สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผลการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่าง

1.1. อัลลิซิน

สารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมจะสกัดมาจากกลีบกระเทียมสด ซึ่งวิธีสกัดที่เหมาะสมจะได้มาจากการดัดแปลงวิธีอ้างอิงของ Curtis *et al.* (2004) โดยหลังจากการสกัดน้ำกระเทียมแล้ว จะนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้นและกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman NO.4 จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ขณะที่ทำการหมุนเหวี่ยงจะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4°C การหมุนเหวี่ยงทำเพื่อขจัดส่วนตะกอนที่ไม่ต้องการออก และเก็บตัวอย่างเฉพาะส่วนสารละลายด้านบน ซึ่งสารสกัดอัลลิซินจากกระเทียมที่ได้จะมีลักษณะเป็นของเหลว สีเหลืองใส และมีร้อยละผลผลิตที่ได้อยู่ในช่วง 50-52% จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ ไปตรวจวัดปริมาณอัลลิซินที่มีอยู่ในตัวอย่าง ด้วยวิธี Spectrophotometric Assay ด้วยปฏิกริยาของ 4-mercaptopyridine กับ Thiosulfinates (Miron *et al.*, 2002) ซึ่งจากการทดลองพบว่า มีปริมาณอัลลิซินอยู่ในช่วง 13.5-14.2 mg/ml โดยจะปรับความเข้มข้นให้มีปริมาณอัลลิซินเท่ากับ 13.5 mg/ml ก่อนนำมาผสมกับสารละลายไคโตซานในขั้นตอนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนในการทดลองขั้นต่อไป

1.2. ไคโตซาน

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

ตารางที่ 3 ระยะเวลาในขั้นตอนการกำจัดหมู่อะเซทติลออกจากสายโมเลกุลของไคติน (deacetylation step) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

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

ตารางที่ 4 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและ %DD ของไคโตซานที่เตรียมได้ในห้องปฏิบัติการ

Chitosan Sample	Molecular weight (Dalton)	%DD
Sample 1	$1.10x10^6$	78
Sample 2	$1.02x10^6$	88

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

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

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

2. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

2.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

2.1.1 ศึกษาอัตราส่วนของอัลลิซินต่อไคโตซาน และวิธีการทำแห้งสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ที่เหมาะสม

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

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

ตารางที่ 6 ปริมาณสารอัลลิซินคงเหลือในสารละลายภายหลังจากการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (complexation) อย่างสมบูรณ์และผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานออกเรียบร้อยแล้ว

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

ตารางที่ 7 Total soluble solid (%), pH และ ร้อยละผลผลิต (%yield) ภายหลังการทำแห้งด้วยวิธี Freeze drying ของตัวอย่างสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานทั้ง 6 ตัวอย่าง

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

จากตารางที่ 7 พบว่า %total soluble solid ของตัวอย่างสารละลายของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน จะมีค่าเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารสกัดอัลลิซิน ทั้งยังมีผลทำให้ค่า pH มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งการเพิ่มขึ้นดังกล่าวอาจเกิดเนื่องมาจาก pH ของสารละลายอัลลิซิน ที่มี pH สูงกว่า pH ของสารละลายไคโตซาน เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักขึ้น จึงส่งผลต่อ pH ของสารละลายอัลลิซิน-ไคโตซานให้เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ร้อยละผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้ จะมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารสกัดอัลลิซิน และอัตราส่วนที่ดีที่สุด ที่ให้ร้อยละผลผลิตของสารประกอบเชิงซ้อนสูงที่สุดและมีปริมาณอัลลิซินคงเหลือต่ำที่สุด คือ ตัวอย่าง C4 ที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10^6 Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1

2.2 ศึกษาคุณลักษณะและสมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

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

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

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

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

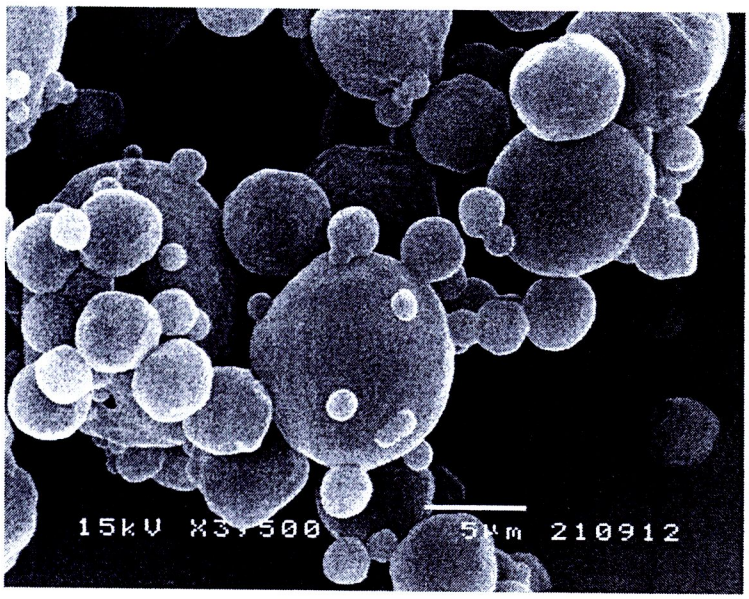
ตารางที่ 8 สีของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน (ตัวอย่างที่ 1-6, C1-C6) ที่ผลิตได้

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

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

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

สารประกอบเชิงซ้อนระหว่าง ไคโตซานและsodium tripolyphosphate มีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดใหญ่ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.2-1.5 มิลลิเมตร



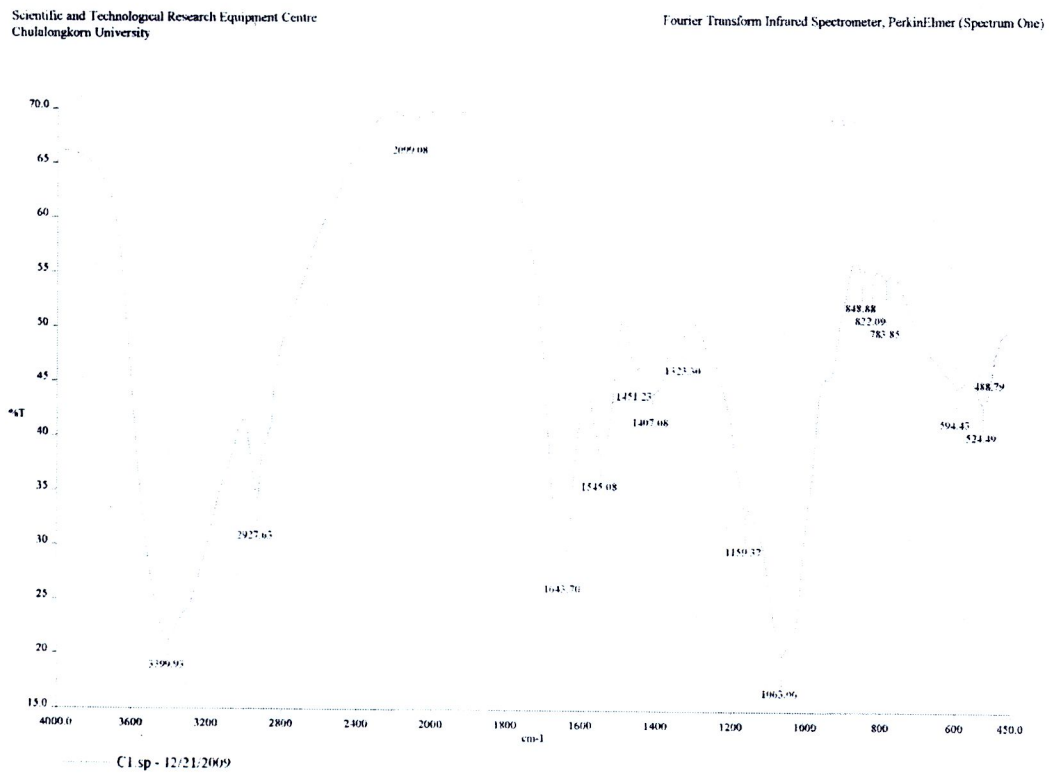
ภาพที่ 1 รูปร่างของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานคอมเพล็กซ์ที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10^6 Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนโดยน้ำหนักของไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 ตรวจวัดด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) ที่กำลังขยาย 3,500 เท่า

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

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

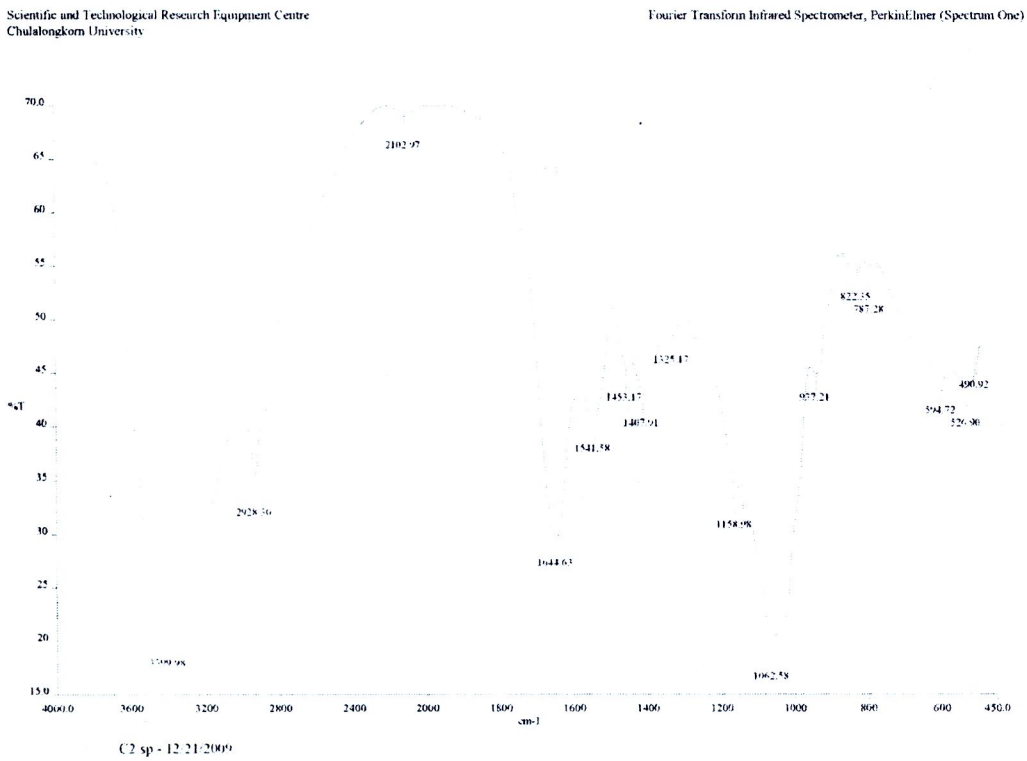
ตารางที่ 9 ลักษณะโครงสร้างและหมู่ function ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ตัวอย่าง C1-C6 ที่ตรวจวัดด้วยวิธี FTIR

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

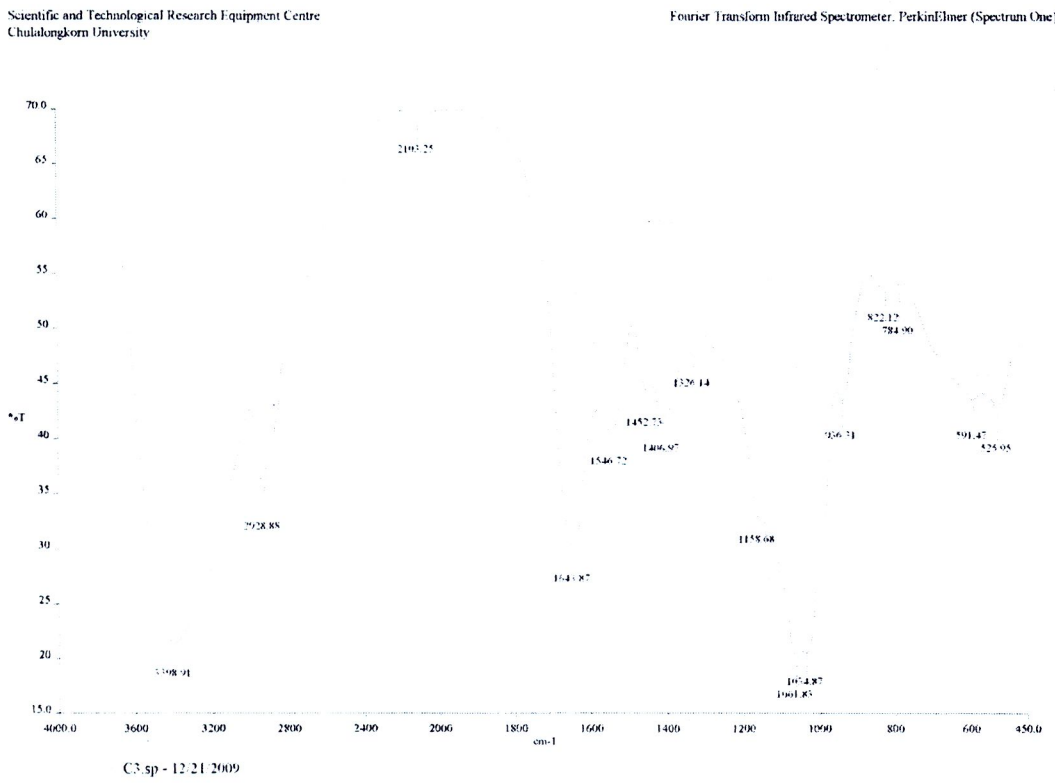


ภาพที่ 2 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10^6 Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 (C1)

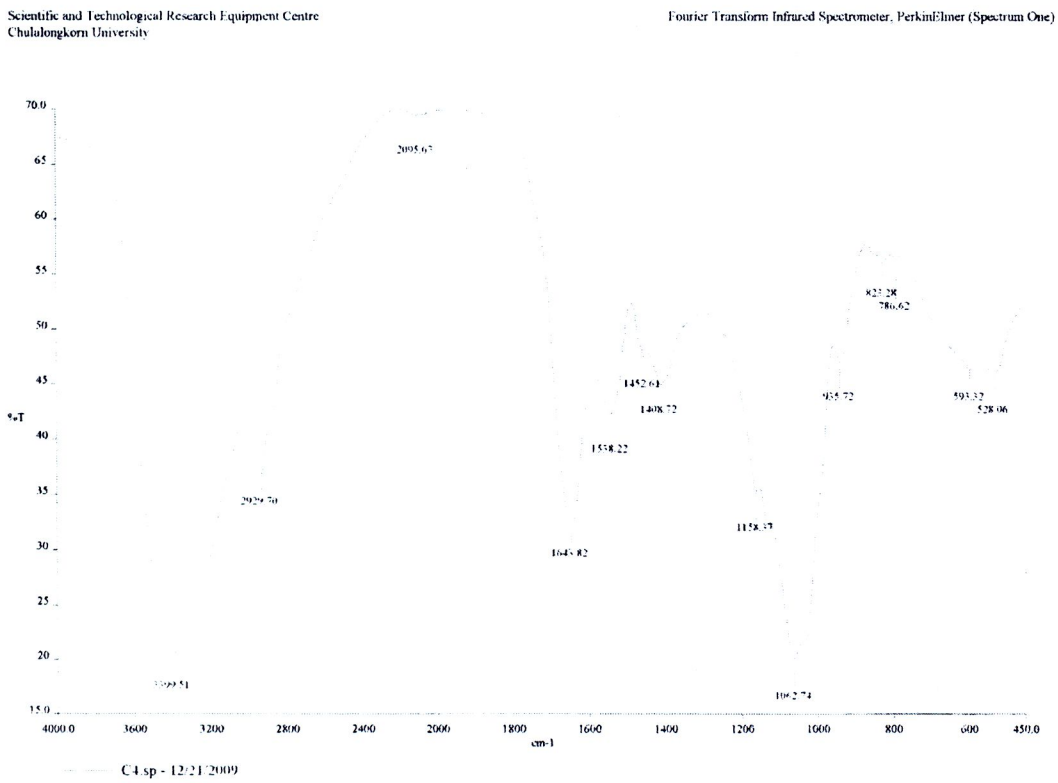
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



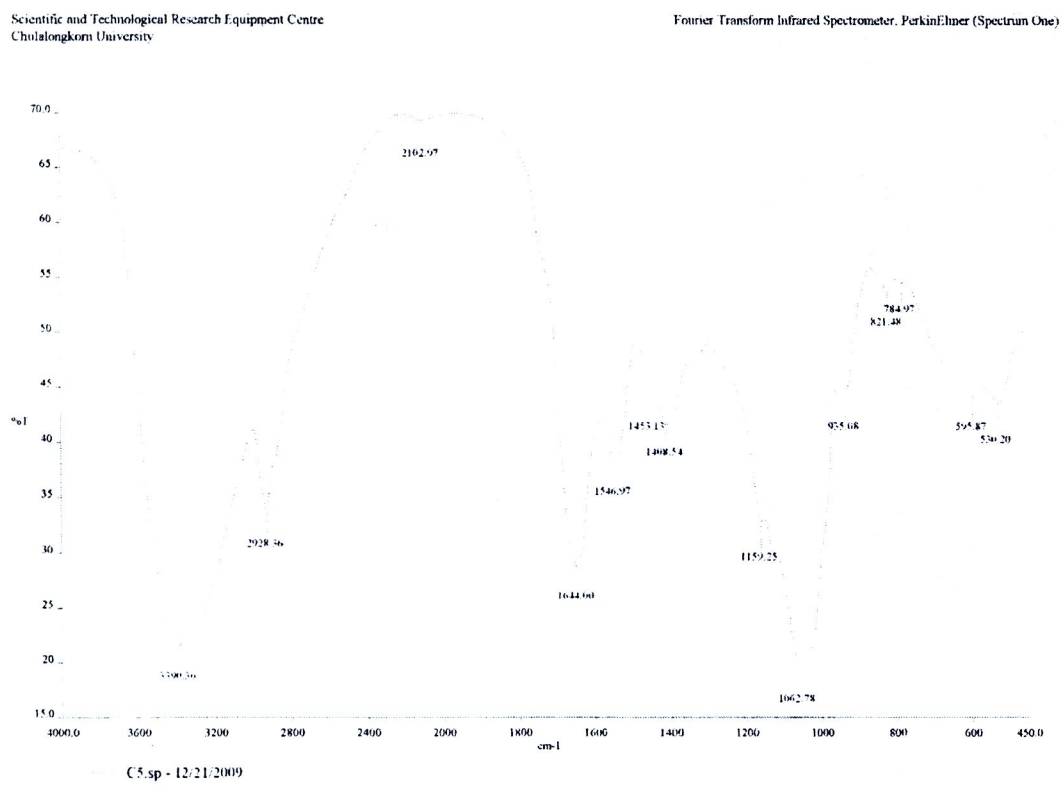
ภาพที่ 3 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10^{6} Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:2 (C2)



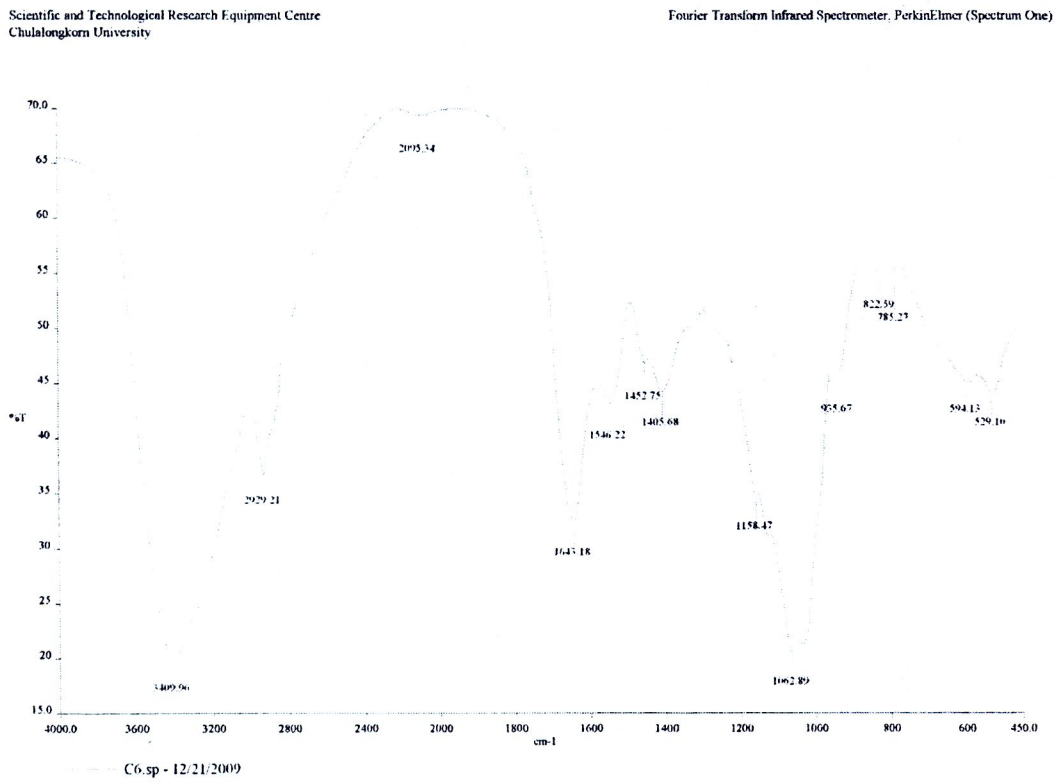
ภาพที่ 4 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10^{6} Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:3 (C3)



ภาพที่ 5 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10^{6} Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:1 (C4)



ภาพที่ 6 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10^6 Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:2 (C5)



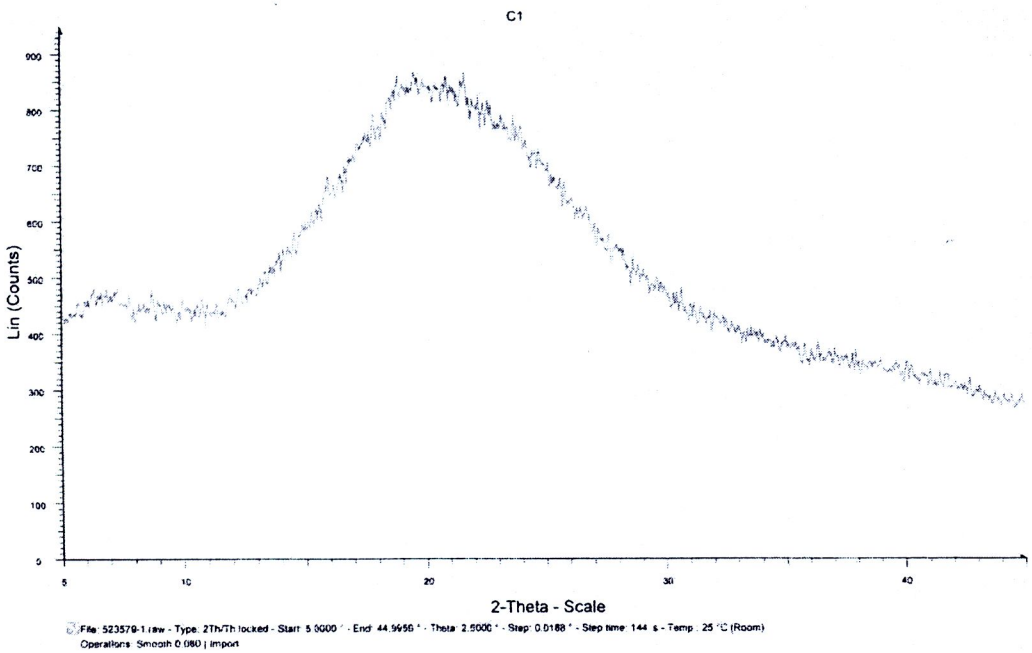
ภาพที่ 7 FTIR-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10^6 Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน เท่ากับ 1:3 (C6)

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

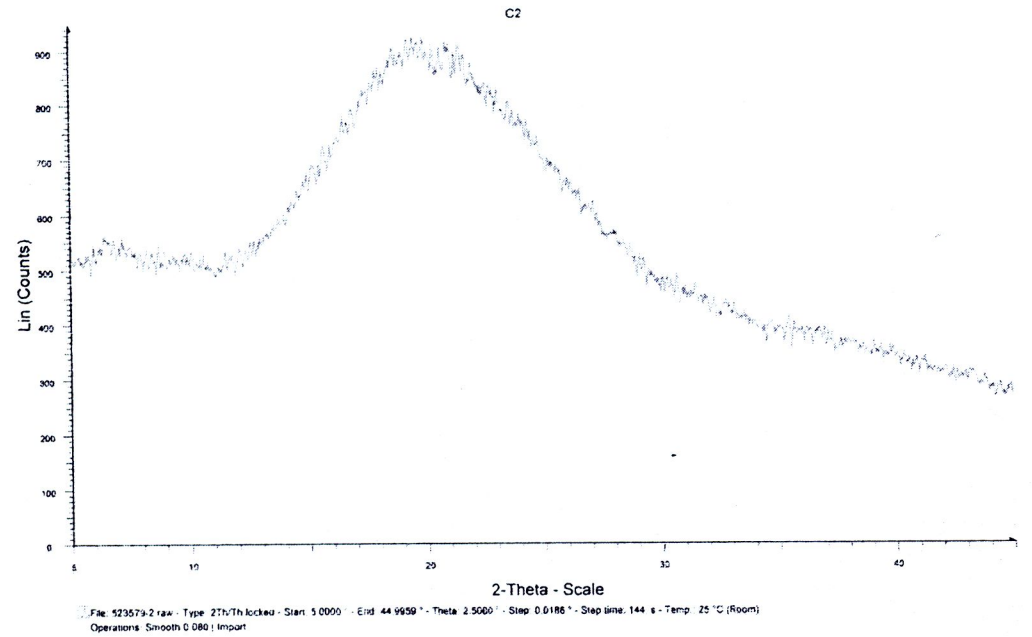
เชิงซ้อน ที่พบเปลี่ยนแปลงไปจาก FTIR-spectra ของไคโตซานอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและหมู่การทำหน้าที่ (functional group) ที่เกิดขึ้นภายหลังการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน และบ่งชี้ได้ว่า ไคโตซานสามารถจับสารอัลลิซินไว้ได้และให้ผลในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหมู่การทำหน้าที่ไปจากเดิม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

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

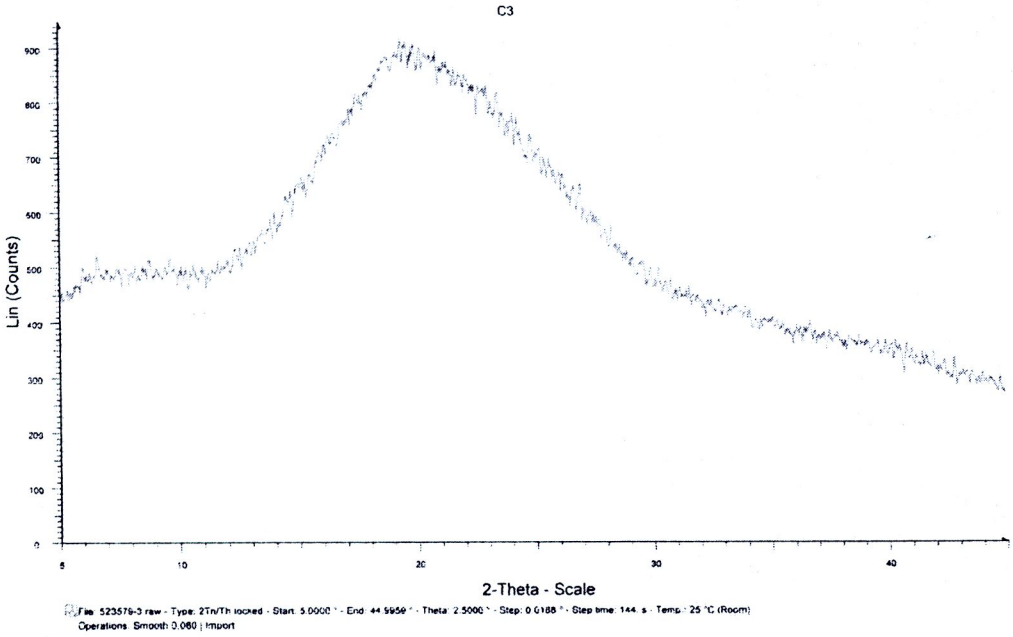
จากผลของ XRD แสดงในภาพที่ 8-13 ทำให้เห็นว่า ลักษณะรูปแบบของ XRD patterns ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 มีรูปแบบคล้ายคลึงกัน pattern ที่ได้ บ่งบอกถึงลักษณะของผลึกแบบอสัณฐาน (Amorphous crystal) ซึ่งดูได้จากลักษณะของ patterns ที่ค่อนข้างแบนและกว้าง ซึ่งลักษณะรูปร่างของยอด (peak) ของ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



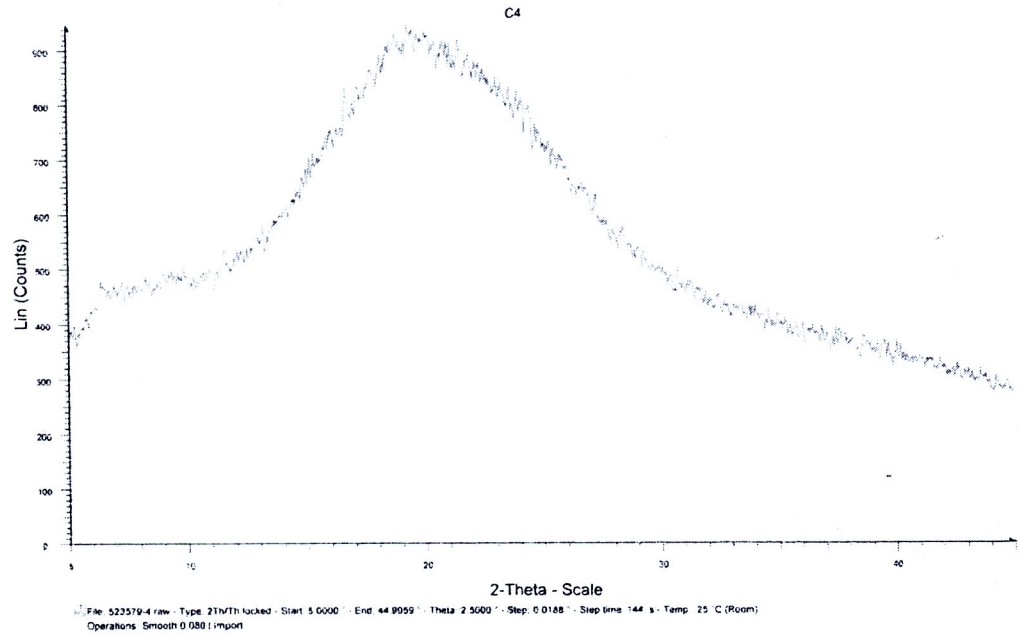
ภาพที่ 8 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10^6 Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน 1:1 (C1)



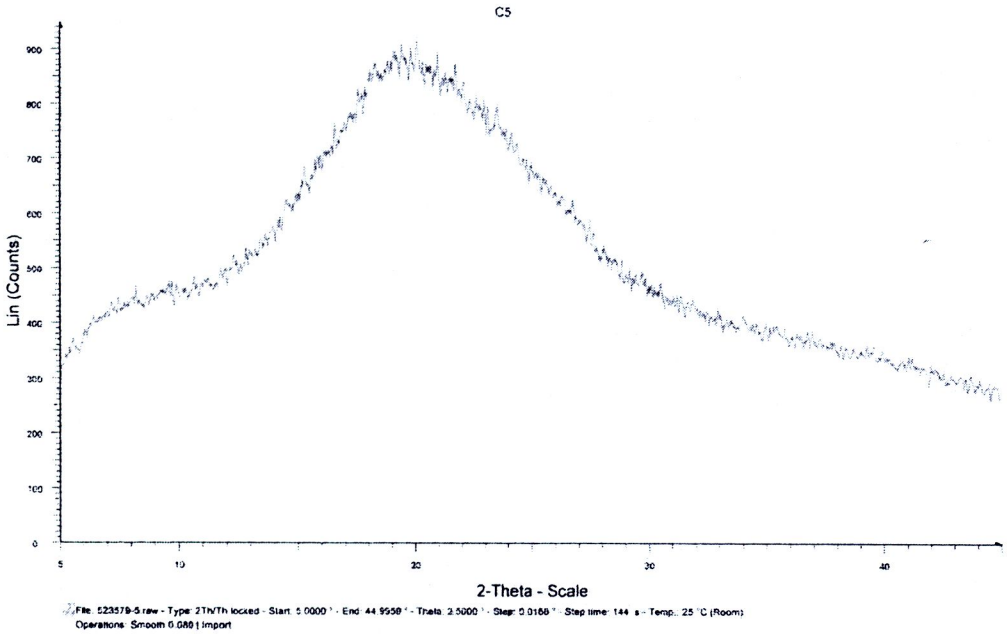
ภาพที่ 9 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10^6 Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน 1:2 (C2)



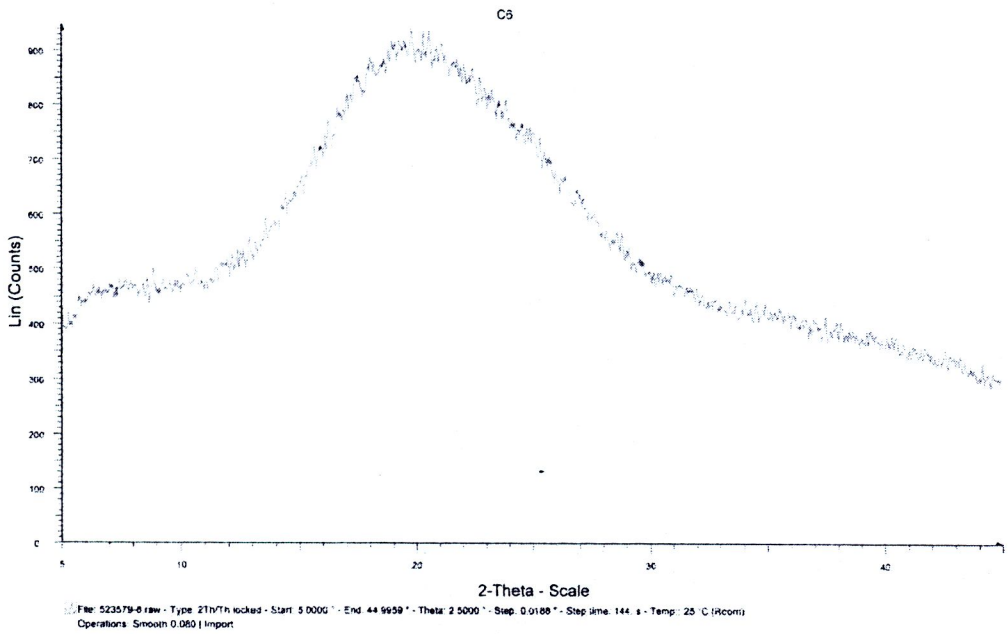
ภาพที่ 10 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (MW=1.1x10^6 Dalton, 78%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน 1:3 (C3)



ภาพที่ 11 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10^6 Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน 1:1 (C4)



ภาพที่ 12 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10^6 Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน 1:2 (C5)



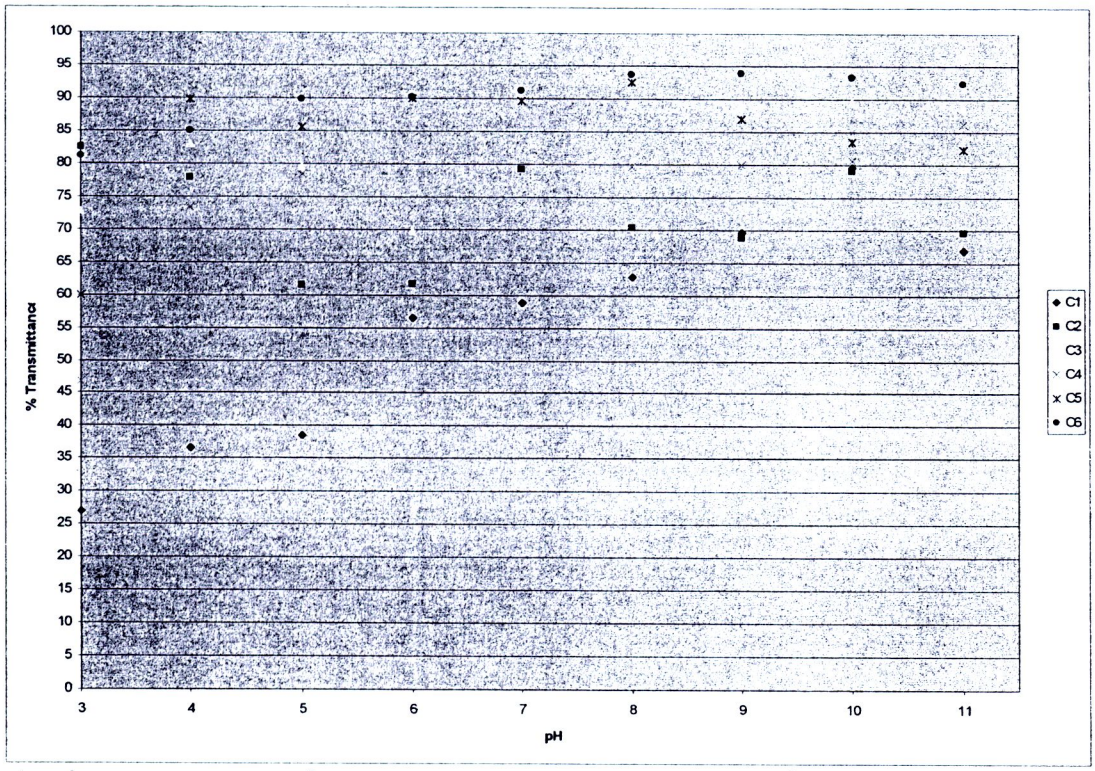
ภาพที่ 13 XRD-spectra ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (MW=1.02x10^6 Dalton, 88%DD) ด้วยอัตราส่วนไคโตซานต่ออัลลิซิน 1:3 (C6)

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

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

ตารางที่ 10 ค่าความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ตัวอย่างC1-C6 แสดงออกในรูปของค่า %Turbidity ที่ pH ต่าง ๆ (pH 3-11)

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



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

2.2.6 ค่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

จากการทดลองพบว่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 11) โดยเมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของสารละลายอัลลิซินจะเป็นผลให้ค่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานมีค่าสูงขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจาก pH ที่สูงกว่าของสารละลายอัลลิซินก่อนการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน เมื่อเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักขึ้น จึงเป็นผลให้ค่าpH ที่พบมีค่าสูงตามไปด้วย

ตารางที่ 11 ค่า pH ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน ตัวอย่างที่ 1-6

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.3 ศึกษาการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

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

สำหรับความกว้างของ clear zone ที่ได้จากงานวิจัยนี้ (ตารางที่ 12) สามารถบ่งชี้ได้ว่า ความสามารถในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานแต่ละตัวอย่าง มีความแตกต่างกัน ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 2 (C4-C6) ที่มีค่า %DD ที่สูงกว่า (88%) จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าสารประกอบเชิงซ้อนที่เตรียมจากไคโตซานตัวอย่างที่ 1 (C1-C3) ที่มีค่า %DD อยู่ที่ 78% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก คุณสมบัติของไคโตซานเองที่มีความสามารถในการละลายในกรดอินทรีย์ที่สูงขึ้น เมื่อมี %DD เพิ่มขึ้น เป็นผลให้มีการเปิดออกของสายโมเลกุล และมีหมู่ที่มีประจุเพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถเกิดพันธะกับสารอื่น ซึ่งในที่นี้คือ อัลลิซิน ได้มากขึ้น ทั้งนี้อัลลิซินเป็นสารที่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียได้สูง จึงเป็นผลให้มีความสามารถในการออกฤทธิ์เป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์มากขึ้นนั่นเอง (Curtis *et al.*, 2004)

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

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

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

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

หมายเหตุ - หมายถึงไม่ยับยั้ง

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

Sample	MIC against *Esherichia coli* (mg/ml)	MIC against *Staphylococcus aureus* (mg/ml)
allicin	25	12.5
chitosan	12.5	12.5
C4	6.25	12.5

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

3.1 การเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำผสมอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน

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

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

↓

นำมันหมูแข็งมาปั่นให้ละเอียด แล้วนำเข้าตู้เย็นช่องแข็งเป็นเวลา 1 คืน

↓

ทำการประกอบเครื่องบด แล้วใส่น้ำแข็งลงไปปั่น ประมาณ 30วินาที เสร็จแล้วให้เทน้ำแข็งออก สะบัดโถปั่นให้มีน้ำติดอยู่น้อยที่สุด

↓

ใส่หมูในข้อที่ 1. ลงไป ทำการปั่นที่ ความเร็วรอบ ≈ 10 นาน 1 นาที

↓

เติมน้ำแข็ง ½ ของสูตร ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที

↓

↓

เติมเกลือ ½ ของสูตร ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที

↓

เติมน้ำแข็ง ½ ของสูตร ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที

↓

เติมมันหมูแข็ง ลงไป ปั่นนาน 30 วินาที

↓

ทำการกลับด้านเนื้อหมูในโถปั่น แล้วปั่นต่ออีก 2 นาที พร้อมกับเติมอัลลิซิน หรือไคโตซาน หรือสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 1-6 (0.5% w/w)

↓

นำเข้าตู้เย็น 15 นาที แล้วนำมาอัดใส่ไส้ เมื่อเสร็จแล้วให้นำเข้าตู้เย็นอีก 15 นาที

↓

ต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 20 นาที

↓

นำมาแช่ในน้ำเย็นทันที เสร็จแล้วเก็บเข้าตู้เย็นที่ 8 °C

แผนผังที่ 4 วิธีการเตรียมไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่เหมาะสม ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

3.2 การศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานในการเป็นสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ และผลของสารประกอบดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมีและ คุณลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

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

3.2.1 การทดลองส่วนที่ 1

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

ตารางที่ 14 แสดงสูตรของแต่ละหน่วยทดลองที่ศึกษาผลสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานต่อสมบัติด้านต่าง ๆ ของไส้กรอกหมูไขมันต่ำ

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

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

Treatment	Sample Explanation	Total Plate Count (cfu/g)	Yeast and Mold (est. cfu/g)
1	control	$1.4x10^2$	<60
2	0.5%C1	4.0x10	<10
3	1.0%C1	3.5x10	<10
4	0.5%C2	7.0x10	<10
5	1.0%C2	6.2x10	<10
6	0.5%C3	1.0x10	<10
7	1.0%C3	1.0x10	<10
8	0.5%C4	<10 est.cfu/g	<10
9	1.0%C4	<10 est.cfu/g	<10
10	0.5%C5	7.0x10	<10
11	1.0%C5	6.0x10	<10
12	0.5%C6	1.0x10	<10
13	1.0%C6	1.1x10	<10

3.2.2 การทดลองส่วนที่ 2

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

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

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

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

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

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

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

3.2.2.2 การศึกษาผลของอัลลิซิน ไคโตซาน และสารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานที่มีต่อคุณลักษณะทางเคมี และคุณลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่เตรียมได้

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

สำหรับค่าความสามารถในการอุ้มน้ำและค่าความชื้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมสารอัลลิซิน หรือไคโตซาน หรือประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซาน โดยค่าความสามารถในการอุ้มน้ำจะต่ำที่สุดในตัวอย่างที่เติมไคโตซาน ($p \leq 0.05$) อาจเนื่องมาจาก pH ที่ต่ำกว่าของสารละลายไคโตซานก่อนทำแห้ง เป็นผลให้เมื่อทำแห้งแล้วเติมลงในตัวอย่างไส้กรอก จะได้ตัวอย่างที่มี pH ต่ำกว่าตัวอย่างอื่น จึงมีความสามารถในการจับกับน้ำต่ำที่สุด สำหรับตัวอย่างไส้กรอกผสมอัลลิซิน จะมีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุม ($p > 0.05$) ซึ่งอาจเนื่องมาจากลักษณะของอัลลิซินที่มีความสามารถในการดูดน้ำได้ดี จึงสามารถจับกับน้ำได้ดีกว่า และส่งผลให้มีน้ำอยู่ในตัวอย่างในปริมาณมากและเป็นผลให้ตัวอย่างที่ได้มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ค่อนข้างนุ่มกว่าตัวอย่างไส้กรอกอื่น ๆ ด้วย (ตารางที่ 19) ซึ่งเมื่อพิจารณาตัวอย่างไส้กรอกที่ผสมสารประกอบเชิงซ้อนพบว่า มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำต่ำลงจากตัวอย่างควบคุม ยกเว้นตัวอย่างที่มีอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินในปริมาณที่สูง สอดคล้องกับผลการทดลองของตัวอย่างที่ผสมอัลลิซินเพียงอย่างเดียว ซึ่งเมื่อยิ่งเพิ่มอัตราส่วนโดยน้ำหนักของอัลลิซินต่อไคโคซานในการผลิตสารประกอบเชิงซ้อนจาก 1:1 เป็น 1:2 และ 1:3 ตามลำดับ จะพบว่า ยิ่งมีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ชี้ให้เห็นถึงผลของการอุ้มน้ำที่เพิ่มขึ้นจากสารอัลลิซิน ซึ่งค่าที่ได้ก็สอดคล้องกับค่าความชื้นของตัวอย่างที่เพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมสารประกอบเชิงซ้อนที่มีอัตราส่วนอัลลิซินโดยน้ำหนักเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 19) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงความเชื่อมโยงกับการเสื่อมเสีย ก็พบว่า ตัวอย่างที่ยิ่งมีปริมาณน้ำมาก ก็ยิ่งมีอัตราการเสื่อมเสียที่เร็วขึ้น ดังนั้นตัวอย่างไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่ผสม

สารประกอบเชิงซ้อนอัลลิซิน-ไคโตซานตัวอย่างที่ 4 (C4) ที่พบว่ามีค่าอัตราการเสื่อมเสียที่ช้าที่สุดนั้น จึงเป็นตัวอย่างที่มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำและค่าความชื้นต่ำที่สุดไปด้วย ซึ่งเมื่อพิจารณาดูการยอมรับจากคะแนนความชอบของตัวอย่างจากการทดลองความชอบ 9 point hedonic scaling test ก็พบว่า ตัวอย่างดังกล่าวได้รับการยอมรับจากผู้ทดสอบมากกว่า ตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 20)

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

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

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

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

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

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

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

3.2.2.3 การศึกษาผลของสารดังกล่าวที่มีต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำที่เตรียมได้

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

ไส้กรอกหมูไขมันต่ำสามารถมีอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยไม่ได้ทำการบรรจุแบบสุญญากาศ ได้เป็นระยะเวลาประมาณ 15 วัน

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสและการยอมรับของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไขมันต่ำหลังเตรียมเสร็จสิ้น โดยใช้แบบสอบถามความชอบแบบ 9-point hedonic scale

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

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

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

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

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