CIE L* C* h (ยี่ห้อ Minolta รุ่น CM 3500d)

ทำการเทียบมาตรฐานเครื่องวัดค่าสี Spectrophotometer โดยวัดค่าการสะท้อนแสง (Reflectance) ใช้แหล่งกำเนิดแสง D_{65} มุมผู้สังเกตการณ์มาตรฐาน 10 องศา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำวัด 5 ครั้ง

ระบบสี CIE L* C* h ถูกพัฒนาขึ้นจากการแปลงค่าสีระบบ CIE L* a* b* ให้เป็นค่าความเข้มสี (Chroma, C*) และค่ามุมของสี (hue angle, h) ซึ่งเป็นค่าที่รับรู้โดยทั่วไป สมการสำหรับคำนวณค่า C* และ h คือ

ค่าความเข้มสี $C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$

ค่ามุมของสี (องศา) $h = \arctan \frac{b^*}{a^*}$



ภาพผนวกที่ ข1 ค่าความสว่าง (L*) ค่าความเข้มสี (C*) และค่ามุมของสี (h)

4. วิเคราะห์เนื้อสัมผัส Texture Profile Analysis ด้วยเครื่อง Lloyd

เตรียมตัวอย่างลูกชิ้นเนื้อวัวโดยทำการตัดให้เป็นรูปลูกบาศก์ ขนาด 1 x 1 x 1 เซนติเมตร ทำการวัดค่าเนื้อสัมผัสด้วยเครื่องวัดค่าเนื้อสัมผัส Lloyd Instrument รุ่น TA 500 ด้วยวิธีการวัดค่าแบบ Texture Profile Analysis โดยใช้หัวกดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร โดยกดลงบนตัวอย่างด้วยความเร็วในการเคลื่อนที่ของหัวกด 20 มิลลิเมตรต่อนาที ทำการกดตัวอย่าง 50% ของความสูงของตัวอย่าง โดยกดลงบนตัวอย่าง 2 ครั้ง

5. วิเคราะห์เนื้อสัมผัส (ความแข็ง) ด้วยเครื่อง Lloyd

เตรียมตัวอย่างเนื้อวัวบด (ดิบ) ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร และความหนา 1 เซนติเมตร ทำการวัดค่าเนื้อสัมผัส (ความแข็ง) ด้วยเครื่องวัดค่าเนื้อสัมผัส Lloyd Instrument รุ่น TA 500 โดยใช้หัวกดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิเมตร โดยกดลงบนตัวอย่างด้วยความเร็วในการเคลื่อนที่ของหัวกด 20 มิลลิเมตรต่อนาที ทำการกดตัวอย่าง 50% ของความสูงของตัวอย่าง

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

1. การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ตามที่ข้างขวดระบุ ต้มจนเดือด แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1.2.1 ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ในถุงสำหรับเครื่องตีป่น (stomacher) จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

1.2.2 นำตัวอย่างในข้อ 1.2.1 ไปตีด้วยเครื่องตีป่น (stomacher) เป็นเวลา 60 วินาที

1.2.3 จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เข้าเครื่องเขย่าหลอด (vortex) เพื่อให้เข้ากัน ได้ตัวอย่างความเจือจางที่ระดับ 10^{-1} ทำการเจือจางด้วยวิธี serial dilution จนคาดว่ามีจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี

1.2.4 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1 ปริมาณ 22-25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

1.2.5 นำไปบ่มโดยคว่ำจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 -48 ชั่วโมง

1.2.6 นับเชื้อและคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด หน่วย cfu/g หรือ cfu/ml

2. การวิเคราะห์จำนวนราและยีสต์

2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Drextose Agar ตามที่ข้างขวดระบุ ต้มจนเดือด แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.2.1 ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ด้วยวิธี เทคนิคปลอดเชื้อ ใส่ในถุงสำหรับเครื่องตีป่น (stomacher) จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

2.2.2 นำตัวอย่างในข้อ 1.2.1 ไปตีด้วยเครื่องตีป่น (stomacher) เป็นเวลา 60 วินาที

2.2.3 จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เข้าเครื่องเขย่าหลอด (vortex) เพื่อให้เข้ากัน ได้ตัวอย่างความเจือจางที่ระดับ 10^{-1} ทำการเจือจางด้วยวิธี serial dilution จนคาดว่ามีจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 25 – 250 โคโลนี

2.2.4 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ปริมาณ 22 – 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว

2.2.5 นำไปบ่มโดยคว่ำจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 -48 ชั่วโมง

2.2.6 นับเชื้อและคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด หน่วย cfu/g หรือ cfu/ml

3. วิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ด้วยวิธี Disc diffusion (ดัดแปลงจาก Ponce *et al.*, 2003)

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar

3.1.1.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar ตามที่ข้างขวดระบุ ต้มจนเดือด แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.1.1.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงจานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณ 20-25 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเชื้อ ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว ใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth

3.1.2.1 ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ตามที่ข้างขวดระบุ เทใส่ในหลอดทดลอง ปริมาณ 10 -15 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง ต้มจนเดือด แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

3.2.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ใช้แบคทีเรียที่มีอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้ต้องในปริมาณที่เหมาะสม วิธีการทำมีดังต่อไปนี้

3.2.1.1 เขี่ยโคโลนีของเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เพาะเลี้ยงไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอายุประมาณ 24 ชั่วโมง มาประมาณ 2-3 โคโลนี นำมาใส่ในอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดสอบ

3.2.1.2 นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 3.2.1.1 ไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.1.3 นำเชื้อจากข้อ 3.2.1.2 มาเจือจางให้ได้จำนวนแบคทีเรีย 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเจือจางด้วย sterile water นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Number 0.5 (McFarland Number 0.5 เตรียมโดยผสม 0.05 มิลลิลิตรของ 1.175% BaCl2 กับ 9.95 มิลลิลิตร 1% sulfuric acid)

3.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.2.2.1 เพาะแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิเปตแบคทีเรียที่ปรับความขุ่นไว้โดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ กระจายให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม

3.2.2.2 วางแผ่น paper disc ของสารละลายไคโตซานลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (เตรียมแผ่น paper disc สำหรับทดสอบโดยตัดกระดาษกรองให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) หยดสารละลายไคโตซานลงบนแผ่น disc จำนวน 10 ไมโครลิตร

3.2.2.3 บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียขึ้น (inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร

ภาคผนวก ง

วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของสารต้านออกซิเดชัน

1. วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

1.1 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1.1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร สารละลาย Folin Ciocalteu ความเข้มข้น 2.0 นอร์มอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 5 มิลลิลิตร

1.1.2 บ่มตัวอย่างไว้ในที่มืดนาน 1 ชั่วโมง

1.1.3 อ่านค่าการดูดกลืนแสงจากเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง ยี่ห้อ Thermo Scientific รุ่น Helios Alpha UV-Vis Spectrophotometer ประเทศเนเธอร์แลนด์ ที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

1.2 การทำกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานกรดแกลลิกสร้างระหว่างความเข้มข้นของกรดแกลลิก (แกน X) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (แกน Y) โดยความเข้มข้นของกรดแกลลิก อยู่ในช่วง 0.1-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคำนวณค่ามิลลิกรัมกรดแกลลิกต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging activity

2.1 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH radical scavenging activity) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Chan *et al*. (2006) นำสารสกัด 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) ที่ความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ในตัวทำละลายเอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer จะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (Triplicate) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณเป็น % Scavenging activity โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงควบคุม (control OD) หาได้จากการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้นแต่ใช้เอทานอลแทนตัวอย่าง

2.2 วิธีการคำนวณ

% DPPH Radical Scavenging Activity = (A – B)/A x 100

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม (ซึ่งประกอบด้วยสารทั้งหมด ยกเว้นตัวอย่างสารสกัดขิง)

B = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงจากตัวอย่างทดสอบ

3. การทดสอบความสามารถการจับประจุเหล็กโดยวิธี Ferrous ion chelating ability

3.1 วิเคราะห์ตัวอย่าง

วิเคราะห์ความสามารถในการจับกับเฟอรัสไอออน โดยดัดแปลงวิธีของ Chan *et al.* (2008) นำสารสกัด 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟอรัสซัลเฟต ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์โรซีน ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรง ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer จะทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (Triplicate) นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณเป็น % Ferrous ion chelating ability โดยค่าการดูดกลืนคลื่นแสงควบคุม (control OD) หาได้จากการวิเคราะห์ตามวิธีข้างต้นแต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

3.2 วิธีการคำนวณ

% Ferrous ion chelating ability = (A – B)/A x 100

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาควบคุม (ซึ่งประกอบด้วยสารทั้งหมด ยกเว้นตัวอย่างสารสกัดขิง)

B = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงจากตัวอย่างทดสอบ