

ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่มีอิมัลชันน้ำมันกานพลู

นางสาวไพลิน สุขวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)

are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF WHEY PROTEIN ISOLATE FILM CONTAINING
CLOVE OIL EMULSION

Miss Pailin Sukwong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่มีอิมัลชันน้ำมันกานพลู
โดย	นางสาวไพลิน สุขวงษ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประกิจชัยวัฒนา)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ คุรุสง)

ไพลิน สุขวงษ์: ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่มีอิมัลชันน้ำมันกานพลู. (ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF WHEY PROTEIN ISOLATE FILM CONTAINING CLOVE OIL EMULSION) อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.สุเมธ ตันตระเชียร, อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.พาสวดี ประทีปะเสน, 103 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาฟิล์มพอลิเมอร์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ประกอบด้วยความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 และแปรความเข้มข้นคือ Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ทำการลดขนาดอนุภาคน้ำมันด้วยการโฮโมจิไนซ์ และคลื่นเหนือเสียง โดยอิมัลชันมีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย เท่ากับ 22.018 0.152 และ 0.117 μm ตามลำดับ เมื่อนำอิมัลชันทั้งสามชนิด ไปศึกษาความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 มีความสามารถในการต้านแบคทีเรียได้ดีที่สุด และมีค่า MBC เท่ากับ 7.8 $\mu\text{g/mL}$ ของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ยกเว้น *B. subtilis* จึงเลือกอิมัลชันที่มี Tween 20 ร้อยละ 20 ใส่ในฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท โดยแปรความเข้มข้นอิมัลชันเป็นร้อยละ 1 3 5 และ 7 โดยน้ำหนัก และนำมาทดสอบความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ พบว่ามีเพียงฟิล์มที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 เท่านั้น ที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และเมื่อนำฟิล์มที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 มาปิดทับบนเนื้อหมูสดไสซ์ และเก็บที่ 4°C สามารถชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด *E.coli* Coliform และ *Salmonella* spp. ได้ เมื่อเทียบกับเนื้อหมูสดไสซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มที่ผสมอิมัลชัน และผลทางประสาทสัมผัส แสดงว่า ฟิล์มที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 สามารถชะลอการเกิดกลิ่นคาวของเนื้อหมูได้ แต่มีผลต่อสีของเนื้อหมู และมีกลิ่นน้ำมันกานพลูบนเนื้อหมู ซึ่งทำให้คะแนนความต้องการซื้อเนื้อหมูของผู้บริโภคน้อยในช่วงเริ่มต้นของอายุการเก็บ และมีคะแนนสูงขึ้นในช่วงท้ายของอายุการเก็บ

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
 ปีการศึกษา..... 2555.....ลายมือชื่อ อ. ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5472063123 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : ANTIMICROBIAL ACTIVITIES / WHEY PROTEIN ISOLATE FILM / CLOVE OIL / EMULSION / TWEEN 20

PAILIN SUKWONG : ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF WHEY PROTEIN ISOLATE FILM CONTAINING CLOVE OIL EMULSION. ADVISOR: ASSOC. PROF. SUMATE TANTRATIAN, Ph.D., CO-ADVISIR : ASST. PROF. PASAWADEE PRADIPASENA, Sc.D., 103 pp.

This research aimed to develop a polymeric film with antimicrobial activity from whey protein isolate (WPI) and clove oil emulsion (oil in water). Emulsions were prepared by varying the concentration of Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) at 20, 40, 60% w/w with a constant concentration of clove oil (20% by weight). Homogenizer and ultrasonication units were used to disperse oil droplets. The emulsions contained average size of oil particles at 22.018, 0.152 and 0.117 μm , respectively. The antimicrobial activities were determined against *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The clove oil emulsion incorporated with Tween 20 at 20% demonstrated the most intense inhibitory effect with MBC at 7.81 $\mu\text{g/mL}$ except for *B. subtilis*. Antimicrobial films were prepared by adding the clove oil emulsion contained Tween 20 at 20% at 1, 3, 5 and 7% (by weight) into WPI solution and then casted. The only WPI film incorporated with 7% of clove oil emulsion demonstrated antimicrobial activity against almost bacteria. The WPI film contained 7% clove oil emulsion was chosen to apply on slices of fresh pork meat. It was found that the pork meat treated with antimicrobial film showed tentatively slower growth of total plate count, *E.coli*, coliform and *Salmonella* spp. as compared to untreated pork meat, when kept under 4^oC. The sensory evaluation of pork meat slices, the antimicrobial films could prolong the exhibition of off-flavor of pork meat. The defections of pork meat, discoloration and clove oil smell, were detected by panelists. The treated pork meat slices showed lower intention to buy score at the intial stage of storage, but better score was found when they were kept longer, as compared to the untreated slices.

Department:.....	Food Technology.....	Student's Signature.....
Field of Study:.....	Food Technology.....	Advisor's Signature.....
Academic Year:.....	2012.....	Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญาโทและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเชียร ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พาสวดี ประทีปะเสน อาจารย์ ซึ่งได้ให้คำปรึกษา ข้อชี้แนะ และความช่วยเหลือจนกระทั่งลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา และ รองศาสตราจารย์ ดร.วราวุฒิ คุรุส่ง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ช่วยชี้แนะแนวทางการปรับปรุงจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและตรวจสอบอาหาร ทางจุลชีววิทยา ณ ชั้น 16 อาคารมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์และคำแนะนำในเรื่องเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คุณยอดชาย ประกายศักดิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวัด interfacial tension ภาควิชากรรมสิ่งแวดลอม คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณรามนรี เนตรวิเชียร เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง Particle Size Analyzer

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 ที่ให้อนุมัติรับรองการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ Food Microbiology Food Quality และ Food Process และเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ อำนวยความสะดวกตลอดการใช้งานและให้กำลังใจตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน น้อง ในคณะวิทยาศาสตร์ที่ให้คำปรึกษาและกำลังใจตลอดการทำงานวิจัย ตลอดจนทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือแต่มิได้กล่าวนาม ขอได้รับความและขอบคุณจากผู้วิจัยไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สุดท้ายนี้ต้องขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว ญาติทุกคนที่ช่วยสนับสนุนและช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ฉ
สารบัญสมการ.....	ค
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 फिल्मเวย์โปรตีนไอโซเลท.....	3
2.2 กานพลู.....	8
2.3 อิมัลชัน.....	11
2.4 จุลินทรีย์.....	17
บทที่ 3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	22
3.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นTween 20 ต่อฤทธิ์การเจริญของแบคทีเรีย ขนาดและอนุภาคน้ำมัน และความหนืดของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.....	22
3.2 ศึกษาผลของความเข้มข้น อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำต่อสมบัติทางกายภาพ และฤทธิ์ ด้านการเจริญของแบคทีเรียของฟิล์มโปรตีน.....	25
3.3 ศึกษาผลของการใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู กับเนื้อหมูสดสไลซ์ ต่อฤทธิ์ด้านการ เจริญของแบคทีเรียบนเนื้อหมู และลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และความต้องการซื้อเนื้อหมูของผู้บริโภค.....	28
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	31
4.1 ผลของความเข้มข้นTween 20 ต่อฤทธิ์การเจริญของแบคทีเรีย ขนาดและอนุภาคน้ำมัน และความหนืดของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.....	31
4.2 ผลของความเข้มข้น อิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำต่อสมบัติทางกายภาพ และฤทธิ์ ด้านการเจริญของแบคทีเรียของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท.....	47
4.3 ผลของการใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู กับเนื้อหมูสดสไลซ์ ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียบนเนื้อหมู และลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และความต้องการซื้อเนื้อหมูของผู้บริโภค.....	60

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	70
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก ส่วนประกอบของน้ำมันกานพลู.....	81
ภาคผนวก ข เกณฑ์จุลชีววิทยาของเนื้อสัตว์แช่เย็นและแช่แข็งของกรมปศุสัตว์.....	86
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์.....	88
ภาคผนวก ง การประเมินทางประสาทสัมผัส.....	92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	103

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่ในเวย์โปรตีน.....	5
2.2	ชื่อและลักษณะทางกายภาพของ อีธอกซิเลทเอสเทอร์ (ethoxylated esters).....	15
4.1	ค่า MIC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลู ต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย.....	34
4.2	ค่า MBC ของอิมัลชันและน้ำมันกานพลู ต่อฤทธิ์การฆ่าแบคทีเรีย.....	38
4.3	ผลของความเข้มข้นของ Tween 20 น้ำมันกานพลูหรืออิมัลชันน้ำมันกานพลู ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ทำให้มีขนาด clear zone มากกว่า 0.8 cm ในแบคทีเรียชนิดต่างๆ.....	43
4.4	ลักษณะปรากฏของอิมัลชันที่มีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และแปรความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก.....	45
4.5	ผลของความเข้มข้น Tween 20 ต่อ D[4,3] การกระจายขนาดและลักษณะของอนุภาคน้ำมันของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ.....	46
4.6	การทดสอบลักษณะทางกายภาพของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก.....	51
4.7	สมบัติทางด้านทัศนศาสตร์ของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก.....	54
4.8	ภาพพื้นผิวหน้าและตัดขวางของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลท ฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก ซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 200 เท่า.....	55
4.9	ภาพพื้นผิวหน้าและตัดขวางของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1 3 5 และ 7 โดยน้ำหนัก ซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า.....	56
4.10	ขนาด clear zone (cm) ของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก.....	59

ตารางที่		หน้า
4.10	การประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสการได้รับกลิ่นคาวของเนื้อหมู และกลิ่นน้ำมันกานพลู ของเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ซึ่งอิมัลชันประกอบด้วย Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และมีความเข้มข้น น้ำมันกานพลูร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 4°C.....	68
4.11	การประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสการเปลี่ยนแปลงด้านสี และความต้องการซื้อของผู้บริโภคของเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ซึ่งอิมัลชันประกอบด้วย Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และมีความเข้มข้น น้ำมันกานพลูร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 4°C.....	69

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	พันธะต่างๆ ในโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน.....	3
2.2	โครงสร้างของเบต้า-แลกโตโกลบูลิน.....	5
2.3	โครงสร้างของแอลฟา-แลกโตโกลบูลิน.....	5
2.4	ลักษณะของดอกกานพลูแห้ง.....	9
2.5	สูตร โครงสร้างยูนิทอลในน้ำมันกานพลู.....	9
2.6	ตัวอย่างรูปแบบของอิมัลชัน.....	12
2.7	การทำ homogenization.....	13
2.8	ลักษณะการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว.....	14
2.9	สูตร โครงสร้าง Tween 20.....	15
3.1	ตำแหน่งของอิมัลชันที่มีความเข้มข้น น้ำมันกานพลูคงที่ที่ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และที่ความเข้มข้น Tween 20 ที่ร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ใน phase diagram.....	22
3.2	สีมาตรฐานของเนื้อหมูสด ที่ใช้แหล่งสี D65.....	29
4.1	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g) ในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 4°C.....	63
4.2	การเปลี่ยนแปลงของ <i>E. coli</i> (log CFU/g) เนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 4°C.....	63
4.3	การเปลี่ยนแปลงของ coliform (log CFU/g) ในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 4°C.....	64
4.4	การเปลี่ยนแปลงของ <i>Salmonella</i> spp. (log CFU/g) ในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 4°C.....	64

สารบัญสมการ

สมการที่		หน้า
3.1	ค่าการซึมผ่านไอน้ำ.....	25
3.2	ค่าความแข็งแรงดึง.....	26
3.3	เปอร์เซ็นต์การยืดออก.....	27
3.4	ค่าความชุ่ม.....	27

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพในด้านต่างๆ มากมาย จึงทำให้มีความสนใจในการศึกษาและการพัฒนาฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพมากตามไปด้วย ซึ่งลักษณะเด่นของฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพ คือ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ในขณะที่เดียวกันยังสามารถควบคุมการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกของไอน้ำ และก๊าซต่างๆ จึงสามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพและอายุการเก็บของอาหารได้ โดยส่วนใหญ่ฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพผลิตจากคาร์โบไฮเดรตและ โปรตีน เนื่องจากฟิล์มที่ได้มีความสามารถด้านการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดี แต่ป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้ไม่ดี ดังนั้น จึงมักผสมไขมัน เพื่อปรับปรุงสมบัติการซึมผ่านของไอน้ำให้ดีขึ้น ซึ่งอาจจะขึ้นรูปเป็นฟิล์มอิมัลชัน หรือฟิล์มไฮโดรคอลลอยด์ที่เคลือบด้วยชั้นของไขมัน (Guilbert, 1986) นอกจากนี้ยังมีการเติมสารต่างๆ เพื่อปรับปรุงสมบัติฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพด้านอื่นๆ ให้ดีขึ้น เช่น การผสมสารต้านจุลชีพในฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยเป็นสารต้านจุลชีพธรรมชาติที่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย ช่วยยืดอายุการเก็บของอาหารให้นานขึ้น แต่เนื่องจากตัวทำละลายของสารละลายฟิล์มมักใช้น้ำ เพื่อลดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อนำน้ำมันกานพลูผสมพร้อมทั้งน้ำจะเกิดแยกชั้นขึ้น เนื่องจากแรงดึงระหว่างผิวประจันระหว่างน้ำและน้ำมันสูงมาก ดังนั้น จึงต้องใช้ตัวทำอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ เป็นสารลดแรงดึงผิวระหว่างผิวประจัน และใช้พลังงานดีให้น้ำมันเกิดเป็นอนุภาคเล็ก ๆ และกระจายตัวอยู่ในน้ำ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะปรากฏเป็นเนื้อเดียวกัน เรียกว่า อิมัลชันในงานวิจัยนี้ใช้เวย์โปรตีนไอโซเลทเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพ ซึ่งมีสามารถเกิดเป็นอิมัลชันกับน้ำมันหอมระเหยได้เอง จากโครงสร้างของเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ประกอบด้วยส่วนที่มีขี้และส่วนที่ไม่มีขี้ แต่การทำอิมัลชันของเวย์โปรตีนไอโซเลท ทำให้ได้ขนาดอนุภาคน้ำมันที่มีความหลากหลาย ซึ่งงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาขนาดของน้ำมันในอิมัลชันต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ จึงเลือกทำอิมัลชันน้ำมันหอมระเหยกานพลูในน้ำ โดยทำการลดขนาดของอนุภาคน้ำมันด้วยโฮโมจิไนเซชันและคลื่นเหนือเสียง ก่อนผสมลงในสารละลายเวย์โปรตีนไอโซเลท เพื่อขึ้นรูปฟิล์มต่อไป สารลดแรงดึงผิวในงานวิจัยนี้เลือกใช้ Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20) เป็นตัวทำอิมัลชันที่ไม่มีประจุ มีหมู่พอลิออกไซด์ขนาดใหญ่ และมีค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) เท่ากับ 16.7 จึงละลายน้ำได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้คลื่นเหนือเสียงมีผลต่อโครงสร้างของเวย์โปรตีนไอโซเลท พบว่าการทำอิมัลชันระหว่างเวย์โปรตีนคอนเซนเตรท และน้ำมันมะกอก โดยใช้คลื่นเหนือเสียง ที่มีแอมพลิจูดในช่วงร้อยละ 70-90 สามารถใช้เวลาในการทำอิมัลชัน โดยใช้คลื่นเหนือเสียงที่ได้สูงสุดที่ 4 นาที และหลังจาก 4 นาที พบว่าขนาดของน้ำมันในอิมัลชัน เริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งเกิดจากพลังงานความร้อนของการใช้คลื่นเสียงที่สูงขึ้น ส่งผลให้อุณหภูมิในอิมัลชันสูงขึ้นตามไปด้วย (Kaltsa et al., 2013) ซึ่งอุณหภูมิสูงมีผลต่อความเสถียรของอิมัลชัน นอกจากนี้ Chandrapala et al. (2011) ศึกษาผลของการใช้คลื่นเหนือเสียงต่อการเปลี่ยนแปลง

สมบัติความร้อนและโครงสร้างของโปรตีนในเวย์โปรตีนคอนเซนเตรท ที่ปริมาณต่างๆพบว่า การใช้เวลาของคลื่นเหนือเสียง ในเวย์โปรตีนคอนเซนเตรทที่ปริมาณร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก นาน 5 นาที ทำให้โปรตีนในเวย์โปรตีนคอนเซนเตรทเกิดการจับกันระหว่างสายโปรตีน เนื่องจากคลื่นเหนือเสียงมีผลต่อ โครงสร้างทุติยภูมิและส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน อย่างไรก็ตามการใช้คลื่นเสียงในการทำอิมัลชันทำให้ได้ขนาดของอนุภาคน้ำมันที่มีความสม่ำเสมอ และสามารถลดความหลากหลายของขนาดอนุภาคในวิฎภาคกระจายได้ (Tadros et al., 2004) โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ

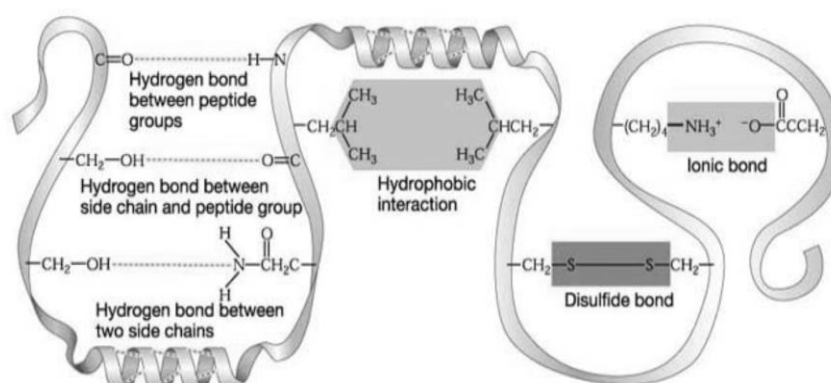
1. ศึกษาผลของความเข้มข้น Tween 20 ต่อฤทธิ์การเจริญของแบคทีเรีย ขนาดและอนุภาคน้ำมัน และความหนืดของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ
2. ศึกษาผลของความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำต่อสมบัติทางกายภาพ และฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท
3. ศึกษาผลของการใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ กับเนื้อหมูสดสไลซ์ ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียบนเนื้อหมู และลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และความต้องการซื้อของผู้บริโภค

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 फिल्मเวย์โปรตีนไอโซเลท

ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทเป็นฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพ ซึ่งมีลักษณะเด่นของฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพ คือ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ในขณะที่เดียวกันยังสามารถควบคุมการเคลื่อนที่ผ่านเข้าก๊าซ ไออน้ำ ไอระเหย สารละลาย จุลินทรีย์ หรือสารอื่นๆ จากอาหาร และยังสามารถใช้ในการห่อหุ้มอาหารหรือใช้เป็นแผ่นกั้นระหว่างส่วนประกอบอาหารแต่ละส่วน จึงสามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพและอายุการเก็บของอาหารได้ (Guilbert, 1986) สารพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์ม สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน การขึ้นรูปของฟิล์มจากสารละลายโปรตีนต้องอาศัยพันธะต่างๆ เช่น แรงดึงดูดระหว่างสารที่มีขั้ว พันธะไฮโดรเจน พันธะไดซัลไฟด์ แรงดึงดูดระหว่างขั้ว และแรงจากปฏิกิริยาของสารที่ไม่ชอบน้ำ ที่อยู่บนกรดอะมิโน (Krochta, Baldwin, and Nisperos-Carriedo, 1994) แสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 พันธะต่างๆ ในโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน
ที่มา: สมปอง ธรรมศิริรักษ์ (2550)

2.1.1 องค์ประกอบและประเภทของเวย์โปรตีน

โปรตีนที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตฟิล์ม คือ กลุ่มเวย์โปรตีน ซึ่งเวย์โปรตีนเป็นผลผลิตที่เหลือจากการตกตะกอนเคซีน (casein) ในระหว่างขั้นตอนการทำชีส ส่วนประกอบของเวย์โปรตีน ได้แก่ เบต้า-แลคโตโกลบูลิน (beta-lactoglobulin) แอลฟา-แลคตัลบูมิน (alpha-lactalbumin) โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) และ โปรทีโอส-เพพโทน (proteose-peptones) ตามตารางที่ 2.1 (Gennadios, 2002) ดังนี้

2.1.1.1 เบต้า-แลกโตโกลบูลิน เป็นโปรตีนหลักที่พบในเวย์โปรตีน และประกอบด้วยกรดอะมิโน 160 ตัว และมีขนาดมวล 18.3 กิโลดัลตัน (รูปที่ 2.2) ซึ่งปริมาณของเบต้า-แลกโตโกลบูลินขึ้นอยู่กับวัตถุดิบตั้งต้น โดยโครงสร้างของเบต้า-แลกโตโกลบูลินประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว และในเบต้า-แลกโตโกลบูลิน 1 โมเลกุล พบหมู่ของไฮดรอกซิล (-SH) อยู่ 1 หมู่ และพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) อยู่ 2 พันธะ เมื่อให้ความร้อนหมู่ไฮดรอกซิลถูกสลายพันธะกลายเป็นพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมสายพอลิเมอร์แต่ละสายเข้าด้วยกัน ส่งผลให้ฟิล์มโปรตีนมีความแข็งแรงมากขึ้น นอกจากนี้ความร้อนยังมีผลต่อส่วนที่ไม่ชอบน้ำและหมู่ $-NH_2$ ในโครงสร้างเบต้า-แลกโตโกลบูลินอีกด้วย ดังนั้น ในการขึ้นรูปฟิล์มเวย์โปรตีนมักใช้ความร้อน เพื่อให้ได้ฟิล์มที่มีลักษณะแข็งแรงและทนต่อแรงดึงได้มากขึ้น เมื่อเทียบกับฟิล์มเวย์โปรตีนที่ไม่ผ่านความร้อน (Kinsella, 1984; Perez-Gago, Naduad, and Krocha, 1999) นอกจากนี้เบต้า-แลกโตโกลบูลินเป็นสารที่มีความไวต่อกรดเบส โดยโครงสร้างของ beta-lactoglobulin แยกออกเป็นมอนอเมอร์ (monomer) ได้ที่ pH น้อยกว่า 3 และ pH มากกว่า 8 ซึ่ง pH น้อยกว่า 3 แต่ละ monomer ยังมีรูปร่างและ conformation ที่เหมือนเดิม แต่ที่ pH มากกว่า 8 พบว่าทำให้เกิดการแตกออกของพันธะคาร์บอกซิล และหมู่ของไฮดรอกซิล

2.1.1.2 แอลฟา-แลคตัลบูมิน เป็นโปรตีนที่พบมากเป็นอันดับ 2 ในเวย์โปรตีน โครงสร้างแอลฟา-แลคตัลบูมิน มีลักษณะกลม ประกอบด้วยกรดอะมิโน 123 ชนิด ขนาดมวล 14 กิโลดัลตัน และประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 4 คู่ (รูปที่ 2.3) ซึ่งพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้แอลฟา-แลคตัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีความยืดหยุ่น ทนต่อความร้อนได้ดี

2.1.1.3 โปวีนซีรัมอัลบูมิน เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ มีรูปร่างกลม ประกอบด้วยกรดอะมิโน 528 ชนิด ขนาดมวล 66 กิโลดัลตัน และประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 17 คู่ และมีหมู่ของไฮดรอกซิล (-SH) อีก 1 หมู่ ซึ่งทำให้โปวีนซีรัมอัลบูมินทนต่อความร้อนได้ดี และมักจับอยู่กับกรดไขมันอิสระ ไขมัน หรือสารให้กลิ่นรส (Kinsella and Whitehead, 1989)

2.1.1.4 อิมมูโนโกลบูลิน เป็นสารที่มีขนาดมวล 150-1000 กิโลดัลตัน และประกอบด้วย สายโพลีเพปไทด์ 4 สายมาต่อเชื่อมกัน ด้วยพันธะไดซัลไฟด์

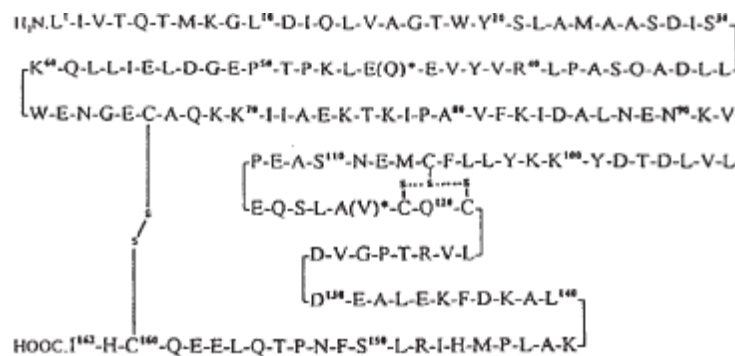
2.1.1.5 โพรทีโอส-เพฟโทน ประกอบอยู่ในส่วน proteolytic ใน β -casein (Andrews, 1979)

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของโปรตีนที่อยู่ในเวย์โปรตีน

ที่มา: Dybing and Smith, 1991, cited in Gennadios, 2002)

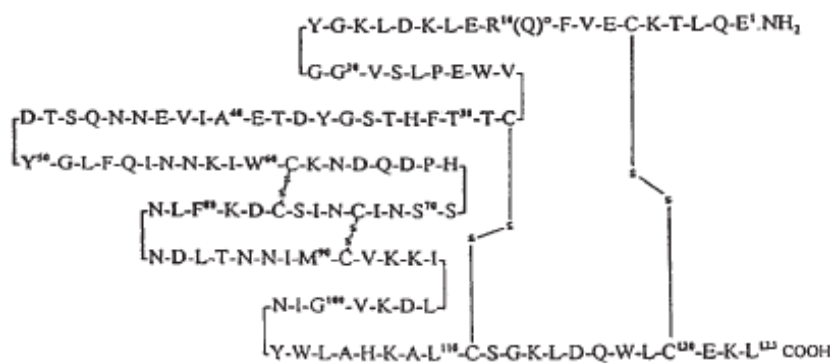
Fraction	Molecular Weight (Da)	Disulfide Bonds	Sulfhydryl Groups
57% β-Lg	18,300	2	1
19% α-La	14,200	4	0
7% BSA	66,300	17	1
13% Igs	150,000–1,000,000	nv	nv
4% PP	4,100–22,000	0	0

β-Lg = β-lactoglobulin; α-La = α-lactalbumin; BSA = bovine serum albumin, Igs = immunoglobulins; PP = proteose-peptones; nv = numerous variable.



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเบต้าแลคโตโกลบูลิน

ที่มา: Cayot and Lorient (1997)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของแอลฟาแลคโตโกลบูลิน

ที่มา: Cayot and Lorient (1997)

ประเภทของเวย์โปรตีน สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่ม คือ เวย์โปรตีนคอนเซนเตรท (whey concentrate) ที่มีปริมาณ โปรตีนอยู่ร้อยละ 25-80 และเวย์โปรตีนไอโซเลท (whey protein isolate) มีปริมาณ โปรตีนมากกว่า ร้อยละ 90 ซึ่งใช้วิธี ion exchange chromatography ในการแยกเอาโปรตีนออกมา (Gennadios, 2002)

2.1.2 การขึ้นรูปฟิล์มเวียโปรตีน

การขึ้นรูปฟิล์มโปรตีนต้องอาศัยแรงสองชนิด คือ แรงโคฮีซีฟ (cohesive force) เป็นแรงระหว่างโมเลกุลโพลิเมอร์ด้วยกันเองในระหว่างการทำฟิล์ม ถ้าแรงโคฮีซีฟมากทำให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่น ความเป็นรูพรุน การแพร่ผ่านของแก๊สและสารในเนื้อฟิล์มลดลง ซึ่งระดับของแรงโคฮีซีฟขึ้นอยู่กับโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของโพลิเมอร์ฟิล์ม การละลายและสภาวะในการเตรียมฟิล์ม แรงชนิดที่สอง คือ แรงแอดฮีซีฟ (adhesive force) เป็นแรงระหว่างโพลิเมอร์กับสารอื่นที่ใช้ในการเตรียมฟิล์ม และทำให้เกิดโครงสร้างของฟิล์มได้ เช่น แรงระหว่างโพลิเมอร์และพลาสติกไซเซออร์ เป็นต้น พลาสติกไซเซออร์เป็นสารโมเลกุลต่ำ เช่น กลีเซอรอล ซอร์บิทอล โพลีเอทิลีนไกลคอล โพรพิลีนไกลคอล และไขมัน (Krochta and Mulder-Johnston, 1997) ช่วยเพิ่มความอ่อนตัว ความคงทนต่อการใช้งาน และการยึดตัว (Banker, 1966) ลักษณะทางกายภาพของฟิล์มเวียโปรตีน คือ โปร่งใส ไม่มีกลิ่น ไม่มีสี ป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจน ไขมัน และกลิ่นได้ดี แต่ฟิล์มที่ไม่มีพลาสติกไซเซออร์ มีลักษณะเปราะ เพื่อเพิ่มความยืดหยุ่นของฟิล์มและปรับปรุงสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม

วิธีในการขึ้นรูปฟิล์มพอลิเมอร์ (Bank, 1966; Embuscado and Huber, 2009) แบ่งได้เป็น 5 วิธี คือ

1. การเคลือบ (panning) เป็นกระบวนการขึ้นรูปฟิล์ม ที่นิยมใช้ในกระบวนการทำลูกกวาดและยา โดยใส่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเคลือบลงในเคลือบในหม้อที่หมุนได้ จากนั้นราดหรือพ่นฝอยสารเคลือบลงในหม้อที่หมุนด้วยความเร็วสม่ำเสมอ ทำให้สารเคลือบถูกเคลือบติดอยู่บนผลิตภัณฑ์ ซึ่งอาจจะเป่าด้วยลมหรือลมร้อนช่วยทำแห้ง พบว่าลูกอมช็อกโกแลตที่เคลือบด้วยเวียโปรตีนมีลักษณะใส และมีมันวาว
2. ฟลูอิดไดซ์เบด (fluidized-bed coating) มักในการเคลือบเม็ดยา และได้มีการศึกษาใช้เคลือบถั่วลิสงและถั่วเปลือกแข็งด้วยเวียโปรตีน ซึ่งการเคลือบแบบฟลูอิดไดซ์เบดสามารถลดปัญหาการจับเป็นก้อนของสารเคลือบ เมื่อใช้วิธีการจุ่ม และป้องกันการชนกันของผลิตภัณฑ์ เมื่อใช้วิธี panning
3. การจุ่ม (dipping) คือ การนำผลิตภัณฑ์หรืออาหารที่ต้องการเคลือบจุ่มลงในสารละลายฟิล์ม แล้วนำไปทำแห้ง มักใช้กับเนื้อ ปลา สัตว์ปีก ผลไม้และผัก
4. การพ่นฝอย (spraying) คือ การพ่นฝอยให้เกิดเป็นฟิล์ม ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการพ่นฝอย ได้แก่ ความดันในการพ่นฝอย ความหนืดของสารละลายที่ใช้พ่นฝอย อุณหภูมิในกระบวนการ เป็นต้น ซึ่งข้อด้อย คือ สามารถเคลือบอาหารได้เพียงครั้งละ 1 ด้าน และต้องการพื้นที่หน้าตัดที่กว้างสำหรับการพ่นฝอย และความหนาบางของฟิล์มขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้พ่นฝอย
5. การขึ้นรูปโดยใช้สารละลาย (solvent casting) คือ นำสารละลายฟิล์มมาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์ม แล้วจึงนำแผ่นฟิล์มไปห่อหุ้มอาหารหรือผลิตภัณฑ์ เป็นวิธีที่ใช้มากในงานวิจัย เนื่องจากสามารถขึ้นรูปฟิล์มได้หลายรูปแบบและราคาไม่แพง

2.1.3 สมบัติทางกายภาพของฟิล์ม

ฟิล์มพอลิเมอร์ มักใช้ในการห่อหุ้มอาหาร แยกเป็นแต่ละชั้นของอาหาร และฟิล์มอาจมีสมบัติช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของอาหาร ซึ่งสมบัติทางกายภาพของฟิล์มมีบทบาทสำคัญต่อการนำฟิล์มไปใช้งานของฟิล์ม เช่น ในขั้นตอนการผลิต การขนส่ง ตลอดจนถึงการใช้งานของผู้บริโภค เป็นต้น สมบัติทางกายภาพของฟิล์มที่ควรพิจารณาสามารถแบ่งออกได้อย่างกว้างๆ ดังนี้ (Guilbert, 1986)

1. ความหนา เป็นการวัดระยะตั้งฉากระหว่างผิวหน้าทั้งสองของฟิล์ม ซึ่งความหนาสัมพันธ์กับค่าความต้านทานแรงดึง ค่าการซึมผ่านไอน้ำและออกซิเจน เป็นต้น
2. การต้านทานแรงดึง เป็นค่าความเครียดที่ใช้ในการดึงฟิล์มที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของฟิล์ม ที่มีความกว้างคงที่ จนฟิล์มขาด โดยใช้หน่วยนิวตันต่อตารางเมตร ซึ่งค่าการต้านทานแรงดึงขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของพันธะระหว่างสายโซ่พอลิเมอร์มากกว่าความแข็งแรงภายในสายโซ่พอลิเมอร์ นอกจากนี้การเติมพลาสติกไซเซอร์ ทำให้ค่าการต้านทานแรงดึงลดลง เนื่องจากพลาสติกไซเซอร์จับกับพอลิเมอร์ด้วยพันธะทุติยภูมิ ความแข็งแรงระหว่างสายโซ่โมเลกุลลดลง ทำให้ฟิล์มเวียโปรตีนมีความยืดหยุ่นมากขึ้น
3. การยืดออก เป็นค่าที่ได้จากระยะทางของฟิล์มที่ยืดออกด้วยแรงดึงจนขาดต่อความยาวเดิม ซึ่งการใส่พลาสติกไซเซอร์ทำให้ฟิล์มยืดตัวออกได้มากขึ้น เนื่องจากพลาสติกไซเซอร์ลดความแข็งแรงของพันธะระหว่างสายโซ่โมเลกุล ทำให้สายโซ่พอลิเมอร์เคลื่อนที่ได้มากขึ้น แต่ถ้าฟิล์มมีลักษณะเปราะและไม่ยืดหยุ่น ค่าการยืดออกก็จะลดลง
4. การซึมผ่านไอน้ำ เป็นการวัดปริมาณไอน้ำที่ซึมผ่านจากผิวหน้าฟิล์มด้านหนึ่งไปอีกด้านหนึ่งของฟิล์ม ต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวฟิล์ม ในระยะเวลาที่กำหนดและภายใต้สภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ ฟิล์มเวียโปรตีนมีข้อจำกัดในเรื่องการซึมผ่านไอน้ำ เนื่องจากมีส่วนที่ชอบน้ำอยู่ในโมเลกุล และสามารถลดค่าการซึมผ่านไอน้ำได้โดยการเปลี่ยนชนิดของพลาสติกไซเซอร์ หรือการเติมน้ำมันลงในฟิล์ม

นอกจากนี้ฟิล์มพอลิเมอร์ ยังสามารถทำให้หน้าที่เก็บสารแต่งเติมของอาหาร เช่น วัตถุกันเสีย สารช่วยรักษากลิ่นรส หรือสารต้านการเจริญแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อนำฟิล์มที่ผสมสารต้านการเจริญแบคทีเรีย สามารถช่วยชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้อายุการเก็บอาหารนานขึ้น

2.2 กานพลู

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของกานพลู

กานพลู เป็นพืชในวงศ์ Myrtaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Eugenia caryophyllata* (Sprengel) Bullock and Harrison หรือ *Eugenia aromaticum* Baill. (Bailey, 1969) กานพลูเป็นพืชที่เติบโตได้ดีในที่มีอากาศร้อนชื้น จึงสามารถพบได้ตามแถบบริเวณมาเลเซีย หมู่เกาะสุมาตรา ออสเตรเลีย อเมริกาใต้ และไทย ซึ่งในประเทศไทยนั้นสามารถพบได้ตามทะเลชายฝั่งภาคตะวันออกและภาคใต้ ต้นกานพลูเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางไม่ผลัดใบ มีอายุประมาณ 80 ปี ลำต้นเป็นทรงพุ่มรูปกรวยสูงประมาณ 20-40 เมตร แตกกิ่งก้านเป็นระเบียบ มีเปลือกสีน้ำตาลอ่อน เรียบ ทุกส่วนเกลี้ยง ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ใบหนาเป็นมัน ส่วนหัวและท้ายใบแหลม และออกใบตรงข้ามกัน ปลายเรียวแหลม กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 7-12 เซนติเมตร ใบอ่อนมีสีชมพูหรือสีแดง และเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวมัน มีกลิ่นหอมเผ็ดร้อน และมีจุดน้ำมันอยู่ทั่วไปบนใบ ดอกมีลักษณะเป็นช่อคล้ายดอกชมพู มักออกที่ปลายยอดหรือตามง่ามใบใกล้ๆ ปลายยอด ประกอบด้วยดอกย่อยประมาณ 10-15 ดอก แต่ละดอกจะมีดอกย่อยขนาดเล็กประมาณ 3 ดอก กลีบรองดอกและกลีบดอกมีสีเขียวอมเหลือง มีสีแดงกระจาย เมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มและร่วงง่าย กลีบเลี้ยงและฐานดอกสีแดงหนาแข็ง ผลเป็นรูปไข่ มีกลิ่นเฉพาะและเผ็ดร้อน สำหรับการเก็บเกี่ยวจะเริ่มต้นตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ โดยนำดอกกานพลูมาตากแห้ง ดอกเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีน้ำตาล (รูปที่ 2.4) ผลของกานพลู มีลักษณะเป็นผลเดี่ยว เนื้อหนา ผลที่สุกมีสีม่วงคล้ำคล้ายลูกหว้า มีขนาดประมาณ 2.5 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 0.2 เซนติเมตร ตั้งแต่เริ่มออกดอก จนกระทั่งผลแก่ใช้เวลาประมาณ 9-10 เดือน ซึ่งอยู่ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน ส่วนเมล็ดของกานพลู เป็นเมล็ดเดี่ยว ลักษณะค่อนข้างนิ่ม (วุฒิ วุฒิธรรมเวช, 2540; วัชรวิญญู ลักษณาศัย, 2514) กานพลูสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง (รุ่งรัตน์ เหลืองนันทิเทพ, 2540; สุพจน์ กิลานเกสัช, 2543) ดังนี้

1. เป็นส่วนผสมของยารักษาโรค เช่น ยาแก้ไอ แก้สะอึก ยาชาต่างๆ ยาแก้โรคเลือดออกตามไรฟัน ยาขับลม ยาขับระดู ยาแก้ปวดท้อง จุกเสียด ท้องเสีย ยาระงับอาการปวดฟัน และยาบำรุงธาตุ
2. มีฤทธิ์เป็นยาชา ยาฆ่าเชื้อ แก้ปวดฟัน
3. เป็นส่วนผสมสำหรับต้มน้ำดื่ม เนื้อสัตว์ เครื่องแกงและน้ำพริกสำเร็จรูปและกึ่งสำเร็จรูป
4. เป็นส่วนผสมของอาหารเพื่อปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติอาหาร ช่วยถนอมอาหาร ใช้ในอาหารหมักดอง อาหารกระป๋องและผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ มีฤทธิ์ในการฆ่าและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อไทฟอยด์ เชื้อบิดชนิดที่ไม่มีตัว และเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคกลาก และตกขาว เป็นต้น

5. ใช้ในการผลิตเครื่องสำอาง สบู่ สั้งเคราะห์กลิ่นวนิลา ทำน้ำมันสำหรับล้างแผ่นสไลด์ของกล้องจุลทรรศน์

ทางด้านความปลอดภัย พบว่า องค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration, FDA) ระบุให้น้ำมันกานพลูและสารองค์ประกอบในน้ำมันกานพลู เป็น generally recognized as safe (GRAS) ในผลิตภัณฑ์ทางทันตกรรม และอาหาร ในหัวข้อที่ 21 CFR 184.1257 (Code of Federal Regulation, 2012)

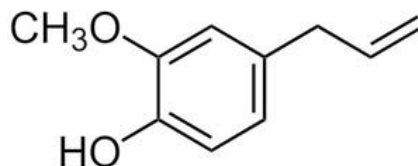


รูปที่ 2.4 ลักษณะของดอกกานพลูแห้ง

ที่มา: พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์ (2553)

2.2.2 องค์ประกอบของน้ำมันกานพลู

ดอกกานพลูแห้ง มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ประมาณร้อยละ 14-20 ซึ่งประกอบด้วยยูจีนอล (eugenol) กรดแกลโลแทนนิก (gallotannic acid) วานิลลิน (vanillin) สารโครโมนส์ (chromenes) ยูจีนอลอะซิเตท (eugenol acetate) แคร์ริโอฟิลลิเน (Caryophyllene) เมทิล-เอ็น-เอมิลคีโทน (methyl-N-amylketone) เป็นต้น เมทิล-เอ็น-เอมิลคีโทน เป็นสารที่ทำให้กานพลูมีกลิ่นเฉพาะ ลักษณะของน้ำมันกานพลู มีสีเหลือง กลิ่นหอมฉุนและรสเผ็ด สารที่พบมากในน้ำมันกานพลู คือ ยูจีนอล (รูปที่ 2.5) เป็นสารในกลุ่มฟีนอลิก (phenolic) มีสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, 2553; รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ, 2540)



รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างยูจีนอลในน้ำมันกานพลู

ที่มา: Terjung et al. (2012)

2.2.3 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกานพลู

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันกานพลูมากขึ้น เนื่องจากน้ำมันกานพลูมียูจินอลเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีสมบัติด้านการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ เป็นต้น (Matan et al., 2006) และจากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกานพลู เมื่อใช้วิธี agar diffusion พบว่า น้ำมันกานพลูสามารถต้านการเจริญของยีสต์ราได้ดีที่สุด (*Candida albicans* และ *Aspergillus niger*) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone อยู่ในช่วง 32-40 mm รองลงมา คือ แบคทีเรีย (*Staphylococcus epidermidis* *Staph. aureus* *Bacillus subtilis* *Escherichia coli* และ *Proteus vulgaris*) พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone อยู่ในช่วง 16.3-19.5 mm แต่พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถต้านการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* ได้น้อยที่สุด ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone เท่ากับ 9.5 mm ส่วนวิธี broth dilution พบว่าค่า minimal bactericidal concentration (MBC) ของยีสต์รา อยู่ในช่วง 0.195-0.780 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนค่า MBC ของแบคทีเรีย อยู่ในช่วง 0.125-0.250 $\mu\text{g/mL}$ ยกเว้นใน *Ps. aeruginosa* มีค่า MBC เท่ากับ 0.500 $\mu\text{g/mL}$ (Fu et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันกานพลูในอาหารประเภทต่างๆ เช่น อาหารประเภทผลไม้ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เมื่อผสมน้ำมันกานพลูในน้ำแอปเปิ้ล พบว่าที่ 60 นาที น้ำแอปเปิ้ลที่ผสมน้ำมันกานพลูสามารถลดจำนวน *E. coli* O157:H7 และ *Salmonella* Enterica ลงไปร้อยละ 50 เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในช่วง ร้อยละ 0.075-0.098 และ 0.019-0.026 ตามลำดับ (Friedman et al., 2004) ส่วนในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ พบว่าไส้กรอกแฟรงค์เฟอ์เตอร์ไก่ (chicken frankfurters) ที่ทาน้ำมันกานพลูที่ผิวไส้กรอกร้อยละ 1 และ 2 โดยปริมาตรต่อมวล สามารถลดจำนวน *Listeria monocytogenes* ลงไปได้ 0.3-2.6 และ 1.2-2.7 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เป็นระยะเวลา 14 วัน (Mytle et al., 2006) เป็นต้น นอกจากนี้การใช้น้ำมันกานพลูในอาหารโดยตรงแล้ว ก็ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการใส่น้ำมันกานพลูลงในบรรจุภัณฑ์ เพื่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผิวหน้าของอาหาร โดยเฉพาะบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจากธรรมชาติ เช่น ฟิล์มที่ผลิตจากไคโตแซน พบว่าฟิล์มไคโตแซนที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 โดยน้ำหนัก สามารถยับยั้ง *A. oryzae* ได้ดีที่สุดรองลงมา คือ *P. digitatum* *Staph. aureus* และ *E. coli* ตามลำดับ ซึ่งฟิล์มไคโตแซนที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 10 สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด (Wang et al., 2011) ส่วนฟิล์มที่ผลิตจากเวย์โปรตีนไอโซเลท พบว่าฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก สามารถต้านการเจริญของ *L. innocua* *Staph. aureus* และ *S. Enteritidis* แต่สามารถต้านการเจริญของ *Ps. fragi* เมื่อมีน้ำมันกานพลูร้อยละ 3 ในฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท (Fernandez-Pan et al., 2012) เป็นต้น

น้ำมันที่สกัดจากสารในธรรมชาติหรือน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ถูกใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์มากขึ้น เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ และยังเป็นมิตรต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ซึ่งน้ำมันหอมระเหยสามารถสกัดได้จากพืช สมุนไพร หรือเครื่องเทศ ใดๆก็ตาม ความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับวิธีการสกัด เช่น

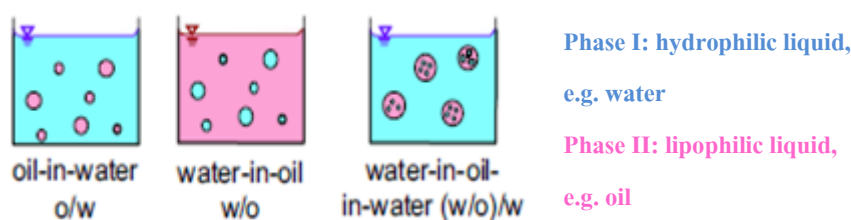
การกลั่นด้วยน้ำไอ การสกัดด้วยตัวทำละลาย การบีบอัด เป็นต้น และยังขึ้นอยู่กับคุณภาพของวัตถุดิบตั้งต้นอีกด้วย คุณภาพของน้ำมันหอมระเหย อาจวัดด้วยปริมาณฟีนอลิกที่อยู่ในน้ำมันที่ได้จากการสกัด เพราะสารฟีนอลิกเป็นสารที่พบมากในน้ำมันหอมระเหยและมีฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งพืชที่ปริมาณของสารฟีนอลิกที่สูง ได้แก่ กานพลู จันทร์เทศ และ laurel (Davidson, Sofos, and Branen, 2005) กลไกของฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟีนอลิก ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด แต่อาจจะเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ในส่วนน้ำมันหรือส่วนที่มีสมบัติเป็น hydrophobic ของสารประกอบฟีนอลในน้ำมันสามารถแทรกเข้าไปในส่วนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์และไมโทคอนเดรียของแบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียสูญเสียความสามารถในการซึมผ่านของสารและนำไปสู่การรั่วของ intercellular membrane ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก หรือเนื่องจากน้ำมันหอมระเหยทำความเสียหายต่อระบบเอนไซม์ของแบคทีเรีย โดยพบว่ายูจีนอลสามารถยับยั้งการผลิตเอนไซม์ amylase และ protease ของ *B. cereus* นอกจากนี้บางงานวิจัยยังพบว่าส่วน -OH group ของยูจีนอลสามารถจับกับโปรตีน จึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ใน *Enterobacter aerogene* (Burt, 2004; Davidson, Sofos, and Branen, 2005) ในปี 1960 Katayama and Nagai ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ โดยใช้วิธี agar diffusion พบว่า eugenol carvacrol isoborneol thymol vanillin และ salicyldehyde ซึ่งมีหมู่ hydroxyl (-OH) ในโครงสร้างสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ (*B. subtilis* *S. Enteritidis* *Ps. aeruginosa* *Ps. morganii* และ *E. coli*) ที่มีความเข้มข้น ร้อยละ 0.05 ส่วน carvone ที่มีหมู่ ketone (-CO-) ในโครงสร้าง สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าวได้ ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 1-5 ซึ่งสารที่มีหมู่ hydroxyl (-OH) ในโครงสร้าง สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าการมีหมู่ ketone (-CO-) ในโครงสร้าง

2.3 อิมัลชัน

2.3.1 ลักษณะทั่วไปของอิมัลชัน

อิมัลชัน คือ ของผสมที่ประกอบด้วยของเหลวอย่างน้อย 2 ชนิด (น้ำและน้ำมัน) ที่ไม่ผสมหรือละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยในระบบอิมัลชันประกอบด้วย 2 วัฏภาค คือ วัฏภาคภายในหรือวัฏภาคกระจาย (internal or dispersed phase) กระจายตัวแขวนลอยอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ที่เรียกว่า วัฏภาคภายนอกหรือวัฏภาคต่อเนื่อง (external or continuous phase) เนื่องจากของเหลวทั้ง 2 ชนิดนี้มีสมบัติที่แตกต่างกัน คือ ชนิดหนึ่งมีความเป็นขี้สูง ขณะที่อีกชนิดหนึ่งมีความเป็นขี้ต่ำ ทำให้แรงดึงระหว่างผิวประจันระหว่างของเหลวทั้ง 2 ชนิดนี้สูงมาก ดังนั้น เพื่อทำให้เกิดเป็นอิมัลชันที่มีลักษณะปรากฏเป็นเนื้อเดียวกันนั้น จึงต้องใช้พลังงานดีให้ของเหลวหนึ่งเกิดเป็นอนุภาคเล็กๆ และกระจายตัวหรือแขวนลอยอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง การทำให้อิมัลชันมักใช้วิธีโฮโมจีไนเซชัน (Homogenization) ซึ่งเป็นวิธีลดขนาดของวัฏภาคกระจายในอยู่ช่วงอนุภาคที่ต้องการและกระจายอยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องได้ ผลลัพธ์ที่ได้จากการทำ homogenization มีอนุภาค

กระจายอยู่ในช่วงแคบ ซึ่งเครื่อง homogenizers มีหลายแบบ เช่น high speed blenders high-pressure valve homogenizers และ colloid mills อิมัลชันที่มีวัฏภาคกระจายเป็นน้ำมันและวัฏภาคต่อเนื่องเป็นน้ำ เรียกว่าอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (oil-in-water emulsion หรือ O/W) ซึ่งให้ลักษณะสัมผัสเหนอะหนะน้อย และใช้น้ำล้างออกได้ง่าย ขณะที่อิมัลชันที่มีวัฏภาคกระจายเป็นน้ำและวัฏภาคต่อเนื่องเป็นน้ำมัน เรียกว่าอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน (water-in-oil emulsion หรือ W/O) ซึ่งให้ลักษณะสัมผัสเหนอะหนะ และล้างออกด้วยน้ำยาก อิมัลชันทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นอิมัลชันเดี่ยว นอกจากนี้ยังมีหุอิมัลชัน (multiple emulsion) ที่วัฏภาคกระจายเป็นอิมัลชันเดี่ยวได้แก่ อิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำในน้ำมัน (oil-in-water-in oil emulsion หรือ O/W/O) ซึ่งมีวัฏภาคกระจายเป็นอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำและวัฏภาคต่อเนื่องเป็นน้ำมัน และอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันในน้ำ (water-in-oil-in-water emulsion หรือ W/O/W) ซึ่งมีวัฏภาคกระจายเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันและวัฏภาคต่อเนื่องเป็นน้ำ (McClements, 2005) ตามรูปที่ 2.6



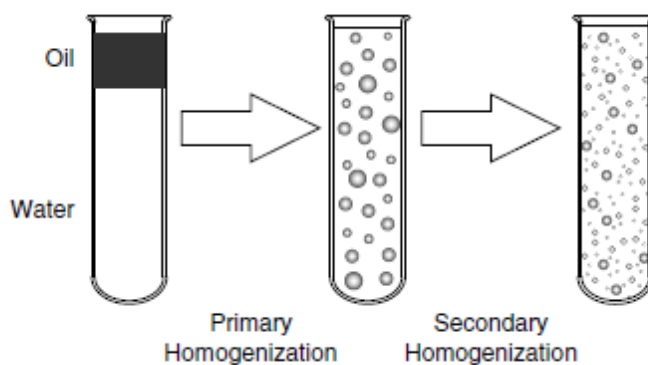
รูปที่ 2.6 ตัวอย่างรูปแบบของอิมัลชัน

ที่มา: McClements (2005)

เมื่อตีผสมน้ำและน้ำมันเข้ากันแล้ว และตั้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลาหนึ่ง พบว่าเกิดการแยกชั้นของน้ำและน้ำมัน เพราะระบบอิมัลชันต้องการพลังงานอิสระในการเพิ่มพื้นที่ผิวระหว่างเฟสของน้ำและน้ำมัน ดังนั้น เมื่อเวลาผ่านไป จึงเกิดการรวมตัวของวัฏภาคกระจายกับโมเลกุลข้างเคียง และส่งผลให้เกิดการแยกชั้นขึ้น ถ้าในระบบอิมัลชันมีความหนาแน่นของน้ำมันน้อยกว่าความหนาแน่นของน้ำ ชั้นของน้ำมันอยู่ด้านบนของชั้นน้ำ แต่ถ้าความหนาแน่นของน้ำมันมากกว่าความหนาแน่นของน้ำ ชั้นของน้ำมันอยู่ด้านล่างของชั้นน้ำ เรียกว่าความไม่เสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ (thermodynamically unstable) อย่างไรก็ตาม อิมัลชันที่ไม่เสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ อาจจะมีเสถียรทางจลน์ โดยความเสถียรจลน์ขึ้นอยู่กับระยะเวลา (เป็นสัปดาห์ เป็นเดือน หรือเป็นปี) ในทางทฤษฎี ความคงตัวของอิมัลชันเกี่ยวข้องกับคุณระหว่างแรงดึงดูดและแรงผลักระหว่างอนุภาค แรงดึงดูดซึ่งเป็นแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) หรือแรงกระจายของลอนดอน (London dispersion) เป็นแรงที่ทำให้เกิดความไม่คงตัวของอิมัลชัน ในขณะที่แรงผลักจะช่วยให้เกิดความคงตัวโดยทำให้อนุภาคแยกออกจากกัน (St. Angelo, 1989)

2.3.2 วิธีการเตรียมอิมัลชัน

หลักการของอิมัลชัน คือ การทำให้ของเหลวที่เป็นวัฏภาคกระจายแตกตัวเป็นอนุภาคเล็กๆ ที่กระจายตัวอยู่ในอีกวัฏภาคหนึ่ง ซึ่งขั้นตอนการเตรียมอิมัลชัน อาจจะเตรียมเพียง 1 ขั้นตอน หรือหลายขั้นตอนก็ได้ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์เริ่มต้น โดยส่วนใหญ่มักใช้วิธีทำอิมัลชัน 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรก (primary homogenization) เป็นการทำให้เกิดอิมัลชัน ส่วนขั้นที่สอง (secondary homogenization) เป็นการลดขนาดอนุภาคของในวัฏภาคกระจายให้อยู่ในช่วงที่ต้องการ (รูปที่ 2.7) ซึ่งในอาหารมักวิธี homogenization แบบ 2 ขั้นตอน เช่น ในขั้นแรกใช้ high-speed blender เพื่อทำให้เกิดการแยกกระจายของอนุภาคในวัฏภาคกระจายในวัฏภาคต่อเนื่อง ส่วนในขั้นที่สองใช้ high-pressure valve homogenizer เป็นกระบวนการลดขนาดของอนุภาคกระจาย เป็นต้น

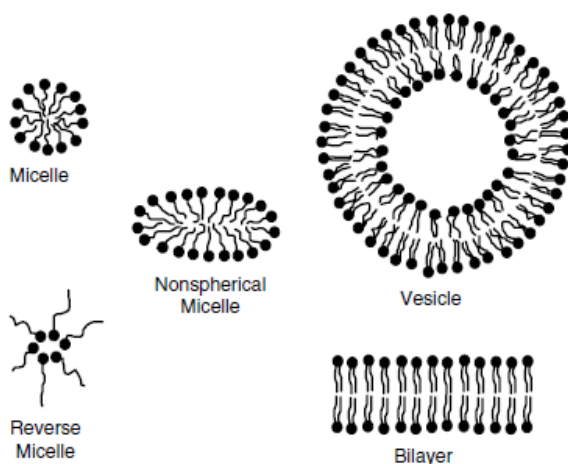


รูปที่ 2.7 การทำ homogenization
ที่มา: McClements (2005)

นอกจากนี้ยังมีการใช้คลื่นเหนือเสียง ซึ่งคลื่นเหนือเสียงเป็นคลื่นเชิงกลและเป็นคลื่นตามยาว โดยคลื่นเหนือเสียง ผลิตคลื่นเสียงที่ทำให้เกิดคลื่นระหว่างผิวประจันของอนุภาคน้ำกับน้ำมัน เป็นผลทำให้วัฏภาคกระจายแตกออกเป็นอนุภาคขนาดเล็กกระจายตัวในวัฏภาคต่อเนื่อง และการเคลื่อนที่ของคลื่นเหนือเสียงในของเหลวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของความดันในของเหลว นั้น เป็นผลทำให้เกิดฟองก๊าซเล็กๆ ในของเหลว นั้น ซึ่งฟองก๊าซนี้ขยายขนาด ในช่วงขยายของคลื่น และลดขนาดในช่วงอัดของคลื่น แต่ผลรวมพบว่าขนาดของฟองใหญ่ขึ้นเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น ในที่สุดฟองก๊าซแตก เกิดเป็นคลื่นกระแทก (shock wave) ที่รุนแรง ให้แรงเฉือนสูง แรงเฉือนนี้เป็นแรงที่กระทำต่ออนุภาคและลดขนาดอนุภาคให้มีขนาดเล็กอยู่ในระดับ submicron (Li and Fogler, 1978)

2.3.3 สารลดแรงตึงผิว

สารลดแรงตึงผิว (surface active agent หรือ surfactant) เป็นสารที่ช่วยรักษาความคงตัวของอิมัลชันในช่วงระยะเวลาหนึ่งๆ และยังมีผลต่อการลดขนาดของน้ำมันอีกด้วย สารลดแรงตึงผิวประกอบด้วย ส่วนหัว ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) และส่วนหางซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ หรือส่วนที่ชอบละลายในน้ำมัน (lipophilic) ดังนั้น สารลดแรงตึงผิวสามารถช่วยทำให้เกิดอิมัลชัน และยังรักษาความเสถียรของอิมัลชัน โดยสารลดแรงตึงผิวสามารถเกาะบริเวณพื้นผิวของอนุภาคที่กระจายอยู่ ซึ่งป้องกันไม่ให้อนุภาคเข้ามาอยู่ใกล้กันจนเกิดการรวมตัวกัน (Coupland and McClements, 1996) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวยังสามารถรวมตัวกันเองในสารละลาย เพื่อทำให้เกิดการจัดเรียงตัวของโครงสร้างที่มีความเสถียรทางเทอร์โมไดนามิกส์ เรียกลักษณะนี้ว่า association colloids เช่น micelles bilayers vesicles และ reverse micelles (รูปที่ 2.8) การจัดเรียงตัวของโครงสร้างเหล่านี้เพื่อลดบริเวณสัมผัสระหว่างส่วน nonpolar tails ของโมเลกุลสารกับน้ำ ชนิดของ association colloids ของสารจะขึ้นกับความมีขี้และรูปร่างของ โมเลกุล



รูปที่ 2.8 ลักษณะการจัดเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิว

ที่มา: McClements (2005)

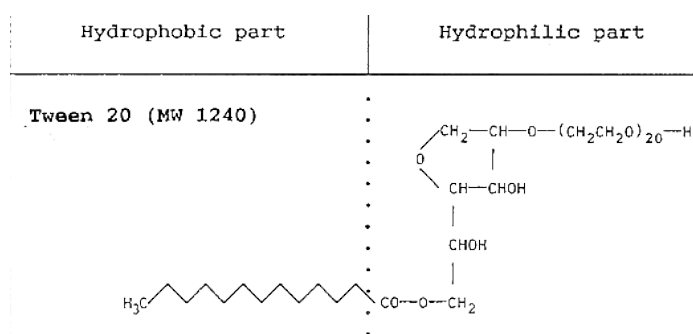
ในงานวิจัยนี้เลือกเป็นสารในสารลดแรงตึงผิวในกลุ่ม polysorbate ที่มีส่วนที่ชอบน้ำมาก จึงสามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งสมบัติการละลายของ polysorbate ขึ้นกับกรดไขมัน เนื่องจากในทางการค้ากำหนดความยาวของสาย ethylene oxide ให้คงที่ 20 โมลต่อสาย ซึ่งทำให้โครงสร้างมีความเป็นขี้สูง Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate หรือชื่อทางการค้า Tween 20 มีกรดไขมันสายสั้นเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้สามารถละลายน้ำได้และมีค่า HLB สูง คือ 16.7 จึงจัดเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบน้ำมันในน้ำ (ตารางที่ 2.2) ซึ่งค่า HLB เป็นค่าที่คำนวณสัดส่วนของส่วนที่ชอบน้ำ และส่วนที่ชอบน้ำมันในสารลดแรงตึงผิว ถ้าค่า HLB มีค่าอยู่ในช่วง 10-18 จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบน้ำมันในน้ำ แต่ถ้าค่า HLB อยู่ในช่วง 3-6 จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบน้ำในน้ำมัน

ตารางที่ 2.2 ชื่อและลักษณะทางกายภาพของ อีธอกซีเลทเอสเทอร์ (ethoxylated esters)

ที่มา: Whitehurst (2004)

Generic name	Common name	Other name	Moles of EO/ester	Physical form (25°C)	HLB* (±1)
Polysorbate 20	Tween 20	Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate	20	Liquid	16.7
Polysorbate 40	Tween 40	Polyoxyethylene (20) sorbitan monopalmitate	20	Liquid	15.6
Polysorbate 60	Tween 60	Polyoxyethylene (20) sorbitan monostearate	20	Gel	14.9
Polysorbate 80	Tween 80	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate	20	Liquid	15.0
Polysorbate 65	Tween 65	Polyoxyethylene (20) sorbitan tristearate	20	Solid	10.5
Polysorbate 85	Tween 85	Polyoxyethylene (20) sorbitan trioleate	20	Liquid	11.0
Polglycerate 60	Ethoxylated mono and diglycerides	Polyoxyethylene (20) mono- and diglycerides of fatty acids	20	Liquid	13.0
	Myrj-45	Polyoxyethylene (8) stearate	8	Gel	11.1

โครงสร้างของ Tween 20 พบว่าประกอบด้วยส่วน hydrophilic ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำ และส่วน hydrophobic ซึ่งเป็นส่วนที่ชอบน้ำมัน ทำให้สามารถจับได้ทั้งน้ำและน้ำมัน (รูปที่ 2.9) จากลักษณะโครงสร้างตัวทำอิมัลชันจึงชอบอยู่ที่ผิวหน้าระหว่าง 2 ภูมิภาค และช่วยลดแรงดึงระหว่างผิวประจัน ส่งผลให้อนุภาคน้ำมันสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ จึงเกิดเป็นอิมัลชันขึ้น



รูปที่ 2.9 สูตรโครงสร้าง Tween 20

ที่มา: Esser (1988)

ทางด้านความปลอดภัย พบว่า polysorbates อนุญาตให้ใช้ในอาหารได้ในหลายประเทศ แต่ในประเทศตะวันออกกลางและญี่ปุ่น ไม่อนุญาตให้ใช้ polysorbates แม้ว่าในประเทศสหรัฐอเมริกา และยุโรปอนุญาตให้ใช้ polysorbates แต่จะต้องมีการควบคุมปริมาณในการใช้ ซึ่ง Joint

FAO/WHO กำหนดปริมาณ polysorbates ที่ควรบริโภคต่อวัน อยู่ในช่วง 0-25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว เนื่องจากการใช้ polysorbates ในปริมาณสูง สามารถทำให้เกิดท้องเสียได้ นอกจากนี้ European Commission, Scientific Committee on Food ตระหนักถึงความไม่บริสุทธิ์ของสาร ethylene oxide และสารเจือปนอื่นที่อยู่ใน polysorbates ถึงแม้ว่าในงานวิจัยบางฉบับ รายงานว่า ethylene oxide ใน polysorbates มีความปลอดภัย และไม่ทำให้เกิดสารก่อมะเร็งขึ้น แต่สาร 1,4-dioxane และ mono-,di-ethylene glycol ยังไม่มีงานวิจัยรับรองความปลอดภัย ดังนั้น Commission Directive 2003/95/EC กำหนดปริมาณ ethylene oxide ใน polysorbates ให้น้อยกว่า 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว (mg/kg) และสาร 1,4-dioxane และ mono-,di-ethylene glycol กำหนดให้ไม่เกิน 5 mg/kg และ 0.25 mg/kg ตามลำดับ สำหรับ Tween 20 (Whitehurst, 2004)

2.3.4 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของอิมัลชัน

ในช่วงทศวรรษนี้ งานวิจัยที่ศึกษาความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ของอิมัลชันเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากในบางงานวิจัย พบว่าการทำอิมัลชัน การเคลือบ หรือการห่อหุ้มน้ำมัน สามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ เช่น การห่อหุ้มน้ำมันด้วยไซเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (beta-cyclodextrin, BCD) ซึ่งน้ำมันกานพลู และน้ำมันอบเชย ถูกห่อหุ้มด้วย BCD โดยใช้วิธีการกวนผสม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมา Freeze-drying ซึ่งขนาดของน้ำมันกานพลูและน้ำมันอบเชย มีค่าเท่ากับ 1.398 และ 1.390 μm ตามลำดับ และจากการศึกษาสำหรับฤทธิ์ด้านการเจริญของ *S. Typhimurium* พบว่าค่า MIC ของน้ำมันกานพลูที่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD (281 $\mu\text{g/mL}$) ซึ่งมีค่าน้อยกว่าน้ำมันกานพลูสกัด หรือน้ำมันกานพลูที่ไม่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD (มากกว่า 1000 $\mu\text{g/mL}$) ส่วนใน *L. innocua* ค่า MIC ของน้ำมันกานพลูที่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD มีค่าน้อยกว่าน้ำมันกานพลูสกัด คือ 281 และ 2000 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ และจากการศึกษาในน้ำมันอบเชยใน *S. Typhimurium* พบว่าค่า MIC ของน้ำมันอบเชยที่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD มีค่าน้อยกว่าน้ำมันอบเชยสกัด คือ 166 และ 400 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ แต่ค่า MIC ใน *L. innocua* ของน้ำมันอบเชยที่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD มีค่าน้อยกว่าน้ำมันอบเชยสกัด คือ 166 และ 500 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์ด้านของยูจีนอล ซึ่งเป็นสารที่พบมากในน้ำมันกานพลู โดยค่า MIC ของยูจีนอลที่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD ใน *S. Typhimurium* มีค่าเท่ากับ 693 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ายูจีนอลที่ไม่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD ที่มีค่ามากกว่า 1000 $\mu\text{g/mL}$ สำหรับ *L. innocua* พบว่าค่า MIC ของยูจีนอลที่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD ใน *S. Typhimurium* เท่ากับ 1155 $\mu\text{g/mL}$ ซึ่งมีค่าน้อยกว่ายูจีนอลที่ไม่ถูกห่อหุ้มด้วย BCD มีค่าเท่ากับ 2000 $\mu\text{g/mL}$ ดังนั้น การห่อหุ้มน้ำมันหอมระเหยด้วย BCD ทำให้มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าการใช้ น้ำมันหอมระเหยโดยตรง (Hill, Gomes, and Taylor, 2013) นอกจากนี้ในงานบางวิจัย พบว่าการห่อหุ้มหรือทำอิมัลชันของสารบริสุทธิ์หรือน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น การห่อหุ้มยูจีนอลด้วยเวย์โปรตีน

ไอโซเลท (WPI) ที่ผสมร่วมกับมอลโตเดกซ์ตริน (maltodextrin, MD) จากนั้นลดขนาดของยูจีนอลด้วย homogenizer ที่ 15000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที และ spray dry เก็บไว้ที่ -18°C ซึ่งขนาดอนุภาคของยูจีนอลที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย WPI และ MD เท่ากับ 127 nm และค่า MBC ของยูจีนอลที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย WPI และ MD ใน *E. coli* O157:H7 มีค่าเท่ากับ 1.75 g/L ซึ่งมากกว่าค่า MBC ของยูจีนอลบริสุทธิ์ ซึ่งเป็นยูจีนอลที่ไม่ได้ห่อหุ้มด้วย WPI และ MD ที่มีค่าเท่ากับ 1.5 g/L สำหรับ *L. monocytogenes* ค่า MBC ของยูจีนอลที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย WPI และ MD มีค่ามากกว่าการใช้ยูจีนอลบริสุทธิ์ มีค่าเท่ากับ 2.0 และ 1.75 g/L ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของยูจีนอลที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย WPI และ MD ในนมผงขาดมันเนย และนมที่มีไขมันนมร้อยละ 2 สำหรับ *E. coli* O157:H7 พบว่าค่า MBC ของยูจีนอลที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย WPI และ MD และยูจีนอลบริสุทธิ์ ในนมผงขาดมันเนย และนมที่มีไขมันนมร้อยละ 2 มีค่าเท่ากัน คือ 4.5 และ 5.5 g/L ตามลำดับ ใน *L. monocytogenes* พบว่าค่า MBC ของยูจีนอลที่ผ่านการห่อหุ้มด้วย WPI และ MD และยูจีนอลบริสุทธิ์ ในนมทั้งสองชนิด มีค่าเท่ากัน คือ 6.5 และ 6.5 g/L ดังนั้น การห่อหุ้มยูจีนอลด้วย WPI และ MD ไม่ได้ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเกิดการละลายของยูจีนอลที่ห่อหุ้มด้วย WPI และ MD ที่ไม่ดีพอ ทำให้เกิดการไม่กระจายตัวของยูจีนอลจึงส่งผลให้ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของยูจีนอลที่ห่อหุ้มด้วย WPI และ MD ที่ลดลง (Shah and Zhong, 2013) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในบางงานวิจัย พบว่าจุลินทรีย์เป็นสารแขวนลอยที่มีขนาด 0.25-10 μm สามารถเป็นสารต้านจุลินทรีย์ได้ด้วยตัวเอง เนื่องจากมีการจับน้ำไว้ในโครงสร้างของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้น้ำได้ ดังนั้น ระบบของจุลินทรีย์จึงมีสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Friberg, 1984; Bortoleto et al., 1998)

2.4 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่พบในอาหารสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.4.1 แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

แบคทีเรียก่อโรคในอาหารนั้น เป็นปัญหาสุขภาพหลักของประชากรในประเทศต่างๆ เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ สำหรับประเทศไทย พบว่าจำนวนครั้งของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในปี 2552 ได้รับรายงาน โรคอาหารเป็นพิษ จำนวน 103,420 ราย อัตราป่วย 162.98 ต่อประชากรแสนคน มีผู้เสียชีวิต 1 ราย และจากข้อมูลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร จากห้องปฏิบัติการฝ่ายตรวจวินิจฉัยแบคทีเรียทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จำนวนทั้งสิ้น 2,588 ตัวอย่าง พบเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 493 ตัวอย่าง ได้แก่ *Aeromonas* spp. ร้อยละ 39.94 *Salmonella* (group B C D E G I K) ร้อยละ 12.56 *E. coli* ร้อยละ

11.43 *Plesiomonas shigelloides* ร้อยละ 7.57 *Vibrio parahaemolyticus* ร้อยละ 7.41 *B. cereus* ร้อยละ 6.76 *Vibrio* (*V. fluvialis* *V. alginoloticus* *V. furnissii* *V. mimicus* *V. spp.*) ร้อยละ 6.44 *Staph. aureus* ร้อยละ 4.99 *V. cholerae* Non O1 Non O139 และ *Edwardsiella tarda* ร้อยละ 1.45 (สำนักกระบาดวิทยา, 2552) แบคทีเรียก่อโรคในอาหารมักพบได้ตามสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน โคลน สิ่งปฏิกูล แหล่งน้ำ แผลง สัตว์พื้นทะเล และสัตว์ชนิดอื่นที่เป็นพาหะ (Hui et al., 2001) ดังนั้น วัตถุประสงค์ที่ใช้ประกอบหรืออาหารที่มีกระบวนการที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ก็อาจจะพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคในวัตถุดิบหรืออาหารได้ ซึ่งเนื้อสัตว์ก็เป็นวัตถุดิบอีกชนิดที่สามารถพบการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคได้ ตัวอย่างของแบคทีเรียก่อโรคที่พบในเนื้อสัตว์ (Suo et al., 2010; Velusamy et al., 2010) ได้แก่

2.4.1.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 37°C สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ และซากสัตว์เน่าเปื่อย และก่อให้เกิดโรค Salmonellosis ซึ่งมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน เป็นไข้

2.4.1.2 *E. coli*

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน พบได้ในไข่ สัตว์ปีก เนื้อสัตว์ อาหารทะเล อาหารประเภทนม และยังสามารถพบอาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่นจึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นครุภัณฑ์บ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร เกิดโรค Hemorrhagic colitis ซึ่งมีอาการปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน เป็นไข้ และถ่ายเป็นเลือด

2.4.1.3 *Staph. aureus*

Staph. aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม และพบได้ในอาหารประเภทนมและเนื้อสัตว์ อาหารที่ผ่านการสัมผัสและเคลื่อนย้ายด้วยมือมนุษย์ รวมทั้งอาหารที่ไม่ได้ทำให้สุกก่อนบริโภค *Staph. aureus* สร้างสารพิษแบบเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ชักนำให้เกิดการหลั่งของเหลวขึ้นภายในลำไส้หรือทางเดินอาหาร เป็นผลทำให้เกิดอาการท้องเดิน

2.4.2 แบคทีเรียทำให้อาหารเสื่อมเสีย

แบคทีเรียทำให้อาหารเสื่อมเสีย เป็นแบคทีเรียสามารถทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงไป จนไม่เป็นที่พึงประสงค์ของผู้บริโภค เช่น ในเนื้อสัตว์ พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ ทำให้อาหารเน่าเหม็น

กลิ่นเหม็นเปรี้ยว สีของเนื้อมีกลิ่น เกิดเมือกที่ผิวหน้าเนื้อ เป็นต้น ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (Nollet and Toldra, 2008; Suo et al., 2010; Velusamy et al., 2010) ได้แก่

2.4.2.1 *Pseudomonas* spp.

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มีรูปร่างแท่ง สามารถพบในดิน น้ำ ขยะ หรือในพืช ซึ่ง *Pseudomonas* spp. ทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ในเนื้อสัตว์ ส่วน *Ps. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรง แต่เป็นโรคติดเชื้อที่พบในโรงพยาบาล โดยเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคปอดบวมในโรงพยาบาล

2.4.2.2 *B. subtilis*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน พบได้ตามพื้นดินและน้ำ สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนได้ที่อยู่ในอาหาร ทำให้อาหารเน่าเสียได้

เนื้อสัตว์ที่บริโภคควรปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้น จึงต้องกำหนดปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในเนื้อสัตว์ เช่น จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด *Staph. aureus* และ *Salmonella* spp. เป็นต้น (สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์, 2554) และจากการสุ่มตรวจเนื้อหมูจากเชิงหมูและโรงงานฆ่าสัตว์ในจังหวัดสกลนคร ปี 2550-2553 เนื้อสุกรจากเชิงจำหน่ายเนื้อสัตว์พบเชื้อมากกว่าโรงฆ่าสัตว์ โดยตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. *E.coli* coliform และ total bacteria count จากเชิงจำหน่ายเนื้อสัตว์ ร้อยละ 43.75 12.5 18.75 และ 18.75 ตามลำดับ และตรวจพบจากโรงฆ่าสัตว์ ร้อยละ 36.8 0 10.52 และ 18.75 ตามลำดับ และไม่พบ *Staph. aureus* ในการตรวจสอบ ส่วน *Salmonella* spp. ที่พบในเนื้อสุกร ส่วนใหญ่เป็น group B C และ E (วิเชษฐ ชาติทองไชย และรัชยา หมั่นจรรยา, 2554) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์ มีหลายปัจจัย เช่น สภาพในการเก็บ โดยการเก็บเนื้อหมูในที่ที่มีอากาศ อุณหภูมิ 4°C พบการเจริญของ *Brochothrix thermosphacta* และ *Pseudomonas* sp. มากที่สุด ส่วนการเก็บในสภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า *Lactobacillus* sp. สามารถเจริญได้ดีที่สุด ส่วน *B. thermosphacta* และ *Pseudomonas* sp. สามารถเจริญได้น้อยกว่า *Lactobacillus* sp. เนื่องจาก *Lactobacillus* sp. สามารถสร้างกรดได้ ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นสามารถเจริญได้น้อยลง (Li et al., 2006) นอกจากนี้ อุณหภูมิก็ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยที่อุณหภูมิ 10°C มีอัตราการเจริญของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด coliform *Pseudomonas* spp. และ *B. thermosphacta* ในเนื้อหมู สูงกว่าที่อุณหภูมิ 4°C (Liu et al., 2006) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการลดจำนวนจุลินทรีย์บนเนื้อสัตว์เริ่มต้น ก็สามารถช่วยชะลอการเสื่อมเสียของอาหารได้

2.4.3 วิธีการลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคและที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

แบคทีเรียที่พบในอาหารส่วนใหญ่มักเกิดจากการปนเปื้อนข้ามในระหว่างขั้นตอนการเตรียมและผลิตอาหาร เช่น ในขั้นตอนฆ่าหั่นหมู มักทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ผิวหนัง เนื้อหมู ดังนั้น ขั้นตอนการลดจำนวนแบคทีเรียจึงมีส่วนช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นในอาหารลง ซึ่งวิธีการลดจำนวนจุลินทรีย์ (Nollet and Toldra, 2008) ได้แก่

2.4.3.1 การฆ่าหั่นด้วยวิธีที่ถูกสุขลักษณะ

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์มักมาจากผิวหนังและอวัยวะภายในของเนื้อหมู ดังนั้น ในการฆ่าหั่นจึงมักต้องแยกส่วนหนังและอวัยวะภายในออกก่อน และต้องทำการฆ่าหั่นในสถานที่ที่ถูกสุขลักษณะด้วย

2.4.3.2 การทำความสะอาดด้วยน้ำ

การทำความสะอาดด้วยน้ำที่มีแรงดัน มักใช้กำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่ที่หมูออก และยังสามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้บางส่วน

2.4.3.3 การล้างทำความสะอาดด้วยน้ำร้อน

การใช้น้ำร้อน (80-96°C) สามารถลดจำนวนแบคทีเรียลงได้ 1-2 Log CFU/cm² แต่ต้องระวังเรื่องการเปลี่ยนสีของเนื้อหมู

2.4.3.4 การใช้คลอรีน

การใช้คลอรีนสามารถลดจำนวนแบคทีเรียลงได้ถึง 2 Log CFU/cm² ซึ่งประสิทธิภาพของคลอรีนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและ pH ของน้ำ เป็นต้น

ในปัจจุบันผู้บริโภคต้องการอาหารที่มีคุณภาพที่ดี สดใหม่ และต้องมีการเติมสารเจือปนให้น้อยที่สุด ดังนั้น ผู้ผลิตจึงหันมาใช้สารที่สกัดได้จากธรรมชาติในอาหารมากขึ้น เนื่องจากเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค (Gound, 1996) เช่น สารต้านจุลินทรีย์จากสารสกัดจากชาเขียว โดยการผสมสารสกัดจากชาเขียว ที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 กับสารละลาย hsian-tsoa leaf gum ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารเคลือบ และนำไปฉีดพ่นลงในเนื้อหมูสไลซ์และผัก romaine hearts เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4.2±0.1°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เนื้อหมูสไลซ์ที่เคลือบด้วยชาเขียว ซึ่งสกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 สามารถลดจำนวน *B. cereus* ได้ 3.42 และ 3.58 log CFU/g ตามลำดับ ส่วนผัก romaine hearts ที่เคลือบด้วยชาเขียว ซึ่งสกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ได้เท่ากัน คือ 5.98 log CFU/g (Chiu and Lai, 2010) นอกจากการใช้สารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติโดยตรงแล้ว ยังมีการศึกษาฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพที่ผสมน้ำมันหอมระเหย ซึ่งทำให้ได้ฟิล์มที่มีสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial packaging) ที่สามารถยืดอายุการเก็บและการต้านจุลินทรีย์ที่ผิวหนังของอาหารได้ (Rooney, 1995) เช่น ฟิล์มที่ผสมน้ำมันหอมระเหยออริกานอ ฟิล์มที่ผสมน้ำมันหอมระเหยพิเมนโต และฟิล์มที่ผสมน้ำมันหอมระเหยออริกานอและพิเมนโต ที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1 สามารถลดจำนวนของ *Pseudomonas* spp.

บนเนื้อวัวสไลซ์ ได้ 0.95 0.30 และ 0.45 log CFU/cm² ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 7 วัน และสำหรับ *E. coli* O157:H7 พบว่าฟิล์มที่ผสมน้ำมันหอมระเหยออริกาน และฟิล์มที่ผสมน้ำมันหอมระเหยออริกานและพิเมนโต สามารถลดจำนวนได้ 1.12 และ 0.60 log CFU/cm² ตามลำดับ แต่ในฟิล์มที่ผสมน้ำมันหอมระเหยพิเมนโต พบว่าไม่สามารถต้านการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ได้ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 7 วัน (Oussallah et al., 2004) ส่วนฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกระเทียม ที่ความเข้มข้น มากกว่าร้อยละ 2 โดยน้ำหนัก สามารถต้านการเจริญของ *E. coli* O157:H7 *Staph. aureus* *S. Enteritidis* *L. monocytogenes* และ *Lactobacillus plantarum* ได้ดี แต่ในขณะที่ฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมน้ำมันออริกาน ที่ความเข้มข้น มากกว่าร้อยละ 1 (โดยน้ำหนัก) สามารถต้านการเจริญแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิดได้ดี (Seydim and Sarikus, 2006) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสารต้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถต้านการเจริญ จุลินทรีย์ที่ไม่เท่ากัน ดังนั้น ในการใช้สารต้านจากจุลินทรีย์จากธรรมชาติ จึงต้องคำนึงถึงชนิดของ จุลินทรีย์ที่ต้องการศึกษาร่วมด้วย

บทที่ 3

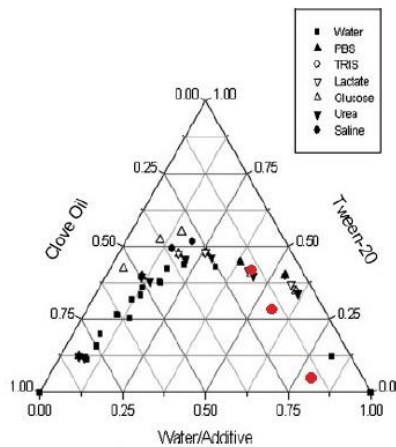
ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ศึกษาผลของความเข้มข้น Tween 20 ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย ขนาดและอนุภาคน้ำมัน และความหนืดของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

3.1.1 การเตรียมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำโดยใช้ Tween 20 เป็นตัวทำอิมัลชัน

3.1.1.1 การเตรียมสารละลาย Tween 20 ในน้ำ

ละลาย Tween 20 (Ajax Finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand) ในน้ำ กลั่นปลอดเชื้อ โดยแปรความเข้มข้นของ Tween 20 เป็นร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก จาก phase diagram ของ Gupta and Moulik (2007) ตามรูปที่ 3.1 เช่าเบาๆ ให้ Tween 20 ละลายอย่างช้าๆจน Tween 20 ละลายหมดที่อุณหภูมิห้อง ($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$) ระวังไม่ให้สารละลายเกิดฟอง



รูปที่ 3.1 ตำแหน่งของอิมัลชันที่มีความเข้มข้น น้ำมันกานพลูคงที่ที่ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และที่ความเข้มข้น Tween 20 ที่ร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ใน phase diagram

คัดแปลงจาก Gupta และ Moulik (2007)

3.1.1.2 การเตรียมอิมัลชัน

ชั่งและผสมน้ำมันกานพลู ซึ่งประกอบด้วยยูจีนอลร้อยละ 96.36 รายละเอียด ส่วนประกอบของน้ำมันกานพลูแสดงในภาคผนวก ก (บริษัทอุตสาหกรรมเครื่องหอม ไทย-จีนจำกัด ถนนพหลโยธิน ประเทศไทย) ลงในสารละลาย Tween 20 ในน้ำ เพื่อให้ได้ความ

เข้มข้นของน้ำมันกานพลูในอิมัลชันคงที่ที่ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และแปรความเข้มข้นของ Tween 20 ในอิมัลชันเป็นร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก พร้อมกวนให้หยดน้ำมันกานพลูแขวนลอยในสารละลาย Tween 20 ในน้ำ จากนั้นทำให้หยดน้ำมันมีขนาดเล็กลงโดยใช้เครื่องไฮโมจิไนซ์ (Ystralgmbh SERIES W10/25, Ballrechten-Dottingen, Germany) ที่ 22000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที (เปิดเครื่อง 5 นาที สลับกับปิดเครื่อง 5 นาที จนครบตามเวลาที่กำหนด) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องคลื่นเหนือเสียง (Hielscher UP400S ultrasonic processor, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany) ที่กำลัง 400 Watt 80% amplitude cycle = 0.8 โดยใช้ probe Horn H22 เส้นผ่านศูนย์กลาง 22 mm เป็นเวลา 5 นาที โดยหล่อภาชนะที่ใช้ด้วยน้ำผสมน้ำแข็งตลอดเวลาที่ใช้เครื่องไฮโมจิไนซ์และคลื่นเหนือเสียงเพื่อถ่ายเทความร้อน

3.1.2 การศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย

3.1.2.1 การเตรียมแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ 5 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 *Escherichia coli* ATCC 25922 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยและตรวจสอบอาหาร ทางจุลชีววิทยา ณ ชั้น 16 อาคารมหามกุฏ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียจาก stock culture ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 1 loop ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Nutrient Broth (NB, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ปริมาตร 10 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะมีความเข้มข้นของแบคทีเรียประมาณ 10^7 - 10^8 CFU/ml

3.1.2.2 ค่า MIC และ MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูหรือน้ำมันกานพลู

ใช้วิธีการทดสอบแบบ broth macro dilution assay ตามวิธีของ Ramos et al. (2012) โดยนำสารที่เตรียมได้ในข้อ 3.1.1.2 มาเจือจางกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ โดยแต่ละหลอดที่มีน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 1 ml และหลอดสุดท้ายให้ดูดสารทิ้งไป 1 ml ด้วยเทคนิค serial doubling dilution ในช่วงความเข้มข้น 0.48–500 μ L/ml จากนั้นเติม NB ปริมาตร 1 ml ลงในแต่ละหลอด ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 2 ml ถ่ายเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.2.1 ปริมาตร 5 μ L ลงในอาหารแต่ละหลอด นำไปบ่มที่ 37 °C นาน 18 ± 2 ชั่วโมง ในสภาพมีอากาศ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ไม่ผสมเชื้อ

เป็นตัวควบคุม ให้สังเกตหลอดสุดท้ายที่ไม่ขุ่น อ่านความเข้มข้น ของสารทดสอบของ หลอดนี้เป็นค่า Minimum Inhibitory Concentration (MIC) และบันทึกหน่วยเป็น $\mu\text{g/ml}$

ตรวจสอบหาค่า Minimum Bactericidal Concentration (MBC) โดยปิเปต $10 \mu\text{l}$ จากหลอดที่ไม่ขุ่นและ spread ลงบนอาหารแข็ง NA บ่มที่ 37°C นาน 18 ± 2 ชั่วโมง ใน สภาพมีอากาศ ประเมินได้จากการสังเกตความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญของเชื้อบน อาหารแข็ง NA ถือว่าความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC โดยคิดเป็นความเข้มข้น น้ำมัน กานพลูในหน่วย $\mu\text{g/ml}$ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.2.3 การเกิด clear zone ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูหรือน้ำมันกานพลูต่อฤทธิ์ต้าน การเจริญของแบคทีเรีย

ใช้วิธีการทดสอบแบบ disc diffusion assay โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ramos et al. (2012) โดย spread แบคทีเรียจากข้อ 3.1.2.1 บนอาหาร NA จากนั้นเจือจางอิมัลชัน ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.1.2 โดยใช้น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ และปิเปตอิมัลชันที่ความเข้มข้น อิมัลชันต่อสารละลายทั้งหมด ในช่วง $0.48\text{-}500 \mu\text{g/ml}$ บน paper disc (ขนาด 0.6 cm) ปริมาณ $15 \mu\text{L}$ ที่วางบนอาหาร NA บ่มที่ 37°C นาน 18 ± 2 ชั่วโมง ในสภาพมีอากาศ ตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (cm) ของ clear zone ที่เกิดขึ้น รอบ paper disc ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ โดยรายงานความสามารถในการต้าน แบคทีเรียเป็นความเข้มข้นอิมัลชัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก) ในความเข้มข้นของอิมัลชันที่ ทำให้เกิด clear zone รอบ paper disc มากกว่า 0.8 cm ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.3 การวิเคราะห์ขนาด การกระจายตัว และลักษณะของอนุภาคน้ำมัน

นำอิมัลชันที่ได้จากข้อ 3.1.1.2 มาวิเคราะห์ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยแบบค่าเฉลี่ยโดย ปริมาตร (mean volume diameter, $D [4,3]$) และการกระจายขนาดของอนุภาคน้ำมัน ด้วยเครื่อง วิเคราะห์ขนาดอนุภาค (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Ltd., Worcestershire, UK) และ ค่า refractive index ของน้ำมันกานพลู เท่ากับ 1.5352 โดยใช้ deionize water เป็น liquid dispersant (Goloub and Pugh, 2005) ค่า $D[4,3]$ เป็นการคำนวณขนาดของอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย จากปริมาตร ทรงกลมของอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย สำหรับภาพอนุภาคน้ำมันในอิมัลชันต่างๆ ที่ได้จากข้อ 3.1.1.2 โดย การผสมอิมัลชันในน้ำหมึกสีน้ำเงินที่ละลายในน้ำ จากนั้นนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ (trinocular phase contrast microscope, Olympus BX51, Tokyo, Japan) และบันทึกภาพด้วยโปรแกรม Vcapture (SmungMug, Inc., Mountain View, California, USA) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.4 การวัดค่าความหนืด

นำอิมัลชันจากข้อ 3.1.1.2 มาวัดค่าความหนืดด้วยเครื่อง Rotational Viscometer (ALPHA SERIES, Fungilab, S.A., Barcelona, Spain) ที่ความเร็วในการหมุน 100 รอบต่อนาที โดยใช้หัววัด L2 และบันทึกค่าในหน่วย mPa·s ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำต่อสมบัติทางกายภาพ และฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท

3.2.1 การเตรียมฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู

ผสมเวย์โปรตีนไอโซเลท (Davisco Foods International, Inc., Minnesota, U.S.A) ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก กับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และกวนผสมให้เข้ากันอย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 30 นาที และผสมกับกลีเซอรอล (Qrec Grade AR, Auckland, New Zealand) โดยใช้อัตราส่วนเวย์โปรตีนต่อกลีเซอรอล คือ 3:2 กวนให้เข้ากันเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นผสมกับอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่ได้จากข้อ 3.1.1.2 โดยแปรปริมาตรเป็น ร้อยละ 1 3 5 และ 7 โดยน้ำหนักของสารละลายฟิล์ม ตามลำดับ และใช้ฟิล์มเวย์ไอโซเลทที่ไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูและฟิล์มที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 เพียงอย่างเดียวเป็นตัวอย่างควบคุม ทำแห้งฟิล์มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บฟิล์มที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50±2% สำหรับการทดสอบสมบัติทางกายภาพของฟิล์ม ต้องเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิห้อง ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50±2% เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ

3.2.2 การศึกษาสมบัติทางกายภาพฟิล์ม

3.2.2.1 ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor permeability, WVP)

วัดค่า WVP ตามวิธีของ Ramos et al. (2012) เติมน้ำกลั่น 15 ml ลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร จากนั้นตัดฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 cm เพื่อหุ้มถ้วย และชั่งน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น เก็บขวดตัวอย่างในตู้ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 50 ที่อุณหภูมิห้อง (25°C) และชั่งน้ำหนักขวดตัวอย่างเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และคำนวณหาค่า WVP ($\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$) ของแผ่นฟิล์ม ตามสมการที่ 3.1 ดังนี้

$$\text{WVP} = \frac{\Delta W \times FT}{S \times \Delta p} \dots\dots\dots(3.1)$$

เมื่อ Δw คือ น้ำหนักน้ำที่สูญเสียไปต่อวัน โดยได้ความชันของสมการเส้นตรง
ระหว่างน้ำหนักน้ำที่สูญเสียต่อชั่วโมง

FT คือ ความหนาของฟิล์ม หน่วย mm

S คือ พื้นที่ผิวหน้าฟิล์ม หน่วย mm²

Δp คือ ความแตกต่างของความดันไอที่ผิวหน้าฟิล์ม หน่วย kPa

3.2.2.2 วอเตอร์แอกติวิตี (water activity, a_w)

วัดค่า a_w โดยใช้เครื่องวัด a_w (Aqua Lab model series 3 TE, Decagon Devices, Inc., Washington, USA) โดยตัดฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 ที่มีขนาด 2×2 cm และวัดค่าตัวอย่างละ 4 ซ้ำ

3.2.2.3 การหาความชื้น

หาความชื้นฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 ด้วยเครื่องวัดความชื้น (Moisture Analyzer MJ 33, Mettler-Toledo AG Laboratory & Weighing Technologies CH-8606 Greifensee, Switzerland) ทำการทดลองตัวอย่างละ 4 ซ้ำ และรายงานเป็นร้อยละความชื้น

3.2.2.4 ความหนา

วัดความหนาของฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 ที่ความแตกต่างกัน 9 จุดของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ digital micrometer (Mitutoyo Absolute, Tester Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) รายงานผลในหน่วย mm ทำการทดลองตัวอย่างละ 9 ซ้ำ (อุปกรณ์สิริภัทรารธรรม, สุวิศสา พงษ์อำไพ และสุภาภรณ์ คักกลาส, 2552)

3.2.2.5 ค่าความแข็งแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดออก

ตัดฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 ให้มีขนาด 3×12 เซนติเมตร วัดเครื่อง Instron Universal Testing machine (Instron Corporation, Canton, Massachusetts, USA) ทำการทดลองตัวอย่างละ 9 ซ้ำ สำหรับค่าความแข็งแรงดึงและเปอร์เซ็นต์ความยืด คำนวณหาค่าความแข็งแรงดึงและเปอร์เซ็นต์การยืดออก ตามสมการที่ 3.2 และ 3.3 ตามลำดับ (ASTM, 2002) ดังนี้

$$\text{ค่าความแข็งแรงดึง} = \frac{T \times g}{\text{area}} \dots\dots\dots(3.2)$$

เมื่อ T คือ ค่าความต้านทานแรงดึง (gram-force)

g คือ ค่าแรงโน้มถ่วงโลก (9.8 m/s^2)

Area คือ พื้นที่ผิวฟิล์มที่ตั้งฉากกับแรงดึง (m^2)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยืดออก} = \frac{\Delta l}{l_0} \times 100 \dots\dots\dots(3.3)$$

เมื่อ Δl คือ ผลต่างของฟิล์มที่ยืด (mm)

l_0 คือ ความยาวของฟิล์มเริ่มต้น (mm)

3.2.2.6 สมบัติทัศนศาสตร์

3.2.2.6.1 การวัดค่าความขุ่น

ตัดฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 ให้มีขนาด $1 \times 4 \text{ cm}$ และใส่ถ้วยสำหรับเครื่องวัดการดูดกลืนแสง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm โดยใช้ถ้วยสำหรับเครื่องวัดการดูดกลืนแสงเป็นตัวอย่างควบคุม และคำนวณตามสมการของ Han และ Floros (1997) ทำการทดลองตัวอย่างละ 4 ซ้ำ จากนั้นคำนวณค่าความขุ่น ตามสมการที่ 3.4 ดังนี้

$$\text{ค่าความขุ่น} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } 600 \text{ nm}}{\text{ความหนาของฟิล์ม (mm)}} \dots\dots\dots(3.4)$$

3.2.2.6.2 การวัดสี

วัดสีฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 ด้วยเครื่องวัดสี (Chroma meter CR-400, Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan) โดยใช้ระบบสี CIE lab และรายงานค่าเป็นค่า L^* หมายถึงความสว่าง (lightness) จากค่า $+L^*$ แสดงถึงสีขาว จนไปถึง $-L^*$ แสดงถึงสีดำ แกน a^* จะบรรยายถึงแกนสีจากเขียว ($-a^*$) ไปจนถึงแดง ($+a^*$) ส่วนแกน b^* จะบรรยายถึงแกนสีจากน้ำเงิน ($-b^*$) ไปเหลือง ($+b^*$) ทำการทดลองตัวอย่างละ 12 ซ้ำ

3.2.2.7 การวิเคราะห์ภาพพื้นผิวและตัดขวาง

ตัดฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 และนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ (trinocular phase contrast microscope, Olympus BX51, Tokyo, Japan) ที่กำลังขยาย 200 เท่า และบันทึกภาพด้วยโปรแกรม Vcapture (SmungMug, Inc., Mountain View, California, USA)

3.2.3 การเกิด clear zone ของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมสารต่างๆ ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย

ใช้วิธีการทดสอบแบบ disc diffusion assay โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ramos et al. (2012) โดย spread แบคทีเรียจากข้อ 3.1.2.1 บนอาหาร NA และตัดฟิล์มที่ได้จากข้อ 3.2.1 ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร จากนั้นวางบนอาหาร NA บ่มที่ 37°C นาน 18 ± 2 ชั่วโมง ในสภาพมีอากาศตรวจฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย และรายงานในหน่วยเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้น ในหน่วย cm ด้วยเวอร์เนียร์คาลิเปอร์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติในหัวข้อ 3.2 ซึ่งทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 17, Chicago IL, USA) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Fisher's Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

3.3 ศึกษาผลของการใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู กับเนื้อหมูสดสไลซ์ ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียบนเนื้อหมู และลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และความต้องการซื้อของผู้บริโภค

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูสดสไลซ์

เลือกฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู จากข้อ 3.2 มาทดสอบฤทธิ์ด้านแบคทีเรียและประสาทสัมผัสกับเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ซื้อจากท็อปส์ ซูเปอร์มาร์เก็ต โดยเลือกเนื้อหมูส่วนสันใน ที่ผ่านการชำแหละและแช่ซาก 48 ชั่วโมง และตัดให้มีขนาดประมาณ 4×5 cm จากนั้นตัดฟิล์มให้มีขนาด 5×6 cm และนำมาปิดผิวหน้าเนื้อหมูสดสไลซ์ทั้งด้านบนและล่าง หลังจากนั้นนำมาใส่ถุงพลาสติกพอลิโพรไพลีน และนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ± 1 °C จากนั้นทดสอบฤทธิ์ด้านแบคทีเรียและประสาทสัมผัส ที่อายุการเก็บ 0 24 72 120 และ 149 ชั่วโมงของเนื้อหมูสด และใช้เนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม เป็นตัวอย่างควบคุม

3.3.2 ฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย

ศึกษาแบคทีเรีย คือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count: TPC) coliform *E. coli* *Salmonella* spp. และ *Staph. aureus* ตามเกณฑ์จุลชีววิทยาของเนื้อสัตว์ดิบแช่เย็นและแช่แข็งของกรมปศุสัตว์ (สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์, 2554) แสดงในภาคผนวก ข ใช้วิธีการตรวจสอบหาจุลินทรีย์ดัดแปลงตามวิธีของ Liu, Yang and Li (2006)

การวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ใช้อาหาร nutrient agar สำหรับ *Salmonella* spp. ใช้อาหาร Salmonella Shigella Agar (SSA, Himedia, Mumbai, India) และนำมาทดสอบต่อใน Triple Sugar Iron Agar (TSI, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) ส่วน *Staph. aureus* ใช้อาหาร Baird-Parker agar (Himedia, Mumbai, India) ที่ผสม egg yolk tellurite ร้อยละ 5 สำหรับ *E. coli* และ coliform ใช้ compact dry (Nissui pharmaceutical CO., LTD, Tokyo, Japan) บ่มที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง การรายงานผล TPC *E. coli* Coliform *Staph. aureus* และ *Salmonella* spp. รายงานในหน่วยโคโลนีต่อกรัม (CFU/g) รายละเอียดวิธีวิเคราะห์และตรวจนับจุลินทรีย์ตามภาคผนวก ค

3.3.3 การประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัส

ใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 30 คน ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบ คือ เนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเว็ปโรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ซึ่งฟิล์มที่ปิดผิวหน้าเนื้อหมูถูกลอกออกก่อนนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัส การประเมินลักษณะประสาทสัมผัสด้านสีของเนื้อหมูที่เปลี่ยนแปลงไป ตามอายุการเก็บต่างๆ ซึ่งสีของเนื้อหมูเริ่มต้นมีค่า L^* อยู่ในช่วง 48-50 a^* อยู่ในช่วง 18-20 และ b^* อยู่ในช่วง 8-10 แหล่งแสงที่ใช้วัด คือ D65 และเมื่อเทียบกับมาตรฐานสีของเนื้อหมูของ National Pork Board (1999) ที่ใช้แหล่งแสง D65 สีของเนื้อหมูอยู่ที่เบอร์ 3 ตามรูปที่ 3.2 คะแนนที่ใช้ในการประเมินแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้ 1 คือ มีสีชมพูน้อยที่สุด 2 คือ มีสีชมพูน้อย 3 คือ มีสีชมพูปานกลาง 4 คือ มีสีชมพูมาก และ 5 คือ มีสีชมพูมากที่สุด ในระหว่างการทดสอบลักษณะประสาทสัมผัสด้านสีของเนื้อหมู ผู้ทดสอบจะได้รับมาตรฐานสีของเนื้อหมู เพื่อใช้ในการประกอบการตัดสินใจ สำหรับการประเมินการได้รับกลิ่นของเนื้อหมู แบ่งการทดสอบออกเป็น 2 กลิ่น คือ กลิ่นคาวของเนื้อหมู และกลิ่นน้ำมันกานพลูบนเนื้อหมู คะแนนที่ใช้ในการประเมินแบ่งออกเป็น 5 ระดับ ดังนี้ 1 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูน้อยที่สุด 2 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูน้อย 3 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูปานกลาง 4 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูมาก และ 5 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูมากที่สุด และการประเมินความต้องการซื้อเนื้อหมูของผู้บริโภค ใช้ระดับการให้คะแนน 5 ระดับ ดังนี้ 1 คือ ไม่ซื้อแน่นอน 2 คือ บางทีอาจจะไม่ซื้อ 3 คือ อาจจะซื้อ/ไม่ซื้อ 4 คือ บางทีอาจจะซื้อ และ 5 คือ ซื้อแน่นอน รายละเอียดวิธีการและแบบประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสแสดงในภาคผนวก ง



รูปที่ 3.2 สีมาตรฐานของเนื้อหมูสด ที่ใช้แหล่งสี D65

ที่มา: National pork board (1999)

3.3.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าทางสถิติในหัวข้อ 3.3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) วิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ ANOVA และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Fisher's Least Significant Difference (LSD) ที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของความเข้มข้น Tween 20 ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย ขนาดและอนุภาคน้ำมัน และความหนืดของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

งานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูที่ ร้อยละ 20 และแปรความเข้มข้น Tween 20 ออกเป็น 3 ระดับ คือ ร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ทำการศึกษาแบคทีเรียทั้งหมด 5 ชนิด คือ *B. subtilis* *E. coli* *Ps. aeruginosa* *Staph. aureus* และ *S. Typhimurium* ผลการทดสอบหาค่า MIC และ MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ โดยใช้วิธีทดสอบแบบ broth macro dilution test จากตารางที่ 4.1 พบว่าค่า MIC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่แปรความเข้มข้น Tween 20 เป็น 3 ระดับ คือ ร้อยละ 20 40 และ 60 ค่า MIC ของ *B. subtilis* สำหรับอิมัลชันน้ำมันกานพลูสูงกว่าค่า MIC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว เป็น 2, 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ สำหรับค่า MIC ของ *E. coli* สำหรับอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 มีค่าต่ำกว่า 2 เท่า เมื่อเทียบกับค่า MIC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 พบว่ามีค่า MIC ที่เท่ากับของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ส่วนค่า MIC ของ *Ps. aeruginosa* สำหรับอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 มีค่าเท่ากับค่า MIC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 พบว่ามีค่า MIC สูงกว่า 3 เท่า ส่วนค่า MIC ของ *Staph. aureus* สำหรับอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 มีค่าต่ำกว่า 2 และ 3 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า MIC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว แต่ในอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 พบว่ามีค่า MIC ที่เท่ากับค่า MIC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว และค่า MIC ของ *S. Typhimurium* พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 40 และ 60 ค่า MIC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูเพิ่มขึ้นเป็น 2 3 และ 4 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า MIC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณค่า MIC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูเป็นความเข้มข้นร้อยละของน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน เพราะน้ำมันกานพลูเป็นสารออกฤทธิ์ด้านแบคทีเรียในอิมัลชันน้ำมันกานพลู พบว่าการทำอิมัลชันน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด ได้ดีกว่าการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ยกเว้นในตัวอย่างที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 ใน *S. Typhimurium* เนื่องจากอิมัลชันน้ำมันกานพลูใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูน้อยกว่าในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อเทียบกับน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว การใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียวมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.48-3.90 $\mu\text{g/ml}$ และสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* และ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *E. coli* และสามารถต้านการเจริญของ *Ps. aeruginosa* และ *Staph. aureus* ได้น้อยที่สุด ซึ่งการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียวมีประสิทธิภาพฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียแถมลบได้ดี

เหมือนในแบคทีเรียแกรมบวก อาจเกิดจากอิมัลชันน้ำมันกานพลูสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี และเกิดการปลดปล่อยน้ำมันกานพลู ซึ่งน้ำมันกานพลูเป็นสารที่ไม่มีขั้วจึงสามารถจับกับไขมันหรือ lipopolysaccharide ได้ และทำให้ยูจีนอลที่อยู่บนผิวของน้ำมันกานพลูสามารถละลายน้ำและจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้โปรตีนเสียสภาพ และเกิดการรั่วที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นไขมันบาง แต่มีชั้นโปรตีนที่หนาทำให้เมื่อสัมผัสน้ำมันกานพลู ทำให้ยูจีนอลสามารถจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพไป และเกิดการรั่วที่ผนังเซลล์ได้ (Davidson et al., 2005; Terjung et al., 2012) ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 มีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.98-3.90 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในช่วง 0.20-0.78 $\mu\text{g/ml}$ และสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* *E. coli* *S. Typhimurium* และ *Staph. aureus* ได้ดีที่สุด แต่สามารถต้านการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 สามารถลดการใช้ความเข้มข้น น้ำมันกานพลูได้ 2.4-5.0 เท่า ซึ่งการทำอิมัลชันสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ อาจเกิดจาก Tween 20 ที่ล้อมรอบน้ำมันกานพลู ทำให้น้ำมันกานพลูสามารถละลายน้ำและมีการแพร่กระจายในน้ำได้ดีขึ้น ส่งผลให้น้ำมันกานพลูมีโอกาสที่เข้าไปสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีขึ้น แต่อิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 พบว่ามีประสิทธิภาพต้านการเจริญของแบคทีเรียลดลง ซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 1.95-15.63 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูอยู่ในช่วง 0.39-3.12 $\mu\text{g/ml}$ สามารถต้านการเจริญของ *E. coli* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *B. subtilis* *S. Typhimurium* และ *Staph. aureus* และสามารถต้านการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 สามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูได้ 1.2 เท่า ซึ่งทั้งอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ได้น้อยที่สุด อิมัลชันน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมลบได้ดีเหมือนในแบคทีเรียแกรมบวก แต่การทำเป็นอิมัลชันน้ำมันกานพลูสามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ในบางงานวิจัย พบว่าการทำอิมัลชันหรือเอนแคปซูลชัน (encapsulation) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยได้ดีขึ้น เช่น การกักน้ำมันหอมระเหยกานพลูไว้ในเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (beta-cyclodextrin inclusion) พบว่าค่า MIC ของน้ำมันกานพลูที่ผสมด้วย beta-cyclodextrin (BCD) ของ *S. Typhimurium* และ *L. innocua* เท่ากัน คือ 281 $\mu\text{g/ml}$ แต่ค่า MIC ของน้ำมันกานพลูสกัด มีค่าเท่ากับ 400 และ 2000 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ และยังพบว่าการกักน้ำมันหอมระเหยกานพลูไว้ในเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทรินสามารถต้านการเจริญของ *S. Typhimurium* ได้ดีกว่า *L. innocua* (Hill et al., 2013) และจากงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำมันกานพลู พบว่าสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* *E. coli* และ

Staph. aureus ได้ดีที่สุด ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับร้อยละ 0.125 โดยปริมาตร และสามารถต้านการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ได้น้อยที่สุด (Fu et al., 2007) อย่างไรก็ตามการใช้ไขมันหอมระเหยใส่ลงไปในการอาหารโดยตรง เพื่อด้านการเจริญของจุลินทรีย์ มักทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางประสาทสัมผัสในอาหาร จึงจำเป็นต้องใช้น้ำมันหอมระเหยในปริมาณที่น้อย เพื่อให้การเปลี่ยนแปลงทางด้านประสาทสัมผัสให้น้อยที่สุด แต่ยังคงสามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ไว้ได้อยู่ นอกจากนี้ไขมันหอมระเหยยังมีข้อจำกัดในการต้านจุลินทรีย์ในอาหารที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจุลินทรีย์พบอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำของอาหาร แต่เมื่อผสมน้ำกับน้ำมันเข้าด้วยกัน เกิดการแยกชั้น ทำให้น้ำมันหอมระเหยมีโอกาสเข้าไปสัมผัสกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้น้อยลง ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์จึงลดลง ดังนั้น การทำอิมัลชันหรือเอนแคปซูลเลชันจึงถูกใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถลดใช้ปริมาณของไขมันหอมระเหยให้น้อยลงได้ เมื่อเทียบกับน้ำมันหอมระเหยที่ไม่ผ่านกระบวนการทำอิมัลชันหรือเอนแคปซูลเลชัน ซึ่งการทำอิมัลชันหรือเอนแคปซูลเลชัน ทำให้น้ำมันหอมระเหยสามารถกระจายลงไปได้น้ำได้ดีกว่าไขมันหอม ซึ่งเพิ่มโอกาสที่เข้าไปสัมผัสกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้เพิ่มขึ้น (Kalemba and Kunicka, 2003)

ตารางที่ 4.1 ค่า MIC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลู ต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)		ค่า MIC ($\mu\text{g/ml}$) ของอิมัลชันและน้ำมันกานพลู									
น้ำมัน กานพลู	Tween 20	<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>		<i>Ps. aeruginosa</i>		<i>Staph. aureus</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
		ฐานนิยม ^a	ความเข้มข้น ^b	ฐานนิยม	ความเข้มข้น	ฐานนิยม	ความเข้มข้น	ฐานนิยม	ความเข้มข้น	ฐานนิยม	ความเข้มข้น
100	-	0.48	<0.48-0.48	1.95	1.95	3.90	3.90	3.90	1.95-3.90	0.48	0.48
20	20	0.98	0.98-1.95	0.98	0.98-1.95	3.90	1.95-3.90	1.95	0.98-1.95	0.98	0.98-1.95
		(0.20)	(0.20-0.39)	(0.20)	(0.20-0.39)	(0.78)	(0.39-0.78)	(0.39)	(0.20-0.39)	(0.20)	(0.20-0.39)
20	40	0.98	0.98-1.95	0.98	0.98-1.95	3.90	1.95-3.90	0.98	0.98-1.95	1.95	0.98-1.95
		(0.20)	(0.20-0.39)	(0.20)	(0.20-0.39)	(0.78)	(0.39-0.78)	(0.20)	(0.20-0.39)	(0.39)	(0.20-0.39)
20	60	3.90	3.90	1.95	1.95-3.90	15.63	7.81-15.63	3.9	3.9	3.9	3.9
		(0.78)	(0.78)	(0.39)	(0.39-0.78)	(3.12)	(1.56-3.12)	(0.78)	(0.78)	(0.78)	(0.78)

หมายเหตุ: ค่าใน () คือ ค่า MIC คำนวณตามร้อยละของความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในสารละลายอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

^a คือ ความเข้มข้นของอิมัลชันหรือน้ำมันกานพลูที่มีจำนวนครั้งในการหาค่า MIC มากที่สุด

^b คือ ความเข้มข้นของอิมัลชันหรือน้ำมันกานพลูที่สามารถหาค่า MIC ได้

ส่วนค่า MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ตามตาราง ที่ 4.2 พบว่า ใน *B. subtilis* พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ไม่สามารถหาค่า MBC ได้ เนื่องจากอิมัลชันของน้ำมันกานพลูไม่สามารถฆ่าสปอร์ของ *B. subtilis* ที่ใช้ในการทดสอบได้ แต่น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียวสามารถฆ่าสปอร์ของ *B. subtilis* ได้และมีค่า MBC ของ *B. subtilis* ได้คือ 3.90 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน *E. coli* พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 60 มีค่า MBC สูงกว่า 3 เท่า เมื่อเทียบกับในน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 พบว่าค่า MBC เท่ากับค่า MBC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว สำหรับ *Ps. aeruginosa* พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 40 และ 60 มีค่า MBC เพิ่มขึ้นเป็น 2 2 และ 5 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า MBC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ส่วน *Staph. aureus* พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 40 และ 60 มีค่า MBC เพิ่มขึ้นเป็น 2 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับค่า MBC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว และ *S. Typhimurium* พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 60 มีค่า MBC สูงกว่า 2 เท่า เมื่อเทียบกับในน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว แต่เมื่อใช้ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 พบว่าค่า MBC เท่ากับค่า MBC ของน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณค่า MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลู เป็นความเข้มข้นร้อยละของน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่าการทำอิมัลชันน้ำมันกานพลู ใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูที่น้อยกว่าน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ในการฆ่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ ยกเว้นใน *B. subtilis* และ ตัวอย่างที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 ใน *Ps. aeruginosa* และ *Staph. aureus* และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้น Tween 20 พบว่าตัวอย่างที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 มีค่า MBC ในแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นใน *E. coli* และ *S. Typhimurium* แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้น Tween 20 เป็นร้อยละ 60 พบว่าค่า MBC เพิ่มขึ้น 4 และ 5 เท่า ใน *Ps. aeruginosa* และ *Staph. aureus* เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 ตามลำดับ การใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว มีค่า MBC อยู่ในช่วง 1.95 -3.90 $\mu\text{g/ml}$ และสามารถฆ่า *E. coli* และ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *B. subtilis* *Staph. aureus* และ *Ps. aeruginosa* ที่มีฤทธิ์ฆ่าเท่ากัน ส่วนการทำอิมัลชันนั้น ไม่สามารถฆ่าสปอร์ของ *B. subtilis* ที่ใช้ในการทดสอบได้ แต่อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 มีค่า MBC เท่ากับ 7.8 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูเท่ากับ 1.56 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่า *E. coli* *Ps. aeruginosa* *S. Typhimurium* และ *Staph. aureus* ได้ดีเท่ากัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 สามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูได้ 1.25-5.0 เท่า ส่วนการใช้อิมัลชันน้ำมันกานพลูมีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 มีค่า MBC อยู่ในช่วง 0.98-3.90 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูอยู่ในช่วง 0.20-0.78 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่า *E. coli* และ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Ps. aeruginosa* และ *Staph. aureus* ที่มีฤทธิ์ฆ่าเท่ากัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่า

อิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 สามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูได้ 2.5-5.0 เท่า ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 มีค่า MBC อยู่ในช่วง 7.81-62.50 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูอยู่ในช่วง 1.56-12.50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถฆ่า *E. coli* และ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Staph. aureus* และสามารถฆ่า *Ps. aeruginosa* ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 สามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูได้ 2.5 เท่า สำหรับ *E. coli* และ *S. Typhimurium* แต่ใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูเพิ่มขึ้น 1.6-3.2 เท่า สำหรับ *Staph. aureus* และสามารถฆ่า *Ps. aeruginos* ซึ่งอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 มีฤทธิ์การฆ่าแบคทีเรียลดลง อาจเกิดจากมีจำนวนโมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมันลดลง ส่งผลต่อความสามารถในการกระจายของน้ำมันในน้ำลดลง จึงมีโอกาสสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ลดลงตามไปด้วย แต่อิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 มีจำนวน โมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมันใกล้เคียงกัน ซึ่งจำนวนโมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมันคำนวณมาจากค่า D[4,3] ที่เป็นค่าเฉลี่ยของขนาดอนุภาคน้ำมัน อย่างไรก็ตามขนาดอนุภาคน้ำมันกานพลูในอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 ประกอบด้วยขนาดอนุภาคน้ำมันทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ซึ่งอนุภาคน้ำมันขนาดใหญ่ ก็จะมีจำนวนโมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมันกานพลูที่สูงกว่าอนุภาคน้ำมันขนาดเล็ก จึงทำให้ฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียในอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 จึงแตกต่างกัน ส่วนอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 พบว่ามีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยที่ใหญ่กว่าในอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 จึงมีจำนวนโมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมันสูง ทำให้สามารถกระจายตัวของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำได้ดี จึงมีโอกาสสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้มากขึ้น จากการทดสอบของอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลู พบว่าสามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมลบได้ดีเหมือนในแบคทีเรียแกรมบวก จากงานวิจัยของ Nonsee et al. (2011) รายงานว่าน้ำมันกานพลูที่ถูกเคลือบ (encapsulated) ด้วยมอลโตเดกซ์ทรินสามารถฆ่า *L. monocytogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีที่สุด รองลงคือ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบและ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีค่า MBC เท่ากับร้อยละ 0.5 1.0 และ 1.5 โดยมวลต่อปริมาตร ซึ่งฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียของการทำ encapsulated ขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ส่วนงานวิจัยของ Hill et al. (2013) รายงานว่าน้ำมันกานพลูที่ถูกห่อหุ้มด้วยไซเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (beta-cyclodextrin, BCD) สามารถฆ่าแบคทีเรียแกรมบวก (*L. innocua*) ได้ดีเหมือนในแบคทีเรียแกรมลบ (*S. Typhimurium*) ซึ่งมีค่า MBC เท่ากัน คือ มากกว่า 1125 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนการศึกษาฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย เมื่อใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าสามารถฆ่า *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบได้ดีที่สุด (ค่า MBC เท่ากับร้อยละ 0.125 โดยปริมาตร) รองลงมาคือ *S. aureus* และ *B. subtilis* ที่น้ำมันกานพลูมีฤทธิ์การฆ่าเท่ากัน (ค่า MBC เท่ากับร้อยละ 0.250 โดยปริมาตร) และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และสามารถฆ่า *P. aeruginosa* ได้น้อยที่สุด ซึ่งมีค่า MBC เท่ากับร้อยละ 0.500 โดยปริมาตร (Fu et al., 2007) อย่างไรก็ตามอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 เพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรีย โดยสามารถลดความเข้มข้นน้ำมันกานพลูที่ใช้ได้ เมื่อเปรียบเทียบ

กับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว และสำหรับสารออกฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียในน้ำมันกานพลู คือ ยูจีนอล ซึ่งเป็นสารกลุ่มของฟีนอลิก ปริมาณของสารฟีนอลิกหรือของน้ำมันมีผลต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ โดยในงานวิจัย พบว่าปริมาณของสารฟีนอลิกต่ำ มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้างพลังงาน แต่ที่ปริมาณของสารฟีนอลิกสูง มีผลต่อการเสื่อมสภาพของโปรตีน และมีผลต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารของเยื่อเลือกผ่าน ทำให้เกิดการสูญเสียสารออกนอกเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถปฏิกิริยากับโปรตีนของเยื่อเลือกผ่าน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและหน้าที่ไป (Prindle and Wright, 1977; Fung et al., 1977)

ตารางที่ 4.2 ค่า MBC ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลู ต่อฤทธิ์การฆ่าแบคทีเรีย

เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก)		ค่า MBC ($\mu\text{g/ml}$) ของอิมัลชันและน้ำมันกานพลู									
น้ำมัน กานพลู	Tween 20	<i>B. subtilis</i>		<i>E. coli</i>		<i>Ps. aeruginosa</i>		<i>Staph. aureus</i>		<i>S. Typhimurium</i>	
		ฐานนิยม ^a	ความเข้มข้น ^b	ฐานนิยม	ความเข้มข้น	ฐานนิยม	ความเข้มข้น	ฐานนิยม	ความเข้มข้น	ฐานนิยม	ความเข้มข้น
100	-	3.90	1.95-3.90	1.95	1.95	3.90	3.90	3.90	1.95-3.90	1.95	1.95
20	20	>500	>500	7.81	3.90-7.81	7.81	7.81-15.63	7.81	7.81	7.81	7.81-15.63
		(>100)	(>100)	(1.56)	(0.78-1.56)	(1.56)	(1.56-3.12)	(1.56)	(1.56)	(1.56)	(1.56-3.12)
20	40	>500	>500	1.95	1.95-3.90	7.81	7.81-15.63	7.81	7.81	1.95	1.95-3.90
		(>100)	(>100)	(0.39)	(0.39-0.78)	(1.56)	(1.56-3.12)	(1.56)	(1.56)	(0.39)	(0.39-0.78)
20	60	>500	>500	7.81	7.81-15.63	62.50	62.50	31.25	15.63-31.25	7.81	7.81
		(>100)	(>100)	(1.56)	(1.56-3.12)	(12.50)	(12.50)	(6.25)	(3.12-6.25)	(1.56)	(1.56)

หมายเหตุ: ค่าใน () คือ ค่า MBC กำหนดตามร้อยละของความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในสารละลายอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

^aคือ ความเข้มข้นของอิมัลชันหรือน้ำมันกานพลูที่มีจำนวนครั้งในการหาค่า MBC มากที่สุด

^bคือ ความเข้มข้นของอิมัลชันหรือน้ำมันกานพลูที่หาค่า MBC ได้

จากการทดสอบด้วย disc diffusion assay สำหรับศึกษาการเกิด clear zone ที่มีขนาดมากกว่า 0.8 cm ของแบคทีเรียต่างๆ เมื่อใช้อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่แปรความเข้มข้น Tween 20 เป็น 3 ระดับ คือ ร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ตามตารางที่ 4.3 พบว่า Tween 20 เพียงอย่างเดียว ไม่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิดได้ ส่วนฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่แปรความเข้มข้น Tween 20 อยู่ 3 ระดับ พบว่าใน *B. subtilis* อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 40 และ 60 ใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันเพิ่มขึ้นเป็น 2 3 และ 4 เท่า ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ส่วน *E. coli* อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 ใช้ความเข้มข้นอิมัลชันเท่ากับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 ใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า สำหรับ *Ps. aeruginosa* อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 ใช้ความเข้มข้นอิมัลชันเท่ากับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 ใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันเพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 3 เท่า ใน *Staph. aureus* อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 ใช้ความเข้มข้นอิมัลชันเท่ากับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 ใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า และ *S. Typhimurium* พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 และ 40 ใช้ความเข้มข้นอิมัลชันเท่ากับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 ใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณค่าความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูเป็นความเข้มข้นร้อยละของน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่าในการต้านแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด อิมัลชันน้ำมันกานพลูใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูน้อยกว่าการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ยกเว้นในตัวอย่างที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 ของ *Staph. aureus* อิมัลชันน้ำมันกานพลูสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดได้ดีกว่าการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว สำหรับความเข้มข้นน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ที่สามารถทำให้เกิด clear zone ขนาดมากกว่า 0.8 cm อยู่ในช่วง 7.81-31.25 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *E. coli* *Ps. aeruginosa* และ *S. Typhimurium* ที่มีฤทธิ์ด้านเท่ากัน ส่วน *Staph. aureus* สามารถต้านการเจริญได้น้อยที่สุด ส่วนความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 ที่สามารถทำให้เกิด clear zone ขนาดมากกว่า 0.8 cm อยู่ในช่วง 15.63-31.25 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูอยู่ในช่วง 3.12-6.25 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *B. subtilis* *E. coli* *Ps. aeruginosa* และ *S. Typhimurium* ได้ดีเท่ากัน และสามารถต้านการเจริญของ *Staph. aureus* ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 สามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูได้ 2.5-5.0 เท่า ส่วนความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 ที่สามารถทำให้เกิด clear zone ขนาดมากกว่า 0.8 cm อยู่ในช่วง 15.63-31.25 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูอยู่ในช่วง 3.12-6.25 $\mu\text{g/ml}$ มีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *E. coli* และ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุด

รองลงมาคือ *B. subtilis* *Ps. aeruginosa* และ *Staph. aureus* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเท่ากัน นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 สามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูได้ 1.2-5.0 เท่า และความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 ที่สามารถทำให้เกิด clear zone ขนาดมากกว่า 0.8 cm อยู่ในช่วง 31.25-125 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อคำนวณเป็นความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในอิมัลชัน พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูอยู่ในช่วง 6.25-25 $\mu\text{g/ml}$ สามารถต้านการเจริญของ *E. coli* และ *S. Typhimurium* ได้ดีที่สุดในรองลงมาคือ *B. subtilis* และ *Ps. aeruginosa* ที่มีฤทธิ์ต้านเท่ากัน และสามารถต้านการเจริญ *Staph. aureus* ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 สามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูได้ 1.2-5.0 เท่าในแบคทีเรียส่วนใหญ่ ยกเว้น *B. subtilis* ที่ใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูเพิ่มขึ้น 1.6 เท่า จากการศึกษาด้วยวิธี disc diffusion assay พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูสามารถต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าในแบคทีเรียแกรมบวก อาจเกิดจากการทำอิมัลชันทำให้อิมัลชันน้ำมันกานพลูสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี และปลดปล่อยน้ำมันกานพลูเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบที่มีชั้นไขมันหนาได้ดี จึงทำให้ยูจินอลที่อยู่บนผิวของน้ำมันกานพลูสามารถเข้าไปจับกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ แต่การใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว พบว่าสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (*B. subtilis*) ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ อาจเกิดจากยูจินอลสามารถละลายน้ำได้ เมื่อยูจินอลสัมผัสกับโปรตีนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ก็ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ สมบัติการแลกเปลี่ยนของสารที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียจึงเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นโปรตีนที่หนาจึงไวต่อสารยูจินอลได้เร็วกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ มีชั้นไขมันที่หนาจึงทำให้ความไวต่อยูจินอลน้อย เมื่อเทียบกับแบคทีเรียแกรมลบ อย่างไรก็ตาม การใช้ทั้งอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลูสามารถต้านการเจริญของ *S. aureus* ได้น้อยที่สุด แต่การทำเป็นอิมัลชันน้ำมันกานพลูสามารถลดการใช้ความเข้มข้นน้ำมันกานพลูที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบวิธี broth macro dilution test และ disc diffusion assay พบว่าฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียในอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียวแตกต่างกัน และการใช้ disc diffusion assay พบว่ามีการใช้ปริมาณอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียวที่สูงกว่าวิธี broth macro dilution test อาจเกิดจากวิธี disc diffusion assay ใช้ปริมาณอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลูทั้งหมด 2 ml ซึ่งสูงกว่าวิธี disc diffusion assay ที่สามารถใส่ปริมาณอิมัลชันน้ำมันกานพลูและน้ำมันกานพลูลงใน paper disc ได้เพียง 15 μL ดังนั้น จึงทำให้ฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองวิธีไม่เท่ากัน และเมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี disc diffusion assay ของอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ทั้ง 3 ระดับ พบว่า อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 ใช้ความเข้มข้นของอิมัลชันน้อยกว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลู ที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 ตามลำดับ ดังนั้น ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย โดยวิธี disc diffusion assay ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 จึงมีฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียดีที่สุด รองลงมาคืออิมัลชันน้ำมัน

กานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 ตามลำดับ จากวิจัยของ Fu et al. (2007) ศึกษาการเกิดขนาด clear zone ของน้ำมันกานพลู ด้วยวิธี disc diffusion assay พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด (ขนาด clear zone 19.5 cm) รองลงมา คือ *E. coli* และ *Staph. aureus* ที่มีฤทธิ์ต้านเท่ากัน (ขนาด clear zone 16.3 cm) ซึ่งผลการทดลองไม่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้อาจเกิดจากงานวิจัยของ Fu et al. (2007) ใส่ น้ำมันกานพลูลงใน paper disc ปริมาณ 5 μ L ของน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 100% แต่ในงานวิจัยนี้ใส่ปริมาณอิมัลชันน้ำมันกานพลูหรือน้ำมันกานพลูที่ถูกเจือจางบน paper disc 15 μ L ซึ่งปริมาณและความเข้มข้นมีผลต่อฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์

การศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย ด้วย disc diffusion assay มักใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเชิงคุณภาพ และสามารถบอกความสามารถในการต้านจุลินทรีย์โดยอาศัยการเกิด clear zone ถ้าสารต้านจุลินทรีย์มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ก็จะเกิด clear zone แต่ถ้าสารต้านจุลินทรีย์ไม่มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ก็จะไม่เกิด clear zone การเกิด clear zone ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ของสารต้านจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่าโครงสร้างของสารต้านจุลินทรีย์ เช่น น้ำหนักโมเลกุล ขนาด ประจุไอออน รวมถึงความสามารถในการละลายน้ำของสารต้านจุลินทรีย์ มีผลต่อการเกิด clear zone (Schwalbe, Steele-Moore, and Goodwin, 2007; Acar and Goldstein, 1996; Jorgensen, Turnidge, and Washington, 1999) ในบางงานวิจัย พบว่า การมีประจุของสารสกัดจากธรรมชาติ มีผลต่อฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อทดสอบด้วย disc diffusion assay เนื่องจากสารสกัดจากธรรมชาติมักประกอบด้วยสารที่มีประจุและสารที่ไม่มีประจุ ซึ่งสารที่มีประจุสามารถแพร่ไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่สำหรับสารที่ไม่มีประจุมีข้อจำกัดในการแพร่ของสาร เช่น การสกัดโรสแมรี่ด้วยเอทานอลและอะซิโตน พบสาร carnosol และ carnosic acid ซึ่งเป็นสารที่มีประจุโดยการสกัดด้วยเอทานอล พบสารทั้งสองในปริมาณที่สูงกว่าการสกัดด้วยอะซิโตน และเมื่อศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของ *E. coli* จากสารสกัดทั้งสองชนิด ด้วย disc diffusion assay พบว่าสารสกัดโรสแมรี่ที่สกัดด้วยเอทานอลมีขนาดของ clear zone ใหญ่กว่าสารสกัดโรสแมรี่ที่สกัดด้วยอะซิโตน (Moreno et al., 2006) เป็นต้น ส่วน broth dilution test เป็นวิธีมาตรฐานในการศึกษาฤทธิ์ต้านและฆ่าจุลินทรีย์ ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเชิงความเข้มข้นการทำ broth dilution test สามารถหาค่าได้ 2 ค่า คือ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ (MBC) สิ่งที่ต้องควบคุมในการทำ broth dilution test คือ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ สภาพในการบ่ม รวมถึงช่วงของความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งในการทำ broth dilution test สามารถตรวจสอบความถูกต้องของผลการทดลองได้จากตัวอย่างควบคุม ภายในหลอดของตัวอย่างควบคุมมีปริมาณสารต้านจุลินทรีย์ตามแต่ละความเข้มข้น แต่จะไม่มีสารเติมจุลินทรีย์ผสมลงไป ถ้าพบการเจริญของจุลินทรีย์ในหลอดตัวอย่างควบคุม แสดงว่าเกิดการปนเปื้อนข้าม (contamination) ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง ผลการทดลองที่ได้ก็อาจมีความคลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริง และไม่สามารถนำไปใช้งานต่อได้ (Schwalbe, Steele-Moore, and Goodwin, 2007) แม้ว่าการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากธรรมชาติ ด้วย disc diffusion assay อาจเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพน้อย แต่จากบางงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ต้าน

จุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะ ด้วย disc diffusion assay และ broth dilution test ให้ประสิทธิภาพของการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งได้มีการศึกษายาปฏิชีวนะ ดังนี้ amikacin ampicillin amoxicillin-clavulanate ceftriaxone ciprofloxacin erythromycin imipenem minocycline และ trimethoprim-sulfamethoxazole ต่อฤทธิ์ต้านการเจริญของ *Nocardia asteroides* พบว่าประสิทธิภาพของทั้งสองวิธีเท่ากัน คือ ร้อยละ 95.7 (Ambaye et al., 1997) ซึ่งจากการทดสอบด้วยยาปฏิชีวนะพบว่า ประสิทธิภาพของการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญจุลินทรีย์ของ disc diffusion assay และ broth dilution test ไม่แตกต่าง แต่การใช้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากธรรมชาตินั้นอาจจะทำให้ผลการทดสอบของทั้งสองวิธีนี้แตกต่างกันได้ เนื่องจากในน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารหลายชนิด

ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นของ Tween 20 น้ำมันกานพลูหรืออิมัลชันน้ำมันกานพลู ($\mu\text{g/ml}$) ทำให้มีขนาด clear zone มากกว่า 0.8 cm ในแบคทีเรีย

ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)		ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)				
น้ำมันกานพลู	Tween 20	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
-	100	ND	ND	ND	ND	ND
100	-	7.81	15.63	15.63	31.5	15.63
20	20	15.63	15.63	15.63	31.25	15.63
		(3.12)	(3.12)	(3.12)	(6.25)	(3.12)
20	40	31.25	15.63	31.25	31.25	15.63
		(6.25)	(3.12)	(6.25)	(6.25)	(3.12)
20	60	62.5	31.25	62.5	125	31.25
		(12.50)	(6.25)	(12.50)	(25.00)	(6.25)

หมายเหตุ: ND คือ ไม่เกิด clear zone

ค่าใน () คือ ค่าคำนวณตามร้อยละของความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในสารละลายอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

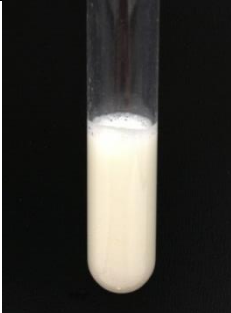

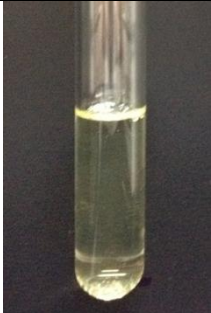
การเพิ่มความเข้มข้น Tween 20 พบว่าอิมัลชันมีลักษณะที่ใสมากขึ้น แสดงในตารางที่ 4.4 และยังทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย (D[4,3]) และรูปแบบการกระจายขนาดเปลี่ยน แสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 มีขนาดของอิมัลชัน 2 ช่วง คือ ช่วงขนาดอนุภาคน้ำมันเล็ก ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 0.893-6.325 μm ร้อยละ 14.42 โดยปริมาตรของน้ำมันกานพลูทั้งหมดในอิมัลชัน และกลุ่มของอิมัลชันขนาดใหญ่ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 7.096-126.191 μm ร้อยละ 85.58 โดยปริมาตรของน้ำมันกานพลูทั้งหมดในอิมัลชัน ส่วนอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีปริมาณ Tween 20 ร้อยละ 40 มีขนาดของอิมัลชัน 2 ช่วง คือ ช่วงกลุ่มขนาดอนุภาคน้ำมันเล็ก ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 0.040-0.399 μm ร้อยละ 96.92 โดยปริมาตรของน้ำมันกานพลูทั้งหมดในอิมัลชัน และกลุ่มของอิมัลชันขนาดใหญ่ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 0.448-1.262 μm ร้อยละ 3.08 โดยปริมาตรของน้ำมันกานพลูทั้งหมดในอิมัลชัน และอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 พบว่ามีช่วงขนาดของอนุภาคน้ำมันกานพลูเพียงกลุ่มเดียว ซึ่งมีขนาดอนุภาคน้ำมันอยู่ในช่วง 0.050-0.252 μm จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น Tween 20 เพิ่มจากร้อยละ 20 เป็น 40 โดยน้ำหนัก ทำให้ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยลดลง ร้อยละ 99.31 การเพิ่มความเข้มข้น Tween 20 จากร้อยละ 40 เป็น 60 ไม่มีผลต่อ ขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย

แต่เปลี่ยนรูปแบบการกระจายขนาด คือ ไม่มีอนุภาคน้ำมันที่ขนาดใหญ่กว่า $0.3 \mu\text{m}$ ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณ Tween 20 พอไปล้อมรอบผิวของอนุภาคน้ำมันซึ่งมีขนาดในช่วง $0.056\text{-}0.283 \mu\text{m}$ จาก phase diagram ของ Gupta และ Moulik (2007) พบว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก เป็นอิมัลชันแบบน้ำมันในน้ำ ที่เป็น biphasic หรือ coarse emulsion ที่ขนาดอนุภาคน้ำมันใหญ่กว่า $10 \mu\text{m}$ มีความเสถียรแบบจลน์ (kinetically stable) และความเสถียรต่ำกว่าอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละมากกว่า 40 โดยน้ำหนัก ซึ่งให้อนุภาคน้ำมันที่มีขนาดเล็กกว่า $1 \mu\text{m}$ (Hiemans, 1977) จาก D[4,3] ที่ได้นำไปคำนวณหาจำนวนโมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมัน โดยสมมุติว่าตัวทำอิมัลชันทั้งหมดอยู่ที่ผิวประจันระหว่างน้ำกับน้ำมัน พบว่าจำนวนโมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมัน เท่ากับ 4.38×10^{-9} 2.88×10^{-15} และ 1.97×10^{-15} เมื่อใช้ความเข้มข้น Tween 20 สูงขึ้นจากร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เนื่องจาก Tween 20 เรียงตัวรอบอนุภาคน้ำมันโดยส่วนหัวซึ่งมีความเป็น hydrophilic หันออกเข้าหาหน้า ดังนั้น จากผลของจำนวน โมล Tween 20 ต่ออนุภาค ที่ลดลง บ่งว่าผิวของอนุภาคน้ำมันมีความเป็น hydrophilic ต่ำลงเมื่อความเข้มข้น Tween 20 เพิ่มขึ้น ทำให้ลดความสามารถที่อนุภาคน้ำมันจะจับกับผิวแบคทีเรียซึ่งมีประจุลบ นอกจากนี้ การเพิ่มความเข้มข้น Tween 20 ยังทำให้ความหนืดของอิมัลชันสูงขึ้น โดยความหนืดของอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 40 และ 60 มีค่าเท่ากับ 9.3 80.9 และ 169.4 mPa.s ตามลำดับ ทำให้อนุภาคน้ำมันเคลื่อนที่ช้าลง ดังนั้น การที่ผิวของอนุภาคน้ำมันมีความเป็น hydrophilic ลดลง พร้อมกับความหนืดของอิมัลชันเพิ่มขึ้นเป็นผลทำให้โอกาสที่อนุภาคน้ำมันกานพลูสัมผัสกับผิวแบคทีเรียแล้วปลดปล่อยน้ำมันกานพลูออกเพื่อดำเนินฤทธิ์ลดลง เมื่อความเข้มข้น Tween 20 เพิ่มขึ้น จากงานวิจัยของ Van-Ruth, King, and Giannouli (2002) พบว่าความหนืดของอิมัลชันที่สูงขึ้นส่งผลต่อการเคลื่อนที่และการปลดปล่อยของสารให้กลิ่นที่น้อยลง ซึ่งศึกษาผลของการปลดปล่อยของสาร dimethyl sulfide ที่ผสมในอิมัลชันที่มี fraction ของน้ำมันทานตะวัน เท่ากับ 0.40 และ fraction ของ Tween 20 เท่ากับ 0.010 พบว่า เมื่อลดขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยโดยพื้นผิว หรือ ค่า D[3,2] จาก 0.85 เป็น $0.60 \mu\text{m}$ ทำให้มีความหนืดสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นจาก 4.4 เป็น 5.8 และร้อยละของการปลดปล่อยสาร dimethyl sulfide ลดลงจาก 8.67 เป็น 3.57 ดังนั้น อิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 มีความหนืดต่ำ และจำนวน โมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมันมากที่สุด อิมัลชันน้ำมันกานพลูจึงสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี จึงมีโอกาสสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้มากขึ้น จึงมีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีที่สุด ส่วนอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 มีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยใกล้เคียงกัน แต่อิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 มีฤทธิ์ด้านการเจริญแบคทีเรียได้ดีกว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 เนื่องจากอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 มีจำนวน โมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคสูงกว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 60 และอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 ยังมีช่วงกระจายขนาดอนุภาคน้ำมันทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ซึ่งขนาดของอนุภาคน้ำมันกานพลูที่ใหญ่ มีจำนวน โมลของ Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมันสูงกว่าน้ำมันกานพลูขนาดเล็ก ทำให้อนุภาคของน้ำมันกานพลูขนาดใหญ่จึงสามารถกระจายตัวในน้ำและมีโอกาสจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ดีกว่าขนาดอนุภาคน้ำมันกานพลูที่เล็ก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย

ของ Terjung et al. (2012) พบว่าอิมัลชัน carvacrol ความเข้มข้น 600 ppm ที่มีขนาดอนุภาค 3000 nm มีฤทธิ์ต้านการเจริญของ *L. innocua* ได้ดีกว่าอิมัลชัน carvacrol ความเข้มข้น 600 ppm ที่มีขนาดอนุภาค 80 nm เนื่องจากอิมัลชันที่มีขนาด 3000 nm มีปริมาณ Tween 80 ที่ล้อมรอบอนุภาคสาร carvacrol ที่มากกว่าอิมัลชันที่มีขนาด 80 nm จึงทำให้อิมัลชันที่มีขนาด 3000 nm สามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี ส่วน Buranasuksombat et al. (2011) ศึกษาอิมัลชันน้ำมัน lemon myrtle และน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าอิมัลชันที่มีขนาดอนุภาคระดับไมโคร (100-400 nm) และนาโน (97 nm) มีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ไม่แตกต่าง ซึ่งสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดและฤทธิ์ของน้ำมันที่ใช้มากกว่าขนาดของอนุภาคน้ำมัน

อิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าอิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 และการทำอิมัลชันยังสามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ดีกว่าการใช้น้ำมันกานพลูเพียงอย่างเดียว ยกเว้นสปอร์ของ *B. subtilis* ที่อิมัลชันไม่สามารถฆ่าได้ อิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 มีฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียได้ดี เนื่องจากมีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยมีขนาดใหญ่ จึงทำให้มีจำนวนโมเลกุล Tween 20 ต่ออนุภาคน้ำมันกานพลูมากที่สุด อิมัลชันน้ำมันกานพลูจึงสามารถกระจายตัวในน้ำได้ดี และทำให้น้ำมันกานพลูมีโอกาสสัมผัสกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้มากขึ้น นอกจากนี้การใช้ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 ในอิมัลชันน้ำมันกานพลู ยังทำให้ความหนืดของอิมัลชันน้อย ส่งผลให้น้ำมันกานพลูสามารถเคลื่อนที่ได้ดีกว่าในอิมัลชันที่มีความหนืดสูง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้อิมัลชันที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 มาผสมกับสารละลายฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลท และขึ้นรูปเป็นฟิล์ม เพื่อทดสอบสมบัติทางกายภาพและฤทธิ์การต้านแบคทีเรียของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลท

ตารางที่ 4.4 ลักษณะปรากฏของอิมัลชันที่มีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และแปรความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 40 และ 60 โดยน้ำหนัก

อิมัลชันที่น้ำมันกานพลู ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และ ความเข้มข้น Tween 20 ระดับต่างๆ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		
20	40	60
		

ตารางที่ 4.5 ผลของความเข้มข้น Tween 20 ต่อขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ย การกระจายขนาดและลักษณะของอนุภาคน้ำมันของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ

ความเข้มข้น (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)		รูปแบบการกระจายขนาดอนุภาคน้ำมัน	ลักษณะของอนุภาคน้ำมัน
น้ำมันกานพลู	Tween 20		
20	20	<p>Particle Size Distribution</p> <p>Volume (%)</p> <p>20.000 μm</p> <p>85.58%</p> <p>14.42%</p> <p>D [4,3]= 22.018 μm</p> <p>Particle Size (μm)</p>	<p>10 μm</p>
20	40	<p>Particle Size Distribution</p> <p>Volume (%)</p> <p>0.123 μm</p> <p>96.92%</p> <p>3.08%</p> <p>D [4,3]= 0.152 μm</p> <p>Particle Size (μm)</p>	<p>1 μm</p>
20	60	<p>Particle Size Distribution</p> <p>Volume (%)</p> <p>0.112 μm</p> <p>D [4,3]= 0.117 μm</p> <p>Particle Size (μm)</p>	<p>1 μm</p>

หมายเหตุ: อิมัลชันน้ำมันกานพลู ที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 ใช้กำลังขยาย 200 เท่า

อิมัลชันน้ำมันกานพลู ที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 40 และ 60 ใช้กำลังขยาย 1000 เท่า

4.2 ผลของความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำต่อสมบัติทางกายภาพ และฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรีย ของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท

อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และมีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ผสมลงในสารละลายฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท แล้วขึ้นรูปฟิล์ม ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้แปรความเข้มข้นของอิมัลชันตามข้างต้นออกเป็น 4 ระดับ คือ ร้อยละ 1 3 5 และ 7 โดยน้ำหนักของสารละลายฟิล์ม และศึกษาเปรียบเทียบกับฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ไม่ผสมสารใดๆ ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 และฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 ซึ่งความเข้มข้นน้ำมันกานพลูและ Tween 20 ร้อยละ 1.4 คำนวณจากความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ที่อิมัลชันประกอบด้วย Tween 20 และน้ำมันกานพลูอย่างละ ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก

จากตารางที่ 4.6 แสดงสมบัติทางกายภาพที่เกี่ยวกับค่าการซึมผ่านไอน้ำ ค่าออสโมติซิตี (a_w) เปอร์เซ็นต์ความชื้น ความหนา ค่าความต้านทานแรงดึง ร้อยละของการยืดออก และร้อยละของการละลายของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู (ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20) ฟิล์มที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 และฟิล์มที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 ค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 มีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ไม่ผสมสารใดๆ อาจเกิดจาก Tween 20 เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและประกอบด้วยสารที่มีขั้ว ซึ่งส่วนที่มีขั้วของ Tween 20 สามารถจับกับส่วนที่มีขั้วของเบต้า-แลคโตโกลบูลินในเวย์โปรตีนไอโซเลท ทำให้ส่วนที่มีขั้วของเบต้า-แลคโตโกลบูลินจับกับไอน้ำได้ลดลง และฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 มีแนวโน้มการซึมผ่านไอน้ำสูง เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ไม่ผสมสารใดๆ อาจเกิดจากน้ำมันกานพลูเป็นสารที่ไม่มีขั้ว จึงสามารถจับกับส่วนที่ไม่มีขั้วของเบต้า-แลคโตโกลบูลิน ทำให้ส่วนที่มีขั้วของเบต้า-แลคโตโกลบูลินสามารถจับกับไอน้ำได้ สำหรับฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นอิมัลชันจากร้อยละ 1 ถึง 5 ค่าการซึมผ่านไอน้ำลดลงร้อยละ 53.42 แม้ว่าฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 1 มีค่าการซึมผ่านไอน้ำสูง เมื่อเทียบกับฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 3 และ 5 อาจเกิดจากการใส่อิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 1 ทำให้อิมัลชันน้ำมันกานพลูจับกับส่วนที่มีขั้วของเบต้า-แลคโตโกลบูลินได้บางส่วน จึงเหลือส่วนที่มีขั้วของเบต้า-แลคโตโกลบูลินที่สามารถจับกับไอน้ำได้ ส่วนฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 3 และ 5 มีค่าการซึมผ่านไอน้ำลดลง อาจเกิดจากอิทธิพลของความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่สูงขึ้น จึงไปจับกับส่วนที่มีขั้วของเบต้า-แลคโตโกลบูลินได้มากขึ้น ค่าการซึมผ่านไอน้ำจึงลดน้อยลง แต่ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 พบว่าค่าการซึมผ่านไอน้ำมีแนวโน้มสูงขึ้น อาจเกิดจากมีการแทรกตัวของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในโครงสร้างของเวย์โปรตีนไอโซเลทมาก ทำให้อันตรกิริยาระหว่างสายโปรตีนลดลง และเกิดการรวมตัวของน้ำมันกานพลูที่ผิวหน้าของฟิล์มกระจายที่ผิวหน้า จึงทำให้ส่วนที่มีขั้วของเบต้า-แลคโตโกลบูลินสามารถจับกับไอน้ำได้

จากการศึกษาของ Nonsee et al. (2011) รายงานว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันกานพลูที่ถูกกักเก็บ (encapsulated) ด้วยมอลโตเดกซ์ตริน ในฟิล์ม hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) จากร้อยละ 1.5 ถึง 2.5 ค่าการซึมผ่านไอน้ำลดลงจาก 55 เป็น 32 $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{day}\cdot\text{mm}^2\cdot\text{kPa}$ นอกจากนี้ Gontard et al. (1994) รายงานว่าปริมาณไขมันที่มาก เมื่อใส่ลงในฟิล์ม สามารถป้องกันการซึมผ่านไอน้ำได้ เนื่องจากไขมันหรือน้ำมันสามารถเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่ไม่เข้ากันสารละลายเวย์โปรตีนได้ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 พบว่ามีค่าการซึมผ่านไอน้ำสูงขึ้นร้อยละ 45.26 เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 5 ซึ่งการที่ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 มีค่าการซึมผ่านไอน้ำเพิ่มขึ้น อาจเกิดจากมีความเข้มข้น Tween 20 ผสมในเนื้อฟิล์มที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Ziani et al. (2008) พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณ Tween 20 ในฟิล์มไคโตซาน จากร้อยละ 0 ถึง 5 ค่าการซึมผ่านของไอน้ำเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 18.18 เนื่องจาก Tween 20 เป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุและมีค่า Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) เท่ากับ 16.7 ทำให้อิทธิพลของไขมันสามารถซึมผ่านได้มากขึ้น เนื่องจากส่วนที่ชอบน้ำของ Tween 20 สามารถจับน้ำได้มากขึ้น

ค่า a_w ของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ซึ่งแปรความเข้มข้นออกเป็น 4 ระดับ ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 และฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 มีค่าอยู่ในช่วง 0.522-0.566 ซึ่งมีค่า a_w ไม่เกิน 0.6 และค่า a_w ต่ำกว่า 0.6 สามารถเก็บไว้ได้โดยไม่เกิดการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 และน้ำมันกานพลูที่ร้อยละ 1.4 มีค่า a_w สูงกว่าในฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ไม่ผสมสารใดๆ อาจเกิดจากในขั้นตอนการทำแห้งส่วนที่มีหัวของ Tween 20 และเบต้า-แลคโตโกลบูลิน สามารถจับและกักน้ำไว้ในโครงสร้างของฟิล์ม เมื่อทดสอบหาค่า a_w จึงเกิดการปลดปล่อยโมเลกุลน้ำออกมาทำให้มีค่า a_w ที่สูงขึ้น และสำหรับฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 1 พบว่ามีค่า a_w น้อย อาจเกิดจากมีความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูน้อย จึงไม่ส่งผลต่อการระเหยไอน้ำของฟิล์มในระหว่างการทำแห้ง แต่ในฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่มีอิมัลชันน้ำมันร้อยละ 3 พบว่ามีค่า a_w สูง อาจเกิดจากมีความเข้มข้น Tween 20 ในสารละลายฟิล์มมากขึ้น ส่งผลให้น้ำถูกกักไว้ในโครงสร้างฟิล์มมากขึ้น ส่วนฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่มีอิมัลชันน้ำมันร้อยละ 5 และ 7 มีแนวโน้มของค่า a_w ลดลง อาจเกิดจากมีความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่ใส่ลงไปมากขึ้น และสามารถเกิดอันตรกิริยากับเวย์โปรตีนไอโซเลท ทำให้ลดการเกิดอันตรกิริยาของน้ำกับเวย์โปรตีนไอโซเลท

สำหรับเปอร์เซ็นต์ความชื้นของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ไม่ผสมสารอื่น มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำที่สุด คือ 17.00 ส่วนฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 มีค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นสูงขึ้น ซึ่ง Sorbal et al. (2001) รายงานว่า ส่วนที่ชอบน้ำของวัตถุเจือปน สามารถทำปฏิกิริยากับน้ำ ส่งผลปริมาณน้ำภายในฟิล์มเพิ่มได้ ประกอบกับ Tween 20 มีส่วนชอบน้ำในโมเลกุล จึงทำให้สามารถละลายน้ำได้ดี ส่วนฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ทั้ง 4 ระดับ พบว่า ความเข้มข้นอิมัลชันไม่มีผลต่อความชื้นของฟิล์ม และมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 17.34-17.39 ความชื้นของฟิล์ม เป็นปริมาณน้ำที่อยู่ในฟิล์ม ซึ่งประกอบด้วยน้ำส่วนที่เป็นอิสระและน้ำในส่วนที่ถูกจับไว้ในโครงสร้าง จึงอาจเป็นผลทำให้เมื่อหา

ความชื้นฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้นต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความชื้นสูง อาจเกิดจากในระหว่างการทำแห้ง น้ำมันกานพลูบางส่วน เคลื่อนที่ขึ้นมาบริเวณผิวหน้าฟิล์ม ทำให้อุณหภูมิจากฟิล์มสามารถระเหยได้น้อยลง ซึ่งมีค่าความชื้นสูงกว่าฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลทที่ไม่ผสมสารอื่น อยู่ร้อยละ 3.85

ความหนาของฟิล์มของฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลท ฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ซึ่งแปรความเข้มข้นออกเป็น 4 ระดับ ฟิล์มที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 และฟิล์มที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีความหนาอยู่ในช่วง 0.101-0.129 มิลลิเมตร

จากทดสอบความต้านทานแรงดึงพบว่าฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ซึ่งแปรความเข้มข้นออกเป็นทั้ง 4 ระดับ ฟิล์มที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 และฟิล์มที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อเทียบกับฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลท พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยฟิล์มที่ไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูมีค่าต้านทานแรงดึงสูงกว่าฟิล์มที่ใส่อิมัลชันน้ำมันกานพลู สำหรับฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลู จากร้อยละ 1 ถึง 7 ค่าความต้านทานแรงดึงลดลงร้อยละ 24.01 เนื่องจากอนุภาคน้ำมันกานพลู ที่ล้อมรอบด้วย Tween 20 แทรกในระหว่างสายโปรตีน ทำให้อันตรกิริยาระหว่างสายโปรตีนลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Nonsee และ คณะ (2011) พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันกานพลูที่ถูกกักเก็บด้วยมอลโตเดกซ์ทริน ในฟิล์ม HPMC จากร้อยละ 0.5 ถึง 3.0 พบว่าค่าความต้านทานแรงดึงลดลง จาก 20.38 MPa เป็น 7.26 MPa และการลดลงของค่าความต้านทานแรงดึงเป็นการบ่งชี้ว่าน้ำมันแทรกตัวอยู่ในเนื้อฟิล์ม นอกจากนี้ในงานวิจัยที่ศึกษาการผสมน้ำมันหอมระเหยลงในสารละลายฟิล์มโดยตรง ก็พบว่าค่าความต้านทานแรงดึงมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมัน จากงานวิจัยของ Pranoto, Salokhe, and Rakshit (2005) พบว่าค่าความต้านทานแรงดึงของฟิล์มแอลจินेटที่ผสมน้ำมันกระเทียมลดลงจาก 64.70 เป็น 38.67 MPa เมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำมันกระเทียมจากร้อยละ 0.1 เป็น 0.4 นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างฟิล์มแอลจินेटที่ผสมน้ำมันกระเทียมมีค่าความต้านทานแรงดึงของฟิล์ม (64.70 MPa) น้อยกว่าฟิล์มแอลจินेटที่ไม่ผสมน้ำมันกระเทียม ซึ่งเท่ากับ 66.12 MPa ซึ่งแสดงว่าน้ำมันได้แทรกตัวอยู่ในเนื้อฟิล์ม ส่งผลให้อันตรกิริยาระหว่างสายแอลจินेटลดลง สำหรับเปอร์เซ็นต์การยืดออก พบว่า ฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ความเข้มข้นทั้ง 4 ระดับ มีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดออก อยู่ในช่วง 61.14-98.90 ซึ่งสูงกว่าฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลทที่ไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูอยู่ในช่วงร้อยละ 16.90-46.95 สำหรับฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 3 พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การยืดออกอยู่ในช่วง 98.90-99.81 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นอิมัลชันเป็นร้อยละ 5 และ 7 พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การยืดออกลดลง เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอิมัลชันที่ร้อยละ 1 และ 3 เนื่องจากอนุภาคน้ำมันกานพลู ที่ล้อมรอบด้วย Tween 20 แทรกในระหว่างสายโปรตีน ทำให้อันตรกิริยาระหว่างสายโปรตีนลดลง นอกจากนี้ Gontard et al. (1994) ยังรายงานว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณลิพิดหรือไขมันทำให้สูญเสียสมบัติทางกายภาพของฟิล์มกลูเตนวีท และยังคงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pranoto et al. (2005) ที่พบว่าการผสมน้ำมันกระเทียมร้อยละ 0.1-0.3 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยืดออกอยู่ในช่วง 4.10-

4.84 ซึ่งมีค่ามากกว่าฟิล์มแอลจินेटที่ผสมน้ำมันกระเทียมร้อยละ 0.4 มีค่าเปอร์เซ็นต์การยึดออกเท่ากับ 2.73

ร้อยละของการละลาย ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ซึ่งแปรความเข้มข้นออกเป็น 4 ระดับ ฟิล์มที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 และฟิล์มที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีร้อยละของการละลายอยู่ในช่วง 15.85-17.87 เนื่องจากมีการใช้ความร้อนในขั้นตอนการขึ้นรูปฟิล์ม ทำให้เกิดการสูญเสียสภาพและปลดปล่อยหมู่ที่ไม่ชอบน้ำออกมาที่ผิวหน้าระหว่างสายโปรตีน และเกิดการจับกันระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำด้วยตัวเอง (Perez-Gago et al., 1999) ทำให้ได้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ความแข็งแรง และสามารถละลายน้ำได้ลดลง

ตารางที่ 4.6 การทดสอบลักษณะทางกายภาพของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก

การทดสอบ	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทผสมน้ำมันกานพลูร้อยละ 1.4	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้นร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
				1	3	5	7
ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ (g·mm/m ² ·day·kPa)	3.07E-3 ^{CD} ±0.24E-3	2.76E-3 ^D ±0.04E-3	3.30E-3 ^C ±0.03E-3	4.83E-3 ^A ±0.00E-3	2.82E-3 ^D ±0.09E-3	2.25E-3 ^E ±0.56E-3	4.11E-3 ^B ±0.04E-3
ค่าออสโมติซิตี	0.529 ^D ±0.002	0.566 ^A ±0.007	0.558 ^B ±0.007	0.522 ^E ±0.000	0.536 ^C ±0.003	0.529 ^D ±0.002	0.524 ^E ±0.001
เปอร์เซ็นต์ความชื้น	17.00 ^B ±0.50	17.43 ^{AB} ±0.43	17.68 ^A ±0.46	17.34 ^{AB} ±0.00	17.37 ^{AB} ±0.36	17.37 ^{AB} ±0.10	17.39 ^{AB} ±0.17
ความหนา ^{NS} (mm)	0.119±0.007	0.108±0.010	0.114±0.002	0.108±0.006	0.112±0.016	0.122±0.016	0.129±0.011
ค่าความต้านทานแรงดึง (MPa)	1989.30 ^A ±200.38	1358.84 ^B ±21.33	1360.43 ^B ±22.73	1361.50 ^B ±88.50	1125.92 ^C ±48.28	1039.99 ^{CD} ±139.04	1034.55 ^C ±70.52
ร้อยละของการยืดออก	52.47 ^D ±5.83	80.80 ^B ±2.50	84.54 ^B ±3.76	98.90 ^A ±6.46	99.81 ^A ±1.51	79.14 ^B ±2.50	63.14 ^C ±4.51
ร้อยละของการละลาย ^{NS}	15.85±1.35	16.46±0.54	15.91±0.56	17.87±1.40	17.57±1.07	17.49±2.68	17.81±1.17

หมายเหตุ: ตัวอักษร A, B, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แสดงมีความแตกต่างกันในแนวนอนของแต่ละการทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD

^{NS} หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แสดงไม่มีความแตกต่างกันในแนวนอนของแต่ละการทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD

จากตารางที่ 4.7 สมบัติทางด้านทัศนศาสตร์ของฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลท พบว่ามีลักษณะโปร่งแสง แต่เมื่อผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูหรือน้ำมันกานพลู หรือ Tween 20 ลงในฟิล์ม ส่งผลให้ฟิล์มมีความขุ่นและสีเหลืองมากขึ้น โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นอิมัลชันจากร้อยละ 1 ถึง 7 ในฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลท ค่าความขุ่นมีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 86.08 ส่วนค่าความสว่างลดลงร้อยละ 1.75 นอกจากนี้ ค่าสีเขียว (-a*) และค่าสีเหลือง (+b*) มีค่าเพิ่มขึ้นร้อยละ 67.90 และ 29.19 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nonsee et al. (2011) พบว่าฟิล์ม HPMC ที่ผสมน้ำมันกานพลูที่ถูกกักเก็บด้วยมอลโตเดกซ์ทรินจากร้อยละ 1.0 เป็น 3.0 มีค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้นร้อยละ 73.81 และเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ผสมน้ำมันกานพลูร้อยละ 1.4 กับฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ร้อยละ 7 ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูในสารละลายฟิล์มที่เท่ากัน พบว่ามีค่าความขุ่นน้อยกว่าร้อยละ 79.48 ค่าความสว่างลดลงร้อยละ 1.97 ค่าสีเขียวลดลง 64.92 และค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้น 20.72 ทั้งนี้อาจจะเกิดจาก Tween 20 ที่ผสมอยู่อิมัลชันน้ำมันกานพลู ทำให้ฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 7 มีค่าสีที่แตกต่างจากฟิล์มฟิล์มที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4

ภาพพื้นผิวหน้าและตัดขวางของฟิล์ม (ตารางที่ 4.8 และ 4.9) พบว่าฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลท และฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 มีลักษณะผิวหน้าและส่วนตัดขวางของฟิล์มเรียบสม่ำเสมอ แต่ฟิล์มเวียโปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 พบว่าผิวหน้าและส่วนตัดขวางของฟิล์ม มีลักษณะขรุขระ และมีการกระจายตัวของน้ำมัน ไม่เกิดการรวมตัวของน้ำมัน เนื่องจากอนุภาคน้ำมันกานพลูสามารถแทรกในระหว่างสายโปรตีน และมีผลทำให้อันตรกิริยาระหว่างสายโปรตีนลดลง ส่วนฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู พบว่าผิวหน้าของฟิล์มมีความขรุขระเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลู เมื่อพิจารณาภาพตัดขวาง พบว่า ฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ 3 มีลักษณะการกระจายตัวของน้ำมันที่ดี และไม่เกิดการรวมตัวของน้ำมันในระหว่างการทำแห้ง แต่ในฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 พบการรวมกลุ่มของน้ำมันกานพลูกระจายเล็กน้อย แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 7 พบการรวมกลุ่มของน้ำมันกานพลูกระจายไปที่ผิวหน้าของฟิล์มมากขึ้น อย่างไรก็ตามการเกิดการรวมตัวของน้ำมันหรือไขมันที่ผิวหน้าฟิล์ม ก็สามารถเกิดได้ในฟิล์มที่ผสมน้ำมันหรือไขมันลงไปโดยตรงในสารละลายฟิล์ม จากการศึกษาของ Zúñiga et al. (2012) พบว่าลักษณะพื้นผิวของฟิล์ม HPMC ที่ผสมน้ำมันทานตะวันร้อยละ 0.3 และ 1.0 โดยน้ำหนัก ด้วยกล้องจุลทรรศน์และ วิธี scanning electron microscopy (SEM) พบว่า ลักษณะผิวหน้าฟิล์มที่ขรุขระและเกิดการรวมตัวของน้ำมันกระจายอยู่ทั่วผิวหน้าฟิล์ม ซึ่งผิวหน้าฟิล์มที่ขรุขระ เกิดการเคลื่อนที่ของน้ำมันขึ้นมาบริเวณผิวหน้าของฟิล์มในระหว่างการขึ้นรูปฟิล์มและการทำแห้งฟิล์มที่อุณหภูมิ 40°C นอกจากนี้ Villalobos et al. (2005) ศึกษาลักษณะของฟิล์ม HPMC ที่ผสม span 60 จำนวน 3 g และ Methocel E-15 จำนวน 1.5 g โดยใช้วิธี SEM พบผิวหน้าฟิล์มมีลักษณะขรุขระ ซึ่งเกิดการรวมตัวของไขมันที่บริเวณผิวหน้าของฟิล์ม ในขั้นตอนการระเหยของน้ำในระหว่างการทำแห้งที่อุณหภูมิห้อง แต่จากงานวิจัยของ Fernandez-Pan et al. (2012) พบว่าพื้นผิวของฟิล์มที่ผสมน้ำมันออริกาโนที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ที่ส่องด้วย SEM มีลักษณะเรียบ และมีความสม่ำเสมอ และจากภาพตัดขวาง น้ำมันออริกาโนแทรกตัวอยู่ในเนื้อของเวียโปรตีนไอโซเลท ซึ่งน้ำมันออริกาโนมีการกระจายในเนื้อฟิล์มที่ดี ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการ


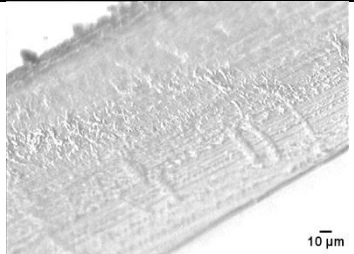
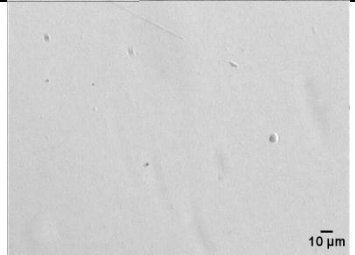
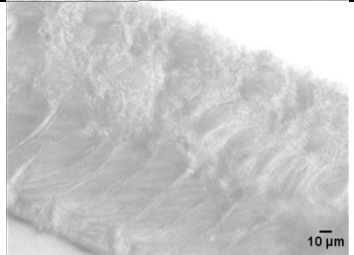

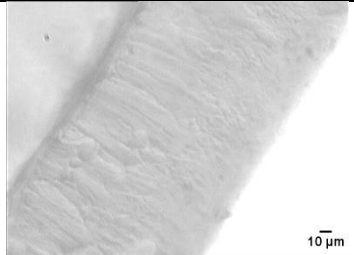
รวมตัวของน้ำมันบนผิวหน้าฟิล์ม มีอยู่หลายปัจจัย เช่น ชนิดของน้ำมันหรือไขมัน ความเข้มข้นของน้ำมันหรือไขมันที่ใช้ ขนาดของอนุภาคกระจายในอิมัลชัน ชนิดของสารลดแรงตึงผิว ความหนืดของวัฏภาคต่อเนื่องในอิมัลชัน แรงตึงผิวของอนุภาคในวัฏภาคกระจาย อุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้ง และรวมถึงสารละลายของฟิล์มพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์ม (Phan et al., 2002; Villalobos et al., 2005; Fabra, Talens, and Chiralt, 2009).

ตารางที่ 4.7 สมบัติทางด้านทัศนศาสตร์ของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก

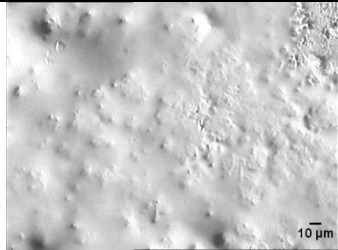
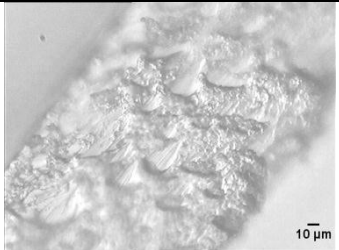


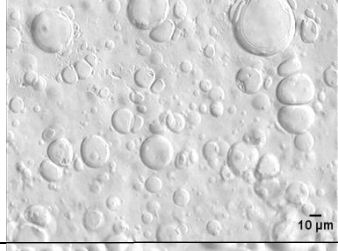
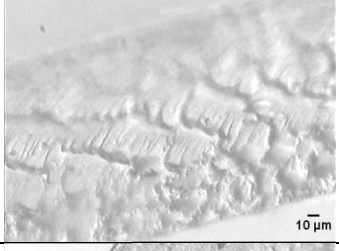

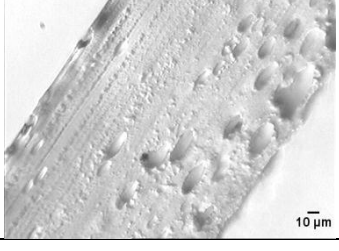
การทดสอบ	ฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลท	ฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4	ฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทผสมน้ำมัน กานพลูร้อยละ 1.4	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มี ความเข้มข้นร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
				1	3	5	7
ค่าความขุ่น	0.275 ^D ±0.002	0.265 ^F ±0.004	0.426 ^B ±0.015	0.289 ^D ±0.012	0.350 ^C ±0.004	0.426 ^B ±0.068	2.076 ^A ±0.240
L*	91.90 ^A ±0.07	89.29 ^E ±0.020	88.15 ^F ±0.12	91.46 ^B ±0.19	90.19 ^{CD} ±0.14	90.34 ^C ±0.56	89.86 ^D ±0.55
a*	-0.66 ^E ±0.02	-0.84 ^D ±0.04	-1.14 ^C ±0.02	-0.86 ^D ±0.02	-1.16 ^{BC} ±0.05	-1.21 ^B ±0.03	-3.25 ^A ±0.08
b*	2.79 ^F ±0.03	3.27 ^E ±0.09	6.41 ^A ±0.27	3.76 ^D ±0.11	5.16 ^C ±0.12	6.17 ^B ±0.05	6.21 ^B ±0.18

หมายเหตุ: ตัวอักษร ^{A,B,...} หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แสดงมีความแตกต่างกันในแนวนอนของแต่ละการทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญ ที่ p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD

ตารางที่ 4.8 ภาพพื้นผิวหน้าและตัดขวางของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก ซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 200 เท่า

สารที่ผสม ในฟิล์มเวย์ โปรตีน ไอโซเลท	ความเข้มข้นสารที่ ผสมในฟิล์ม (ร้อยละโดย น้ำหนักของ สารละลายฟิล์ม)	ภาพพื้นผิวหน้าฟิล์ม	ภาพตัดขวางของฟิล์ม
-	-		
Tween 20	1.4		
น้ำมัน กานพลู	1.4		

ตารางที่ 4.9 ภาพพื้นผิวหน้าและตัดขวางของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1 3 5 และ 7 โดยน้ำหนัก ซึ่งใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 200 เท่า

สารที่ผสมในฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท	ความเข้มข้นสารที่ผสมในฟิล์ม (ร้อยละโดยน้ำหนักของสารละลายฟิล์ม)	ภาพพื้นผิวหน้าฟิล์ม	ภาพตัดขวางของฟิล์ม
อิมัลชันน้ำมันกานพลู (ความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20)	1		
	3		
	5		
	7		

เมื่อทดลองฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยวิธี disc diffusion assay ซึ่งตัดฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมสารต่างๆ ให้มีขนาด 0.6 cm และวัดขนาดของ clear zone ที่เกิดขึ้น แสดงใน ตารางที่ 4.10 พบว่าฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ไม่ผสมและผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 5 ไม่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียได้ เนื่องจากอนุภาคน้ำมันกานพลูที่ถูกล้อมรอบด้วย Tween 20 สามารถทำอันตรกิริยากับส่วนที่มีขี้ของเบต้า-แลกโตโกลบูลินในเวย์โปรตีน ไอโซเลท จึงทำให้เกิดการปลดปล่อยของอนุภาคน้ำมันกานพลูได้น้อยขึ้น ส่งผลให้ฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียลดลง แต่ในบางงานวิจัยที่ศึกษาฟิล์ม ฟิล์ม HPMC ที่ผสมน้ำมันกานพลูที่ถูกกักเก็บด้วยมอลโตเดกซ์ทรินร้อยละ 1 โดยมีผลต่อปริมาตร มีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *E. coli* ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์ของ clear zone เท่ากับ 25 และ 18.5 mm ตามลำดับ (Nonsee et al., 2011) อย่างไรก็ตามยังมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรีย โดยการผสมน้ำมันหอมระเหย ลงในสารละลายฟิล์มโดยตรง พบว่าฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่ผสมน้ำมันหอมระเหยจากทรีที ผักชี ไธม์ ใบเสจ และ โรสแมรี่ ที่ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ไม่มีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *L. innocua* *Staph. aureus* *Salmonella* *Enteritidis* และ *Ps. fragi* ได้ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ และสามารถทำอันตรกิริยากับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของเบต้า-แลกโตโกลบูลินในเวย์โปรตีน ไอโซเลท ทำให้ถูกกักเก็บไว้ภายในฟิล์ม และถูกปลดปล่อยออกมาจากเนื้อฟิล์มได้ยากขึ้น แต่สำหรับฟิล์มโปรตีน ไอโซเลทที่ผสมน้ำมันหอมระเหยกานพลูร้อยละ 3 พบว่ามีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียข้างต้น ได้ทั้งหมด ซึ่งฤทธิ์การด้านแบคทีเรียของฟิล์มที่ผสมน้ำมันหอมระเหย ขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำมันหอมระเหย จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ รวมถึงสารละลายฟิล์มพอลิเมอร์ที่ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์มด้วย (Fernandez-Pan et al., 2012) แต่ในงานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ด้านของอิมัลชันน้ำมันกานพลู ซึ่งใช้ Tween 20 เป็นสารลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำและน้ำมัน จึงทำให้ผิวของน้ำมันกานพลูมีความขี้จากการล้อมรอบของ Tween 20 ดังนั้น เมื่อใส่อิมัลชันน้ำมันกานพลูลงในสารละลายฟิล์ม อิมัลชันน้ำมันกานพลูจึงสามารถเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่มีขี้ของเบต้า-แลกโตโกลบูลินในเวย์โปรตีน ไอโซเลท และจากการศึกษา พบว่าความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ในฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลท สามารถด้านการเจริญของแบคทีเรียได้ ซึ่งมีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด ส่วน *S. Typhimurium* และ *Staph. aureus* พบว่ามีฤทธิ์ด้านที่เท่ากัน และมีฤทธิ์ด้านการเจริญของ *E. coli* ได้น้อยที่สุด แต่ฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ไม่สามารถด้านการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของฤทธิ์ด้านการเจริญของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และมีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก โดยใช้วิธี disc diffusion assay พบว่าใช้ความเข้มข้นอิมัลชันอยู่ในช่วง 15.63-31.25 $\mu\text{g/ml}$ สามารถด้านการเจริญของ *B. subtilis* *E. coli* *Ps. aeruginosa* และ *S. Typhimurium* ได้ดีเท่ากัน และสามารถด้านการเจริญของ *Staph. aureus* ได้น้อยที่สุด แต่เมื่อผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูข้างต้นลงในสารละลายฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลท พบว่าต้องใส่ความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลู ถึงร้อยละ 7 โดยน้ำหนักของสารละลายฟิล์ม จึงมีฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้ อาจเกิดจากอิมัลชันน้ำมันกานพลูเกิดอันตรกิริยากับส่วนที่มีขี้ของเบต้า-แลกโตโกลบูลินในเวย์โปรตีน ไอโซเลท ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำมันได้ยากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการ

ใช้น้ำมันหอมระเหยลงในสารละลายฟิล์มโดยตรง ก็พบปัญหาเรื่องการปลดปล่อยน้ำมันหอมระเหยออกมานอกฟิล์มเช่นกัน งานวิจัยของ Fernandez-Pan et al. (2012) รายงานว่า ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมน้ำมันกานพลูร้อยละ 2 สามารถต้านการเจริญของ *L. innocua* *Staph. aureus* และ *S. Enteritidis* แต่ไม่สามารถต้านการเจริญของ *Ps. fragi* ได้ ซึ่ง *Pseudomonas* spp. มีสามารถต่อต้านน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากส่วนที่เป็นลิโปโพลิแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์ ที่สามารถป้องกันสารเข้ามาทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนความสามารถต่อต้านน้ำมันหอมระเหยของแบคทีเรียแกรมบวก ขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Ouattara et al., 1997) จากการทดลอง พบว่าฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มีสมบัติต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ และเมื่อคำนวณความเข้มข้นของอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 พบว่ามีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 1.4 แล้วจึงผสมความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 1.4 ลงในสารละลายฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท แต่จากการทดสอบฤทธิ์ต้านการเจริญของแบคทีเรียด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.4 พบว่าสามารถต้านการเจริญของ *E. coli* และ *S. Typhimurium* ได้เท่านั้น แต่ไม่สามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* *Ps. aeruginosa* และ *Staph. aureus* ได้ ส่วนฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 พบว่าไม่สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ทุกชนิด

การผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้น Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และมีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ในสารละลายฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ส่งผลให้ฤทธิ์ต้านการเจริญแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูลดลง และต้องผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูข้างต้น ร้อยละ 7 ในสารละลายฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท จึงสามารถต้านการเจริญของ *B. subtilis* *E. coli* *S. Typhimurium* และ *Staph. aureus* แต่ไม่สามารถต้านการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ได้ และอาจประกอบกับฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มีความชื้นของฟิล์มและการละลายของฟิล์มน้อย จึงอาจส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่ลดลง และอิมัลชันน้ำมันกานพลูอาจเกิดอันตรกิริยากับเบต้า-แลกโตโกลบูลินในเวย์โปรตีนไอโซเลท จึงทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำมันกานพลูได้น้อยลง ในงานวิจัยนี้จึงเลือกฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 นี้ ไปศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่อยู่บนเนื้อหมูสดสดไลซ์ และลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และความต้องการซื้อของผู้บริโภค

ตารางที่ 4.10 ขนาด clear zone (cm) ของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมและไม่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก และฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4 โดยน้ำหนัก

แบคทีเรีย	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทผสม Tween 20 ร้อยละ 1.4	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทผสมน้ำมันกานพลู ร้อยละ 1.4	ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้นร้อยละ (โดยน้ำหนัก)			
				1	3	5	7
<i>B. subtilis</i>	0±0.00	0±0.00	0 ^C ±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	2.02 ^A ±0.02
<i>E. coli</i>	0±0.00	0±0.00	0.71 ^A ±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0.69 ^C ±0.00
<i>Ps. aeruginosa</i>	0±0.00	0±0.00	0 ^C ±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0 ^D ±0.00
<i>S. Typhimurium</i>	0±0.00	0±0.00	0.68 ^B ±0.01	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0.82 ^B ±0.01
<i>Staph. aureus</i>	0±0.00	0±0.00	0 ^C ±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0.82 ^B ±0.02

หมายเหตุ: ตัวอักษร^{A,B,C,D} หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่แสดงมีความแตกต่างกันในแนวคอลัมน์อย่างมีนัยสำคัญ ที่ p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD

3.3 ผลของการใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู กับเนื้อหมูสดสไลซ์ ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียบนเนื้อหมู และลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และความต้องการซื้อของผู้บริโภค

เลือกเนื้อหมูสดสไลซ์ ที่มีขนาดประมาณ 4×5 cm และสีของเนื้อหมูเริ่มต้นมีค่า L* อยู่ในช่วง 48-50 ค่า a* อยู่ในช่วง 18-20 และ b* อยู่ในช่วง 8-10 ซึ่งศึกษาฤทธิ์จุลินทรีย์บนเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกด้วยฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ซึ่งอิมัลชันน้ำมันกานพลูประกอบด้วย Tween 20 และน้ำมันกานพลูอย่างละ ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ฟิล์มข้างต้นถูกนำมาปิดทั้งด้านล่างและบนของผิวหน้าเนื้อหมู และเก็บเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ จากนั้นทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและประสาทสัมผัส ที่อายุการเก็บ 0 24 72 120 และ 149 ชั่วโมงของการเก็บเนื้อหมูสด และใช้เนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 เป็นตัวอย่างควบคุม

การศึกษากิจกรรมด้านการเจริญของแบคทีเรียในเนื้อหมูสดสไลซ์ ตามเกณฑ์จุลชีววิทยาของเนื้อสัตว์ดิบแช่เย็นและแช่แข็งของกรมปศุสัตว์ (สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์, 2554) ซึ่งตรวจสอบจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) coliform *Salmonella* spp. และ *Staph. aureus* ตามอายุการเก็บของเนื้อหมู แสดงในภาคผนวก จ และผลการตรวจสอบ TPC (รูปที่ 4.1) ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 ที่ปิดบนเนื้อหมูสดสไลซ์ สามารถช่วยชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ 0.41 0.42 0.85 และ 0.34 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม ส่วนเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มีค่า TPC เกินกว่าข้อกำหนดของกรมปศุสัตว์ ตั้งแต่อายุการเก็บ 120 ชั่วโมง แต่ในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดด้วยฟิล์ม มีค่า TPC เกินตามข้อกำหนดในอายุการเก็บ 149 ชั่วโมง ซึ่งตามข้อกำหนดของกรมปศุสัตว์ ระบุว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในเนื้อหมูสดที่แช่เย็นต้องไม่เกิน 5×10^5 CFU/g ดังนั้น การใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 สามารถชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ได้ และที่อายุการเก็บ 24 72 120 และ 149 ชั่วโมง

การเปลี่ยนแปลงจำนวน *E. coli* (รูปที่ 4.2) ของเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ที่อายุการเก็บที่ 0 ถึง 149 ชั่วโมง เพิ่มขึ้น 1.78 log CFU/g ส่วนเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม จำนวนเพิ่มขึ้น 2.59 log CFU/g ดังนั้น การใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 สามารถชะลอการเจริญของ *E. coli* ได้ และที่อายุการเก็บ 24 72 120 และ 149 ชั่วโมง ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 ที่ปิดบนเนื้อหมูสดสไลซ์ สามารถช่วยชะลอการเจริญของ *E. coli* ได้ 0.39 1.03 0.78 และ 0.81 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม แม้ว่าในข้อกำหนดของกรมปศุสัตว์ ระบุว่าจำนวน *E. coli* ที่สามารถพบในเนื้อหมูสดแช่เย็นต้องไม่เกิน 2 log CFU/g :ซึ่งทั้งในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิด

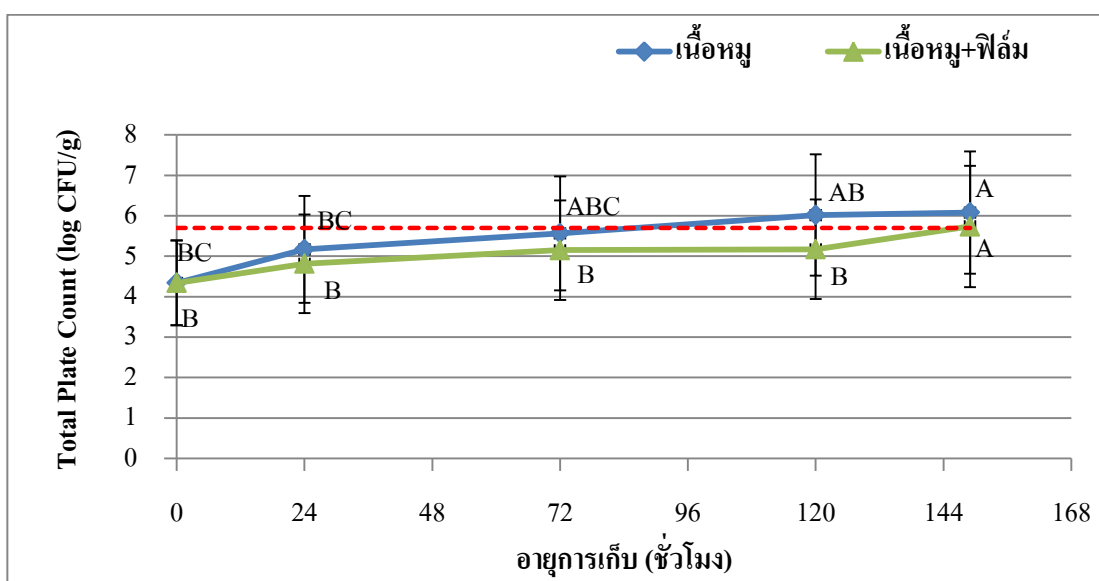
ด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 พบจำนวน *E. coli* เกินกว่าข้อกำหนดที่อายุการเก็บที่ 72 ชั่วโมง

การเปลี่ยนแปลง coliform (รูปที่ 4.3) ของเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ที่อายุการเก็บ 24 72 120 และ 149 ชั่วโมง พบว่าฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 ที่ปิดบนเนื้อหมูสดสไลซ์สามารถช่วยชะลอการเจริญของ coliform ได้ 0.52 0.03 0.22 และ 0.29 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม และตามข้อกำหนดของกรมปศุสัตว์ เนื้อหมูสดแช่เย็นต้องไม่พบ coliform เกิน 3.70 log CFU/g ซึ่งทั้งเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มีจำนวน coliform เกินตามข้อกำหนดของกรมปศุสัตว์ตั้งแต่ที่อายุการเก็บ 72 ชั่วโมง ซึ่งพบที่ 4.46 และ 4.43 log CFU/g

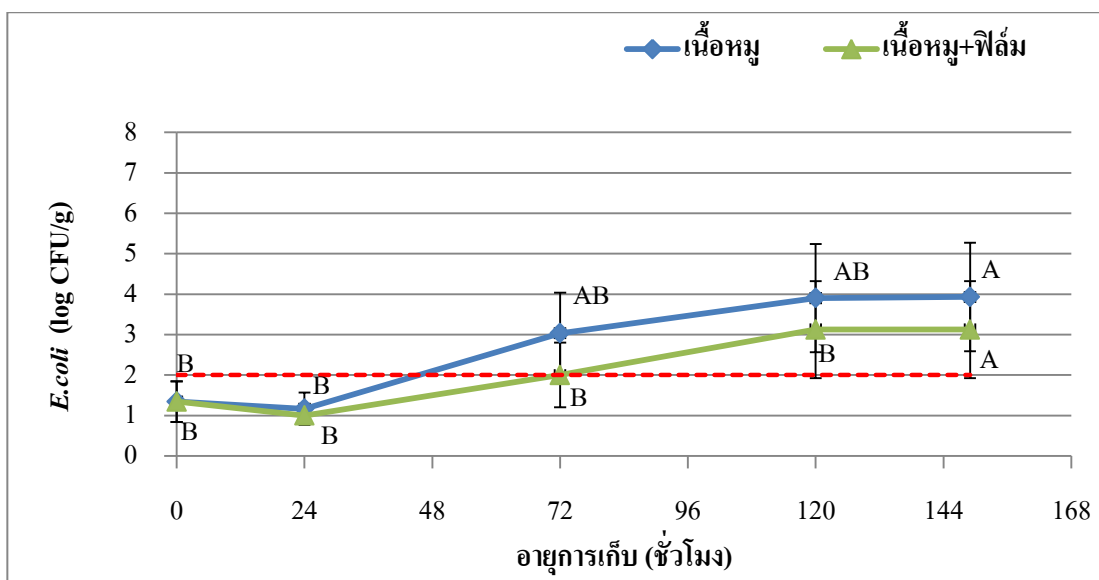
สำหรับ *Salmonella* spp. (รูปที่ 4.4) พบว่า การใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 สามารถชะลอการเจริญของ *Salmonella* spp. ที่อายุการเก็บ 24 72 120 และ 149 ชั่วโมง ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7 ที่ปิดบนเนื้อหมูสดสไลซ์สามารถช่วยชะลอการเจริญของ *Salmonella* spp ได้ 0.12 0.60 1.08 และ 0.18 log CFU/g ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม และตามข้อกำหนดของกรมปศุสัตว์ระบุว่าต้อง *Salmonella* spp ไม่พบในเนื้อหมูสดแช่เย็น แต่ในงานวิจัยนี้พบ *Salmonella* spp ตั้งแต่วันแรกที่เริ่มการทดลอง ส่วน *Staph. aureus* ตรวจไม่พบในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ และตามข้อกำหนดของกรมปศุสัตว์สามารถพบได้ไม่เกิน 1×10^2 CFU/g

ปัจจัยที่มีผลต่อการต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู มีอยู่หลายปัจจัย เช่น ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ใช้มีสมบัติสามารถป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจนได้ ซึ่งอาจทำให้จุลินทรีย์บนเนื้อหมูเจริญได้น้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 เป็นฟิล์มที่มีความชื้นต่ำและเวย์โปรตีนไอโซเลทยังประกอบด้วยส่วนที่มีขี้ผึ้ง เมื่อนำมาปิดที่ผิวหน้าของเนื้อหมู ก็สามารถลดความชื้นจากเนื้อหมู ทำให้จุลินทรีย์บนเนื้อหมูสามารถใช้น้ำที่ผิวหน้าเนื้อหมูในการเจริญได้น้อยลง ซึ่งปัจจัยข้างต้นอาจช่วยทำให้เพิ่มประสิทธิภาพฤทธิ์ด้านการเจริญของฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 อย่างไรก็ตามฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทนั้นสามารถชะลอการเจริญของจุลินทรีย์บนเนื้อหมูได้ชั่วคราว ซึ่งอาจเกิดจากน้ำมันกานพลูถูกจับด้วยสารอื่น ซึ่งน้ำมันกานพลูอาจจะจับด้วย Tween 20 หรือในส่วนของเบต้า-แลกโตโกลบูลินในเวย์โปรตีนไอโซเลท หรือไขมันในเนื้อหมู ทำให้โอกาสที่น้ำมันกานพลูเข้าไปจับกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการต้านจุลินทรีย์ลดลงตามไปด้วย จากงานวิจัยของ Gill et al. (2002) ศึกษา น้ำมัน cilantro และน้ำมัน cilantro ที่ผสมเลซิติน ต่อการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในแฮม โดยใช้วิธีจุ่มสารตามข้างต้น และเก็บในสภาวะสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 10°C พบว่า การเจริญของ *L. monocytogenes* ในแฮมที่ไม่มีและมีน้ำมัน cilantro ไม่แตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเกิดจากน้ำมัน cilantro จับ

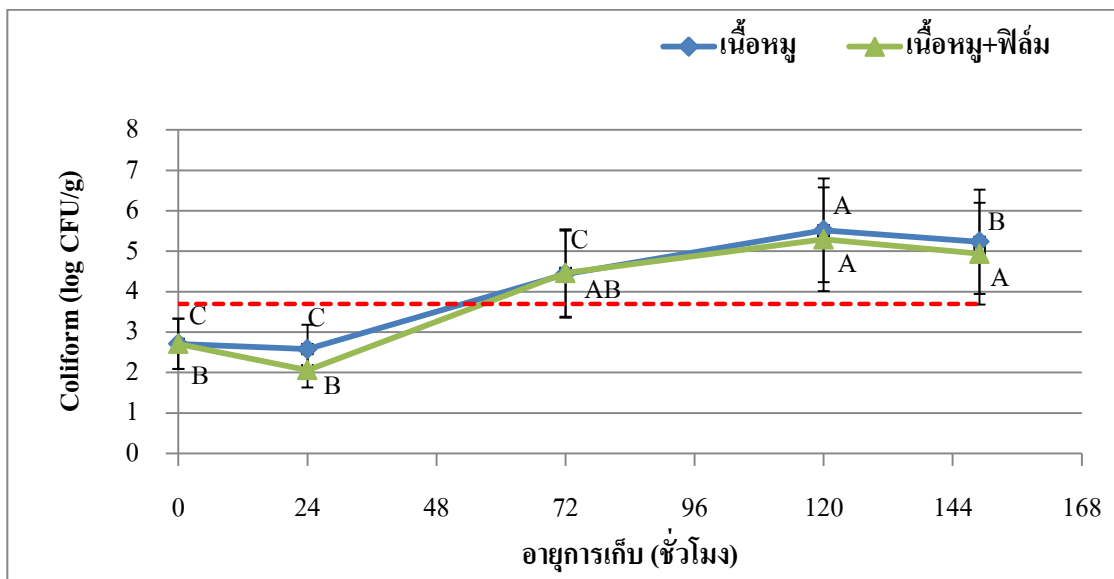
กับส่วนที่ไม่มีหัวของสารอื่น เช่น เลซิธิน หรือไขมันในแสม ส่งผลให้มีเกิดการจับที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ที่อยู่ในส่วนที่ชอบน้ำของแสมได้น้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเคลือบและการห่อด้วยฟิล์มพอลิเมอร์ที่ผสมสารต้านจุลินทรีย์ ก็มีผลต่อต้านการเจริญจุลินทรีย์ ฟิล์มพอลิเมอร์ที่ผสมสารต้านจุลินทรีย์แล้วขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มอาจจะมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ได้น้อยกว่าการเคลือบผิว (coating) เนื่องจากสารต้านจุลินทรีย์ที่อยู่ในฟิล์มอาจจะไม่สัมผัสกับผิวหนังอาหารได้ทั่วถึง ทำให้มีข้อจำกัดในเรื่องของการแพร่ของสารต้านจุลินทรีย์ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการต้านจุลินทรีย์ (Han, 2000; Chiu and Lai, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Emiroglu et al. (2010) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มถั่วเหลืองที่ผสมน้ำมันโรสม์และออริกาโนในก้อนเนื้อวัวสดสด เก็บในสถานะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า ฟิล์มถั่วเหลืองที่ผสมน้ำมันโรสม์และออริกาโนสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในก้อนเนื้อวัวสดได้เล็กน้อยในช่วงอายุการเก็บที่ 3 และ 6 วัน และที่อายุการเก็บที่ 12 วัน พบว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดใกล้เคียงกับก้อนเนื้อวัวสดที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม ซึ่งอาจเกิดจากก้อนเนื้อวัวสดสดมีพื้นผิวที่ไม่เรียบ ทำให้ฟิล์มไม่สามารถสัมผัสพื้นที่ผิวของก้อนเนื้อวัวได้ทั่วทั้งก้อน จึงส่งผลให้สารต้านจุลินทรีย์ในน้ำมันทั้งสองชนิด มีโอกาสสัมผัสกับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ได้น้อยลง ประสิทธิภาพการต้านการเจริญของจุลินทรีย์จึงลดลงตามไปด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการเคลือบ ก็มีข้อจำกัดในเรื่องของการควบคุมสารที่เคลือบบนอาหาร รวมถึงต้องมีขั้นตอนในการกำจัดสารต้านจุลินทรีย์ที่เกินออกนอกผิวอาหาร ซึ่งต้องใช้เวลาและเป็นอุปสรรคต่อการใช้งานในอุตสาหกรรม (Han, 2000; Chiu and Lai, 2010) อย่างไรก็ตามการมีคุณสมบัติตั้งแต่ขั้นตอนการผลิตวัตถุดิบตลอดจนถึงกระบวนการผลิตอาหารก็ยังเป็นสิ่งที่จำเป็น เนื่องจากสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ รวมถึงการปนเปื้อนจุลินทรีย์ข้ามกระบวนการผลิต และยังช่วยการทำงานของสารต้านจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นอีกด้วย



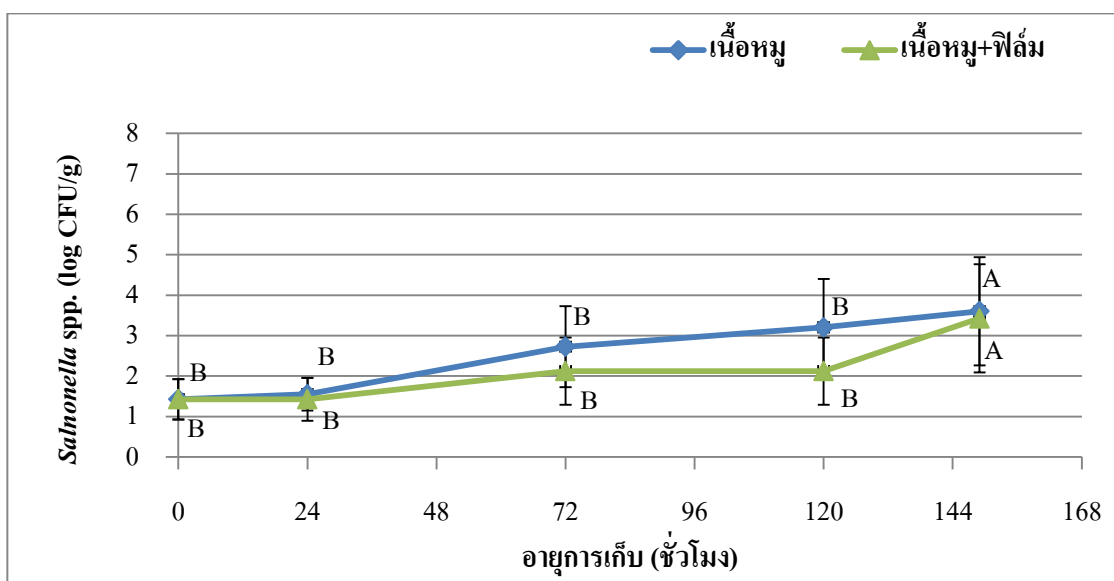
รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g) ในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 4°C



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงของ *E. coli* (log CFU/g) เนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 4°C



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงของ coliform (log CFU/g) ในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 4°C



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของ Salmonella spp. (log CFU/g) ในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 4°C

การประเมินประสิทธิภาพสัมพัทธ์การได้รับกลิ่นของเนื้อหมูสดไสซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ซึ่งศึกษากลิ่นทั้งหมด 2 ชนิด คือ กลิ่นคาว และกลิ่นน้ำมันกานพลูบนเนื้อหมู (ตารางที่ 4.10) สำหรับกลิ่นคาวของเนื้อหมู พบว่าเนื้อหมูสดไสซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มีแนวโน้มกลิ่นคาวของเนื้อหมูสูงขึ้น ตามอายุการเก็บ แต่ในเนื้อหมูสดไสซ์ที่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 พบว่าที่อายุการเก็บตั้งแต่ 24 ถึง 149 ชั่วโมง กลิ่นคาวของเนื้อหมูมีค่าเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ซึ่งอยู่ในช่วง 1.64-1.93 และยังมีกลิ่นคาวของเนื้อหมุน้อยกว่าเนื้อหมูสดที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 งานวิจัยของ Lee et al. (2004) ศึกษาการใช้ฟิล์ม micro-perforated ห่อเนื้อหมูสด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C ต่อการประเมินทางประสาทสัมผัสการได้รับกลิ่นคาวหมู (off-odour) โดยใช้ระดับการให้คะแนน 1 ถึง 5 ซึ่ง 1 คือ มากที่สุด และ 5 คือ น้อยที่สุด พบว่าการเกิดกลิ่นคาวของเนื้อหมูมาก (ช่วงคะแนน เท่ากับ 2) ในวันที่ 14 ของอายุการเก็บ ซึ่ง off-odour ของเนื้อหมูสัมพันธ์กับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด คือ เกิด off-odour มาก เมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์อยู่ที่ $7 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ (Tewari, Jayas, and Holley, 1999; Lee et al., 2004) และจากการคำนวณ พบว่าค่า log ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่อพื้นที่ผิวของเนื้อหมูในเนื้อหมูสดไสซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 อายุการเก็บที่ 149 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่ผู้บริโภคให้คะแนนกลิ่นคาวของเนื้อหมูอยู่ในระดับปานกลาง (คะแนนอยู่ที่ 3.66) มีเท่ากับ $5 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ นอกจากนี้ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดกลิ่นคาวในเนื้อหมู ส่วนหนึ่งเกิดจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่อยู่ในเนื้อเยื่อของหมู ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (Kanner, 1994) และในเนื้อหมูพบว่าปริมาณไขมันสูง จึงทำให้เกิดกลิ่นคาวได้เร็ว สำหรับกลิ่นน้ำมันกานพลู พบว่า เนื้อหมูสดไสซ์ที่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มีกลิ่นน้ำมันกานพลูบนเนื้อหมูสดไสซ์ที่มีค่าใกล้เคียงกัน ตั้งแต่อายุการเก็บที่ 24-149 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วง 3.12-3.61 อาจเกิดจากน้ำมันกานพลูจับกับไขมันบนเนื้อหมูสด ทำให้เมื่อเวลาลอกฟิล์มออกสำหรับทดสอบทางประสาทสัมผัส ก็ยังคงมีกลิ่นน้ำมันกานพลูติดอยู่ แม้ว่าฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 สามารถชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ได้ แต่การใช้ปริมาณของน้ำมันกานพลูที่สูง อาจมีผลต่อกลิ่นรสของอาหาร รวมถึงการยอมรับของผู้บริโภคด้วย เนื้อหมูที่ถูกปิดผิวหน้าด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ยังมีกลิ่นคาวของเนื้อหมูใกล้เคียงกัน ตามอายุการเก็บ ซึ่งอาจเกิดจากน้ำมันกานพลูสามารถชะลอการเกิดกลิ่นคาวของเนื้อหมูได้ และกลิ่นน้ำมันกานพลูที่ติดบนเนื้อหมูอาจจะกลบกลิ่นคาวของเนื้อหมู ทำให้ผู้ทดสอบได้รับกลิ่นคาวของเนื้อหมุน้อย (Kong et al., 2010)

การประเมินทางด้านของสีชมพูของเนื้อหมูสดไสซ์ที่เปลี่ยนแปลงไป (ตารางที่ 4.11) พบว่าสีชมพูของเนื้อหมูสดไสซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มีสีชมพูของเนื้อหมูที่ลดลง เมื่ออายุการเก็บที่ 149 ชั่วโมง ส่วนฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มีสีชมพูของเนื้อหมูที่ลดลง เมื่ออายุการเก็บที่ 120 ชั่วโมง เนื่องจากฟิล์มเวย์โปรตีน

ไอโซเลทมีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของก๊าซออกซิเจนได้ดี (McHugh et al., 1994) ซึ่งออกซิเจนมีบทบาทสำคัญในการรักษาสีชมพูของเนื้อหมู ในสภาวะที่มีออกซิเจนเนื้อหมูมีสีแดงสด ที่มาจาก oxymyoglobin แต่เมื่อ oxymyoglobin เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้กลายเป็น metmyoglobin ซึ่งทำให้เนื้อหมูมีสีคล้ำขึ้นได้ นอกจากออกซิเจนแล้ว อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บเนื้อหมู ก็มีผลต่อสีของเนื้อหมูเช่นกัน พบว่าการใช้อุณหภูมิที่ -1.5°C สามารถรักษาสีชมพูของเนื้อหมูได้ดีกว่าการใช้อุณหภูมิที่สูง 2°C และ 5°C (Hui et al., 2001) ปัจจุบันยังมีการใช้ฟิล์มสังเคราะห์ หรือ ฟิล์ม micro-perforated มาใช้ห่อเนื้อหมูสด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0°C พบว่าที่อายุการเก็บ 7 วัน สีของเนื้อหมูยังอยู่ในช่วงที่ผู้บริโภคยังสามารถยอมรับได้ แต่ที่อายุการเก็บ 14 วัน พบว่าสีของเนื้อหมูเปลี่ยนแปลงไปจนผู้บริโภคไม่ยอมรับ ดังนั้น ในการใช้ฟิล์มพอลิเมอร์หรือฟิล์มสังเคราะห์ในเนื้อสัตว์ โดยเฉพาะเนื้อหมู ต้องคำนึงถึงการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อหมูด้วย เนื่องจากฟิล์มที่ใช้อาจมีผลต่อการซึมผ่านออกซิเจน (Lee et al., 2004)

สำหรับความต้องการซื้อของผู้บริโภคของเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ตามตารางที่ 4.11 พบว่าอายุการเก็บที่ 24 ชั่วโมง ผู้บริโภคอาจจะซื้อเนื้อหมู มีคะแนนอยู่ที่ 4.10 แต่ที่อายุการเก็บที่ 72 120 และ 149 ชั่วโมง พบว่าความต้องการซื้อของผู้บริโภคลดลง ซึ่งมีคะแนน คือ 2.90 2.39 และ 2.21 ตามลำดับ ซึ่งเหตุผลหลักที่ผู้บริโภคมีความต้องการซื้อลดลง เนื่องจากเกิดกลิ่นคาวหมู แต่ในขณะที่เนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 พบว่าความต้องการซื้อของผู้บริโภคมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ตามอายุการเก็บที่ 24 72 120 และ 149 ชั่วโมง โดยมีคะแนน เท่ากับ 2.29 2.96 3.12 และ 3.26 ตามลำดับ ซึ่งคะแนนอยู่ในช่วงที่ผู้บริโภคตัดสินใจที่อาจจะไม่ซื้อหรือซื้อเนื้อหมูก็ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม อายุการเก็บที่ 24 ชั่วโมง พบว่าผู้บริโภคต้องการซื้อเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 มากกว่าเนื้อหมูที่ถูกปิดด้วยฟิล์ม เนื่องจากเนื้อหมูที่ถูกปิดด้วยฟิล์ม มีความฉุนของน้ำมันกานพลูมาก แต่ในอายุการเก็บที่ 72 ชั่วโมง พบว่าความต้องการซื้อของผู้บริโภคในเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจจะกลิ่นน้ำมันกานพลูในเนื้อหมูที่ถูกปิดด้วยฟิล์มช่วยลดการเกิดกลิ่นคาวของเนื้อหมู ส่วนอายุการเก็บที่ 120 และ 149 ชั่วโมง ของเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม มีกลิ่นคาวของเนื้อหมูเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ความต้องการซื้อของผู้บริโภคลดลง ซึ่งจากงานวิจัยของ Kong et al. (2010) ศึกษาประสิทธิภาพ antioxidant ของสารสกัดที่ได้จากกานพลู โรสแมรี่ เปลือกของขุมเห็ดเทศ ชะเอมเทศ จันทร์เทศ และกระวาน พบว่าสารสกัดจากกานพลูมีความสามารถในการรีดิวซ์สูงสุด (reducing power) และสามารถยับยั้งการเกิด thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ได้ ร้อยละ 51.3 ซึ่ง TBARS ถูกใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation ในสารสกัด นอกจากนี้เมื่อนำสารสกัดจากกานพลูผสมในเนื้อหมูสับและทอดที่อุณหภูมิ 73°C เก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 0 1 3 5 และ 7 วัน พบว่า สารสกัดจากกานพลูสามารถลดการเกิด off-flavor ได้ และยังช่วยรักษาสีชมพูที่อยู่ภายในของก้อนเนื้อหมูที่ผ่านการทอดได้อีกด้วย ซึ่งสารสกัดในกานพลูมีสมบัติเป็น

reducing power ที่สูง จึงสามารถช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ ทำให้เกิด off-flavor ในเนื้อหมูน้อยลง ดังนั้นในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ซุป และซอส จึงมักใช้กานพลูถูกเป็นเครื่องเทศในการลดการเกิดกลิ่นคาว (สุพจน์ คีลานเกตุชม, 2543)

ฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อใช้ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ซึ่งอิมัลชันประกอบด้วยความเข้มข้น Tween 20 และน้ำมันกานพลูอย่างละ ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก มาปิดบนเนื้อหมูสดสไลซ์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C อายุการเก็บ 149 ชั่วโมง พบว่าสามารถ TPC *E.coli* coliform และ *Salmonella* spp. และผลการประเมินประสาทสัมผัสของผู้บริโภค พบว่าฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู สามารถชะลอการเกิดกลิ่นคาวของเนื้อหมูได้ อย่างไรก็ตามฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีของเนื้อหมู และยังมีกลิ่นของน้ำมันกานพลูติดบนเนื้อหมู ทำให้ความต้องการซื้อเนื้อหมูของผู้บริโภคช่วงเริ่มต้นของอายุการเก็บน้อยกว่าช่วงท้ายของอายุการเก็บ เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อหมูที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม

ตารางที่ 4.11 การประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสการได้รับกลิ่นคาวของเนื้อหมู และกลิ่นน้ำมันกานพลู ของเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ซึ่งอิมัลชันประกอบด้วย Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และมีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 4°C

ลักษณะ		อายุการเก็บ (ชั่วโมง)				
		0	24	72	120	149
กลิ่นคาวของเนื้อหมู	เนื้อหมูสด	1.00 ^c ±0.00	1.92 ^{Ac} ±0.85	2.98 ^{Ab} ±1.14	3.68 ^{Aa} ±0.94	3.66 ^{Aa} ±1.16
	เนื้อหมูสดที่ถูกปิดด้วยฟิล์ม	1.00 ^{ab} ±0.00	1.72 ^{Aab} ±0.81	1.64 ^{Bb} ±0.85	1.93 ^{Ba} ±0.96	1.83 ^{Bab} ±1.05
กลิ่นน้ำมันกานพลู	เนื้อหมูสด	1.00 ^b ±0.00	1.56 ^{Aab} ±0.76	1.63 ^{Aa} ±0.80	1.38 ^{Ab} ±0.72	1.36 ^{Ab} ±0.74
	เนื้อหมูสดที่ถูกปิดด้วยฟิล์ม	1.00 ^c ±0.00	3.61 ^{Ba} ±0.93	3.52 ^{Ba} ±1.03	3.12 ^{Bb} ±0.95	3.16 ^{Bb} ±1.26

หมายเหตุ: ตัวอักษร ^{A,B...} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของที่แสดงมีความแตกต่างกันในแนวคอลัมน์ของแต่ละลักษณะอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD
 ตัวอักษร ^{a,b...} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของที่แสดงมีความแตกต่างกันในแนวแถวของแต่ละลักษณะอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD
 คะแนนสำหรับการประเมินด้านกลิ่น: 1 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูน้อยที่สุด 2 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูน้อย 3 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูปานกลาง
 4 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูมาก และ 5 คือ มีกลิ่นคาว/น้ำมันกานพลูมากที่สุด

ตารางที่ 4.11 การประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสการเปลี่ยนแปลงค่านี และความต้องการซื้อของผู้บริโภคของเนื้อหมูสดไสซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ซึ่งอิมัลชันประกอบด้วย Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และมีความเข้มข้นน้ำมันกานพลูร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 4°C

ลักษณะ		อายุการเก็บ (ชั่วโมง)				
		0	24	72	120	149
สีชมพู	เนื้อหมูสด	3.00 ^b ±0.00	3.16 ^{Ab} ±0.75	3.56 ^{Aa} ±0.75	3.72 ^{Aa} ±0.88	3.43 ^{Aa} ±1.15
	เนื้อหมูสดที่ถูกปิดด้วยฟิล์ม ^{NS}	3.00±0.00	3.07 ^A ±0.56	3.34 ^A ±1.05	3.22 ^B ±1.02	2.83 ^B ±0.90
ความต้องการซื้อของผู้บริโภค	เนื้อหมูสด	5.00 ^a ±0.00	4.10 ^{Aa} ±0.90	2.90 ^{Ab} ±1.19	2.39 ^{Ac} ±1.14	2.21 ^{Ac} ±1.22
	เนื้อหมูสดที่ถูกปิดด้วยฟิล์ม	5.00 ^a ±0.00	2.29 ^{Bd} ±1.03	2.96 ^{Ac} ±1.16	3.12 ^{Bb} ±1.00	3.26 ^{Bb} ±1.03

หมายเหตุ: ตัวอักษร ^{A, B, ...} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของที่แสดงมีความแตกต่างกันของในแนวคอลัมน์ของแต่ละลักษณะอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD

ตัวอักษร ^{a, b, ...} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของที่แสดงมีความแตกต่างกันของในแนวแถวของแต่ละลักษณะอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD

ตัวอักษร ^{NS} หมายถึง ค่าเฉลี่ยของที่แสดงมีความไม่แตกต่างกันของในแนวแถวของแต่ละลักษณะแต่ละแถวอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD

คะแนนสำหรับการประเมินค่านี: 1 คือ มีสีชมพูน้อยที่สุด 2 คือ มีสีชมพูน้อย 3 คือ มีสีชมพูปานกลาง 4 คือ มีสีชมพูมาก และ 5 คือ มีสีชมพูมากที่สุด

คะแนนสำหรับการประเมินความต้องการซื้อของผู้บริโภค: 1 คือ ไม่ซื้อแน่นอน 2 คือ บางทีอาจจะไม่ซื้อ 3 คือ อาจจะซื้อ/ไม่ซื้อ 4 คือ บางทีอาจจะซื้อ และ

5 คือ ซื้อแน่นอน

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

อิมัลชันน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น ของ Tween 20 ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก และมีความเข้มข้น น้ำมันกานพลู ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก มีความสามารถด้านการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดได้ดีที่สุด (*B. subtilis* *E. coli* *Ps. aeruginosa* *S. Typhimurium* และ *Staph. aureus*) และมีค่า MIC ของแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิด อยู่ในช่วง 0.98-3.90 $\mu\text{g/mL}$ และค่า MBC ของ *E. coli* *Ps. aeruginosa* *S. Typhimurium* และ *Staph. aureus* เท่ากัน คือ 7.81 $\mu\text{g/mL}$ ส่วน *B. subtilis* พบว่าค่า MBC มีค่ามากกว่า 500 $\mu\text{g/mL}$ ส่วนความเข้มข้นของอิมัลชันที่สามารถทำให้เกิด clear zone มากกว่า 0.8 cm ในแบคทีเรีย 5 ชนิด อยู่ในช่วง 7.81-15.63 $\mu\text{g/mL}$ ความหนืดของอิมัลชันน้ำมันกานพลู ที่มีความเข้มข้น ของ Tween 20 ร้อยละ 20 เท่ากับ 9.3 mPa·s และมีขนาดอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยโดยปริมาตร มีค่าเท่ากับ 22.018 μm

ฤทธิ์ด้านการเจริญแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ซึ่งอิมัลชันน้ำมันกานพลูประกอบด้วยความเข้มข้นของ Tween 20 และน้ำมันกานพลูอย่างละ ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ในฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท สามารถด้านการเจริญของ *B. subtilis* *E. coli* *S. Typhimurium* และ *Staph. aureus* ได้ แต่ที่ไม่สามารถด้านการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ได้ และสำหรับสมบัติทางกายภาพของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่มีความเข้มข้นอิมัลชันร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก มีค่าการซึมผ่านไอน้ำที่เท่ากับ 4.11 $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2\cdot\text{day}\cdot\text{kPa}$ ค่าต้านทานแรงดึงเท่ากับ 1034.55 MPa ร้อยละของการยืดออกเท่ากับ 63.14 ร้อยละของการละลายเท่ากับ 17.81 และความชื้นของฟิล์ม เท่ากับร้อยละ 17.39 ส่วนสีของฟิล์มเวย์โปรตีน ไอโซเลทที่มีความเข้มข้น อิมัลชันร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก มีสีเหลืองอ่อน

ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่มีความเข้มข้นอิมัลชันร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก ซึ่งอิมัลชันน้ำมันกานพลูประกอบด้วยความเข้มข้นของ Tween 20 และน้ำมันกานพลูอย่างละ ร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ที่ปิดบนเนื้อหมูสดสไลซ์ ที่อุณหภูมิ 4°C สามารถชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด *E. coli* coliform และ *Salmonella* spp. ที่อยู่บนเนื้อหมูได้ เมื่อเทียบกับเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่มีความเข้มข้นอิมัลชันร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก และผลการประเมินประสาทสัมผัสของผู้บริโภค พบว่าฟิล์มที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก สามารถชะลอการเกิดกลิ่นคาวของเนื้อหมูได้ อย่างไรก็ตามฟิล์มที่มีความเข้มข้นอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 โดยน้ำหนัก มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสีของเนื้อหมู และยังมีกลิ่นของน้ำมันกานพลูติดบนเนื้อหมู ทำให้ความต้องการซื้อเนื้อหมูของผู้บริโภคช่วงเริ่มต้นของอายุการเก็บน้อยกว่าช่วงท้ายของอายุการเก็บ เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อหมูที่ไม่ถูกปิดด้วยฟิล์ม

5.2 ข้อเสนอแนะ

ศึกษาชนิดของสารละลายพอลิเมอร์ชนิดอื่น เพื่อใช้ในการขึ้นรูปฟิล์ม ที่สามารถทำให้ฟิล์มมีสมบัติด้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เมื่อใช้ปริมาณของอิมัลชันที่น้อย หรือศึกษาฤทธิ์การต้านของจุลินทรีย์ด้วยอิมัลชันของน้ำมันผสม เพื่อลดกลิ่นฉุนของน้ำมันกานพลู เมื่อนำไปประยุกต์ในอาหาร

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์. 2553. Clove/ กานพลู[ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

<http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1332/clove>[28 มีนาคม 2556]

รุ่งรัตน์ เหลืองนทีเทพ. 2540. พืช เครื่องเทศ และสมุนไพร. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

วัชรวิ ลักษณ์าศัย. 2514. กานพลู. กสิกรรม 44(4): 313-315.

วิเชษฐ ชาติทองไชย และรัชยา หมั่นจริยา. 2554. การเฝ้าระวังการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ในเนื้อสุกร และเนื้อโค ในเขตพื้นที่จังหวัดสกลนคร ปีงบประมาณ 2551-2553[ออนไลน์]. แหล่งที่มา:

<http://www.dld.go.th/certify/th/images/stories/report/academic/FieldsurveillanceofBacterialcontaminationinPorkandBeefmeatinSakonNakhonProvincebetweenthefiscayear2008-2010.pdf>[28 เมษายน 2556]

วุฒิ วุฒิชรรณเวช. 2540. รวมหลักเภสัชกรรมไทย. สารานุกรมพืชสมุนไพร เล่มที่1: 618.

สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2550. โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน[ออนไลน์].

แหล่งที่มา:<http://www.champa.kku.ac.th/biochem/sompongwebpage/book/proteinstructureandfunction/Proteinstructureandfunction.pdf>[28 เมษายน 2556]

สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์. 2554. เกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของสินค้าปศุสัตว์เพื่อการส่งออก[ออนไลน์]. แหล่งที่มา:<http://www.dld.go.th/certify/th/images/stories/BLSC/generaladministration/law/p03.pdf>[24 เมษายน 2556]

สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์. 2554. เนื้อหมูอนามัย สะอาด ปลอดภัย ช่วยโย ผู้บริโภค[ออนไลน์]. แหล่งที่มา:<http://www.dld.go.th/certify/th/images/stories/project/foodeducation/7.pdf>[24 เมษายน 2556]

สำนักระบาดวิทยา. 2552. การปรับเปลี่ยนรูปแบบการนำเสนอข้อมูลเฝ้าระวังโรค[ออนไลน์]. แหล่งที่มา:[http://www.boe.moph.go.th/files/outbreak_detection_readme\[1\].pdf](http://www.boe.moph.go.th/files/outbreak_detection_readme[1].pdf)[25 กุมภาพันธ์ 2556]

สุพจน์ คิลานเภสัช. 2543. สมุนไพร เครื่องเทศ และพืชปรุงแต่งกลิ่นรส. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ประพันธ์สาส์น.

อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ, สุวิสา พงษ์อำไพ และสุภาภรณ์ คีตกลาส. 2552. การใช้ฟิล์มเคลือบบริโภคได้จากไคโตซานเพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารแช่เย็นพร้อมบริโภค. โครงการงานวิจัยเสนอสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Acar, J. and Goldstein, F.W. 1996. Disk susceptibility test. In V. Lorian (ed.), Antibiotics in Laboratory Medicine, pp. 1–51. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Ambaye, A., Kohner, P. C., Wollan, P. C., Roberts, K. L., Roberts, G. D., and Cockerill III, F. R. 1997. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of *Nocardia asteroides* complex. Journal of Clinical Microbiology 35: 847-852.
- Andrews, A.T. 1979. The formation and the structure of proteose peptone components. Journal of Dairy Research 46: 215–218.
- ASTM. 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D 882–02. In Annual Book of ASTM Standards, pp. 1–9. Philadelphia.
- Bailey, L. H. 1969. Manual of cultivated plants. New York: The Macmillan.
- Banker, G. S. 1966. Film coating theory and practice. Journal of Pharmaceutical Sciences 55: 81-89.
- Bortoleto, R. K., Oliveira, A. H., Ruller, R., Arni, R. K., and Ward, R. J. 1998. Tertiary structural changes of the alpha hemolysin from *Staphylococcus aureus* on association with liposome membranes. Archives of Biochemistry and Biophysics 351: 47-52.
- Buranasuksombat, U., Y.J. Kwon, M. Turner and B. Bhandari. 2011. Influence of emulsion droplet size on antimicrobial properties. Food Science and Biotechnology 20: 793-800.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.
- Cayot, P., and Lorient, D. 1997. Structure-function relationships of whey proteins. In S. Damodaran and A. Paraf (eds.), Food Proteins and Their Applications, pp. 225–256. New York: Marcel Dekker.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., and Ashokkumar, M. 2011. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. Ultrasonics Sonochemistry 18: 951-957.
- Chiu, P.E., and Lai, L.S. 2010. Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tso leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. International Journal of Food Microbiology 139: 23-30.
- Code of Federal Regulation. 2012. Section 184.1257 Clove and its derivatives [Online]. Available from: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1257>[2012, April 1]

- Coupland, J. N., and D. J. McClemets. 1996. Lipid oxidation in food emulsions. Trends in Food Science and Technology 7: 83-91.
- Davidson, P. M., Sofos, J. N., and Branen, A. L. 2005. Antimicrobials in foods. Florida: CRC Press LLC.
- Dybing, S. T., and Smith, D. E. 1991. Relation of chemistry and processing procedures to whey protein functionality: A Review. Cultured Dairy Products Journal 26: 4-12.
- Embuscado, E. M., and Huber, C.K. 2009. Edible films and coatings for food applications. New York: Springer Science Business Media.
- Emiroglu, Z.K., Yemis, G.P., Coskun, B.K., and Candogan, K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. Meat Science 86: 283-288.
- Esser, P. 1988. Principles in adsorption to polystyrene. Thermo Scientific Nunc Bulletin 6: 1-5.
- Fabra, M. J., Talens, P., and Chiralt, A. 2009. Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures. Food Hydrocolloids 23: 676-683.
- Fernández-Pan, I., Royo, M., and Ignacio Maté, J. 2012. Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. Journal of Food Science 77(7): 383-390.
- Friberg, S. E. 1984. Microemulsions in relation to cosmetics and their preservation. In J. J. Kabara (ed.), Cosmetic and Drug Preservation, Principles and Practice, Cosmetic Science and Technology Series, pp. 7-20. New York: Marcel Dekker.
- Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., and Mandrell, R.E. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enterica in apple juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(19): 6042-6048.
- Fu, Y., Zu, Y., Chen, L., Shi, X., Wang, Z., Sun, S., and Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytotherapy Research 21(10): 989-994.
- Fung, D. Y. C., Taylor, S., and Kahan, J. 1977. Effects of butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus*. Journal of Food Safety 1: 39-51.
- Gennadios, A. 2002. Protein-based films and coatings. Florida: CRC Press LLC.
- Gill, A.O., Delaquis, P., Russo, P., and Holley, R.A. 2002. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. International Journal of Food Microbiology 73: 83-92.

- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J. L., and Guilbert, S. 1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. International Journal of Food Science and Technology 29: 39-50.
- Gould, G. W. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. Journal of Food Protection 59: 82–86.
- Goloub, T. P. and Pugh, R. J. 2005. The role of the surfactant head group in the emulsion process: Binary (nonionic-ionic) surfactant mixtures. Journal of Colloids and Interface Science 291: 256-262
- Guilbert, S. 1986. Technology and application of edible protective films. In M. Mathlouthi (ed.), Food packaging and preservation: theory and practice, pp. 371–394. New York: Elsevier Applied Science.
- Gupta, S., and Moulik, S. P. 2007. Biocompatible microemulsions and their prospective uses in drug delivery. Journal of Pharmaceutical Sciences 97(1): 22-45.
- Han, J.H. 2000. Antimicrobial food packaging. Food Technology 54(3): 56-65.
- Han, J. H., and Floros, J. D. 1997. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. Journal of Plastic Film and Sheet 13: 287–298.
- Hiemens, P. C. 1977. Principles of Colloid and Surface Chemistry. New York: Marcel Dekker.
- Hill, L. E., Gomes, C., and Taylor, T. M. 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. Food Science and Technology 51: 86-93.
- Hui, Y.H., Nip, W.K., Rogers, R.W., and Young, O. A. 2001. Meat science and applications. Florida: CRC Press LLC.
- Jorgensen, J., Turnidge, J., and Washington, J. 1999. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In P.R. Murray (ed.), Manual of clinical microbiology, pp. 1526-1543. Washington DC: ASM Press.
- Kalemba, D., and Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry 10(10): 813-829.
- Kaltsa, O., Michon, C., Yanniotis, S., and Mandala, I. 2013. Ultrasonic energy input influence on the production of sub-micron o/w emulsions containing whey protein and common stabilizers. Ultrasonics Sonochemistry 20: 881–891.

- Kanner, J. 1994. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. Meat Science 36: 169–189.
- Katayama, T., and Nagai, I. 1960. Chemical significance of the volatile components of spices in the food preservative view point. VI. structure and antibacterial activity of terpenes. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 26: 29–32.
- Kinsella, J.E. 1984. Milk proteins: physicochemical and functional properties. Food Science and Nutrition 21: 197–262.
- Kinsella, J.E., and Whitehead, D.M. 1989. Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. Advances in Food and Nutrition Research 33: 343–438.
- Kong, B., Zhang, H., and Xiong, Y. L. 2010. Antioxidant activity of spice extracts in a liposome system and in cooked pork patties and the possible mode of action. Meat science 85(4): 772-778.
- Krochta, J. M., Baldwin, E. A., and Nisperos-Carriedo, M. O. 1994. Edible coating and films to improve food quality. Florida: CRC Press LLC.
- Krochta, J. M., and de Mulder-Johnston, C. D. 1997. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. Food Technology 51: 61–74.
- Lee, K.T., Choi, W.S., and Yoon, C. S. 2004. Effects of micro-perforated film on the quality and shelf-life improvements of pork loins during chilled storage. Meat Science 66: 77-82.
- Li, M. K., and Fogler, H. S. 1978. The instability of the oil-water interface to form the initial droplets. Journal of Fluid Mechanics 88: 499–511.
- Li, M.Y., Zhou, G.H., Xu, X.L., Li, C.B., and Zhu, W.Y. 2006. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. Food Microbiological 23 (7): 607-611.
- Liu, F., Yang, R.Q., and Li, Y.F. 2006. Correlations between growth parameters of spoilage micro-organisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2, 4 and 10°C. Food Microbiological 23: 578-583.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaitanasan, V., and Parker, M. 2006. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. International Journal of Food Microbiology 107: 180-185.
- McClements, J.D. 2005. Food emulsion. Florida: CRC Press LLC.
- McHugh, T. H., Aujard, J. F., and Krochta, J. M. 1994. Plasticized whey protein edible films: water vapor permeability properties. Journal of Food Science 59: 416-419.

- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., and Vojnov, A. A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. Free Radical Research 40: 223–231.
- Mytle, N., Anderson, G. L., Doyle, M. P., and Smith, M. A. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. Food Control 17: 102–107.
- National pork board. 1999. Pork quality standards[Online]. Available from: <http://www.globalswine.com/assets/images/qualitystandards.jpg>[2013, February 25]
- Nollet, L. M. L., and Toldra, F. 2008. Handbook of processed meats and poultry analysis. Florida: CRC Press LLC.
- Nonsee, K., Supitchaya, C., and Thawien, W. 2011. Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) oil. International Food Research Journal 18(4): 1531-1541.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P., and Begin, A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiology 37: 155-162.
- Oussallah, M., Caillet, S., Salmieri, S., Saucier, L., and Lacroix, M. 2004. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52: 5598–5605.
- Perez-Gago, M.B., Nadaud P., and Krochta, J.M. 1999. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. Journal of Food Science 64 (6): 1034-1037.
- Phan, T.D., Debeaufort, F., Peroval, C., Despre, D., Courthaudon, J. L., and Voilley, A. 2002. Arabinoxylan-lipids-based edible films and coatings. 3. Influence of drying temperature on film structure and functional properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2423–2428.
- Pranoto, Y., Salokhe, V. M., and Rakshit, S.K. 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. Food Research International 38: 267-272.
- Prindle, R. F., and Wright, E. S. 1977. Phenolic compounds. In S. S. Block (ed.), Disinfection, Sterilization and Preservation, pp. 291-251. Philadelphia: Lea and Febiger.

- Ramos, L. Ó., Silva, S. I., Soares, J. C., Fernandes, J. C., Poças, M. F., Pintado, M. E., and Malcata, X. 2012. Features and performance of edible films, obtained from whey protein isolate formulated with antimicrobial compounds. Food Research International 45(1): 351-361.
- Rooney, M. L. 1995. Overview of active food packaging. In M. L. Rooney (ed.), Active food packaging, pp. 1–37. Glasgow: Blackie Academic and Professional.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., and Goodwin, A. C. 2007. Antimicrobial susceptibility testing protocols. Florida: CRC Press LLC.
- Seydim, A. C., and Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food Research International 39: 639-644.
- Shah, B., and Zhong, P. M. D. 2013. Nanodispersed eugenol has improved antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in bovine milk. International Journal of Food Microbiology 161: 53–59.
- Sorbal, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinger, M. D., and Roques, M. A. 2001. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible film. Food Hydrocolloids 15: 423–432.
- St. Angelo, A.L. 1989. A brief introduction to food emulsions and emulsifiers. In G. Charalambous and G. Doxastakis (eds.), Food emulsifiers chemistry, technology, functional properties and application, pp. 1-8. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Suo, B., He, Y., Paoli, G., Gehring, A., Tu, S. I., and Shi, X. 2010. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens. Molecular and Cellular Probes 24: 77–86.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. Advances in Colloid and Interface Science 109: 303-318.
- Terjung, N., Löffler, M., Gibis, M., Hinrichs, J., and Weiss, J. 2012. Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. Food and Function 3: 290-301.
- Tewari, G., Jayas, D. S., and Holley, R. A. 1999. Centralized packaging of retail meat cuts: a review. Journal of Food Protection 62: 418–425.
- Van Ruth, S. M., King, C., and Giannouli, P. 2002. Influence of lipid fraction, emulsifier fraction, and mean particle diameter of oil-in-water emulsions on the release of 20 aroma compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 2365-2371.

- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K., and Adley, C. 2010. An overview of foodborne pathogen detection: in the perspective of biosensors. Biotechnology Advances 28: 232–254.
- Villalobos, R., Chanona, J., Hernandez, P., Gutierrez, G., and Chiralt, A. 2005. Gloss and transparency of hydroxypropyl methylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. Food Hydrocolloids 19: 53–61.
- Wang, L., Liu, F., Jiang, Y., Chai, Z., Li, P., Cheng, Y., Jing, H., and Leng, X. 2011. Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(23): 12411-12419.
- Whitehurst, R.J. 2004. Emulsifiers in Food Technology. Oxford: Blackwell Publishing.
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V., and Mate, J. I. 2008. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. Food Science and Technology 41: 2159-2165.
- Zúñiga, R. N., Skurtys, O., Osorio, F., Aguilera, J. M., and Pedreschi, F. 2012. Physical properties of emulsion-based hydroxypropyl methylcellulose films: effect of their microstructure. Carbohydrate Polymers 90(2): 1147-1158.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ส่วนประกอบของน้ำมันกานพลู
จากบริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด

ภาคผนวก ก

ข้อมูลคุณลักษณะ (specification) ของน้ำมันกานพลู



บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย - จีน จำกัด
THAI - CHINA FLAVOURS AND FRAGRANCES INDUSTRY CO., LTD.

SPECIFICATION

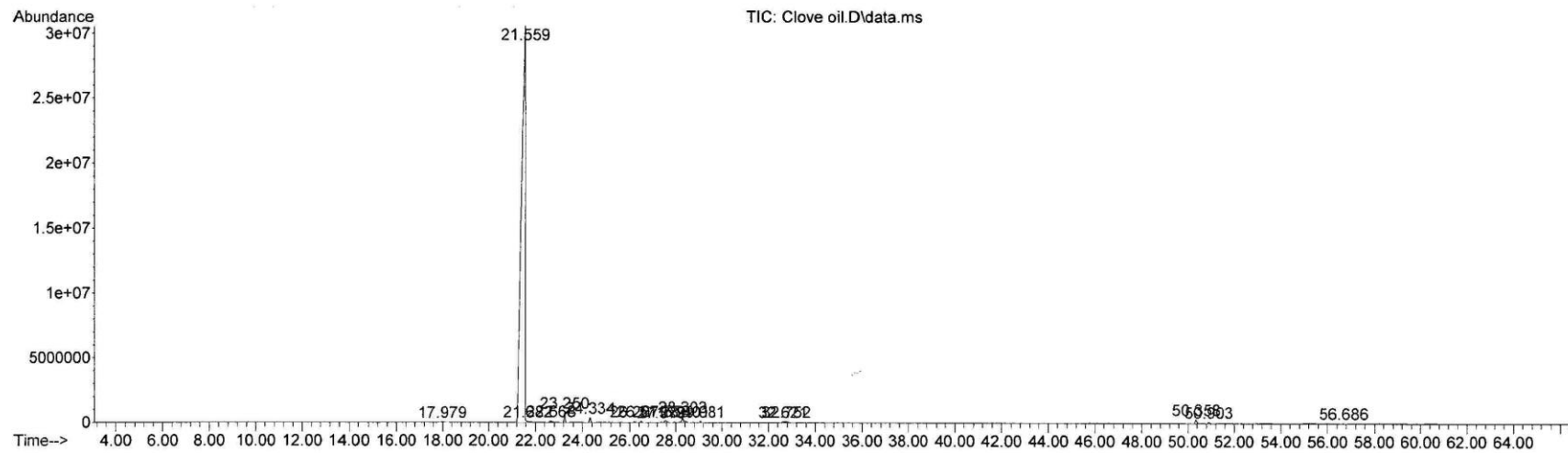
Product name	: Clove Oil
Product code	: 1324-20006
Country of Origin	: China
Product type	: Essential Oil 100%
INCI Name	: <i>Eugenia caryophyllus</i> (Clove) Bud Oil
CAS No.	: 84961-50-2
Production	: This essential oil is obtained by water distillation of dried flower bud of <i>Eugenia caryophyllus</i> (Family of myrtaceae)
Application	: Raw material for the production of foods, beverages, cosmetics and household products.
Colour and appearance	: Colourless to yellow-brown liquid, long time colour change deeper
Odour	: Spicy-sweet, green sweet green-rich clove floral odour.
Specific gravity (20/20°C)	: 1.0400-1.0600
Refractive index (20°C)	: 1.5352-1.5452
Principal constituents	: Eugenol \geq 75%
Storage	: Keep in cool, preferably at about 20- 25°C dry place and protect from light. Keep containers tightly sealed
Shelf life	: 12 Months quality should be checked visually & olfactory before each use and fully checked after the shelf life period

*THE DOCUMENT IS COMPUTER GENERATED AND NO SIGNATURE IS REQUIRED.

IN CASE OF ENQUIRY, PLEASE CONTACT
NUTCHANATH KOOMKLANG
QUALITY CONTROL SUPERVISOR
20006/EF020211

ตัวอย่างกราฟขององค์ประกอบของน้ำมันกานพลู
โดยใช้ Gas Chromatography-Mass Spectrometry

File : C:\msdchem\1\data\TCFF\Clove oil.D
Operator : K
Acquired : 30 Aug 2012 14:14 using AcqMethod FRAGRANCE.M
Instrument : GCMSD
Sample Name: Clove oil
Misc Info :
Vial Number: 4



รายละเอียดองค์ประกอบของน้ำมันกานพลู
โดยใช้ Gas Chromatography-Mass Spectrometry

clove oil.txt
Library Search Report

Data Path : C:\msdchem\1\data\TCFF\
Data File : Clove oil.D
Acq On : 30 Aug 2012 14:14
Operator : K
Sample : Clove oil
Misc :
ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST11.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex
Integration Events: ChemStation Integrator - autoint1.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	17.979	0.10	C:\Database\NIST11.L Phenol, 4-(2-propenyl)- Phenol, 4-(2-propenyl)- Benzaldehyde, 2-ethyl-	15296 15295 15288	000501-92-8 000501-92-8 022927-13-5	95 95 70
2	21.559	96.36	C:\Database\NIST11.L Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)- 3-Allyl-6-methoxyphenol Eugenol	33399 33304 33242	001941-12-4 000501-19-9 000097-53-0	98 98 98
3	21.683	0.16	C:\Database\NIST11.L Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-, (Z)- Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)- Phenol, 2-methoxy-3-(2-propenyl)-	33448 33397 33399	005912-86-7 000097-54-1 001941-12-4	95 95 95
4	22.668	0.12	C:\Database\NIST11.L Vanillin Vanillin Vanillin	25796 25797 25794	000121-33-5 000121-33-5 000121-33-5	96 95 95
5	23.251	0.66	C:\Database\NIST11.L Caryophyllene Caryophyllene Caryophyllene	64272 64275 64274	000087-44-5 000087-44-5 000087-44-5	99 99 94
6	24.334	0.34	C:\Database\NIST11.L Humulene Humulene Humulene	64256 64255 64253	006753-98-6 006753-98-6 006753-98-6	97 93 91
7	26.205	0.11	C:\Database\NIST11.L Butylated Hydroxytoluene Butylated Hydroxytoluene Butylated Hydroxytoluene	77555 77554 77556	000128-37-0 000128-37-0 000128-37-0	97 95 94
8	26.509	0.11	C:\Database\NIST11.L Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydr o-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)- Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydr o-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)- Naphthalene, 1,2,3,4-tetrahydro-1, 6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, (1S -cis)-	64485 64487 62821	000483-76-1 000483-76-1 000483-77-2	95 95 93
9	27.378	0.05	C:\Database\NIST11.L 1H-Indene, 1-ethylideneoctahydro-7 a-methyl-, (1Z,3a.alpha.,7a.beta.) 1H-Indene, 1-ethylideneoctahydro-7	33811 33810	056324-69-7 056324-68-6	78 49

รายละเอียดองค์ประกอบของน้ำมันกานพลู

โดยใช้ Gas Chromatography-Mass Spectrometry (ต่อ)

			a-methyl-, (1E,3a.alpha.,7a.beta.) 2(1H)-Naphthalenone, 3,4,4a,5,8,8a -hexahydro-4a-methyl-, trans-	33714	055283-48-2	49
10	27.558	0.26	C:\Database\NIST11.L RCH 108 Propenoic acid, 3-(bicyclo[2.2.1]hept-1-yl)-, methyl ester 1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3-dimethyl-	24707 45527 46065	002297-94-1 1000159-91-5	27 20 15
11	28.303	0.52	C:\Database\NIST11.L Caryophyllene oxide Caryophyllene oxide Caryophyllene oxide	77536 77539 77538	001139-30-6	94 91 62
12	28.402	0.16	C:\Database\NIST11.L 2,4'-Dihydroxy-3'-methoxyacetophenone Ethanone, 1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)- 4-Bromobutyric acid, 4-cyanophenyl ester	47756 35752 116062	018256-48-9	47 47 43
13	29.083	0.11	C:\Database\NIST11.L 3,5-Dimethylcyclohex-1-ene-4-carboxaldehyde 12-Oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene, 1,5,5,8-tetramethyl-, [1R-(1R*,3E,7E,11R*)]- o-Menth-8-ene	17635 77637 16856	006975-94-6	76 68 55
14	32.620	0.14	C:\Database\NIST11.L 2-Propenal, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)- 4-Hydroxy-2-methoxycinnamaldehyde (7-Methylbenzo(b)thien-2-yl)methanol	43612 43580 43655	000458-36-6	95 90 46
15	32.752	0.24	C:\Database\NIST11.L 4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol 3,7-Benzofurandiol, 2,3-dihydro-2,2-dimethyl- Phenylamine, N,4,5-trimethyl-2-nitro-	45271 45277 46177	1000297-95-5	95 52 44
16	50.360	0.37	C:\Database\NIST11.L Estragole Anethole Anethole	22611 22606 22605	000140-67-0	46 46 46
17	50.904	0.16	C:\Database\NIST11.L Benzothiophene-3-carbonitrile, 4,5,6,7-tetrahydro-2-(3-ethoxy-4-hydroxybenzylideneamino)- 3,3'-Dimethoxycarbonyl-cis-(2,5')(2,5')pyridinophane 5,7-Dimethoxy-3-(3,4-methylenedioxyphenyl)-4H-chromen-4-one	165709 165722 165674	329722-10-3	45 38 38
18	56.684	0.01	C:\Database\NIST11.L Benzeneethanamine, 4-fluoro-.alpha.-methyl- Butanoic acid, 3-amino-2-methyl- Octodrine	26546 8504 13019	000459-02-9	9 9 7

ภาคผนวก ข

**เกณฑ์จูลชีวิทยาของเนื้อสัตว์ดิบแช่เย็นและแช่แข็งของกรมปศุสัตว์
(สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์, 2554)**

ภาคผนวก ข

เกณฑ์จุลชีววิทยาของเนื้อสัตว์ดิบแช่เย็นและแช่แข็งของกรมปศุสัตว์

เกณฑ์มาตรฐานของกรมปศุสัตว์

เกณฑ์ด้านจุลชีววิทยาของเนื้อสัตว์ดิบแช่เย็นและแช่แข็ง

Aerobic Plate Count at 35°C/48 h (or at 30°C/72 h) (cfu/g)	<i>Escherichia coli</i> (org/g)	Coliform (org/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (cfu/g)	<i>Salmonella</i> spp. (in 25g)	<i>Enterococci</i> sp. (cfu/g)	Yeast & Mould (cfu/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> (in 25g)
$\leq 5.0 \times 10^5$	≤ 100	$\leq 5,000$	≤ 100	N	$\leq 1,000$	*	*

ที่มา: สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าปศุสัตว์ (2554)

หมายเหตุ

N = ตรวจไม่พบ

* = ไม่มีเกณฑ์/มาตรฐานกำหนด แต่กรมปศุสัตว์จะทำการเฝ้าระวังและโรงงานควรมีการสุ่มตรวจเป็นระยะๆ

a = Limit of Detection = 10 org/g (Solid sample), 1 org/ml (liquid sample)

b = Limit of Detection = 5 org/g (Solid sample), 1 org/ml (liquid sample)

c = Limit of Detection = 10 org/g (Solid sample), 1 org/ml (liquid sample)

ภาคผนวก ค
การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์
ดัดแปลงตามวิธีของ Liu et al. (2006)

ภาคผนวก ค

การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์

ค 1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อหมูสดสไลซ์

นำเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู จากอุณหภูมิ $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ที่อายุการเก็บต่างๆ มาเตรียมตัวอย่าง ดังนี้

1. ใช้ปากกิบเนื้อหมูสดสไลซ์ที่บรรจุในถาด ให้ได้น้ำหนัก 25 g และใส่ในถุงสำหรับเครื่อง stomacher ซึ่งปากกิบถูกฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 แล้วฉนวนไฟจนเอทานอลระเหยหมด
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (0.85 % NaCl) ปริมาตร 225 mL จากนั้นตีเนื้อหมูสดสไลซ์ด้วยเครื่อง stomacher (stomacher[®] 400 circulator, Seward, West Sussex, England) ที่ระดับ 230 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
3. เจือจางตัวอย่าง ด้วยระดับการเจือจาง 1:10 โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีปริมาตร 9 mL และปิเปตตัวอย่างผสมลงไป 1 mL จากนั้นเขย่าด้วยเครื่องเขย่าหลอดทดลอง (vortex mixer) ให้เข้ากัน และทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ

ค 2 การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด (Totale Plate Count)

โดยใช้วิธีการตรวจนับ spread plate ดังนี้

1. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 0.1 mL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA, Himedia, Mumbai, India)
2. spread ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล แล้วฉนวนไฟจนเอทานอลระเหยหมด ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และบ่มจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 48 ชั่วโมง
3. ตรวจนับจำนวนโคโลนี ที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี จากนั้นคำนวณเป็นโคโลนีต่อกรัม ตัวอย่าง (CFU/g) และคูณกลับด้วยระดับการเจือจางที่ใช้ในการตรวจนับ

ค 3 การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp.

โดยใช้วิธีการตรวจนับ spread plate ดังนี้

1. ปิเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 0.1 mL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella Shigella Agar (SSA, Himedia, Mumbai, India)
2. spread ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล แล้วลนไฟจนเอทานอลระเหยหมด ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และบ่มจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 48 ชั่วโมง
3. เลือกโคโลนีใส มีจุดดำตรงกลาง ในอาหาร SSA และเขี่ยลงใน slant ของอาหาร Triple Sugar Iron Agar (TSI, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 1 โคโลนีต่อ 1 slant และบ่ม slant ที่อุณหภูมิ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 48 ชั่วโมง
4. ถ้าเป็น *Salmonella* spp. ส่วนที่เป็น slant มีสีแดง แต่ส่วน butt มีสีเหลือง และอาจจะสร้างหรือไม่สร้าง H_2S ก็ได้
5. นับจำนวนหลอดที่ลักษณะตามข้อ 4 และรายงานเป็น โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (CFU/g) ที่คูณกลับด้วยระดับการเจือจางที่ใช้ในการตรวจนับ

ค 4 การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus*

โดยใช้วิธีการตรวจนับ spread plate ดังนี้

1. ปิเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 0.1 mL ลงบนอาหารเลี้ยง Baird-Parker agar (Himedia, Mumbai, India) ที่ผสม egg yolk tellurite ร้อยละ 5
2. spread ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วสามเหลี่ยม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล แล้วลนไฟจนเอทานอลระเหยหมด ทำการทดลอง 2 ซ้ำ และบ่มจานเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 24-48 ชั่วโมง
3. เลือกโคโลนีของ *Staph. aureus* ที่มีลักษณะสีดำ เรียบนูน มีโซนเกิดขึ้น ซึ่งโซนด้านในสีขาว ขุ่น แต่โซนด้านนอกสีใส
4. นับจำนวนโคโลนี และรายงานเป็น โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (CFU/g) ที่คูณกลับด้วยระดับการเจือจางที่ใช้ในการตรวจนับ

ค 5 การตรวจวิเคราะห์ *Escherichia coli* และ coliform

โดยใช้แผ่นการตรวจวิเคราะห์เชื้อ *E. coli* และ coliform ของบริษัท Compact Dry (Nissui pharmaceutical CO., LTD, Tokyo, Japan) ซึ่งมีขั้นตอนการตรวจสอบ ดังนี้

1. ปิเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 mL ลงบนกลางแผ่น Compact Dry และทิ้งไว้ในตัวอย่างกระจายตัว ประมาณ 2-3 วินาที ทำการทดลอง 2 ซ้ำ
2. บ่ม compact dry ที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ นาน 20-24 ชั่วโมง
3. นับโคโลนีของ *E. coli* และ Coliform โดยโคโลนีของ *E. coli* มีสีฟ้า แต่โคโลนีของ Coliform มีสีแดง จากนั้นแปลงค่าโคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (CFU/g)

ภาคผนวก ง
การประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัส

ภาคผนวก ง

การประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัส

การประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสในงานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 ในวันที่ 9 ตุลาคม 2555 โครงการวิจัยที่ 110.1/55 เรื่อง ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มบุกที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู

ง 1 การคัดกรองผู้ทดสอบ

ใช้ผู้ทดสอบ 30 คน และเป็นนิสิตหรือคนทำงานบริเวณภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกณฑ์การคัดเข้าร่วมการวิจัย

- ผู้ชายและผู้หญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป
- ผู้ที่มีสุขภาพดีและไม่ป่วยเป็นโรคหัวใจ หรือ โรคและอาการอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบทางเดินหายใจและสายตา
- ผู้ที่เคยซื้อเนื้อหมูสด
- ผู้ที่สามารถอ่านและเขียนภาษาไทยได้
- ผู้ที่มีความยินดีที่จะเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้

เกณฑ์การคัดออกจากการวิจัย

- ผู้ที่ไม่สามารถทำการทดสอบเกี่ยวกับเนื้อหมูได้ (ข้อห้ามทางศาสนา)
- ผู้ที่ป่วยเป็นโรคโรคหัวใจ หรือ โรคอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบทางเดินหายใจและสายตา

ง 2 การเตรียมตัวอย่างสำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัส

1. สุ่มเนื้อหมูสดสไลซ์ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วยฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลท ที่มีความเข้มข้นอิมัลชันร้อยละ 7 จำนวน 3 ซึ้นต่อตัวอย่าง ที่อายุการเก็บต่างๆ ซึ่งเนื้อหมูที่ถูกปิดด้วยฟิล์ม ให้ลอกฟิล์มออกก่อนการนำไปทดสอบนำไปทดสอบทางประสาทสัมผัส
2. เรียงเนื้อหมูใส่ในจานพลาสติก แล้วหุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกใส และเจาะรูไว้สำหรับการทำการทดสอบกลิ่นคาวของเนื้อหมูและกลิ่นน้ำมันกานพลู โดยระหว่างการทดสอบงานที่ใส่เนื้อหมูถูกวางบนน้ำแข็งตลอดเวลา
3. ให้ผู้ทดสอบทำการประเมินลักษณะประสาทสัมผัสเกี่ยวกับเนื้อหมูใน 3 หัวข้อ คือ สีชมพูของเนื้อหมู กลิ่นของเนื้อหมู ซึ่งแบ่ง 2 ชนิด คือ กลิ่นคาวของเนื้อหมูและกลิ่นน้ำมันกานพลู และความต้องการซื้อของผู้บริโภค โดยใช้ระดับการให้คะแนนเป็น 5 ระดับ

ใบรับรองผลพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน

AF 02-12





**The Ethics Review Committee for Research Involving Human Research Subjects,
Health Science Group, Chulalongkorn University**
Institute Building 2, 4 Floor, Soi Chulalongkorn 62, Phyathai Rd., Bangkok 10330, Thailand,
Tel: 0-2218-8147 Fax: 0-2218-8147 E-mail: eccu@chula.ac.th

COA No. 149/2012

Certificate of Approval

Study Title No.110.1/55 : **ANTIMICROBIAL ACTIVITIES KONJAC FILM CONTAINING CLOVE OIL EMULSION**
Principal Investigator : MS.PAILIN SUKWONG
Place of Proposed Study/Institution : Faculty of Science,
Chulalongkorn University

The Ethics Review Committee for Research Involving Human Research Subjects, Health Science Group, Chulalongkorn University, Thailand, has approved constituted in accordance with the International Conference on Harmonization – Good Clinical Practice (ICH-GCP) and/or Code of Conduct in Animal Use of NRCT version 2000.

Signature:  Signature: 
(Associate Professor Prida Tasanapradit, M.D.) (Assistant Professor Dr. Nuntaree Chaichanawongsaroj)
Chairman Secretary

Date of Approval : 9 October 2012

Approval Expire date : 8 October 2013

The approval documents including

- 1) Research proposal
- 2) Patient/Participant Information Sheet and Informed Consent Form
- 3) Researcher
- 4) Questionnaire



Protocol No. 110.1 / 55
Date of Approval..... - 9 OCT 2012
Approval Expire Date..... - 8 OCT 2013

The approved investigator must comply with the following conditions:

1. The research/project activities must end on the approval expired date of the Ethics Review Committee for Research Involving Human Research Subjects, Health Science Group, Chulalongkorn University (ECCU). In case the research/project is unable to complete within that date, the project extension can be applied one month prior to the ECCU approval expired date.
2. Strictly conduct the research/project activities as written in the proposal.
3. Using only the documents that bearing the ECCU's seal of approval with the subjects/volunteers (including subject information sheet, consent form, invitation letter for project/research participation (if available)).
4. Report to the ECCU for any serious adverse events within 5 working days
5. Report to the ECCU for any change of the research/project activities prior to conduct the activities.
6. Final report (AF 03-12) and abstract is required for a one year (or less) research/project and report within 30 days after the completion of the research/project. For thesis, abstract is required and report within 30 days after the completion of the research/project.
7. Annual progress report is needed for a two- year (or more) research/project and submit the progress report before the expire date of certificate. After the completion of the research/project processes as No. 6.

เอกสารข้อมูลสำหรับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

AF 04-07

ข้อมูลสำหรับกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

ชื่อ โครงการวิจัย **ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มที่มีอนุภาคผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู**

ชื่อผู้วิจัย นางสาวไพลิน สุขวงษ์

ตำแหน่ง นิสิต

สถานที่ติดต่อผู้วิจัย (ที่ทำงาน) ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ที่บ้าน) 9/189 อ.ศุภาลัยปาร์ค ซ.พหลโยธิน 21 ถ.พหลโยธิน แขวงจตุจักร เขตจตุจักร กทม. 10900

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02 218 5515 ต่อ - โทรศัพท์ที่บ้าน 02 966 2340

โทรศัพท์มือถือ 086 503 5098

E-mail : nomadtai@gmail.com

- ขอเรียนเชิญท่านเข้าร่วมในการวิจัย ก่อนที่ท่านจะตัดสินใจเข้าร่วมในการวิจัย มีความจำเป็นที่ท่านควรทำความเข้าใจว่างานวิจัยนี้ทำเพราะเหตุใด และเกี่ยวข้องกับอะไร กรุณาใช้เวลาในการอ่านข้อมูลต่อไปนี้อย่างละเอียดรอบคอบ และสอบถามข้อมูลเพิ่มเติมหรือข้อมูลที่ไมชัดเจนได้ตลอดเวลา
- โครงการวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการศึกษาผลศึกษาผลของการใช้ฟิล์มบุกที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ กับเนื้อหมูสดสไลซ์ที่อุณหภูมิ 4°C ต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภค ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันของการเก็บเนื้อหมูสดสไลซ์
- วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- ศึกษาผลของปริมาณ Tween 20 ต่อขนาดของอนุภาคน้ำมันเฉลี่ยและฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียของอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ
- ศึกษาศึกษาปริมาณอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่ได้จากข้อที่ 1 ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียและสมบัติทางกายภาพของฟิล์มบุก
- ศึกษาผลของการใช้ฟิล์มบุกที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ กับเนื้อหมูสด ต่อฤทธิ์ด้านการเจริญของแบคทีเรียบนเนื้อหมู และลักษณะทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภค
- รายละเอียดของกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

นิสิตและคนทำงานบริเวณภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวนประมาณ 30 คน โดยผู้วิจัยเข้าพบเพื่อขอความร่วมมือโดยตรง คิดประกาศตามบอร์ดประชาสัมพันธ์ของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร และอาศัยการบอกต่อจากอาสาสมัครซึ่งสถานที่เก็บข้อมูลมี 1 แห่งคือ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกณฑ์การคัดเข้าร่วมการวิจัย

- ผู้ชายและผู้หญิงที่มีอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป
- ผู้ที่มีสุขภาพดีและไม่ป่วยเป็นโรคหัวใจ หรือ โรคและอาการอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบทางเดินหายใจและสายตา
- ผู้ที่เคยซื้อเนื้อหมูสด
- ผู้ที่สามารถอ่านและเขียนภาษาไทยได้
- ผู้ที่มีความยินดีที่จะเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้

เกณฑ์การคัดออกจากการวิจัย

- ผู้ที่ไม่สามารถทำการทดสอบเกี่ยวกับเนื้อหมูได้ (ข้อห้ามทางศาสนา)
- ผู้ที่ป่วยเป็นโรค โรคหัวใจ หรือ โรคอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบทางเดินหายใจและสายตา



เลขที่โครงการวิจัย..... 110-1/55
 วันที่รับรอง..... - 9 ต.ค. 2555
 วันที่หมดอายุ..... - 8 ต.ค. 2556

เอกสารข้อมูลสำหรับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย (ต่อ)



เลขที่โครงการวิจัย..... 110-1/55

AF 04-07

หมายเหตุ:

วิธีการคัดเลือกผู้ทดสอบ

วันที่เริ่มของ..... - 9 ต.ค. 2555

วันหมดอายุ..... - 8 ต.ค. 2556

- ผู้ที่มีสุขภาพดีและไม่ป่วยเป็นโรคหัวใจ หรือ โรคและอาการอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อระบบทางเดินหายใจและสายตา โดยใช้วิธีการสัมภาษณ์ท่านละประมาณ 1-2 นาที
- ผู้ที่เคยซื้อเนื้อหมู โดยเบื้องต้นใช้วิธีการสัมภาษณ์และให้ผู้ทำการทดสอบประเมินในแบบสอบถามก่อนการทดสอบทางประสาทสัมผัส

5. กระบวนการการวิจัยที่กระทำต่อกลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

โดยผู้วิจัยจะใช้แบบสอบถามแบบสอบถามประเมินทางด้านสีและกลิ่น และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภค ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันของการเก็บเนื้อหมูสด ตัวอย่างละประมาณ 3 ชิ้น ซึ่งใช้เวลาตอบแบบสอบถาม ประมาณ 15 นาทีจำนวนการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 ตัวอย่าง

ข้อมูลที่ี้จากการประเมินของท่านนำไปวิเคราะห์ผลของการประเมินทางด้านสีและกลิ่น และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภคของเนื้อหมูสดสไลซ์ถูกวางแผ่นฟิล์มบุกที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำที่อายุการเก็บต่างๆ

6. กระบวนการให้ข้อมูลแก่กลุ่มประชากรหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

ผู้วิจัยอธิบายหรือชี้แจงเหตุผลถึงหลักเกณฑ์ในการทดสอบทุกครั้งและให้ความช่วยเหลือ/แนะนำตามความเหมาะสม

7. ในงานวิจัยนี้ เป็นการทดลองเนื้อหมูที่ถูกวางแผ่นฟิล์มบุกที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูในน้ำ ที่อายุการเก็บต่างๆ ซึ่งอาจจะทำให้กลิ่นและสีของเนื้อหมูแตกต่างจากท้องตลาดบ้าง ในกรณีที่กลิ่นของตัวอย่างแรงหรือทำให้ผู้ทดสอบไม่สามารถทำการทดสอบต่อได้ วิธีการแก้ไข คือ ให้ผู้ทดสอบออกไปสูดอากาศนอกห้องทดลอง แต่ถ้าผู้ทดสอบไม่สะดวกที่ทำการทดสอบต่อ ก็สามารถออกจากกรทดสอบได้ วิธีการป้องกัน คือ ทำการทดสอบในห้องที่มีอากาศถ่ายเทได้ดี และผู้ทดสอบต้องดมและดูเนื้อหมูผ่านฟิล์มพลาสติกเจาะรู เพื่อป้องกันการสัมผัสกับตัวอย่างโดยตรง

8. ท่านไม่ได้รับประโยชน์โดยตรงจากการเข้าร่วมโครงการแต่ผลการประเมินสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น และอาจจะใช้ในการข้อมูลในการพัฒนางานวิจัยในภายภาคหน้าได้อีกด้วย

9. การเข้าร่วมในการวิจัยของท่านเป็น โดยสมัครใจ และสามารถปฏิเสธที่จะเข้าร่วมหรือถอนตัวจากการวิจัยได้ทุกขณะ โดยไม่ต้องให้เหตุผลและไม่สูญเสียประโยชน์ที่พึงได้รับ และไม่มีผลกระทบต่อการศึกษาหรือการทำงานของท่าน

10. หากท่านมีข้อสงสัยให้สอบถามเพิ่มเติมได้โดยสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ตลอดเวลา และหากผู้วิจัยมีข้อมูลเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์หรือโทษเกี่ยวกับการวิจัย ผู้วิจัยจะแจ้งให้ท่านทราบอย่างรวดเร็วเพื่อให้ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัยทบทวนว่ายังสมัครใจจะอยู่ในงานวิจัยต่อไปหรือไม่

11. ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับท่านจะเก็บเป็นความลับ หากมีการเสนอผลการวิจัยจะเสนอเป็นภาพรวมข้อมูลที่สามารถระบุถึงตัวท่านได้จะไม่ปรากฏในรายงาน

12. การเข้าร่วมทดสอบท่านจะไม่ได้รับค่าใช้จ่ายพาหนะสำหรับการเดินทาง ท่านจะได้รับของที่ระลึก คือ เครื่องเขียน ในครั้งสุดท้ายของการประเมิน

13. หากท่านไม่ได้รับการปฏิบัติตามข้อมูลดังกล่าวสามารถร้องเรียนได้ที่ คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 4 อาคารสถาบัน 2 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-8147 หรือ 0-2218-8141 โทรสาร 0-2218-8147

E-mail: eccu@chula.ac.th

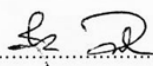
เอกสารข้อมูลสำหรับผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย (ต่อ)

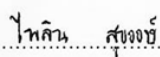


เลขที่โครงการวิจัย..... 110.1/55
 วันที่รับรอง..... - 9 ต.ค. 2555
 วันหมดอายุ..... - 8 ต.ค. 2556
 วันหมดอายุ.....

AF 04-07

ขอขอบพระคุณในความร่วมมือของท่านมา ณ ที่นี้


 (รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)
 อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์


 (นางสาวไพลิน สุขวงษ์)
 ผู้วิจัยหลัก

ตัวอย่างหนังสือแสดงความยินยอม

AF 05-07

หนังสือแสดงความยินยอมเข้าร่วมการวิจัย

ทำที่.....

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.



เลขที่ ประชากรตัวอย่างหรือผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย.....

ข้าพเจ้า ซึ่ง ได้ลงนามท้ายหนังสือนี้ ขอแสดงความยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย

ชื่อ โครงการวิจัย ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของฟิล์มที่มีบุกผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลู

ชื่อผู้วิจัย นางสาวไพลิน สุขวงษ์

ที่อยู่ติดต่อ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02 218 5515

เลขที่โครงการวิจัย 110-1/55

วันที่รับรอง - 9 ต.ค. 2555

วันหมดอายุ - 8 ต.ค. 2556

ข้าพเจ้า ได้รับทราบรายละเอียดเกี่ยวกับที่มาและวัตถุประสงค์ในการทำวิจัย รายละเอียดขั้นตอนต่างๆ ที่จะต้องปฏิบัติหรือได้รับการปฏิบัติ ความเสี่ยง/อันตราย และประโยชน์ซึ่งจะเกิดขึ้นจากการวิจัยเรื่องนี้ โดยได้อ่านรายละเอียดในเอกสารซึ่งให้ผู้เข้าร่วมการวิจัยโดยตลอด และได้รับคำอธิบายจากผู้วิจัย จนเข้าใจเป็นอย่างดีแล้ว

ข้าพเจ้าจึงสมัครใจเข้าร่วมในโครงการวิจัยนี้ ตามที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงให้ผู้เข้าร่วมการวิจัย โดยข้าพเจ้ายินยอม ตอบแบบสอบถามสอบถามประเมินทางด้านศีลและกลิ่น และการยอมรับโดยรวมของผู้บริโภค ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันของการเก็บเนื้อหมูสด ตัวอย่างละประมาณ 3 ชิ้น ซึ่งใช้เวลาตอบแบบสอบถาม ประมาณ 15 นาที จำนวนการทดลอง 3 ครั้ง ครั้งละ 5 ตัวอย่าง

ข้าพเจ้ามีสิทธิถอนตัวออกจากการวิจัยเมื่อใดก็ได้ตามความประสงค์ โดยไม่ต้องแจ้งเหตุผล ซึ่งการถอนตัวออกจากการวิจัยนั้น จะไม่มีผลกระทบในทางใดๆ ต่อข้าพเจ้าทั้งสิ้น และไม่มีผลกระทบต่อการศึกษา

ข้าพเจ้าได้รับคำรับรองว่า ผู้วิจัยจะปฏิบัติต่อข้าพเจ้าตามข้อมูลที่ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงให้ผู้เข้าร่วมการวิจัย และข้อมูลใดๆ ที่เกี่ยวข้องกับข้าพเจ้า ผู้วิจัยจะเก็บรักษาเป็นความลับ โดยจะนำเสนอข้อมูลการวิจัยเป็นภาพรวมเท่านั้น ไม่มีข้อมูลใดในการรายงานที่จะนำไปสู่การระบุตัวข้าพเจ้า

หากข้าพเจ้าไม่ได้รับการปฏิบัติตรงตามที่ได้ระบุไว้ในเอกสารชี้แจงให้ผู้เข้าร่วมการวิจัย ข้าพเจ้าสามารถร้องเรียนได้ที่คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ชั้น 4 อาคารสถาบัน 2 ซอยจุฬาลงกรณ์ 62 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-8147, 0-2218-8141 โทรสาร 0-2218-8147 E-mail: eccu@chula.ac.th

ข้าพเจ้าได้ลงลายมือชื่อไว้เป็นสำคัญต่อหน้าพยาน ทั้งนี้ข้าพเจ้าได้รับสำเนาเอกสารชี้แจงให้ผู้เข้าร่วมการวิจัย และสำเนาหนังสือแสดงความยินยอมไว้แล้ว

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวไพลิน สุขวงษ์)

ผู้วิจัยหลัก

ลงชื่อ.....

(.....)

ผู้มีส่วนร่วมในการวิจัย

ลงชื่อ.....

(.....)

พยาน

ตัวอย่างแบบสอบถามเพื่อคัดกรองผู้ทดสอบ

แบบสอบถามเพื่อคัดกรองผู้ทดสอบ	
รหัส	วันที่.....

คำถามสำหรับการคัดกรองผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัส

1. มีอายุเกิน 18 ปีบริบูรณ์
 ใช่ ไม่ใช่
2. เป็นผู้ที่มิใช่สุขภาพดีและไม่ป่วยเป็นโรคหวัด หรือโรคและอาการอื่นๆ ที่มีผลต่อระบบทางเดินหายใจและสายตา
 ใช่ ไม่ใช่
3. สามารถอ่านและเขียนภาษาไทยได้ดี
 ใช่ ไม่ใช่
4. เป็นผู้ที่สามารถทำการทดสอบเกี่ยวกับเนื้อหุได้ (ไม่มีข้อห้ามทางศาสนา)
 ใช่ ไม่ใช่
5. เป็นผู้ที่เคยเลือกซื้อเนื้อหุสด
 เคย โปรดระบุจำนวน (ต่อเดือน/สัปดาห์).....
 ไม่เคย
6. ผู้ที่มีความยินดีที่จะเข้าร่วมในการวิจัยครั้งนี้
 ใช่ ไม่ใช่



เลขที่โครงการวิจัย..... 110-1/55
 - 9 ต.ค. 2555

วันที่รับรอง.....

วันหมดอายุ..... - 8 ต.ค. 2556

สรุปผล

- สามารถเข้าร่วมทดสอบทางประสาทสัมผัสในงานวิจัยนี้ได้
- ไม่สามารถเข้าร่วมทดสอบทางประสาทสัมผัสในงานวิจัยนี้ได้

ตัวอย่างแบบสอบถามประเมินทางประสาทสัมผัส

แบบสอบถามประเมินลักษณะทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อหมูสดไสซ์ที่อายุการเก็บต่างๆ	
รหัส	วันที่.....

ข้อแนะนำ : โปรดประเมินแต่ละตัวอย่างในลักษณะที่ปรากฏและกลิ่นของเนื้อหมูสดไสซ์ โดยการ ✓ เพื่อตรวจสอบการอธิบายที่เหมาะสม และยินดีรับข้อเสนอแนะปัญหา

1. ผู้ทดสอบเคยเลือกซื้อเนื้อหมูหรือไม่

เคย โปรดระบุจำนวน (ต่อเดือน/สัปดาห์).....

ไม่เคย

2. ข้อมูลการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้านสีและกลิ่นของเนื้อหมูสด โปรดระบุคะแนน ตั้งแต่ 1-5

เมื่อ 1 คือ น้อยที่สุด 2 คือ น้อย 3 คือ ปานกลาง 4 คือ มาก และ 5 คือ มากที่สุด

ด้าน	หัวข้อ	กลุ่มตัวอย่างที่ 1					กลุ่มตัวอย่างที่ 2				
		รหัสตัวอย่าง					รหัสตัวอย่าง				
สี	สีชมพูของเนื้อหมู										
กลิ่น	กลิ่นคาวของเนื้อหมู										
	กลิ่นน้ำมันกานพลู										

3. ความพึงพอใจโดยรวมของเนื้อสดไสซ์ ถ้ามีเนื้อหมูตัวอย่างวางขายตลาดท้องถิ่น ท่านจะซื้อ/ไม่ซื้อ มากเพียงไรในแต่ละตัวอย่างของเนื้อหมูสดไสซ์ โดยใช้สเกลที่เหมาะสมเพื่อแสดงทัศนคติของท่าน โดยการ ✓ บนสเกลที่อธิบายความรู้สึกของท่าน ได้ดีที่สุด และยินดีรับข้อเสนอแนะปัญหา

คะแนน	การอธิบาย	กลุ่มตัวอย่างที่ 1					กลุ่มตัวอย่างที่ 2				
		รหัสตัวอย่าง					รหัสตัวอย่าง				
1	ไม่ซื้อแน่นอน										
2	บางทีอาจจะไม่ซื้อ										
3	อาจจะซื้อ/ไม่ซื้อ										
4	บางทีอาจจะซื้อ										
5	ซื้อแน่นอน										

ข้อเสนอแนะ:

.....

.....

.....

เลขที่โครงการวิจัย..... 110-1/55
 วันที่รับรอง..... - 9 ต.ค. 2555
 วันหมดอายุ..... - 8 ต.ค. 2556



ภาคผนวก จ

**จำนวนจุลินทรีย์ของเนื้อหมูสดไส้ที่ถูกปิดและไม่ถูกปิดด้วย
ฟิล์มเวย์โปรตีนไอโซเลขที่ผสมอิมัลชันร้อยละ 7**

ภาคผนวก จ

ตาราง จ1 จำนวน Total Plate Count , Coliform, *Salmonella* spp. และ *Staph. aureus* (log CFU/g) ในเนื้อหมูสดไส้ที่ถูกรีดและ ไม่ถูกรีดด้วยฟิล์มเวทย์โปรตีนไอโซเลทที่ผสมอิมัลชันน้ำมันกานพลูร้อยละ 7 ซึ่งอิมัลชันน้ำมันกานพลูประกอบด้วย Tween 20 และน้ำมันกานพลูอย่างละ ร้อยละ 20 โดยน้ำหนักหนัก ที่อุณหภูมิ 4°C

จุลินทรีย์	การทดลอง	อายุการเก็บ (ชั่วโมง)				
		0	24	72	120	149
Total Plate Count	เนื้อหมู	4.34 ^C ±1.05	5.17 ^{BC} ±1.32	5.57 ^{ABC} ±1.41	6.02 ^{AB} ±1.50	6.08 ^A ±1.51
	เนื้อหมู+ฟิล์ม	4.34 ^B ±1.05	4.81 ^B ±1.22	5.15 ^B ±1.23	5.17 ^B ±1.23	5.74 ^A ±1.50
<i>E.coli</i>	เนื้อหมู	1.34 ^B ±0.50	1.17 ^B ±0.40	3.03 ^{AB} ±1.00	3.90 ^{AB} ±1.34	3.93 ^A ±1.34
	เนื้อหมู+ฟิล์ม	1.34 ^B ±0.50	1.00 ^B ±0.20	2.00 ^B ±0.80	3.12 ^B ±1.20	3.12 ^A ±1.20
<i>Salmonella</i> spp.	เนื้อหมู	1.43 ^B ±0.50	1.55 ^B ±0.40	2.73 ^B ±1.00	3.20 ^B ±1.20	3.60 ^A ±1.34
	เนื้อหมู+ฟิล์ม	1.43 ^B ±0.50	1.43 ^B ±0.53	2.12 ^B ±0.83	2.12 ^B ±0.83	3.43 ^A ±1.34
Coliform	เนื้อหมู	2.71 ^C ±0.62	2.58 ^C ±0.60	4.43 ^C ±1.08	5.52 ^A ±1.28	5.23 ^B ±1.29
	เนื้อหมู+ฟิล์ม	2.71 ^B ±0.62	2.06 ^B ±0.43	4.46 ^A ±1.08	5.29 ^A ±1.28	4.94 ^A ±1.26

หมายเหตุ: ตัวอักษร A, B, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยของที่แสดงมีความแตกต่างกันของในแนวแถวของแต่ละการทดลอง อย่างมีนัยสำคัญ p < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบแบบ LSD

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวไพลิน สุขวงษ์ เกิดวันที่ 14 สิงหาคม 2530 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552 ในปี 2553 เข้าทำงานในฝ่ายประกันคุณภาพ บริษัท ซี พี ค้าปลีกและการตลาด จำกัด และเข้าศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2554

เสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 ระหว่างวันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2556 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ.