ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

EFFECTS OF ROSELLE FLOWER (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.) EXTRACT AND BACTERIOCIN KL-1 ON MICROBIAL AND PHYSICAL QUALITIES OF GROUND PORK

นภาพร กองการูณ์

NAPAPORN KONGKARN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AG-M-031-212

ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

EFFECTS OF ROSELLE FLOWER (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.) EXTRACT AND BACTERIOCIN KL-1 ON MICROBIAL AND PHYSICAL QUALITIES OF GROUND PORK

นภาพร กองกาญจน์

NAPAPORN KONGKARN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AG-M-031-212

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECTS OF ROSELLE FLOWER (*HIBISCUS SABDARIFFA* L.) EXTRACT AND BACTERIOCIN KL-1 ON MICROBIAL AND PHYSICAL QUALITIES OF GROUND PORK

NAPAPORN KONGKARN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILMENT OF

THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2016

KMITL-2016-AG-M-031-212

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2016

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

Effects of roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract and bacteriocin KL-1 on microbial and physical qualities of ground pork

นักศึกษา นางสาวนภาพร กองกาญจน์

รหัสประจำตัว 57604042

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สัตวศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.คมแข พิลาสมบัติ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ดร.ศุภลักษณ์	สรภักดี	
ผศ.ดร.ศศิธร	นาคทอง	
ผศ.ดร.คมแข	พิลาสมบัติ	
ผศ.ดร.ผุสดี	ตังวัชรินทร์	
ผศ.ดร.มณทินี	ธีรารักษ์	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 1 เมษายน 2559

สถานที่สอบ ห้องประชุมคณะเทคโนโลยีการเกษตร (ชั้น 1 ตึกบุนนาค)

คณบดีรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มณฑล แก่นมณี)

คณบดีคณะเทคโนโลยีการเกษตร

วันที่ 3 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด
นักศึกษา	นางสาว นภาพร กองกาญจน์
รหัสประจำตัว	57604042
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ. ศ.	2559
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.คมแข พิลาสมบัติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ได้แก่ การทดลองที่ 1 ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย การทดลองที่ 2 ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Typhimurium และการทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

การทดลองที่ 1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar well diffusion method เชื้อทดสอบจำนวน 19 สายพันธุ์ ทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (MIC) ที่ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 และ *Escherichia coli* TISTR 780 มีค่าเท่ากับ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ไม่พบการยับยั้ง *S.* Typhimurium TISTR 292 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ (MBC) ทดสอบดังกล่าวข้างต้นมีค่า 25, 50, 50 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาคุณสมบัติเสริมฤทธิ์กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และทำลายเชื้อ (FICI และ FBCI) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซินต่อเชื้อ *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 พบว่าที่ความเข้มข้น 6.25 + 10, 6.25 + 80 และ 6.25 + 40 (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + AU/ml) ตามลำดับ มีคุณสมบัติเสริมฤทธิ์กันและทำลายเชื้อดังกล่าว นอกจากนี้การศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการทำลายเชื้อของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงในรูปแบบสารชนิดเดียวและใช้ร่วมกับแบคเทอริโอซิน พบว่าการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 ได้ที่ระยะเวลา 4 และ 2 นาที แต่การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซินนั้นสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อดังกล่าวได้

การทดลองที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยเลือกความเข้มข้นของสารจากค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมกันในการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ (FICI และ FBCI) โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ (1) กลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด) (2) กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (3) กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml (4) กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 320 AU/ml (5) กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml และ (6) กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน 40 AU/ml เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน 40 AU/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) แต่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium โดยทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$)

การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด โดยมีกลุ่มการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพ สำหรับเนื้อสุกรแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส พบว่าทุกกลุ่มการทดลองที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินสามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์รา และ Coliform แต่ไม่สามารถควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำได้ ค่าสีพบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าความสว่างต่ำที่สุด ค่าสีแดงทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และค่าสีเหลืองกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีค่าสีเหลืองต่ำที่สุด และกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml มีค่าสีเหลืองสูงที่สุด สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันในทางสถิติตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ($P<0.05$) สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เก็บรักษานาน 4 เดือน พบว่าทุกกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เติม โดยกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระสูงที่สุดร้อยละ 92-97 แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Effects of roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract and bacteriocin KL-1 on microbial and physical qualities of ground pork
student	Miss Napaporn Kongkarn
Student ID.	57604042
Degree	Master of Science
Program	Animal Science
Year	2016
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Komkhae Pilasombut
Thesis Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Pussadee Tangwatcharin

ABSTRACT

The objective of this research was to study the effects of roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract and bacteriocin KL-1 on microbial and physical qualities of ground pork. The study was designed into 3 parts. Firstly, study of antimicrobial properties of roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract and bacteriocin production from *Lactobacillus plantarum* KL-1 against pathogenic and spoilage bacteria *in vitro*. Secondly, effects of roselle flower extract and bacteriocin KL-1 on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Typhimurium in ground pork. Thirdly, effects of roselle flower extract and bacteriocin KL-1 on microbial and physical qualities of ground pork.

The *in vitro* properties of antibacterial activity against 19 tested strains by agar well diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), synergistic testing and killing time were performed. The results showed that roselle flower extract (50 mg/ml) revealed antibacterial activity against all 19 strains of both pathogenic and spoilage bacteria. Antibacterial activity of the lowest concentration of 6.25 mg/ml did not inhibit any tested bacterial strains. The MIC of roselle flower extracts to inhibit *S. aureus* TISTR118, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 and *Escherichia coli* TISTR 780 was at 25 mg/ml, but did not inhibit *S.* Typhimurium TISTR 292. The MBC of those bacteria were 25, 50, 50 and 50 mg/ml, respectively. The combination of roselle flower extract and bacteriocin (Fractional inhibitory concentration index, FICI and Fractional bactericidal concentration index, FBCI) at 6.25+10, 6.25+80 and 6.25+40 (mg/ml+AU/ml) showed a synergistic activity against

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. aureus TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358 and *S.* Typhimurium TISTR 292. Moreover, roselle flower extract showed killing time property at 4 and 2 minutes against *S. aureus* TISTR 118 and *S.* Typhimurium TISTR 292. The combination of roselle flower extract and bacteriocin had the effect on growth inhibition but did not kill the pathogen.

The second experiment, study of roselle flower extract and bacteriocin KL-1 against *S. aureus* and *S.*Typhimurium on ground pork stored at 4 °C for 0, 2, 4, 6, 8 and 10 days. The experiments were arranged in 6 treatments as follow : (1) control (no additive), (2) roselle flower extract 50 mg/ml, (3) bacteriocin 640 AU/ml, (4) bacteriocin 320 AU/ml, (5) roselle flower extract 6.25 mg/ml plus bacteriocin 640 AU/ml and (6) roselle flower extract 6.25 mg/ml plus bacteriocin 40 AU/ml. The results showed that ground pork mixed with roselle flower extract 50 mg/ml, roselle flower extract 6.25 mg/ml plus bacteriocin 640 AU/ml and roselle flower extract 6.25 mg/ml plus bacteriocin 40 AU/ml inhibited the growth of *S. aureus* ($P<0.05$). However, there was no any treatments had the effect on the growth of *S.* Typhimurium ($P>0.05$).

The third experiment, the effects of roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract and bacteriocin KL-1 on microbial and physical qualities of ground pork (treatment groups were the same as in second experiment). For microbial qualities, all chilled ground pork mixed with roselle extract store at 4 °C could control total plate count, yeast and mold and coliform except psychrophilic bacteria. The lowest lightness in ground pork was found in roselle extract at 50 mg/ml. Meanwhile, there was no significant differences ($P>0.05$) on treatment. However, the yellowness of treatment was lowest in in roselle extract at 50 mg/ml but highest in bacteriocin 640 AU/ml. There were no significant differences in pH ($P>0.05$) at all treatments. Nevertheless, all frozen ground pork mixed with roselle flower extract store at -20 °C for 4 months had the highest % inhibition of DPPH value at 92-97% compared to all treatment.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้อย่างดีโดยได้รับความกรุณาจาก ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร. ผุสดี ตังวัชรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ส่งเสริมในเรื่องการเรียน และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ดร. ศุภลักษณ์ สรภักดี ผศ.ดร. มณทินี ธีรารักษ์ และ ผศ.ดร. ศศิธร นาคทอง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนโอกาสในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท น้องๆ นักศึกษาปริญญาตรี สาขาวิชาสัตวศาสตร์ทุกคน คุณอังคณา ทุมดี และบุคคลต่างๆ ที่เกี่ยวข้อทุกคนที่ให้คำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่สาว ที่คอยเป็นกำลังใจ เป็นที่ปรึกษาและให้การสนับสนุนในทุกเรื่องๆ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นภาพร กองกาญจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ IV

กิตติกรรมประกาศ VI

สารบัญ VII

สารบัญตาราง XI

สารบัญภาพ XIII

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มา 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา 3

1.3 สถานที่ดำเนินการ 3

1.4 ขั้นตอนการศึกษา 3

1.5 ระยะเวลาการศึกษา 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.) 5

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของกระเจี๊ยบแดง 5

2.1.2 คุณสมบัติของกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ 5

2.1.3 คุณสมบัติของกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ 7

2.2 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) 9

2.2.1 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน 9

2.2.2 การใช้แบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 11

2.2.3 แบคเทอริโอซิน KL-1 14

2.2.4 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) 18
2.3.1 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ 18
2.3.2 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ 22
2.4 ความสำคัญของจุลินทรีย์ในอาหาร 23
2.4.1 จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Pathogenic microorganisms) 24
2.4.2 จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (Spoilage microorganisms) 24
2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์ 25
2.5.4 การเน่าเสียของเนื้อสัตว์ 26
2.5 เนื้อสุกร 27
2.5.1 จุลินทรีย์ก่อโรคที่มักพบในเนื้อสัตว์ 27
2.5.2 มาตรฐานทางด้านจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร 31

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 33
3.1 สารทดสอบ 33
3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ 34
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 36
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 36
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย 39
3.5.1 การทดลองที่ 1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 39
3.5.2 การทดลองที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด 43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

3.5.3 การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด 45

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 48

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 49

4.1 ผลของของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 49

4.1.1 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง โดยวิธี Agar well diffusion method 49

4.1.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียโดยศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) 53

4.1.3 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยวิธี Checker board broth 54

4.1.4 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*) 56

4.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด 62

4.2.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *S. aureus* ในเนื้อสุกรบด 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง **หน้า**

4.2.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *S.* Typhimurium ในเนื้อสุกรบด 64

4.3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด.....66

4.3.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 66

4.3.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในเนื้อสุกรบดแช่แข็ง.....80

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 83

5.1 สรุปผลการทดลอง.....83

5.2 ข้อเสนอแนะ 84

บรรณานุกรม 85

ภาคผนวก 94

ภาคผนวก ก 95

ภาคผนวก ข 97

ภาคผนวก ค 104

ประวัติผู้เขียน 106

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 การจัดแบ่งกลุ่มของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลกติก 10
2.2 ค่าที่ยอมรับได้ในการรับต่อวัน (Acceptable Daily Intake; ADI) และปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ 19
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระจากพืชชนิดต่างๆ 21
3.1 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 33
3.2 แบคทีเรียทดสอบ การติดสีแกรม อาหารที่ใช้ และอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย 35
4.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยวิธี Agar well diffusion method 51
4.2 ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงต่อการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และการทำลายแบคทีเรีย (MBC) 54
4.3 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมกันเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมกันเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 56
4.4 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันหลังเติมเชื้อ *S. aureus* (log cfu/g) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 63
4.5 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันหลังเติมเชื้อ *S.* Typhimurium (log cfu/g) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 65
4.6 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 69
4.7 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic) (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.8 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนยีสต์และรา (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 71

4.9 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวน Coliform (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 72

4.10 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวน *E. coli* (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 73

4.11 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าความสว่าง (Lightness, L*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 76

4.12 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 77

4.13 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าสีเหลือง (Yellowness, b*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 78

4.14 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 79

4.15 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน 82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเกิดจากโมเลกุลแบคเทอริโอซินรวมตัวกัน.....15
2.2 โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน Class II และการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย.....17
2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์.....20
4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค).....58
4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค).....61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มา

เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เป็นแหล่งอาหารประเภทโปรตีนที่สำคัญที่ผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมบริโภค อีกทั้งยังเป็นกลุ่มอาหารที่เสื่อมเสียได้ง่าย เนื่องจากเป็นอาหารประเภทที่มีโปรตีนสูง มีค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้ (water activity, a_w) และความชื้นสูง และมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Borch *et al.* 1996; มาลัยพร ศรีวิระ. 2551) โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เกิดลักษณะการเสื่อมเสียที่ผู้บริโภคไม่สามารถยอมรับได้ เช่น การเกิดเมือกที่ผิวหน้า การเปลี่ยนแปลงของสี กลิ่นรส และการออกซิเดชันของไขมันที่ทำให้เกิดการเหม็นหืน (Samelis *et al.* 2000) เพื่อให้อาหารมีความปลอดภัยมากขึ้น และเพื่อการยืดอายุการเก็บรักษา จึงมีการใช้วัตถุเจือปนอาหารกลุ่มสารกันเสียและสารต้านการออกซิเดชันเพื่อควบคุมลักษณะของการเสื่อมเสียดังกล่าว

อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันผู้บริโภคมีความตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการบริโภคสารเคมีเหล่านั้น และใส่ใจต่อสุขภาพมากขึ้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพได้หากได้รับในปริมาณมาก (Moure *et al.* 2001) จึงมีการใช้สารที่ได้จากธรรมชาติ ได้แก่ (1) สารสกัดที่ได้จากพืช ผัก ผลไม้ ซึ่งในพืช ผัก ผลไม้เหล่านี้ผลไม้นี้มีสารพฤษเคมีที่มีศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ สารโพลีฟีนอล ฟลาโวนอยด์ แอนโทไซยานิน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถพบได้ในสารสกัดจากเปลือกมังคุด สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง และสารสกัดจากผลไม้กลุ่มเบอร์รี่ เป็นต้น นอกจากนี้สารยูจีนอลที่พบในหัวหอม แอลิซินที่พบในกระเทียม สารไทมอลที่พบในสาระแหน่ และคาร์วาครอลที่พบในออริกาโน ยังสามารถใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552) และ (2) จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสาร แบคเทอริโอซิน เนื่องจากแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้ยังเป็นสารที่มีความคงตัวสูงต่ออุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่างและเอนไซม์ย่อยโปรตีนบางชนิด อีกทั้งไม่ตกค้างในร่างกาย จึงมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการถนอมอาหารและผสมในบรรจุภัณฑ์อาหาร เพื่อทดแทนการใช้วัตถุเจือปนอาหารดังกล่าว ผู้บริโภคในปัจจุบันยังให้ความสนใจในเรื่องของอาหารเพื่อสุขภาพ ซึ่งอาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) หมายถึง ผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเข้าไป เช่น สารสกัดจากธรรมชาติที่ให้ประโยชน์นอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการพื้นฐาน และสารอาหารที่มีคุณสมบัติเหล่านั้นยังส่งผลดีต่อสุขภาพและลดความเสี่ยงจากการเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคต่างๆ ซึ่งถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย (จามรี พระสุนิล. 2557; Jime´nez-Colmenero *et al.* 2001) ดังนั้นผู้บริโภคที่ใส่ใจในเรื่องของปัญหาสุขภาพจึงหลีกเลี่ยงการบริโภคอาหารที่มีสารเคมีเป็นองค์ประกอบและยังหาแนวทางในทางป้องกันโรค ซึ่งอีกแนวทางหนึ่งคือการบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะจากแหล่งที่ได้จากธรรมชาติ

กระเจี๊ยบแดง ชื่อสามัญ roselle, red sorrel, Jamaica sorrel หรือ karkade ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hibiscus sabdariffa* Linn. (*H. sabdariffa*) อยู่ในวงศ์ *Malvaceae* เป็นพืชที่หาได้ง่ายทั่วไป ราคาไม่แพงและยังอุดมไปด้วยสารพฤกษเคมีที่ส่งผลดีต่อสุขภาพ โดยเฉพาะในเมล็ดเป็นแหล่งที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวและไขมันที่ละลายน้ำ โดยเฉพาะ γ-Tocopherol (Hudson. 1990) ในกลีบดอกกระเจี๊ยบแดง พบสารสำคัญที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารแอนโทไซยานิน (เช่น ไซยานิดิน และเดลฟินิดิน) สารกลุ่มฟีนอลิก วิตามิน แร่ธาตุ และกรดอินทรีย์ต่างๆ (Jung *et al.* 2013) นอกจากนี้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงยังมีการรายงานเกี่ยวกับการต้านจุลินทรีย์ พบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อได้ เช่น *Bacilus subtilis, Escherichia coli O157:H7, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Micrococcus leuteus, Serratia marcessens, Clostridium sporagens* และ *Streptococcus spp.* เป็นต้น (Tolulope. 2007; Fullerton *et al.* 2011; Al-Hashimi. 2012; Khalaphallah and Soliman. 2014).

แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus plantarun* KL-1 แยกจากแหนมในประเทศเวียตนามเรียกว่า เนมชัว (Nem Chua) โดยแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* ATCC14917^{T} (6400 AU/ml) , (12800 AU/ml), *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^{T} (12800 AU/ml), *Lactobacillus sakei* TISTR 890 (12800 AU/ml), *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* JCM6124^{T} (1600 AU/ml) , *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* TISTR942 (400 AU/ml) , *Enterococcus faecalis* JCM5803^{T}(6400 AU/ml) และ *Enterococcus faecalis* TISTR888 (6400 AU/ml) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด (12,800 AU/ml) คืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สารแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส นานสองวัน (Pilasombut *et al.* 2015)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีแนวคิดในการนำสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน และการใช้งานร่วมกัน เพื่อควบคุมการเน่าเสียในเนื้อสุกรบด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ความมุ่งหมาย และวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

1.3.1 ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.2 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.3.3 ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

1.4.1 ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

1.4.2 ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *Staphylococcus aureus* และ *Sallmonella* Typhimurium

1.4.3 ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

1.5 ระยะเวลาการศึกษา

ใช้เวลาในการศึกษาทั้งสิ้น 24 เดือน เริ่มทำการศึกษาตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2556 เสร็จสิ้นการศึกษาเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 สามารถใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

1.6.2 สามารถนำสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 มาประยุกต์ใช้ในเนื้อสุกรบดเพื่อควบคุมการเน่าเสียในเนื้อสุกรบด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L.)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของกระเจี๊ยบแดง

กระเจี๊ยบแดง ชื่อสามัญ roselle, red sorrel, Jamaica sorrel หรือ karkade ชื่อวิทยาศาสตร์ *Hibiscus sabdariffa* Linn. อยู่ในวงศ์ *Malvaceae* กระเจี๊ยบแดงเริ่มนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอาหารและเภสัชวิทยา ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1658 (ศุภร อังศุจินดา. 2549) โดยนำมาทำเป็นเครื่องดื่มที่ให้ความสดชื่นที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคเนื่องจากไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic effects) ตับและไต หรือสกัดเป็นสารให้สีแดงเนื่องจากเป็นแหล่งของแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ในปริมาณสูง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยน้ำและเมทานอลว่ามีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงมากเมื่อเทียบกับ butylated hydroxyl anisole (BHA) และ α-tocopherol อีกทั้งยังสามารถป้องกันโรคหัวใจและมะเร็งบางชนิดได้ (Awe *et al.* 2013) สำหรับคุณสมบัติทางยาของกระเจี๊ยบคือ ช่วยขับพยาธิตัวจี๊ด ช่วยรักษาโรคกระเพาะ เป็นยาระบาย และขับปัสสาวะ (สารานุกรมสมุนไพร. 2543)

องค์ประกอบของกระเจี๊ยบแดง ส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดฮิบิสซิค (hibisic acid) ร้อยละ 23 กรดซิตริก (citric acid) ร้อยละ 12-17 นอกจากนี้ยังมีกรดมาลิค (malic acid) กรดทาร์ทาลิค (tartaric) กรดออกซาลิค (oxalic acid) เนื่องจากองค์ประกอบส่วนมากเป็นกรดจึงทำให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 2-3 (วีรสิงห์ เมืองมั่น. 2552)

2.1.2 คุณสมบัติของกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์

Tolulope (2007) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษและการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของกลีบดอกกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเมทานอล โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้น 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยวิธี Disc diffusion method พบว่าที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus, B. tearothermophilus, M. luteus, S. erratia marcences, Cl. sporogenes, E. coli, Klebsiella pneumoniae, B. cereus* และ *P. fluorescence* ได้ ซึ่งผลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงการนำสารสกัดไปใช้เพื่อรักษาโรคในระบบทางเดินอาหาร โรคท้องร่วงในมนุษย์และโรคผิวหนัง อย่างไรก็ตามสารสกัดดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งเชื้อรา *Candida albicans* ได้ จึงไม่สามารถนำไปใช้ในการรักษาเชื้อราได้ ประสิทธิภาพเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการใช้สำหรับแพทย์พื้นบ้านในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรคท้องร่วง เลือดออกตามไรฟันและมะเร็ง เป็นต้น ความสามารถในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้นั้นล้วนมาจากสารทุติยภูมิที่มีอยู่ในสารสกัด สารประกอบเหล่านั้นได้แก่ อัลคาลอยด์ (alkaloids) ฟีนอลิก (phenolics) อะซีโทจีนิน (acetogenins) และเทอร์พีนอยด์ (terpenoids)

Fullerton *et al.* (2011) ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่แยกได้จากอาหารของกลีบดอกกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 ด้วยวิธี Agar disk diffusion พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้สูงที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระเจี๊ยบที่มีโครงสร้างที่สามารถรวมกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้และการเพิ่มขึ้นของจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลในวงแหวนของโครงสร้างที่เพิ่มขึ้น จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเพิ่มขึ้น

Morales-Cabrera *et al.* (2013) ทำการศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์และการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันจากกลีบดอกกระเจี๊ยบต่อการยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar disk diffusion โดยทำการสกัดด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอลของกลีบกระเจี๊ยบ 5 สายพันธุ์ คือ Alma blanca, Criolla de Oaxaca, Huajicori, Chiautla และ Tecoanapa ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium, *S.* Choleraesuis และค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าสายพันธุ์ Alma blanca ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Choleraesuis ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าสายพันธุ์ Alma blanca ที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกรดที่ต่ำกว่าทุก ๆ สายพันธุ์

นอกจากนี้ Khalaphallah and Soliman (2014) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดเฮนน่าและกลีบดอกกระเจี๊ยบเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยสกัดด้วยน้ำและเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 ด้วยวิธี Agar disk diffusion พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลให้ผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ เนื่องจากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมี และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่ากระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ เนื่องจากไอออนไฮดรอกซิลอิสระที่มีอยู่ในสารละลายที่มีความสามารถในการรวมตัวกับคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ไปเกาะติดอยู่กับเอนไซม์ เอนไซม์ที่เร่งการเจริญเติบโตไม่สามารถทำงานได้ จึงชี้ให้เห็นได้ว่ากระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถนำไปใช้เพื่อยืดอายุในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้

เนื่องจากคุณสมบัติของกระเจี๊ยบที่มีปริมาณสารแอนโทไซยานิน และสารแอนโทไซยานินนี้จะมีความคงตัวมากเมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรด (สุภาพ นนทะสันต์. 2556) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของกลีบกระเจี๊ยบสายพันธุ์นี้ยังมีค่าอยู่ในช่วง 1.5-2.4 ซึ่งสอดคล้องกับ วีรสิงห์ เมืองมั่น (2522) ได้อธิบายว่าสารสกัดจากกระเจี๊ยบประกอบไปด้วยกรดอินทรีย์นิดต่างๆ จำนวนมาก เช่น กรดฮิบิสซิค (hibisic acid) ร้อยละ 23 กรดซิตริก (citric acid) ร้อยละ 12-17 ซึ่งกรดเหล่านี้มีผลไปลดค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นกรด-ด่าง ทำให้รบกวนการผ่านเข้าออกของผนังเซลล์และไปทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน ทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (สุภร อังศุจินดา. 2549)

นอกจากนี้ยังพบว่าในกลีบกระเจี๊ยบมีสารแอนโธไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในกระเจี๊ยบ มีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้นั้นเนื่องจากโครงสร้างที่เป็น double-ring benzopyran มีประจุบวกทำให้ว่องไวต่อการเกิดคีเลท (chelate) ของโลหะไอออนไปรวมกับหมู่ซัลไฟดริล (sulfydryl) ของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้างพลังงานของแบคทีเรีย เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตทำให้เกิดการยับยั้งและตายไปในที่สุด (Sommaatmadja *et al.* 1964)

2.1.3 คุณสมบัติของกระเจี๊ยบแดงในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ฟลาโวนอยด์ เป็นสารที่ออกฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ซึ่งจะไปยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ เนื่องจากดอกไม้ในกลุ่มสีแดงมีรงควัตถุในกลุ่มฟลาโวนอยด์แอนโทไซยานิน และเบต้าแคโรทีน กระเจี๊ยบแดงก็เป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีรงควัตถุในกลุ่มแอนโทไซยานินเช่นกันจึงทำให้มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Nanjo *et al.* 1996)

สุภาพ นนทะสันต์ (2556) ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต เพื่อศึกษาผลของการเติมสารสกัดจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลปริมาณต่างๆ ได้แก่ร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.6 และศึกษาผลต่อคุณภาพทางด้านเคมี ได้แก่ ปริมาณแอนโทไซยานิน ค่า DPPH (2,2-Diphenyl-I-Picrylhydrazyl ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ศึกษาคุณภาพทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ ปริมาณแบคทีเรียแลคติก คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของโยเกิร์ต ต่อคุณภาพโยเกิร์ตที่เติมสารสกัด ผลการศึกษาพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นเป็น 4.34, 8.90 และ 14.64 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 12.57, 24.24 และ 31.24 ตามลำดับ เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงของแอนโทไซยานินซึ่งมีอยู่ในสารสกัดที่เติมลงไป แต่ไม่มีผลต่อจำนวนแบคทีเรียแลคติกระหว่างการหมัก แต่การเติมสารสกัดในปริมาณสูงขึ้นถึงร้อยละ 0.6 ทำให้คุณภาพทางประสาทสัมผัสลดลง อาจเนื่องจากสีของโยเกิร์ตมีลักษณะเข้มขึ้นรวมทั้งกลิ่นรสของกระเจี๊ยบแดงเด่นชัดซึ่งมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ โดยปริมาณที่เหมาะสมสำหรับเติมในโยเกิร์ต คือร้อยละ 0.4

เมื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษา (4 องศาเซลเซียส เวลา 21 วัน) ต่อคุณภาพโยเกิร์ตที่เติมสารสกัด พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 21 วัน ปริมาณแอนโทไซยานินมีแนวโน้มลดลง (จาก 8.94 เหลือ 5.73 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระลดลง (จากร้อยละ 24.24 เป็น ร้อยละ 19.97) ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งของแอนโทไซยานินซึ่งเป็นสารให้สีจากธรรมชาติ เมื่อนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร จะเกิดการสลายตัวเมื่อระยะเวลานานขึ้น นอกจากนี้จำนวนแบคทีเรียแลคติกมีแนวโน้มลดลง (8.12-5.30 log cfu/g) เช่นเดียวกันกับคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตซึ่งมีแนวโน้มลดลงในวันที่ 21 ของการเก็บรักษา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระในโยเกิร์ตได้

Christian and Jackson (2009) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบ 3 ช่วงการเจริญเติบโตตลอดระยะเวลา 35 วัน (traditional bearing red:TRED, early bearing red:ERED และ white:WHTE) โดยศึกษาสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณแอนโทไซยานิน และการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) พบว่าในกระเจี๊ยบในช่วง ERED มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด (ร้อยละ 79) เนื่องมาจากสารประกอบพวกฟีนอลิก รวมทั้งสารแอนโทไซยานินและสารที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน และหากนำไปใช้ร่วมกับ BHA จะทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากถึงร้อยละ 86

Mohd-Esa *et al.* (2010) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆ ของกระเจี๊ยบแดง (กลีบดอก ใบ เมล็ดและลำต้น) สกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 โดยทำการศึกษาสารประกอบฟีโนลิก ค่า DPPH และนำผลที่ได้ไปศึกษาการต้านออกซิเดชันของไขมันในเนื้อวัวบด (Lipid oxidation) เมื่อเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ผลการศึกษาพบว่า ส่วนของเมล็ดที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 มีค่าฟีโนลิกสูงที่สุด (2.97 ± 0.17 mg GAE /g และ 4.87 ± 0.14 mg GAE /g) มีค่า DPPH สูงที่สุด (ร้อยละ 65.1 ± 2.58 และ 91.8 ± 1.05) เนื่องจากในส่วนของเมล็ดมีปริมาณค่าฟีโนลิกและการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าทุกๆส่วน จึงนำไปเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเนื้อวัวบด โดยศึกษาค่าการต้านออกซิเดชัน (Lipid oxidation) ด้วยวิธี TBARs ของสารสกัดเมล็ดกระเจี๊ยบ ปริมาณการใช้คือที่ความเข้มข้น 7.5 กรัม/กิโลกรัม พบว่าสามารถลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ BHT และ α-tocopherol ทั้งนี้เนื่องมาจากในส่วนของสารสกัดจากเมล็ดนั้นมีค่าฟีโนลิกและค่า DPPH ที่สูงกว่า BHT และ α-tocopherol จึงนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติในผลิตภัณฑ์

Yang *et al.* (2012) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกลีบดอกกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลที่แตกต่างกัน โดยสกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 30, 60 และ 95 เทียบกับกรดแอสคอบิก ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ผลแสดงให้เห็นว่าสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 30 กระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี ผลแสดงให้เห็นว่าสารสกัดนี้สามารถใช้เป็นแหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัย เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีนอลมากที่สุด (20.25 mg GAE /g) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ahmed and Abozed (2014) ศึกษาการเติมผงกลีบดอกกระเจี๊ยบในแครกเกอร์เพื่อเพิ่มใยอาหารและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1.25, 2.5, 3.75 และ 5 โดยศึกษาปริมาณใยอาหารทั้งหมด ค่า DPPH (ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ) และคุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-5 มีใยอาหารเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.36-8.17 ค่า DPPH สูงที่สุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เนื่องจากมีปริมาณสารประกอบฟีโนลิกสูงที่สุดคือร้อยละ 17.57 แสดงให้เห็นว่ามีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดีที่สุด แต่จะส่งผลทางด้านคะแนนทางประสาทสัมผัสที่ไม่ยอมรับที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 แต่จะยอมรับได้ที่ร้อยละ 3.75 ผลโดยรวมแสดงให้เห็นว่าผงกลีบดอกกระเจี๊ยบมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารจะให้ปริมาณเส้นใยและสารต้านอนุมูลอิสระกิจกรรมที่ดีที่ต้องการนำไปใช้ในแป้งและอาหาร เช่น ขนมอบ

2.2 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีการใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โมเลกุลของแบคเทอริโอซินประกอบด้วย กรดอะมิโนหลายร้อยตัวต่อกันแบบ linear chain เนื่องจากไม่มีพันธะโฮโดรเจนและ disulphide bridges (-s-s-) สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อต่างชนิดกันจะมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน (Muyanja *et al.* 2002) โดยแบคเทอริโอซินสามารถกำจัดและยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชีส์ใกล้เคียงกัน และส่วนใหญ่จะไม่มีผลต่อเซลล์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินจะมีขนาดเล็กและทนต่อความร้อน (Rodríguez *et al.* 2003)

2.2.1 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

ในปัจจุบันมีการจัดแบ่งกลุ่มของแบคเทอริโอซิน (Classification of Bacteriocin) ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การจัดแบ่งกลุ่มของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลกติก

กลุ่ม (class)	กลุ่มย่อย	ลักษณะ
I		แบคเทอริโอซินขนาดเล็กกว่า 5 กิโลดาลตัน ทนความร้อน จัดเป็น Lantibiotic
II		แบคเทอริโอซินขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน มีขนาดเล็ก (มีกรดอะมิโน 30-100 ตัว) ทนความร้อน 100-121 องศาเซลเซียส จัดเป็น non-Lantibiotic
	IIa	เหมือนแบคเทอริโอซินชนิด pediocin มีผลยับยั้งต่อ *Listeria*
	IIb	เป็นแบคเทอริโอซินสองเปปไทด์
	IIc	การออกฤทธิ์ต้องการหมู่ไธออล
III		แบคเทอริโอซินขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน ไม่ทนความร้อน
IV		เป็นแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต และ/หรือ ไขมันเป็นองค์ประกอบร่วม

ที่มา : ดัดแปลงจาก Caplice and Fitzgerald (1999); Ouwehand and Vesterlund (2004)

2.2.1.1 Class I : Lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีสายเพปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 19-38 โมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่งภายในสายเพปไทด์แต่ละสายจะมีโครงสร้างลักษณะเป็นวงแหวนย่อย ๆ ที่เกิดจากการสร้าง thioether bridge ระหว่าง sulphydryl group ของกรดอะมิโน ซีสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydroalanine ที่มีชื่อเรียกว่า lanthionine หรือกรดอะมิโนซีสเทอีน กับกรดอะมิโน didehydrobutyrine ที่มีชื่อเรียกว่า β-methyl lanthionine ตัวอย่างการสร้างแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก เช่น ไนซิน A ผลิตโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* supsp. *Lactis* ATCC 11454 แลกโตซิน S ผลิตโดยเชื้อ *L. sakei* L45 แลคติซิน 481 ผลิตโดยเชื้อ *L.lactis* supsp. *lactis* CNRZ 481 เป็นต้น

2.2.1.2 Class II : Non Lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็ก โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน 20-60 โมเลกุล มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) เป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่ทนความร้อนได้ดีตั้งแต่ 100-121 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถแบ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

(1) IIa. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดี ซึ่งในบางครั้งถูกเรียกว่ากลุ่ม pediocin-like bacteriocins โดยพบว่าในขั้นตอนแรกแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะที่เป็นสายเพปไทด์ตั้งต้น (precursor peptide) ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลง โดยการตัดสายเพปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรด อะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไกลซีน 2 โมเลกุลติดกัน ได้เป็นสายเพปไทด์ที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ที่ปลาย N ในสายเพปไทด์ของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดในกลุ่มนี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน (conserved N-terminal sequence) ได้แก่ Try-Gly-Asn-Gly-Val และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซีสเทอีน 2 โมเลกุลที่ อยู่ค่อนมาทางปลาย N ของสายเพปไทด์ ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น *pediococcus acidilactici* ซึ่งเป็น pediocin PA-1

(2) IIb. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน โดยสายเพปไทด์อาจแสดงกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพียงเส้นใดเส้นหนึ่ง หรือทั้งสองเส้น แต่ในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายจะมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเพปไทด์ทั้งสองเส้น ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ แลคตาซินเอฟ (lactacin F) และแลคโตคิกซินจี (lactococcin G)

(3) IIc. การออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ต้องอาศัยหมู่ไธออล ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ แลกตาซิน B ผลิตโดยเชื้อ *L. acidophilus* N2

2.2.1.3 Class III : เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ (มากกว่า 30 กิโลดาลตัน) รวมทั้งเอนไซม์ เช่น ฮีโมไลซิน (hemolysins) และมิวรามิเดส (muramidase) ไม่ทนต่อความร้อนจึงแตกต่างจาก Class I และ Class II ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เฮลเวติซิน J (helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน A (enterolysin A)

2.2.1.4 Class IV : เป็นกลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่นๆ เช่น ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้คือ แลกโตซิน 27 ผลิตโดยเชื้อ *L. helveticus* LP27 ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้าง (Klaenhammer. 1993)

2.2.2 การใช้แบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

กฤตพร รำจวนเกียรติ (2552) ทำการทดลองคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลา โดยทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก จำนวน 400 ไอโซเลท จากปลาจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *Lates calcarifer* (seabass), *Channa stiata* (striped snake-head fish), *Clarias batrachus* (catfish), *Orcochromis niloticus* (nile tilapia), *Barbonymus gonionotus* (javanese barb) และ *Pangasianodon hypophthalmus* (striped catfish) ซึ่งสามารถแยกเชื้อ *L. lactis* supsp. *lactis* Sb2 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *L. plantarum* ATCC 14917, *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T}, *L. sakei* TISTR 890, *L. lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}, *Leu. mesenteroides* TISTR 942, *B. coagulans* JCM 257^{T},

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L. innocua ATCC 33090, *Brochotrix campestris* NBRC 11547, *P. fluorescens* JCM 5693^{T}, *Ps. fluorescens* TISTR 358, *E. faecalis* JCM 5803^{T}, *E. faecalis* TISTR 888, *S. aureus* TISTR 118 และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 เชื้อสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินมากที่สุดเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (12,800 AU/ml)

Nielsen *et al.* (1990) ได้ทำการศึกษาการใช้ pediocin ในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ในเนื้อโคสด โดยเติมเชื้อ *L. monocytogenes* จากนั้นแช่ตัวอย่างเนื้อโคลงในสาร pediocin ทิ้งไว้ 2 นาที พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ 0.5-2.2 log cycle ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของ pediocin ที่ใช้ และจากผลการทดลองพบว่าชิ้นเนื้อโคที่ใส่ pediocin จะตรวจพบเชื้อ *L. monocytogenes* น้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัส pediocin เท่ากับ 1-2.5 log cfu/g

Cintas *et al.* (1997) ศึกษาพบว่า *E. faecium* P13 ที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยวสเปน สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติต้านทานความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที มีชื่อว่า enterocin P มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *L. monocytogenes, S. aureus, C. perfringens* และ *C. botulinum* ได้

Simonetta *et al.* (1997) ศึกษาพบว่า *Enterococcus feacalis* และ *E. faecium* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศอาร์เจนตินา่ สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Vibrio cholera* O1E1T และ *V. cholera* non-O1 ได้ ซึ่งมีคุณสมบัติคือ สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-30 นาที

Solomakos *et al.* (2008a) ทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme, nisin และการใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในเนื้อวัวบดระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็น โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยจาก Thym ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.6 และ 0.9 ระดับความเข้มข้นของ nisin ที่ 500 และ 1000 IU/g และการใช้ร่วมกันเพื่อยับยั้ง *L. monocytogenes* โดยทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) *(In vitro)* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 32 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 และ 0.9 สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ สำหรับความเข้มข้นของ nisin ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1000 IU/g ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ และเมื่อใช้สารสองชนิดร่วมกันพบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ร่วมกับ nisin 500 และ 1000 IU/g และน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ร่วมกับ nisin 500 และ 1000 IU/g นั้นสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาในเนื้อวัวบดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ร่วมกับ nisin 1000 IU/g นั้นสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้มากกว่า 10 องศาเซลเซียส สำหรับความเข้มข้นของ nisin ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1000 IU/g ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้เมื่อทดลองในเนื้อวัวบด นอกจากนี้น้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.9 แสดงให้เห็นว่าไม่เป็นที่ยอมรับในการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

นอกจากนี้ Solomakos *et al.* (2008b) ยังทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme, nisin และการใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ในเนื้อวัวบดระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็น โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยจาก Thym ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.6 และ 0.9 ระดับความเข้มข้นของ nisin ที่ 500 และ 1000 IU/g และการใช้ร่วมกันเพื่อยับยั้ง *E. coli* O157:H7 โดยทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB) *(In vitro)* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 32 ชั่วโมง พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 และ 0.9 สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ สำหรับความเข้มข้นของ nisin ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1000 IU/g ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ และเมื่อใช้สารสองชนิดร่วมกับพบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ร่วมกับ nisin 500 และ 1000 IU/g และน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ร่วมกับ nisin 500 และ 1000 IU/g นั้นสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาในเนื้อวัวบดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ผลการทดลองพบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 ร่วมกับ nisin 500 และ 1000 IU/g นั้นสามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้มากกว่า 10 องศาเซลเซียส สำหรับความเข้มข้นของ nisin ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1000 IU/g ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้เมื่อทดลองในเนื้อวัวบด นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.9 แสดงให้เห็นว่าไม่เป็นที่ยอมรับในการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

Govaris *et al.* (2010) ทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโน, nisin และการใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *S.* Enteritidis ในเนื้อแกะบดระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เย็น โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยจากออริกาโนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 และ 0.9 ระดับความเข้มข้นของ nisin ที่ 500 และ 1000 IU/g และการใช้งานร่วมกันในการยับยั้ง *S.* Enteritidis ในเนื้อแกะบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน ผลการศึกษาพบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยจากออริกาโนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.9 สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ดีที่สุด ในส่วนของการใช้ร่วมกันพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ร่วมกับ nisin ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1000 IU/g สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ดีที่สุด เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 10 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากออริกาโนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.6 มีคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสสูงกว่าน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโนที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.9 นอกจากนี้ยังทำการศึกษาถึงองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโน พบองค์ประกอบที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดดเด่นคือสารประกอบฟีนอลที่ชื่อว่า carvacrol ร้อยละ 80.15 และ thymol ร้อยละ 4.82 ซึ่งสารฟีนอลที่โดดเด่นนี้เป็นสารสำคัญในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ

Turgis *et al.* (2012) ศึกษาประสิทธิภาพการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับแบคเทอริโอซินในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร โดยทำการศึกษาน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ *Origanum vulgare, Cinnamomum cassia*, *Brassica hirta, Thymus vulgaris, Satureja Montagna* และ *Cymbopogon nardus* ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 4 ชนิด ได้แก่ nisin, pediocin และแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *E. faecium* คือ MT 104 และ MT162 ทดสอบกับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus, E. coli, L. monocytogenes, S.* Typhimurium และ *S. aureus* และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. sakei* และ *P. putida* โดยการหาค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) พบว่าค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหย *O. vulgare, C. cassia* ที่ทดสอบกับเชื้อ *B. cereus* , *E. coli* O157:H7 และ *L. sakei* มีค่าเท่ากับ 500 ppm และเมื่อทำการทดสอบน้ำมันหอมระเหย *B. hirta* ในการยับยั้งเชื้อ *P. putida* และ *S. aureus* พบว่ามีค่าเท่ากับ 500 ppm เช่นกัน นอกจากนี้ยังทดสอบการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับแบคเทอริโอซินโดยวิธี Checkerboard technique พบว่า การใช้น้ำมันหอมระเหย *O. vulgare* ร่วมกับ nisin สามารถเสริมฤทธิ์กันต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium โดยมีค่าดัชนีการออกฤทธิ์ยับยั้ง (FIC) คือ 0.2 นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหย *S. Montagna* ที่ใช้ร่วมกับ pediocin ยังสามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 โดยมีค่าดัชนีการออกฤทธิ์ยับยั้ง (FIC) คือ 0.3 และการใช้น้ำมันหอมระเหย *C. cassia* ร่วมกับ MT104 ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *L. sakei* โดยมีค่าดัชนีการออกฤทธิ์ยับยั้ง (FIC) คือ 0.3 เช่นกัน เห็นได้ว่าการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับแบคเทอริโอซินนั้นสามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาติในการควบคุมแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2.3 แบคเทอริโอซิน KL-1

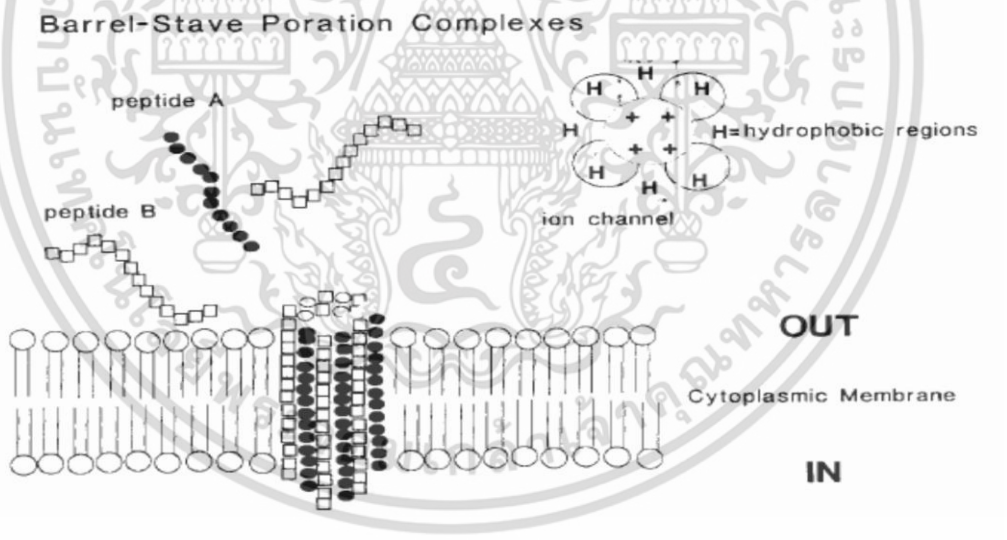
Pilasombut *et al.* (2015) ศึกษาการคัดแยกเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซินและคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหนมจากประเทศเวียตนามเรียกว่า เนมชัว (Nem Chua) จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน ตั้งชื่อว่า *L. plantarum* KL-1 โดยแบคเทอริโอซินที่พบสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและลบ ได้แก่ *L. plantarum* ATCC14917^{T} (6,400 AU/ml), (12,800 AU/ml), *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^{T} (12,800 AU/ml), *L. sakei* TISTR 890 (12,800 AU/ml), *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^{T} (1,600 AU/ml), *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* TISTR942 (400 AU/ml), *E. faecalis* JCM5803^{T}(6,400 AU/ml) และ *E. faecalis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

TISTR 888 (6,400 AU/ml) นอกจากนี้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินโดยศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน และจำแนกชนิดของเชื้อที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด (12,800 AU/ml) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถสร้างสารได้ 6,400 AU/ml สารแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสและความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส นานสองวัน อย่างไรก็ตามการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่นานขึ้น พบว่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อลดลง

2.2.4 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซิน เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาอยู่ร่วมกันทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) แสดงดังภาพที่ 2.1



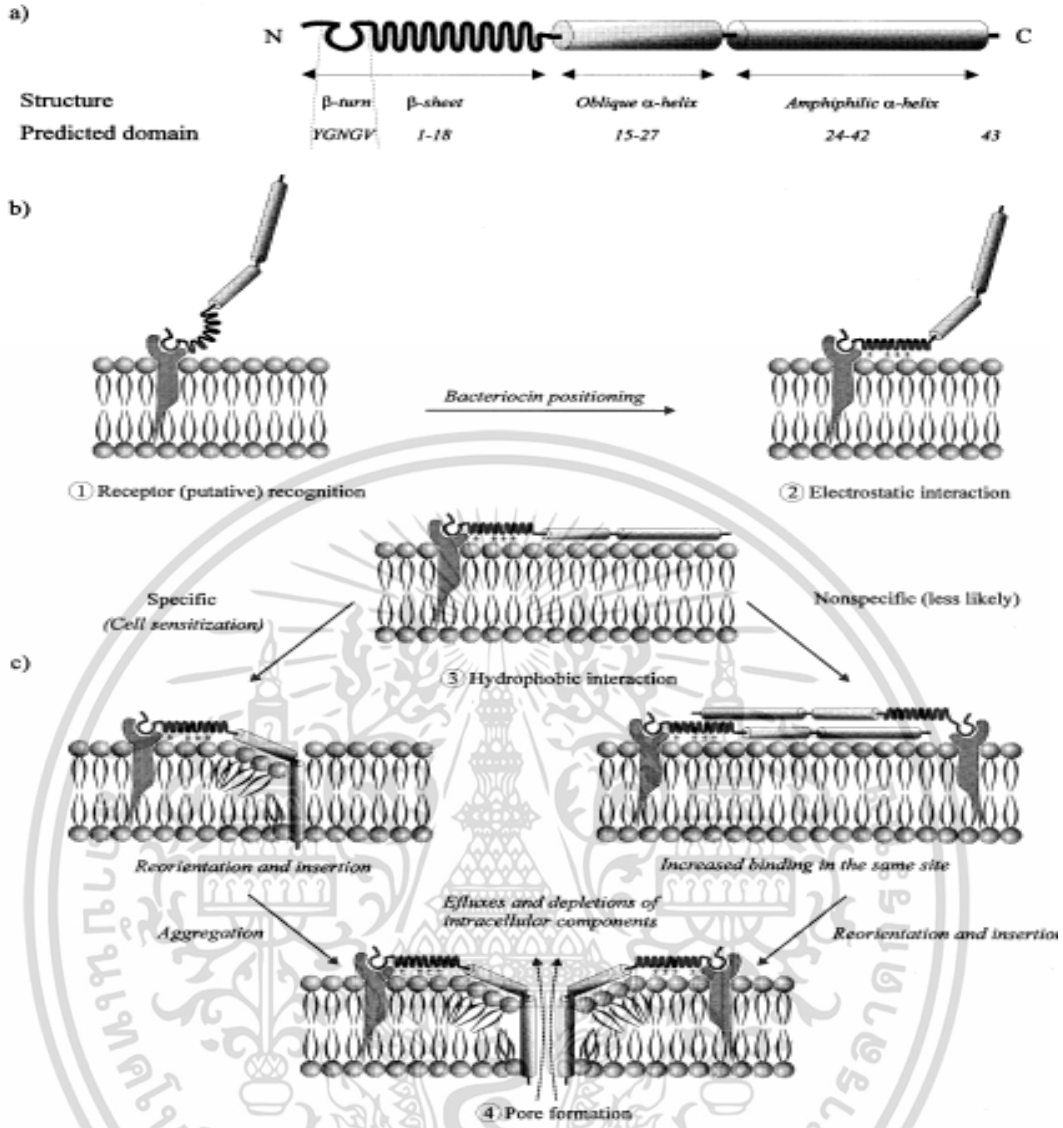
ภาพที่ 2.1 ช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเกิดจากโมเลกุลแบคเทอริโอซินรวมตัวกัน
ที่มา : Klaenhammer (1993)

ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินจึงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซินจะยึดจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และขั้นต่อไป คือ แบคเทอริโอซินจะสร้างช่องว่างในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งขั้นตอนและกลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอซิน ซึ่งในกลุ่มของ lantibiotic แบคเทอริโอซิน กลุ่มนี้ไม่ต้องการตำแหน่งจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ การออกฤทธิ์ต้องอาศัยพลังงานจากเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดช่อง (Bruno and Montville. 1993) แบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *L. lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเพปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกและมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย คือ การเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Davidson and Hoover. 1993) ในกรณีที่เป็นสปอร์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ในระหว่างที่สปอร์งอกออกมา ส่วนแบคเทอริโอซินในกลุ่มของ non lantibiotic จะเป็นกลุ่มที่ต้องการตำแหน่งที่มีความจำเพาะสำหรับการดูดซับที่ผิวเซลล์ และการออกฤทธิ์ไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน (Ennahar *et al*. 2000) นอกจากนี้ในแบคเทอริโอซิน class II ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน พบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยจับเข้าคู่กัน (Abee. 1995) หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al*. 2000) แสดงดังภาพที่ 2.2 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายโดยแบคเทอริโอซิน นอกจากจะมีผลแบบฆ่าทำลายแล้ว (bactericidal) ยังมีผลทำให้หยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน Class II และการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย

a) โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน

b) การเข้าจับกันของแบคเทอริโอซินกับผิวของเซลล์เป้าหมาย

c) การแทรกตัวของแบคเทอริโอซิน ทำให้เกิดช่องว่าง และเกิดการผ่านเข้าออกของน้ำ

ที่มา : Ennahar *et al*. (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction reactions) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั่วไปในระบบทางชีววิทยาและระบบอาหาร ปฏิกิริยาออกซิเดชันบางประเภทก็ให้ประโยชน์ต่ออาหาร บางประเภทก็ทำให้เกิดความเสียหาย เช่น ออกซิเดชันที่ทำให้เกิดการแตกสลายของวิตามิน รงควัตถุต่างๆ ของลิปิดซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ การควบคุมปฏิกิริยาออกซิเดชันอาจใช้กระบวนการควบคุมหรือใช้เทคนิคการบรรจุภัณฑ์ หรือเติมสารเคมีที่ช่วยกำจัดสารที่ทำให้เกิดออกซิเดชัน (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. 2532)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆ ได้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวเนื่องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือเป็นตัวรีดิวซ์ อาทิ ไธออล กรดแอสคอร์บิก และโพลีฟีนอล

สารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่น กรดยูริค บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูลอิสระ ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาของการเกิดอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระประเภทหลังมีบทบาทสำคัญในการทำให้ออกซิเดชันของไขมันสิ้นสุดลง สารต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวมามีโครงสร้างทางเคมีและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่แตกต่างกัน เช่น วิตามินอี มีโครงสร้างเคมีที่ละลายได้ดีในไขมัน ดังนั้นจึงสามารถเข้าไปออกฤทธิ์ที่ผนังเซลล์ได้ วิตามินอี จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ วิตามินอีจะทำปฏิกิริยาขจัดอนุมูลลิพิดเปอร์ออกซี (lipid peroxy) และได้เป็นอนุมูลวิตามินอี ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีความไวต่ำ ทำให้ไม่สามารถเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันต่อไปได้ (Michel. 2001)

2.3.1 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.3.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (synthetic antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์เป็นสารที่ผลิตขึ้นด้วยวิธีทางเคมี ได้มีการพัฒนาและใช้ประโยชน์จากในผลิตภัณฑ์ที่เป็นอาหารและไม่ใช่อาหารหลายชนิด เช่น ใช้เพื่อรักษาความคงตัวของพลาสติกและโพลิเมอร์ แต่มีสารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ได้ในอาหาร เนื่องจากต้องคำนึงถึงความปลอดภัยในอาหาร (Loliger and Wille. 1993) สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอาหารได้แก่ โพรพิวแกลเลต พีจี (propyl gallate, PG) บิวทิลเลตไฮดรอกซีอะนิซอล บีเอชเอ (butylated hydroxyanisole, BHA) บิวทิเลตไฮดรอกซีโทลูอีน บีเอชที (butylated hydroxytoluene, BHT) และ เทอเทียรีบิวทิลไฮโดรควิโนน ทีบีเอชคิว (tertiary

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

butylhydroquinone, TBHQ) สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีโนลิก ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันอันเป็นสาเหตุให้อาหารมีกลิ่น สี และรสชาติที่เปลี่ยนไป สารสังเคราะห์เหล่านี้มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงกว่าสารสกัดจากธรรมชาติ แต่มีข้อจำกัดของการใช้เนื่องจากปัญหาด้านความปลอดภัยในการบริโภค (Miková. 2001) สารต้านอนุมูลอิสระที่นิยมใช้ในอาหารได้แก่ BHA, BHT และ TBHQ ซึ่งอาจใช้สารดังกล่าวเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือใช้ร่วมกัน โดยมีวัตถุประสงค์หลักในการยับยั้งอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา อีกทั้งต้องคำนึงถึงปริมาณที่ยอมรับได้ในแต่ละวันของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่ใช้อีกด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ค่าที่ยอมรับได้ในการรับต่อวัน (Acceptable Daily Intake; ADI) และปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้ของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

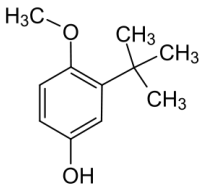
ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ	ค่าที่ยอมรับได้ในการรับต่อวัน (ADI) (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)*	ปริมาณสูงสุดที่ให้ใช้ได้ (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)**
Butylated hydroxyanisole (BHA)	0-0.5	175
Butylated hydroxytoluene (BHT)	0-0.3	75
Propyl gallate (PG)	0-1.4	100
Tertiary buthyl hydroquinone TBHQ)	0-0.7	120

ที่มา : * JECFA (2003a; 2003b; 2003c; 2003d)

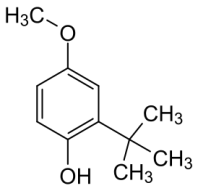
** กระทรวงสาธารณสุข (2543)

ปัจจุบันมีสารต้านอนุมูลอิสระเพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ เนื่องจากการใช้สารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์อาหารจะถูกควบคุมภายใต้กฎหมายของประเทศนั้นๆ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ สานต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Tert-butylhydroquinone (TBHQ) และ Propyl gallate (PG) ซึ่งสูตรโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.3 ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และสัตว์ปีก (Shah *et al.* 2014) แต่หลายปีที่ผ่านมามีความต้องการใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติมากขึ้น โดยเฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระจากพืช เนื่องจากผู้บริโภคมีความกังวลในเรื่องผลทางพิษวิทยาของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (ศิวาพร ศิวเวชช. 2535)

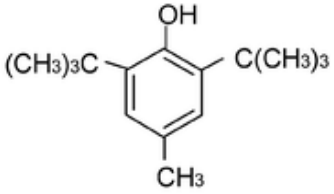
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2-isomer

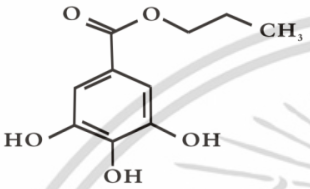


3-isomer

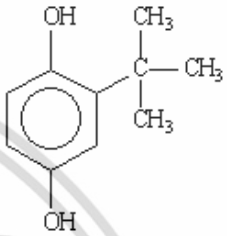


Butylated hydroxyanisole (BHA) (2003a)

Butylated hydroxytoluene (BHT) (2003b)



Propyl gallate (PG) (2003c)



Tertiary butylhy hydroquinone (TBHQ) (2003d)

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

ที่มา : JECFA (2003a; 2003b; 2003c; 2003d)

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์มีข้อจำกัดในการใช้ เนื่องจากการได้รับสารสังเคราะห์นี้ในปริมาณที่สูงกว่าที่ปริมาณที่ควรจะได้รับในแต่ละวัน และรับประทานเป็นประจำอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดความผิดปกติแก่ผู้บริโภคได้ ซึ่งมีรายงานที่ระบุถึงอันตรายของการใช้สารสังเคราะห์ในหนูทดลอง เช่น การเกิดเลือดคั่งในปอดและอวัยวะอื่นๆ ในหนูทดลองที่บริโภคอาหารที่ผสมบีเอชเอร้อยละ 50 การขยายตัวผิดปกติของเนื้อเยื่อหนูทดลองเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดเนื้องอกในช่องท้องในหนูที่บริโภคอาหารที่เติมบีเอชเอร้อยละ 25 (ศิวาพร ศิวเวชช. 2535) ในต่างประเทศมีการกำหนดปริมาณการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์โดยจำกัดที่ชนิดของอาหารและปริมาณการใช้ เช่น หากใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ อนุญาตให้ใช้ BHA หรือ BHT 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หากมีการผสมกันหรือผสมกับสารอื่นๆ อนุญาตให้ใช้ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สำหรับ BHA และ BHT ที่ใช้ร่วมกับแป้งมันฝรั่งหรือเกล็ดขนมปัง อนุญาตให้ใช้ 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ BHT ที่ใช้ในหมากฝรั่งอนุญาตให้ใช้เพียง 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (Taylor. 1980) สำหรับประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้มีกำหนดค่าการใช้ได้สูงสุดของสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น PG อนุญาตให้ใช้ได้ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม BHT อนุญาตให้ใช้ได้ 75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม BHA ให้ใช้ได้ 175 มิลลิกรัม/กิโลกรัม TBHQ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ใช้ได้ 120 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แต่ถ้าต้องการใช้ PG รวมกับ BHT หรือ BHA หรือ TBHQ หรือรวมทั้งสามอย่างใช้ร่วมกันต้องไม่เกิน 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แต่ปริมาณการใช้ของแต่ละตัวต้องไม่เกินปริมาณที่กำหนด (กระทรวงสาธารณสุข. 2543)

2.3.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant)

ช่วงหลายปีที่ผ่านมาผู้บริโภคได้มีความตื่นตัวในเรื่องพิษของสารเคมีที่ใช้เจือปนในอาหาร จึงมีการศึกษาและพยายามนำเอาวัสดุจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้เป็นสารต้านออกซิเดชันในอาหารทั้งในรูปสารสกัดและใช้โดยตรง เช่น สารสกัดจากโรสแมรี่ สารสกัดจากชาเขียวเป็นต้น บางชนิดก็ใช้โดยตรงเช่น เครื่องเทศและสมุนไพรที่เติมลงในอาหาร รวมทั้งมีการทำอาหารเสริมเพื่อต้านอนุมูลอิสระจำหน่าย สารต้านอนุมูลอิสระที่มีในพืชชนิดต่างๆ (Rajalakshmi and Narrasimhan. 1996) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 สารต้านอนุมูลอิสระจากพืชชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	ชนิดของสารต้านอนุมูลอิสระ
ชาเขียว	Epigallocatechin-gallate Epigallocatechin Epicatechin-gallate
โรสแมรี่	Carnosol Rosmarinic acid Carnosic acid and Rosmoridi acid
กานพลู	Phenol
วานิลลา	Eugenol
พริก	Vanillin
ขมิ้น	Capsaicin
พริกไทยดำ	Tetrahydrocurcumin
งา	Ferulic acid
ถั่วเหลือง	Sesamol Sesamoldimer Sesmolinol and Sesaminol
ผักและผลไม้ที่มีสีเหลือง สีแดง หรือสีเข้ม บางชนิด	Isoflavone
ผลไม้ ผักและผลไม้ที่มีสีม่วงและสีแดง บางชนิด เช่น องุ่น	Carotenoid Vitamin C
ชา	Anthocyanin Gallic acid

ที่มา : ดัดแปลงจาก Rajalakshmi and Narrasimhan (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่

(1) สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของเอนไซม์ที่สร้างได้ในเซลล์ร่างกาย ได้แก่ คาทาเลส (catalase) ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) และกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นต้น

(2) สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของวิตามิน ได้แก่ วิตามินอี ซี และเอ

(3) สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของแร่ธาตุ เช่น ซิลิเนียมและสังกะสี ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่ต้านออกซิเดชัน

(4) สารต้านออกซิเดชันในกลุ่มของสารพฤกษเคมี (phytochemicals) เช่น แคโรทีน (carotene) ไลโคปีน (licopene) และสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) เป็นต้น (Frankel and Meyer. 2000)

โดยสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติส่วนใหญ่ที่นิยมใช้เติมในเนื้อสัตว์ ได้แก่ เครื่องเทศและพืชสมุนไพร ซึ่งมีสมบัติในการถนอมอาหาร โดยช่วยชะลอการเน่าเสียและเหม็นหืน ดังนั้นจึงได้มีการเริ่มการค้นคว้าและวิจัยนำเอาเครื่องเทศและพืชสมุนไพรอื่นๆ มาเติมลงในเนื้อสัตว์เพื่อปรับปรุงคุณภาพดังกล่าว (ไมตรี สุทธจิตต์ และ ศิริวรรณ สุทธจิตต์. 2545)

2.3.2 กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระมีกลไกการทำงานแบ่งได้เป็น 6 แบบ คือ

2.3.2.1 ดักจับอนุมูลอิสระ (radical scavenging)

โดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแกอนุมูลอิสระ ดังสมการ

$R\bullet + AH \longrightarrow RH + A\bullet$

$RO\bullet + AH \longrightarrow ROH + A\bullet$

2.3.2.2 ยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen quenching)

สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของ singlet oxygen โดยการเปลี่ยน singlet oxygen ($^1O_2$*) ให้อยู่ในรูป triplet oxygen ($^3O_2$)

2.2.2.3 จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (metal chelation)

สารที่สามารถจับโลหะที่สำคัญคือ EDTA และกรดซิตริก (citric acid)

2.3.2.4 หยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (chain-breaking)

วิตามินอี (α-tocopherol) สามารถป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนจากอนุมูลเปอร์ออกซิล ($ROO^{\cdot}$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.5 เสริมฤทธิ์ (synergism)

สารชนิดนี้จะช่วยสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระทำงานได้ดีขึ้น เช่น การทำงานร่วมกันระหว่างวิตามินอี (α-tocopherol) กับกรดแอสคอบิก (ascorbic acid) โดยที่กรดแอสคอบิกจะให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูล α-tocopherol peroxyl ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง กับอนุมูลเปอร์ออกซิล ($ROO^{\cdot}$) เปลี่ยนรูปกลับไปเป็นวิตามินอี (α-tocopherol) ที่สามารถทำงานได้

2.3.2.6 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition)

สารประกอบฟีโนลิกบางชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) กรดฟีโนลิก (phenolic acid) และแกลเลต (gallates) สามารถยับยั้งการเกิดเอนไซม์ลิโปออกซิจีเนส (lipoxygenease) โดยสามารถเข้าจับกับไอออนของเหล็กซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว (Yanishieva-Maslarova. 2001)

2.4 ความสำคัญของจุลินทรีย์ในอาหาร

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ช่วยขยายให้เห็นรูปร่าง ลักษณะ จุลินทรีย์จำแนกออกเป็น 6 ชนิด คือ แบคทีเรีย ยีสต์ รา โปรโตซัว สาหร่าย และไวรัส จุลินทรีย์สามารถแพร่กระจายโดยทั่วไปในธรรมชาติอย่างกว้างขวางในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญ การเสื่อมเสียของอาหารส่วนใหญ่ไม่ว่าจะเป็นเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างการฆ่า การตัดแต่ง การขนส่ง ระบบทางเดินอาหารของสัตว์และยังมีการปนเปื้อนจากอากาศ ภาชนะบรรจุ พนักงาน หรือหลังกระบวนการแปรรูป เนื่องจากมีจุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ จึงทำให้พบจุลินทรีย์หลายชนิดที่ปนเปื้อนก่อให้เกิดความเสียหายที่แตกต่างกันไป ซึ่งการเสื่อมเสียมักส่งผลโดยตรงในทางที่ไม่ดีต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัส สี กลิ่น รสชาติและคุณค่าทางอาหารในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ทำให้การยอมรับของผู้บริโภคในตัวสินค้าลดลง อีกทั้งในอาหารที่เราบริโภค ยากที่จะหลีกเลี่ยงจากจุลินทรีย์ แม้กระทั่งในร่างกายมนุษย์และสัตว์ก็ยังมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โดยมีทั้งชนิดที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษ สำหรับการมีจุลินทรีย์แปลกปลอมปนเปื้อนในอาหารถือว่าเป็นสิ่งที่ไม่พึงปรารถนา จุลินทรีย์ในอาหารก่อให้เกิดผลต่ออาหารสามารถจำแนกออกได้ดังนี้ (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552; บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Pathogenic microorganisms)

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในอาหาร ได้แก่ แบคทีเรีย รา ไวรัส และ ปรสิต แต่จุลินทรีย์ก่อโรคที่สำคัญในอาหารคือแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่สุดที่ทำให้เกิดโรคและมีอัตราการเสียชีวิตมากมายทั่วโลก (Khalaphallah and Soliman. 2014) การเจ็บป่วยของผู้บริโภคมีความเกี่ยวเนื่องกับการรับประทานเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์ที่ติดต่อไปยังคนได้ (Zoonosis) เช่น โรค Brucellosis, Tuberculosis และ Bovine encepha เป็นต้น นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) เป็นโรคที่เกิดการจากการบริโภคอาหารซึ่งส่วนมากมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ ทำให้เกิดอากรปวดท้อง ท้องเสียและบางครั้งอาจมีคลื่นไส้อาเจียนและมีไข้ร่วมด้วย โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์มี 2 ลักษณะคือ

2.4.1.1 การรับจุลินทรีย์ผ่านอาหาร (Foodborn infection) เป็นโรคที่เกิดจากการกินอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเข้าไป เมื่อเข้าไปสู่ร่างกายแล้วก็สามารถเพิ่มจำนวนได้ เชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitic*, *C. perfringen*, *Campyrobacter jejuni/coli*, *Listeria* spp. และ *E.coli* O157:H7 (คมแข พิลาสมบัติ. 2550)

2.4.1.2 การรับพิษผ่านอาหาร (Foodborn intoxication) เป็นโรคที่เกิดจากการรับเอาสารพิษที่มีอยู่แล้วในอาหารเข้าไปในร่างกาย โดยสารพิษนั้นถูกสร้างขึ้นในขณะที่จุลินทรีย์เพิ่มจำนวนในอาหาร เชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ *C. botulinum*, *S. aureus* และ *B. cereus* ซึ่ง *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษประเภทเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค *C. botulinum* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารพิษประเภทนิวโรทอกซิน (neurotoxin) ที่มีผลต่อระบบประสาท (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542)

2.4.2 จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย (Spoilage microorganisms)

ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์หรือเนื้อสัตว์จัดได้ว่าเป็นอาหารที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่ขั้นตอนการทำให้สัตว์สลบ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากการทำงานเอนไซม์ในกล้ามเนื้อเองหรือมาจากเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นการเปลี่ยนแปลงบางประการเป็นสาเหตุ ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของเนื้อได้ดังนี้

2.4.2.1 การเกิดเมือกที่บริเวณผิวหน้า (surface slime) พบในเนื้อสัตว์แช่เย็นที่มีความชื้นสูง เกิดจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp., *Streptococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ส่วนการเสียของเนื้อสัตว์ที่แช่เย็นในที่ที่ความชื้นต่ำจะพบเชื้อ *Micrococcus* sp. และยีสต์เติบโตมาก

2.4.2.2 การเปลี่ยนสีเนื้อ เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเขียวหรือน้ำตาลหรือเทาได้ โดยเชื้อ *Lactobacillus* sp. และ *Leuconostoc* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2.3 เนื้อเกิดการเรืองแสง (phosphorescence) เกิดจากเชื้อ *Photobacterium* sp. การเน่าเสียแบบนี้จะพบได้น้อยกว่าการเน่าเสียแบบอื่นๆ

2.4.2.4 มีกลิ่นผิดปกติ มักเกิดจากการออกซิไดส์ไขมัน โดยเชื้อ *Achromobacter* sp. และ *Pseudomonas* sp.

2.4.2.5 มีจุดสีบนผิวเนื้อ มักเกิดจากแบคทีเรียชนิดที่มีสารสีต่างๆ เช่น *Serratia marcescen* ทำให้เกิดสีแดง *Pseudomonas syncyanae* ทำให้เกิดสีฟ้า *Chromobacterium lividum* ทำให้เกิดสีน้ำเงินแกมเขียว *Micrococcus* sp. ทำให้เกิดสีเหลือง *Flavobacterium* sp. ทำให้เกิดสีเหลือง

2.4.2.6 การเกิดกลิ่นไม่ดีหรือรสไม่ดีมีกลิ่นตุๆ (taints) เกิดกลิ่นและรสไม่ดีก่อนจะมีรสเปรี้ยวเกิดขึ้น (souring) เนื่องจากแบคทีเรียเติบโตบนเนื้อและสร้างกรดต่างๆ เช่น กรดฟอร์มิก กรดเอซิติก กรดบิวทีริก และกรดโพรพิโอนิก เป็นต้น (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552)

ในการป้องกันการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์นั้นจะช่วยได้หากผู้บริโภคมีความรู้ความเข้าใจในเรื่องจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมถึงกลไกที่นำไปสู่การเสื่อมคุณภาพจะช่วยให้ควบคุมจุลินทรีย์และช่วยชะลอการเน่าเสียได้เป็นผลสำเร็จ เทคโนโลยีการถนอมอาหารจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของอาหารทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นที่ยอมรับและมีประโยชน์ต่อร่างกาย การถนอมอาหารจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้อีกด้วย (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549)

2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

2.4.3.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

2.4.3.2 คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์สัตว์ เนื้อสัตว์เป็นแหล่งอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหารครบถ้วน ความชื้นในอาหารจะเป็นตัวกำหนดชนิดและประเภทของจุลินทรีย์ เช่น บริเวณผิวด้านนอกชิ้นเนื้อค่อนข้างแห้ง อาจพบเชื้อราเจริญเติบโต ส่วนเนื้อที่อยู่ลึกเข้าไปภายในชิ้นเนื้อจะมีความชื้นมากขึ้นจึงพบแบคทีเรียเจริญเติบโต ดังนั้นการควบคุมความชื้นในห้องที่เก็บเนื้อจึงมีความสำคัญมาก ความเป็นกรด-ด่างของเนื้อสดก็จะแตกต่างกันไปตั้งแต่ 5.7-7.2 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณไกลโคเจน โดยทั่วไปแบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ดีในช่วงที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง

2.4.3.3 ปริมาณออกซิเจน จุลินทรีย์ประเภทยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการดำรงชีวิต จะสามารถเติบโตได้ดีในเนื้อสัตว์บริเวณพื้นผิวด้านนอก และหากพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้นจะพบจุลินทรีย์บริเวณนั้นเพิ่มขึ้นด้วย ตัวอย่างเช่นบริเวณพื้นผิวของเนื้อบดจะพบจุลินทรีย์ในปริมาณสูงกว่าบริเวณพื้นผิวของชิ้นเนื้อทั้งก้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3.4 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บเนื้อไม่ควรจะเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าจุดเยือกแข็งมากนักเพราะจะทำให้จุลินทรีย์ที่เติบโตได้ดีในอุณหภูมิต่ำเติบโตได้ โดยปกติแล้วอุณหภูมิมีส่วนสำคัญในการกำหนดชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อ เช่น การเก็บเนื้อไว้ที่อุณหภูมิสำหรับการแช่เย็น จะพบจุลินทรีย์พวกไซโครฟายล์เจริญเติบโตได้ดี จึงทำให้เกิดการเสียแบบเน่าเหม็นได้ ส่วนการเก็บเนื้อที่อุณหภูมิห้องนั้น จะพบการเจริญของเชื้อมีโซฟายล์ ซึ่งสามารถสร้างแก๊สได้ (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552)

2.4.4 การเน่าเสียของเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์ที่เน่าเสีย หมายถึง เนื้อสัตว์ที่มีสี กลิ่น และรสชาติที่ผิดปกติไป เนื่องจากจุลินทรีย์สร้างสารประกอบบางชนิดขึ้นมาระหว่างเจริญบนเนื้อสัตว์ จำนวนที่มักพบในเนื้อสดมีค่าประมาณ 10^2-10^5 cfu/cm^2 แต่มีเพียงประมาณร้อยละ 10 ที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ซึ่งเมื่อเชื้อเจริญเพิ่มถึง 10^7 cell/cm^2 เนื้อเริ่มมีกลิ่นเหม็นเน่า และเมื่อจำนวนเชื้อเพิ่มถึง 10^8 cell/cm^2 จะพบเมือกบริเวณผิวหน้าของเนื้อ โดยเฉพาะบริเวณผิวหน้าของเนื้อสัตว์จะเน่าเสียก่อนส่วนอื่นๆ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542)

การเน่าเสียของเนื้อสัตว์แบ่งการเปลี่ยนแปลงออกได้ 2 แบบ คือ

2.4.4.1 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

การเกิดการย่อยสลายของโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโมเลกุลอื่นๆ ไปเป็นโมเลกุลที่เล็กย่อยลงไปนั้น อาจเป็นผลมาจากปฏิกิริยาของสารย่อยที่มีอยู่ภายในเนื้อสัตว์เอง หรือสารย่อยที่ผลิตขึ้นมาจากจุลินทรีย์ก็ได้ ในระยะแรกๆ สารย่อยภายในเนื้อสัตว์อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการย่อยสลาย แต่ต่อมาเมื่อจำนวนจุลินทรีย์เหล่านี้มากขึ้น ทำให้มีกิจกรรมและสร้างสารย่อยออกมามากขึ้นตามไปด้วย และการเกิดการย่อยสลายต่อจากนี้จึงมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ สารย่อยที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาส่วนใหญ่จะเป็นพวกไลเปส (lipases) ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์พวกไขมัน และฟอสโฟลิปิดไปเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน การย่อยดังกล่าวเรียกว่า ไลโปลิซิส (lipolysis) ถ้าเกิดขึ้นมากๆ ก็จะช่วยให้การเกิดออกซิเดชันของไขมันเร็วขึ้น จึงทำให้เหม็นหืนได้ (ชัยณรงค์ คันธพินิจ. 2529)

2.4.4.2 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพที่เกิดเนื่องมาจากจุลินทรีย์เป็นสาเหตุนั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง สี กลิ่น รสชาติและความนุ่ม ลักษณะการเน่าเสียทางกายภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือ

(1) การเน่าเสียในสภาพที่มีอากาศ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณผิวนอกของเนื้อสัตว์ เช่น การเกิดเมือกบริเวณผิวหน้า (surface slime) การเปลี่ยนสี อาจทำให้ผิวของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อสัตว์มีสีเขียว สีน้ำตาล หรือซีด การเกิดการเรืองสี การมีกลิ่นรสผิดปกติ และการเหม็นหืน (rancidity) เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จากแบคทีเรีย และปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ของกรดไขมันอิ่มตัว

(2) การเน่าเสียในสภาพไม่มีอากาศ มักเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative bacteria) หรืออาจเกิดจากแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ (anaerobic bacteria) ทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น การมีรสเปรี้ยว (souring) เกิดจากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในเนื้อสัตว์ ทำให้เกิดกรดอินทรีย์ต่างๆ ขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และเกิดแก๊สในเวลาเดียวกัน เนื้อสัตว์ที่บรรจุแบบสุญญากาศมักมีการเน่าเสียในลักษณะนี้มาก และการเกิดกลิ่นเหม็นเน่าของโปรตีน (putrification) เกิดจากการย่อยสลายไมเลกุลของโปรตีน สายเปปไทด์ หรือกรดอะมิโนอิสระ ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นได้แก่ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ แอมโมเนีย เอมีน เป็นต้น (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552)

2.5 เนื้อสุกร

เนื้อสุกร (pork) หมายถึง เนื้อเยื่อจากซากสุกรซึ่งสามารถบริโภคเป็นอาหารได้ โดยมีกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) จากสุกรเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในปริมาณสูงสุด อาจผ่านกระบวนการแช่เย็น แต่ยังไม่ได้ถูกกระทำการใดๆ อย่างอื่นเพื่อวัตถุประสงค์ในการถนอมอาหาร ซึ่งเนื้อสุกรที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์แล้วต้องเก็บให้มีอุณหภูมิภายในของเนื้อไม่สูงกว่า 10 องศาเซลเซียสตลอดเวลา แต่ต้องไม่เกิน 24 ชั่วโมง หรือมีอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสตลอดเวลาแต่ต้องไม่เกิน 7 วัน (มกษ 6700-2547) เนื้อสุกร. 2547)

2.5.1 จุลินทรีย์ก่อโรคที่มักพบในเนื้อสัตว์

2.5.1.1 *Salmonella* spp.

Salmonella spp. เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษ ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถสร้างแก๊สในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* spp. คือ 35–37 องศาเซลเซียส แต่เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้ระหว่าง 5–47 องศาเซลเซียส บางครั้งพบว่าเชื้อสามารถมีชีวิตรอดในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4–5.3 ทำให้บางครั้งยังสามารถตรวจพบเชื้อในไส้กรอกหมัก (คมแข พิลาสมบัติ. 2550) เชื้อ *Salmonella* spp. มักพบการปนเปื้อนจากสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไข่ดิบ และสัตว์ปีก เนื้อสุกรเป็นอีกแหล่งการปนเปื้อนเชื้อที่สำคัญในการทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ สุกรที่มีสุขภาพดีมักพบการปนเปื้อนของเชื้อโดยไม่แสดงอาการเจ็บป่วย แต่จะเป็นพาหะของโรคโดยจะขับถ่ายอุจจาระที่มีเชื้อนี้ออกมาเมื่อถ่ายทอดไปสู่คนทำให้แสดงอาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่รุนแรงออกมาได้ นอกจากนี้อาจยังได้รับเชื้อทางอ้อมจากการรับประทานอาหารที่ผ่านการปรุงที่ไม่ถูกสุขลักษณะ (ศุภร อังศุจินดา. 2549) ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรคขึ้นอยู่กับสภาพร่างกายของผู้ป่วย โดยทั่วไปแล้วค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อที่ทำให้เกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษประมาณ 10^5-10^6 เซลล์ อย่างไรก็ตามในการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษพบว่ามีจำนวนเชื้อเพียง 10^3 เซลล์ ก็สามารถทำให้เกิดอาการของโรคได้ อาการของโรคจะเกิดขึ้นภายหลังจากรับเชื้อเข้าไป 8-42 ชั่วโมง มีอาการป่วย 2-3 วัน โดยมีอาการดังนี้ เป็นตะคริวที่ท้อง ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552)

2.5.1.2 *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นเกลียว (curved or spiral formed) มีขนาดเล็ก (กว้าง 0.2-0.9 ไมโครเมตรและยาว 0.2-0.9 ไมโครเมตร) เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา มีความต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) อุณหภูมิที่เหมะสมต่อการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 37–46 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญคือ ประมาณ 46 องศาเซลเซียส เชื้อนี้จะมีอายุอยู่ได้เพียง 2–3 วันเมื่ออยู่ภายนอกโฮสต์ (คมแข พิลาสมบัติ. 2550) *Campylobacter* spp. จัดว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์และติดต่อไปยังมนุษย์ สายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์ คือ *C. jejuni* และ *C. coli* ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถผลิตสารพิษ enterotoxin และ cytotoxin ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยสารพิษทำให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งของเหลวในลำไส้ของสัตว์ทดลอง (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549) การระบาดของโรคที่พบในมนุษย์ส่วนใหญ่เกิดจากการบริโภคอาหารต่างๆ เช่น นมที่ผ่านการความร้อน ผักดิบและเนื้อสัตว์ที่ปรุงไม่สุก โดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อสัตว์ปีก อย่างไรก็ตามถึงแม้ *Campylobacter* spp. จะมีแหล่งการปนเปื้อนหลายแหล่ง แต่แหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญ คือสัตว์ปีก เชื้อ *Campylobacter* spp. เพียง 500 เซลล์ก็สามารถก่อโรคได้ โดยผู้ป่วยได้รับเชื้อจากการรับประทานอาหารเป็นเวลา 2-5 วัน แต่บางครั้งอาจนานถึง 2 สัปดาห์ อาการหลักที่พบคือ ถ่ายเหลวอย่างมาก คลื่นไส้และอาเจียน มีไข้ ปวดศีรษะ หนาวสั่น บางรายถ่ายเป็นเลือด (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552)

2.5.1.3 *Yersinia enterocolitica*

เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยแฟลกเจลลาที่อุณหภูมิต่ำว่า 37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 29 องศาเซลเซียส บางครั้งพบว่าสามารถเจริญในอุณหภูมิต่ำหรือในตู้เย็น สามารถมีชีวิตภายหลังการแช่แข็ง และการละลายอาหาร (thawing) แบคทีเรียชนิดนี้สามารเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือ 4–42 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ทีทำให้เกิดโรคในมนุษย์มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* และ *Y. enterocolitica* แหล่งการปนเปื้อนที่สำคัญของสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์มาจากสุกร สามารถแยกเชื้อ *Y. enterocolitica* และ *Y. pseudotuberculosis* ได้จากสุกรที่มีสุขภาพดี แต่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Y. enterocolitica บ่อยกว่า โดยมักพบบริเวณต่อมทอนซิลของซากสุกร ซึ่งพบมากถึง 10^6 cfu/g ทำให้เกิดโรค Yersiniosis (Van Damme *et al*. 2015) อาการของโรคคือ ปวดบริเวณท้องน้อย ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อาการจะเกิดขึ้นภายหลังการรับเข้าไปเป็นเวลา 24-30 ชั่วโมง โดยมีอาการป่วยประมาณ 2-3 วัน (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552)

2.5.1.4. *Escherichia coli*

E. coli อยู่ในตระกูล Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) โดยทั่วไปมักพบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น โดยทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ กลุ่มที่ทำให้เกิดโรค เรียกว่า enteropathogenic *E. coli* (EC) ซึ่งประกอบไปด้วย 5 กลุ่มย่อย ได้แก่

(1) กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร (enteropathogenic *E. coli* เขียนย่อว่า EPEC)

(2) กลุ่มที่สร้างสารพิษขึ้นในทางเดินอาหาร (enterotoxigeric *E. coli* เขียนย่อว่า ETEC)

(3) กลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร (enterohemorrhagic *E. coli* เขียนย่อว่า EHEC)

(4) กลุ่มที่ทำลายเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร (enteroinvasive *E. coli* เขียนย่อว่า EIEC)

(5) กลุ่มที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (enteroaggregative *E. coli* เขียนย่อว่า EAggEC) (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549)

E. coli O157:H7 เป็นเชื้ออีกชนิดหนึ่งที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคระบาดเนื่องจากการบริโภคเนื้อสัตว์ และมีแนวโน้มพบการระบาดของโรคเพิ่มขึ้น การระบาดของโรคส่วนใหญ่มีสาเหตุมากจากการบริโภคเนื้อโค นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนในแมวและสุนัข แต่มีรายงานค่อนข้างน้อย *E. coli* O157:H7 สามารถมีชีวิตรอดบนเนื้อโคไบซันเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แต่ไม่มีการเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวน แต่พบการเพิ่มจำนวนของเชื้อดังกล่าวบนเนื้อโคไบซันที่เก็บเนื้อไว้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และพบว่าเชื้อยังสามารถเพิ่มจำนวนได้นานถึง 12 วัน ในเนื้อโคบดที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีชีวิตรอดแต่ไม่เพิ่มจำนวน (Li and Logue. 2005) โรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *E. coli* O157:H7 ทำให้เกิดอาการในเด็กที่เรียกว่า “Hemorrhagic colitis” ผู้ป่วยจะมีอาการท้องเดิน ถ่ายเป็นเลือดและปวดท้อง ทำให้ถึงตายได้ และยังทำให้เกิดโรค “hemolytic uremic syndrome” เป็นผลให้ไตวายฉับพลันในเด็ก และยังทำให้เกิดอันตรายกับสมองส่วนกลาง (central nervous system) ด้วย ซึ่งอาการเหล่านี้พบในผู้ป่วยหลังจากรับประทานแฮมเบอร์เกอร์ที่ปรุงไม่สุก *E. coli* ที่สร้างสารพิษ verotoxin จะมีระยะการฟักตัวของโรคประมาณ 1-4 วันและระยะเวลาของการเป็นโรค 5-10 วัน ปริมาณเชื้อที่ทำให้เกิดโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(the infection dose) ต่ำมาก ประมาณ 1000 เซลล์/กรัม ซึ่งการถ่ายทอดเชื้อโรคสามารถถ่ายทอดจากคนหนึ่งไปสู่อีกคนหนึ่งได้ บางรายงานกล่าวว่าการบริโภคอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเพียงน้อยกว่า 10 เซลล์สามารถทำให้เกิดโรคได้ (Carney *et al*. 2006; บุษกร อุตรภิชาติ. 2552)

2.5.1.5 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ไม่สร้างแคปซูล และสปอร์ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) สามารถสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊ส เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้เมื่อเจริญในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบๆตัว ที่มีอยู่ประมาณ 2-3 เส้น สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ปัจจุบันเชื้อ *Listeria* spp. ประกอบไปด้วย 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes* , *L. innocua* , *L. ivanovii* , *L. seelingeri* , *L. welshimeri* , *L. grayi* ส่วน *L. murrayi* รวมอยู่ใน *L. grayi* พบว่าเฉพาะ *L. monocytogenes* และ *L. ivanovii* เท่านั้นที่ก่อโรคในคนและสัตว์ *L. monocytogenes* สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิกว้าง ตั้งแต่ 0–42 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 30–35 องศาเซลเซียส เชื้อ *L. monocytogenes* มักพบทั่วไปในธรรมชาติ และสภาพแวดล้อม สามารถแยกเชื้อได้จากดิน หญ้าหมัก (silage) ผัก อุจจาระของมนุษย์ และสัตว์ มักพบการปนเปื้อนของเชื้อในมูลไก่ นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อได้จากไก่สด ไก่แช่แข็ง และยังพบเชื้อในเครื่องในสุกร และในคนงานโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งพบว่ามนุษย์เป็นพาหะในการแพร่กระจายเชื้อโดยไม่มีอาการเจ็บป่วยและยังพบเชื้อนี้ในนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์อีกด้วย การระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อ *L. monocytoges* จากการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเรียกว่า Listeriosis การเกิดพิษของ Listeriosis ในคนเชื่อว่าแบคทีเรียผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหาร แล้วเกาะกับเซลล์ของลำไส้พร้อมกับขับสารบางอย่างที่เป็นโปรตีนและมีคุณสมบัติป้องกันตนเองจากการทำลายของเม็ดเลือดขาว โดยอาศัยกลไกการช่วยเหลือของสารพิษคือ เบตา-เฮโมไลซิน (beta-haemolysin) ที่เรียกว่าลิสเตอไลโอไลซินโอ (listeriosin O หรือเรียกชื่อย่อว่า LLO) ทำให้แบคทีเรียเข้ามาอยู่ในแวคคิวโอล (Vacuoles) แต่การที่แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนขึ้นภายในเซลล์ของเจ้าบ้านได้นั้น แบคทีเรียต้องออกจากแวคคิวโอล เพราะเม็ดเลือดขาวจะกำจัดจำนวนแวคคิวโอลโดยการกินแบบฟาโกไซโตซิส (phagocytosis) แบคทีเรียที่ออกจากแวคคิวโอลจะเข้าไปในส่วนอื่นๆ ของเซลล์ และสามารถเดินทางจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้ พร้อมกับทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มสมอง เข้าทำลายมดลูก ต่อมน้ำเหลือง ทารกในครรภ์ และก่อให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิต จึงเป็นผลให้มีอัตราการตายสูง นอกจากนี้ยังมีอาการติเชื้อในกระแสเลือด บางรายมีอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง ท้องเดิน อยู่นานถึง 72 ชั่วโมง ก่อนมีอาการอื่นๆตามมาอีก (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.6 *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม (cooci) สร้างเอนไซม์ coagulase ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) *S. aureus* สามารถสร้างสารพิษ staphylococcal enterotoxins (SEA) มีคุณสมบัติทนความร้อน ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ช่วงอุณหภูมิที่แบคทีเรียสามารถสร้างสารพิษอยู่ในช่วง 10 – 46 องศาเซลเซียส แต่ที่เหมาะสมที่สุด คือ 35-40 องศาเซลเซียส (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552) ในสภาวะที่เหมาะสมสารพิษเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxins) สามารถผลิตได้ภายในเวลา 4 -6 ชั่วโมง การเกิดโรคอาหารเป็นพิษ เกิดจากสารพิษเอนเทอโรทอกซินที่ *S.* aureus สร้างขึ้นและขับออกมานอกเซลล์ *Staphylococcus* แต่ละสายพันธุ์สามารถสร้างเอนเทอโรทอกซินหลายชนิด เช่น เอนเทอโรทอกซิน A (SEA) และ B (SEB) โดยพบว่าสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษส่วนใหญ่เกิดจาก เอนเทอโรทอกซิน A ส่วน เอนเทอโรทอกซิน B พบว่าก่อให้เกิดโรคเป็นส่วนน้อย อาหารที่เก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 7 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้และสามารถสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซิน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถเจริญได้ อยู่ในช่วง 4.2-9.3 และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 6.8-7.2 แบคทีเรียชนิดนี้ทนต่อเกลือที่มีความเข้มข้นสูง ทนต่อเกลือไนไตรท์ และสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีค่า a_w ต่ำถึง 0.83 ค่า a_w ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อและสร้างสารพิษอยู่ในช่วง 0.95-0.9 สามารถพบการปนเปื้อนทั่วไปในอากาศ ฝุ่น น้ำ นม อุปกรณ์ต่างๆ มนุษย์และสัตว์ ผู้ปฏิบัติงานที่สัมผัสอาหาร มักพบแบคทีเรียในโพรงจมูก ลำคอ ผมและผิวหนัง อาการโรคอาหารเป็นพิษเนื่องมาจากเชื้อ *S. aureus* มักเกิดขึ้นแบบเฉียบพลันคือ มีอาการอาเจียน ท้องเสีย นอกจากนี้ยังพบว่ามีอาการคลื่นไส้ ปวดท้อง ปวดหัว กล้ามเนื้อเป็นตะคริว มีไข้ ในรายที่มีอาการรุนแรงจะพบว่ามีอุจจาระมีมูกเลือดปนออกมา ส่วนใหญ่แล้วอาการของโรคจะเกิดภายหลังการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ 1-6 ชั่วโมง อัตราการตายต่ำมาก ส่วนมากการเสียชีวิตมักพบในเด็กและผู้สูงอายุ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549; บุษกร อุตรภิชาติ. 2552)

2.5.2 มาตรฐานทางด้านจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร

จุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนเนื้อสุกร ต้องเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนดดังนี้

2.5.2.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 5 x 10^5 โคโลนี (CFU) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 966.23C หรือวิธีการทดสอบที่เทียบเท่า

2.5.2.2 Coliform organisms กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ต้องไม่เกิน 5 x 10^3 วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 966.24 หรือวิธีการทดสอบที่เทียบเท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.3 ***Salmonella*** **spp.** ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 967.26 หรือวิธีการทดสอบที่เทียบเท่า

2.5.2.4 ***S. aureus*** กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ต้องไม่เกิน 1 x 10^2 วิธีทดสอบให้ปฏิบัติตาม AOAC (2000) ข้อ 977.55 หรือวิธีการทดสอบที่เทียบเท่า (มาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ 6700-2547) เนื้อสุกร. 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สารทดสอบ

สารสกัดกระเจี๊ยบแดงในรูปแบบสกัดด้วยเอทานอล ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. มณทินี ธีรารักษ์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การเตรียมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง โดยการนำกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำกระเจี๊ยบแดงมาสกัดโดยแช่ในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของกระเจี๊ยบแดงต่อตัวทำละลาย 1 : 9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สกัดโดยการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลายเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นกรองสารสกัดผ่านกระดาษกรอง whatman No.1 แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ซึ่งคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงแสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้นของสารสกัดกระเจี๊ยบแดง

สิ่งที่ตรวจวิเคราะห์	ค่าที่ได้
1. ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mg GAE/น้ำหนักแห้ง 100 g)	675.80
2. ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH: IC_{50} (ppm)	932.25
3. ความสามารถในการรีดิวซ์: EC_{50} (ppm)	937.20
4. ความสามารถในการยับยั้ง lipid peroxidation: IC_{50} (ppm)	217.07

ที่มา : คมแข พิลาสมบัติ และมณทินี ธีรารักษ์ (2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งหมด 19 สายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและแบคทีเรียอื่นๆ ซึ่งแสดงการติดสีแกรมของแบคทีเรีย อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ ดังแสดงในตารางที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 แบคทีเรียทดสอบ ชนิดแบคทีเรีย อาหารที่ใช้เลี้ยง และอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย

เชื้อทดสอบ	การติดสีแกรม	อาหาร	อุณหภูมิ (°C)
แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค			
Salmonella Typhimurium TISTR 292	-	TSB-YE	37
Staphylococcus aureus TISTR 118	+	TSB-YE	37
Escherichia coli TISTR 780	-	TSB-YE	37
Listeria innocua ATCC 33090^{T}	+	TSB-YE	37
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	-	TSB-YE	30
แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย			
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^{T}	-	TSB-YE	26
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	-	TSB-YE	26
Lactobacillus plantarum 1149	+	MRS	30
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM1157^{T}	+	MRS	30
Lactobacillus sakei TISTR 890	+	MRS	37
Lactobacillus plantarum ATCC 14947	+	MRS	30
Lactococcus cremoris TISTR 1344	+	MRS	30
Lactococcus lactis 19435	+	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}	+	MRS	30
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* TISTR 942	+	MRS	30
Enterococcus faecalis TISTR 888	+	MRS	37
Streptococcus sp. TISTR 1030	+	MRS	30
แบคทีเรียอื่นๆ			
Bacillus coagulans TISTR 1447	+	TSB-YE	37
Bacillus subtilis JCM 1465	+	TSB-YE	37

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese Culture of Microorganism, Wako, Japan

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่องสับผสม (K41RaS, Seydelmann, Seydelmann, Germany)
2) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
3) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, Basic, Sartorius Stedim Biotech GmbH , Germany)
4) ตู้เขี่ยเชื้อ Laminar Flow (Dwyer model merk II, Corporate HQ Michigan city , USA)
5) ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (WTB Binder model BD, BINDER GmbH , Germany)
6) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot-air oven, Memmert model CM500, Memmert GmbH , Germany)
7) หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ
   (Auto clave, Hirayama model HVE 50, Hariyama manufacturing corporation , Japan)
8) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Memmert GmbH ,Germany)
9) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer KMC-1300V, Vision Sciencyific co. ltd., Korea)
10) เครื่องตีป่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, Vision Scientific , France)
11) ไมโครเวฟ (Toshiba model ER-G8C, Toshiba Thailand, Thailand)
12) Multipipette (CappAero96 Multichanel pipette C20-8, Capp, Capp Brand, Denmark)
13) Autopipette (Capp Aid pipette controller PA-100, Capp, Capp Brand, Denmark)
14) ไมโครปิเปต ขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Finnpipette F3, Thermo Scientific, USA)
15) เครื่องวัดค่าสี (Hunterlab Mini Scan EZ LAV, Hunter Associates Laboratory, Inc , USA)
16) เครื่อง Homogenizer (Ultra tarrax model IKA T25 digital, IKA group, Germany)
17) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu model UV–1601, Shimadzu Corparation , Japan)
18) เครื่องวัดค่า กรด-ด่าง (Mettler Toledo model SG-2, Mettler Toledo International Inc., Switzerland)
19) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) (Beckman Coulter model Avanti J-E, Beckman coulter company , USA)
20) เครื่องปิดผนึกด้วยความร้อน (SK-310, Dako, Impulse sealer , Korea)
21) กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman, SIGMA-ALDRICH, England)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) Agar (Criterion, USA)
2) Baird-Parker agar (Merck, Germany)
3) Chromocult (Merck, Germany)
4) Hekoten-Entero-Agar (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) Malt extract (Merck, Germany)

6) Lysine-Indole-Motility (LIM) medium (Difco, USA)

7) MRS broth (Merck, Germany)

8) Plate count agar (Merck, Germany)

9) Simmons citrate agar (Merck, Germany)

10) Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)

11) Triple sugar iron (TSI) agar (Merck, Germany)

12) Yeast extract granulated (Merck, Germany)

13) Mueller Hinton Broth (MHB) (Merck, Germany)

14) Potassium tellurite-hydrate (Merck, Germany)

15) 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Germany)

16) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) (Sigma, Germany)

17) Ethanol 99% (Merck, Germany)

18) Methanol (Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

วัตถุประสงค์	กิจกรรม
การทดลองที่ 1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย	1.1 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง โดยวิธี Agar well diffusion method 1.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรีย โดยศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) 1.3 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมาย โดยวิธี Checker board broth 1.4 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 สัมผัสเชื้อต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*)
การทดลองที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด	โดยเลือกความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สรุปได้จากการทดลองที่ 1 เติมในเนื้อสุกรบด เก็บรักษาในถาดโฟมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างเพื่อหาจำนวนเชื้อที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน 2.1 เติมเชื้อ *S. aureus* 2.2 เติมเชื้อ *S.* Typhimurium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด	3.1 ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส บรรจุใส่ถาดโฟมเก็บรักษานาน 10 วัน ดังนี้ 3.1 คุณภาพด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ - จุลินทรีย์ทั้งหมด - จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic) - ยีสต์และรา - Coliforms และ *E. coli* 3.2 คุณภาพด้านกายภาพ ได้แก่ - ค่าสี (L*a*b*) - ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.2 ศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส บรรจุใส่ถุงเย็น ปิดผนึกด้วยความร้อน เก็บรักษานาน 4 เดือน ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl)

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การทดลองที่ 1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

(1) วิธีการเตรียมจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาแสดงในตารางที่ 3.2 ได้จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ โดยทำการจัดเก็บ stock culture ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการทำการทดลอง นำ stock culture มาละลายน้ำแข็ง และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด เป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้ออยู่ในสภาวะ late log phase (non-stressed cells) ตามวิธีของ Tangwatcharin *et al.* (2006) จากนั้นเตรียมสารละลายแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นแบคทีเรีย 10^8 cfu/ml (McFarland standard of 0.5) เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) วิธีการเตรียมแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินที่ใช้ในการทดสอบได้จากการแยกเชื้อ *L. plantarum* KL-1 ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน วิธีการเตรียมแบคเทอริโอซินดังกล่าว นำมาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำเฉพาะส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อไปต้มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเตรียมความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินโดยทำการเจือจางแบบ two fold dilution ซึ่งส่วนใสที่นำมาใช้คือ แบคเทอริโอซิน KL-1 นำส่วนใสที่ได้ทำการการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn ที่ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.* (1999) เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสำหรับเชื้อทดสอบที่มีวุ้น (agar) ร้อยละ 1.5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นถ่ายเชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ที่ต้องการทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นร้อยละ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นนำแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่ได้ ดูดส่วนใสมาทำให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้รอจนกระทั่งหยดน้ำส่วนใสที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละความเจือจางลงไป ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อยู่ในน้ำส่วนใสต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็น arbitrary unit (AU/ml) โดยค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินคือค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใสซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยคำนวณได้จาก (1000/10)D เมื่อ D เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (Parente *et al.* 1995)

3.5.1.1 การทดลองที่ 1.1 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง โดยวิธี Agar well diffusion method ตามวิธีของ Perez *et al.* (1990) ทำการเจือจางสารสกัดแบบ two fold dilution โดยมีระดับความเข้มข้นของสารสกัด 4 ระดับ ได้แก่ 50, 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยผสมสารละลายแบคทีเรียในอาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายในจานอาหาร $5x10^5$ cfu/ml เจาะหลุมด้วย cork-borer (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ปิเปตสารสกัดลงในหลุมปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมของเชื้อทดสอบ (ตารางที่ 3.2) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone หน่วยมิลลิเมตร (รวมกับเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1.2 การทดลองที่ 1.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียโดยศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC) ด้วยวิธี broth microdilution method ตามวิธีของ CLSI M7-A4 (2002) นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิดที่ถูกยับยั้งจากการทดลองที่ 1.1 มาทำการศึกษา ทำการเตรียมสารปิเปตลงในหลุมของไมโครเพลท โดยมีลำดับการใส่ ดังนี้

- ใส่สารสกัดความเข้มข้นแต่ละระดับลงในหลุมปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ใส่อาหาร 2x TSB ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ใส่อาหาร 1x TSB ปริมาตร 120 ไมโครลิตร
- ใส่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคจากการทดลองที่ 1.1 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate 5 x 10^5 cfu/มิลลิลิตร โดยเตรียมกลุ่มควบคุมตัวอย่างละ 3 แบบ ดังนี้

1) growth control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + แบคทีเรีย
2) negative control คือ ตัวทำละลาย + อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + แบคทีเรีย
3) sterile control คือใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปิดฝา microplate เขย่าเบาๆ ให้อาหารและเชื้อผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความขุ่น จากนั้นทำการวิเคราะห์หาค่า MIC, MIC_{90} และ MBC โดยนำสารละลายในหลุมของ microplate ที่ใส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วทำการบันทึกระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัด โดยถ้าพบการเจริญมากกว่า 500 โคโลนี เป็นค่า MIC หากพบการเจริญอยู่ในช่วง 5-500 โคโลนี เป็นค่า MIC_{90} และถ้าพบการเจริญไม่เกิน 5 โคโลนี เป็นค่า MBC ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 99.9 ของจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น

3.5.1.3 การทดลองที่ 1.3 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อเป้าหมาย โดยวิเคราะห์แบบ Checker board broth dilution แบบ two fold dilution ของ MIC ของสารแต่ละชนิด ในสัดส่วน 1 : 1 จำนวน 7 ระดับ ได้แก่ สารสกัดกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 100 ถึง 0.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคเทอริโอซิน KL-1 พบว่ามีค่าความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เท่ากับ 6400 AU/ml และทำการเจือจางแบบ two fold dilution จะได้ความเข้มข้น 6400 ถึง 50 AU/ml ตามวิธีของ Turgis *et al.* (2012) ทำการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันตามวิธีของ Bharadwaj *et al.* (2003) ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ทำการเตรียมสารปิเปตลงในหลุมของ micro plate ลำดับการใส่ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ใส่สารสกัดความเข้มข้นแต่ละระดับลงในหลุมปริมาตร 20 ไมโครลิตร

- ใส่แบคเทอริโอซินความเข้มข้นแต่ละระดับปริมาตร 50 ไมโครลิตร

- ใส่อาหาร 2x TSB ปริมาตร 110

- ใส่เชื้อ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ให้มีระดับความเข้มข้นสุดท้ายใน microplate 5×10^5 cfu/มิลลิลิตร โดยเตรียมกลุ่มควบคุมตัวอย่างละ 3 แบบ ดังนี้

1) growth control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + แบคทีเรีย

2) negative control คือ ตัวทำละลาย + อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB + แบคทีเรีย

3) sterile control คือใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปิดฝา microplate เขย่าเบาๆ ให้อาหารและเชื้อผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการวัดความขุ่น จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผลค่า MIC, MIC_{90} และ MBC ของการใช้สารสกัดกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินร่วมกันและวิเคราะห์ค่า Fractional inhibitory concentration index (FICI) และ Fractional bactericidal concentration index (FBCI) ตามลำดับ โดยมีสูตรในการคำนวณหาค่าดัชนีเพื่อใช้พิจารณาการออกฤทธิ์เสริมกัน (Lorian. 2005) ดังนี้

ค่า FICI = FIC(A) + FIC(B)

= [A]/MIC(A) + [B]/MIC(B)

[A] คือ ค่า MIC ของสาร A ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

[B] คือ ค่า MIC ของสาร B ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

MIC(A) คือ ค่า MIC ของสาร A

MIC(B) คือ ค่า MIC ของสาร B

ค่า FBCI = FBC(A) + FBC(B)

= [A]/MBC(A) + [B]/MBC(B)

[A] คือ ค่า MBC ของสาร A ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

[B] คือ ค่า MBC ของสาร B ในสารผสมระหว่างสาร A และสาร B

MBC(A) คือ ค่า MBC ของสาร A

MBC(B) คือ ค่า MBC ของสาร B

เมื่อคำนวณตามสูตรข้างต้นจะนำค่าดัชนีมาแปลผลเพื่อพิจารณาการออกฤทธิ์เสริมกัน ดังนี้

- FICI หรือ FBCI ≤ 0.5 คือ ออกฤทธิ์เสริมกัน

- FICI หรือ FBCI > 0.5 to 1.0 คือ ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- FICI หรือ FBCI > 1.0 to <2.0 คือ ไม่ออกฤทธิ์เสริมกันหรือขัดขวางกัน

- FICI หรือ FBCI ≥ 2.0 คือ ออกฤทธิ์ขัดขวางกัน

3.5.1.4 การทดลองที่ 1.4 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*) ตามวิธีของ Tangwatcharin *et. al.* (2006) โดยเลือกระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ (MBC) จากการทดลองที่ 1.2 ทำการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 15, 30, 60, 180, 360, 720 และ 1440 นาที สำหรับเชื้อ (1) *S. aureus* TISTR 118 และ (2) *S.* Typhimurium TISTR 292 เพื่อหาปริมาณ total culturable cells ของแบคทีเรียทุกชนิดและจุลินทรีย์ทั้งหมด และเพาะเลี้ยงบนอาหารที่จำเพาะกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้น เพื่อหาปริมาณ culturable cells โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารสกัด นำข้อมูลที่ได้ไปประมวลผล และนำเสนอเป็นค่า log cfu โดยนำข้อมูลไปประมวลผล Population density estimate หาค่า non-stressed และ stressed cells ของแบคทีเรียแต่ละชนิด ดังสมการ

stressed cells = total culturable – culturable

non-stressed cells = culturable

3.5.2 การทดลองที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด

(1) วิธีการเตรียมตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างเนื้อสุกรบดโดยใช้เนื้อส่วนสะโพกต่อไขมันในอัตราส่วนร้อยละ 90 : 10 ที่ซื้อจากโรงฆ่าที่ได้มาตรฐาน จังหวัดนครปฐม ทำการตัดแต่งไขมันที่ติดอยู่ในส่วนสะโพกออก จากนั้นหั่นเนื้อและไขมันเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องสับผสม บดให้เข้ากัน จากนั้นนำไปคลุกกับสารสกัดกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินที่เตรียมไว้ โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง (ความเข้มข้นสุดท้ายในเนื้อสุกรบด) คือ

1. กลุ่มควบคุม (ไม่เติมสารสกัด)
2. กลุ่มที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
3. กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 Au/ml
4. กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. กลุ่มที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml

6. กลุ่มที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml

นำเนื้อสุกรบดแบ่งบรรจุถาดโฟมชนิดโพลีสเตรียรีน (Polystyrene, PS) ถาดละ 50 กรัม ใช้ฟิล์มพลาสติกชนิด PVC ปิดทับ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

(2) วิธีการเตรียมเชื้อทดสอบ เตรียมเชื้อทดสอบดังข้อ (1) ในข้อ 3.5.1

3.5.2.1 ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S. aureus* เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อดังกล่าวตามวิธีของ BAM (2001) โดยทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10^3 cfu/g ในเนื้อสุกรบดทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน วิเคราะห์หาจำนวนการมีชีวิตรอดของ *S. aureus* ในเนื้อสุกรบดที่เติมสารสกัดหลังเติมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรบด น้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติก ละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Baird-Parker agar (BP) ที่ผสมไข่แดง ปริมาตร 15 - 20 มิลลิลิตร โดยวิธี Spread plate รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะกลมนูน สีดำเป็นมัน ผิวเรียบ ขอบขาว มีตะกอนขุ่นรอบ ๆ โคโลนี รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30–300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่สงสัยมาวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ Couagulase test โดยดูด Rabbit plasma ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้ว ถ่ายเชื้อลงบนสไลด์ที่มีการหยด Rabbit plasma แล้ว ทำการ smear สังเกตการเกิดเส้นใยบนสไลด์

3.5.2.2 ศึกษาความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วม แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S.* Typhimurium เก็บรักษาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อดังกล่าวตามวิธีของ BAM (2014) โดยทำการเติมสารละลายเชื้อบริสุทธิ์ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10^3 cfu/g ในเนื้อสุกรบดทั้ง 6 กลุ่มการทดลอง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน วิเคราะห์หาจำนวนการมีชีวิตรอดของ *S.* Typhimurium ในเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุกรบดที่เติมสารสกัดแล้วก่อนเติมเชื้อและหลังเติมเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรบดน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติก ละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Hektoen enteric agar (HE) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Novomyocin โดยวิธี Spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีน้ำเงินเขียว และตรงกลางมีสีดำ กลมนูน ผิวเรียบเป็นมัน อาจพบหรือไม่พบจุดตรงกลาง นำโคโลนีไปทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อโคโลนีที่สงสัยไปเพาะลงในอาหาร lysine iron agar (LIA) และ triple sugar iron agar slant (TSI) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูผลปฏิกิริยาทางชีวเคมีในหลอด TSI agar slant และ LIA agar เชื้อ *Salmonella* spp โดยผลการทดสอบแสดงดังตารางในภาคผนวก ค 3

3.5.3 การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

3.5.3.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมตัวอย่างดังแสดงในการทดลองที่ 2 ข้อ (1) เก็บรักษาอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน ทำการวิเคราะห์ ดังนี้

(1) คุณภาพทางจุลินทรีย์ ดังนี้

- จุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count)

การวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อสุกบด ตามวิธีของ AOAC (2006) โดยสุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นปิเปตตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธี Pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar หลังจากนั้นนำจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่มีจำนวนระหว่าง 30–300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic)

การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำในเนื้อสุกรบด ตามวิธีการของ Diliello (1982) โดยสุ่มตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติกละลายในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง Stomacher จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Plate Count Agar โดยวิธี Pour plate ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ รอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30–300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

- ยีสต์ และรา

การวิเคราะห์หายีสต์ และราในเนื้อสุกรบด ตามวิธีของ AOAC (2005) โดยสุ่มตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นปิเปตตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธี Pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt agar ที่มีการเติมกรดแลกติค หลังจากนั้นนำจานอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนับจำนวนเชื้อยีสต์และราทั้งหมด รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่มีจำนวนระหว่าง 30–300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

- Coliforms และ *E. coli*

การวิเคราะห์หา Coliform และ *E. coli* ในผลิตภัณฑ์ ตามวิธีของ AOAC (2006) โดยสุ่มตัวอย่างเนื้อสุกรบดน้ำหนัก 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นปิเปตตัวอย่างและ dilution ที่เตรียมไว้จำนวน 0.1 มิลลิลิตร เพื่อการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Chromocult agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดบนจานอาหารเพาะเชื้อ รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะจานอาหารเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30-300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) คุณภาพด้านกายภาพ ดังนี้

- การวัดค่าสี (L*a*b*)

วัดค่าสี (CIE L*a*b*) โดยนำตัวอย่างเนื้อสุกรบดทุกกลุ่มการทดลอง โดยมีขนาด 5 x 5 x 2 เซนติเมตร กลุ่มทดลองละ 3 ชิ้น มาวัดค่าสีในรูปแบบ CIE (L*a*b*) ชิ้นละ 3 จุด ด้วยเครื่องวัดสี Hunter Lab Mini Scan EZ (Hunter Lab Inc., Reston, USA) เมื่อ L* คือค่าความสว่าง a* คือสีแดง และ b* คือสีเหลือง

- การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีของ Carpenter *et al.* (2007) โดยชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรบด 2 กรัม ใส่น้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์ จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่องวัด pH meter บันทึกผล กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ

3.5.3.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl) ของเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

วิธีเตรียมตัวอย่างดังแสดงในการทดลองที่ 2 ข้อ (1) เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยเก็บใส่ถุงสำหรับแช่แข็งชนิด PE (polyethylene) และปิดผนึกด้วยความร้อน เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl) ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Qwele *et al.* (2013) และ Tongnuanchan *et al.* (2012) โดยชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรบดจำนวน 2 กรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 9500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที และนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บสารละลายส่วนใส (ตัวอย่าง) โดยดูดสารละลายส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 mM DPPH ที่ละลายด้วยเมทานอล ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้เตรียมหลอดควบคุมโดยใช้เมทานอลปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาณ มิลลิลิตร และเตรียมหลอด Blank ดูดสารละลายส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 1 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition of DPPH} = 1 - \frac{\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of blank}}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองที่ 1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ แต่ยังคงมีค่าเฉลี่ย (±SD) ส่วนการศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5: SPSS Inc.)

การทดลองที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด โดยการเติมเชื้อก่อโรค *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5: SPSS Inc.)

การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5: SPSS Inc.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

4.1.1 ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง โดยวิธี Agar well diffusion method

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลที่ระดับความเข้มข้น 50, 25, 12.5 และ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 11.00–23.33 มิลลิเมตร สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อได้เกือบทุกสายพันธุ์ ยกเว้นเชื้อ *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T} และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 8.00 – 16.00 มิลลิเมตร สารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อได้เพียง 4 ชนิด คือ *S. aureus* TISTR 118, *B. subtilis* JCM 1465, *S.* Typhimurium TISTR 292 และ *A. hydrophila* TISTR 1321 โดยมีค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 11.00-12.50 มิลลิเมตร และสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากในกลีบกระเจี๊ยบแดงมีสารแอนโธไซยานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในกระเจี๊ยบ มีสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากโครงสร้างที่เป็น double-ring benzopyran มีประจุบวกทำให้ว่องไวต่อการเกิดคีเลท (chelate) ของโลหะไอออนไปรวมกับหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสร้างพลังงานของแบคทีเรีย เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตทำให้เกิดการยับยั้งและตายไปในที่สุด นอกจากนี้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงยังประกอบด้วยกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดฮิบิสซิค กรดซิตริก ซึ่งกรดเหล่านี้มีผลไปลดค่าความเป็นกรด-ด่าง รบกวนการขนส่งสารผ่านเข้าออกของผนังเซลล์ ส่งผลให้เยื่อบุเซลล์แตก ทำให้ไซโตพลาสซึมตกตะกอน อีกทั้งยังมีการรวมกับไรโบโซมและส่งผลต่อการยับยั้งการสร้างโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรืออาจมีการรบกวนการใช้ L-alanine หรือกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต (Sommaatmadja *et al.* 1964)

ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับ ศุภร อังศุจินดา (2549) ทำการศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือก และเมล็ดส้มเขียวหวาน ด้วยวิธี Agar well diffusion method ที่ระดับความเข้มข้น 5 ระดับ ดังนี้ 25, 50, 100, 150 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *E. coli, S.* Anatum, *S. aureus* และ *L. innocua* และกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ *L. platarum* และ *P. pentosaceus* พบว่าภายหลังการบ่ม 24 ชั่วโมง สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลการต้าน *L. innocua* เพียงสายพันธุ์เดียว ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลการต้าน *L. innocua* และ *S. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลการต้านแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบทั้งหมด และที่ระดับความเข้มข้น 150 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อทุกตัวที่ทดสอบ จากการศึกษาดังกล่าวสอดการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง Fullerton *et al.* (2011) ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ที่แยกได้จากอาหารของกลีบดอกกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 ฃและ 10 ด้วยวิธี Agar disk diffusion พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้สูงที่สุด เนื่องจากสารประกอบฟลาโวนอยด์ในกระเจี๊ยบที่มีโครงสร้างที่สามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ และการเพิ่มขึ้นของจำนวนหมู่ไฮดรอกซิลในวงแหวนของโครงสร้างที่เพิ่มขึ้น จะทำให้ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเพิ่มขึ้น Khalaphallah and Soliman (2014) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดเฮนน่าและกลีบดอกกระเจี๊ยบเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยสกัดด้วยน้ำและเอทานอล ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5, 5 และ 10 ด้วยวิธี Agar disk diffusion พบว่าสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลให้ผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าสารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ เนื่องจากฤทธิ์ทางชีวภาพของสารพฤกษเคมี และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 พบว่ากลีบกระเจี๊ยบที่สกัดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้ เนื่องจากไอออนไฮดรอกซิลอิสระที่มีอยู่ในสารละลายที่มีความสามารถในการรวมตัวกับคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ไปเกาะติดอยู่กับเอนไซม์ เอนไซม์ที่เร่งการเจริญเติบโตไม่สามารถทำงานได้ Morales-Cabrera *et al.* (2013) ทำการศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์และการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกันจากกลีบดอกกระเจี๊ยบต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Agar disk diffusion โดยทำการสกัดด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอลของกลีบกระเจี๊ยบ 5 สายพันธุ์ คือ Alma blanca, Criolla de Oaxaca, Huajicori, Chiautla และ Tecoanapa โดยศึกษาเชื้อทดสอบคือ *S.* Typhimurium, *S.* Choleraesuis พบว่าสายพันธุ์ Alma blanca ที่สกัดด้วยน้ำ เอทานอลและเมทานอล ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S.* Choleraesuis ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยวิธี Agar well diffusion method

เชื้อทดสอบ	การติดสีแกรม	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
		50	25	12.5	6.25
แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค					
Salmonella Typhimurium TISTR 292	-	21.33 ± 0.58[†]	15.00 ± 1.15	12.00 ± 2.31	NI
Staphylococcus aureus TISTR 118	+	22.66 ± 2.08	15.00 ± 2.52	12.50 ± 2.89	NI
Escherichia coli TISTR 780	-	20.66 ± 1.15	13.00 ± 1.53	NI	NI
Listeria innocua ATCC 33090^{T}	+	20.66 ± 0.58	15.00 ± 2.08	NI	NI
Aeromonas hydrophila TISTR 1321	-	23.33 ± 1.73	16.00 ± 1.15	12.00 ± 1.00	NI
แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย					
Pseudomonas fluorescens JCM 5963^{T}	-	20.66 ± 0.58	15.00 ± 0.58	NI	NI
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	-	21.00 ± 1.73	12.00 ± 2.00	NI	NI
Lactobacillus plantarum 1149	+	11.66 ± 2.08	9.00 ± 0.58	NI	NI
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM1157^{T}	+	13.00 ± 0.58	9.00 ± 0.58	NI	NI
Lactobacillus. sakei TISTR 890	+	14.33 ± 2.89	10.00 ± 1.00	NI	NI

[†] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต, NI = No inhibition

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

เชื้อทดสอบ	การติดสีแกรม	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)			
		50	25	12.5	6.25
Lactobacillus.plantarum ATCC 14947	+	11.00 ± 2.83[†]	9.00 ± 0.58	NI	NI
Lactococcus cremoris TISTR 1344	+	22.33 ± 2.03	14.00 ± 1.00	NI	NI
Lactococcus lactis 19435	+	12.00 ± 0.58	8.00 ± 0.58	NI	NI
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* JCM 6124[T]	+	11.50 ± 0.71	NI	NI	NI
Leuconostoc mesenteroides subsp.*mesenteroides* TISTR 942	+	13.00 ± 1.00	10.00 ± 1.00	NI	NI
Enterococcus faecalis TISTR 888	+	22.00 ± 0.58	12.33 ± 0.58	NI	NI
Streptococcus sp. TISTR 1030	+	12.00 ± 1.00	NI	NI	NI
แบคทีเรียอื่นๆ					
Bacillus coagulans TISTR 1447	+	19.66 ± 0.58	15.00 ± 1.15	NI	NI
Bacillus subtilis JCM 1465	+	21.00 ± 0.58	15.00 ± 0.58	11.50 ± 0.58	NI

[†] ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

NI = No inhibition

4.1.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียโดยศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งแบคทีเรีย (Minimum inhibition concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration, MBC)

จากผลการทดลองที่ 4.1.1 ที่พบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ ดังนั้นในการทดลองที่ 4.1.2 จึงเลือกแบคทีเรียที่มีความสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคและก่อให้เกิดการเน่าเสียที่สำคัญในเนื้อสัตว์ ได้แก่เชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก *S.* Typhimurium TISTR 292, *P. fluorescens* TISTR 358 และ *E. coli* TISTR 780 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) ดังกล่าวคือที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่ไม่สามารถหาค่าได้ ส่วนค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 90 (MIC_{90}) คือ ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่ระดับความเข้มข้น 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ (MBC) คือ ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.2 นอกจากนี้ทำการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ (MBC) *L. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ของแบคเทอริโอซิน KL- 1 พบว่ามีค่าเท่ากับ 6400 AU/ml

เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ (MBC) พบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากมีค่า MBC ที่ระดับความเข้มข้นต่ำว่าแบคทีเรียแกรมลบ จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันของโครงสร้าง ซึ่งโครงสร้างของแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีสารประกอบพวก phospholipid lipopolysaccharide และ lipoprotein c และชั้นของ peptidoglycan จึงส่งผลให้สารสกัดเข้าไปทำลายหรือรบกวนการทำงานบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Samuel *et al.* 2014) ซึ่งจากผลการทดลองของ Bokaeian *et al.* (2014) ทำการศึกษาผลของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลต่อการยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ผลการทดลองพบว่า ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* (แบคทีเรียแกรมลบ) ที่แยกได้ 2 สายพันธุ์ คือ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* (แบคทีเรียแกรมบวก) ที่แยกได้ 3 สายพันธุ์ คือ 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงต่อการยับยั้งแบคทีเรีย (MIC) และการทำลายแบคทีเรีย (MBC)

เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
	MIC	MIC_{90}	MBC
Staphylococcus aureus TISTR 118	25	25	25
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	25	25	50
Salmonella Typhimurium TISTR 292	NI	12.5	50
Escherichia coli TISTR 780	25	25	50

MIC = Minimum inhibition concentration ; MBC = Minimum bactericidal concentration ; NI = No inhibition

4.1.3 ศึกษาการทำงานเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic testing) ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยวิธี Checker board broth

จากผลการทดลองที่ 4.1.1 ที่พบว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทุกชนิด ดังนั้นในการทดลองที่ 4.1.3 จึงเลือกแบคทีเรียที่มีความสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคและก่อให้เกิดการเน่าเสียที่มีความสำคัญในเนื้อสัตว์และถูกทำลายด้วยสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงได้ดี ได้แก่เชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก *S.* Typhimurium TISTR 292 และ *P. fluorescens* TISTR 358 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีความสำคัญในเนื้อสัตว์ โดยที่ *S. aureus* TISTR 118 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 มีความสำคัญเนื่องจากเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารในมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้ *P. fluorescens* TISTR 358 มักพบในอาหารสดส่วนใหญ่ เช่น ผัก และเนื้อสัตว์แช่เย็น (บุษกร อุตรภิชาติ. 2552) สำหรับ *E. coli* TISTR 780 มักใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549)

ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (Fractional inhibitory concentration index, FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (Fractional bactericidal concentration index, FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ร่วมกัน พบว่าการใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 โดยค่า FICI คือ 0.31 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) และค่า FBCI คือ 0.31 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) การใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens* TISTR 358 โดยค่า FICI คือ 0.75 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 80 AU/ml)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ โดยค่า FBCI คือ 0.37 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 80 AU/ml) การใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันมีฤทธิ์เสริมกันบางส่วนในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 โดยค่า FICI 0.75 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) และมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ โดยค่า FBCI คือ 0.25 (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าทั้งสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารทั้งสองชนิดจะไปทำลายที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของเมมเบรนและทำให้สูญเสียความสามารถในการควบคุมการแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในเซลล์และนอกเซลล์ (Tokarskyy and Marshall. 2008) นอกจากนี้การเสริมฤทธิ์กันของสารยังขึ้นอยู่กับโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสิ่งรบกวนได้ไวกว่าแบคทีเรียแกรมลบอาจเนื่องมาจากความแตกต่างกันของโครงสร้างผนังเซลล์ แบคทีเรียแกรมลบจะมีผนังเซลล์ที่ซับซ้อนและมีโครงสร้างหลายชั้นประกอบด้วย ชั้นที่เป็นฟอสโฟลิปิด (phospholipids) และลิโพลีแซคคาไรด์ (lipolysacchride) ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการผ่านเข้าออกเซลล์ของสสารรวมถึงยาปฏิชีวนะกลุ่มสังเคราะห์ และจากธรรมชาติ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังเพียงชั้นเดียวที่เป็นเปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งไม่เป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านของสาร (Gupta *et al*. 2012) อีกทั้งสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สามารถทำลายผนังเซลล์ทำให้คุณสมบัติของผนังเซลล์เปลี่ยนไป การทำงานเสริมฤทธิ์กันมีกลไกคือทำให้ผนังเซลล์เกิดรอยรั่วชักนำให้สารต่างๆเข้าออกได้ง่ายขึ้น ชักนำให้แบคเทอริโอซินเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้นและเข้าทำลายแบคทีเรียดังกล่าว (Solomakosa *et al.* 2008a)

Turgis *et al.* (2012) ศึกษาประสิทธิภาพการใช้น้ำมันหอมระเหยร่วมกับแบคเทอริโอซินในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร โดยวิธี Checkerboard technique พบว่าการใช้น้ำมันหอมระเหย *Origanum vulgare* ที่ระดับความเข้มข้น 750 ppm ร่วมกับ nisin 250 ppm สามารถเสริมฤทธิ์กันต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium โดยมีค่า FIC คือ 0.2 และการใช้น้ำมันหอมระเหย *Cinnamomum cassia* ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm ร่วมกับ *E. faecium* MT104 800 AU/ml ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *L. sakei* โดยมีค่า FIC คือ 0.3 เช่นกัน แม้ว่าในปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวกับการศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชร่วมกับแบคเทอริโอซินค่อนข้างน้อย แต่ก็มีการประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชร่วมกับแบคเทอริโอซินซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารทั้งสองชนิดออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อ อีกทั้งกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ต่อการยับยั้งนั้นเป็นกลุ่มที่แตกต่างกัน สารสกัดจากพืชมักจะมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์และแอนโทไซยานิน ในขณะที่น้ำมันหอมระเหยจะมีสารประกอบประเภทเทอร์ปีนส์ (terpenes) และสารประกอบอะโรมาติกฟีนอล เช่น ยูกินอล ไทมอล และคาร์วาครอล เป็นต้น (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549; Turgis *et al.* 2012; Solomakosa *et al.* 2008a) จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดจากพืชและแบคเทอริโอซินนั้นสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาติในการควบคุมแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 4.3 ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมเพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) ของการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1

เชื้อทดสอบ	FICI[a]		FBCI[a]	
	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]	ความเข้มข้นของสาร[b]	แปลผล[c]
Staphylococcus aureus TISTR 118	6.25 + 10	0.31	6.25 + 10	0.31
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	6.25 + 80	0.75	6.25 + 80	0.37
Salmonella Typhimurium TISTR 292	6.25 + 40	0.75	6.25 + 40	0.25

[a]FICI = fractional inhibitory concentration index ; FBCI = fractional bactericidal concentration index

[b]ความเข้มข้นของกระเจี๊ยบแดง (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ร่วมกับแบคเทอริโอซิน (KL-1) (AU/ml)

[c]การแปลผลค่า FICI และ FBCI : - FICI หรือ FBCI < 0.5 คือ ออกฤทธิ์เสริมกัน
- FICI หรือ FBCI > 0.5 to 1.0 คือ ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน
- FICI หรือ FBCI > 1.0 to <2.0 คือ ไม่ออกฤทธิ์เสริมกันหรือขัดขวางกัน
- FICI หรือ FBCI ≥ 2.0 คือ ออกฤทธิ์ขัดขวางกัน

4.1.4 ศึกษาระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium โดยศึกษาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดและจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บ (Cell stress) ของเชื้อบริสุทธิ์ (*In vitro*)

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium เป็นเชื้อที่มีความสำคัญที่มักปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ และก่อให้เกิดโรคที่มีความสำคัญในเนื้อสัตว์ จึงต้องการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อประสิทธิภาพการลดลงของเชื้อดังกล่าว

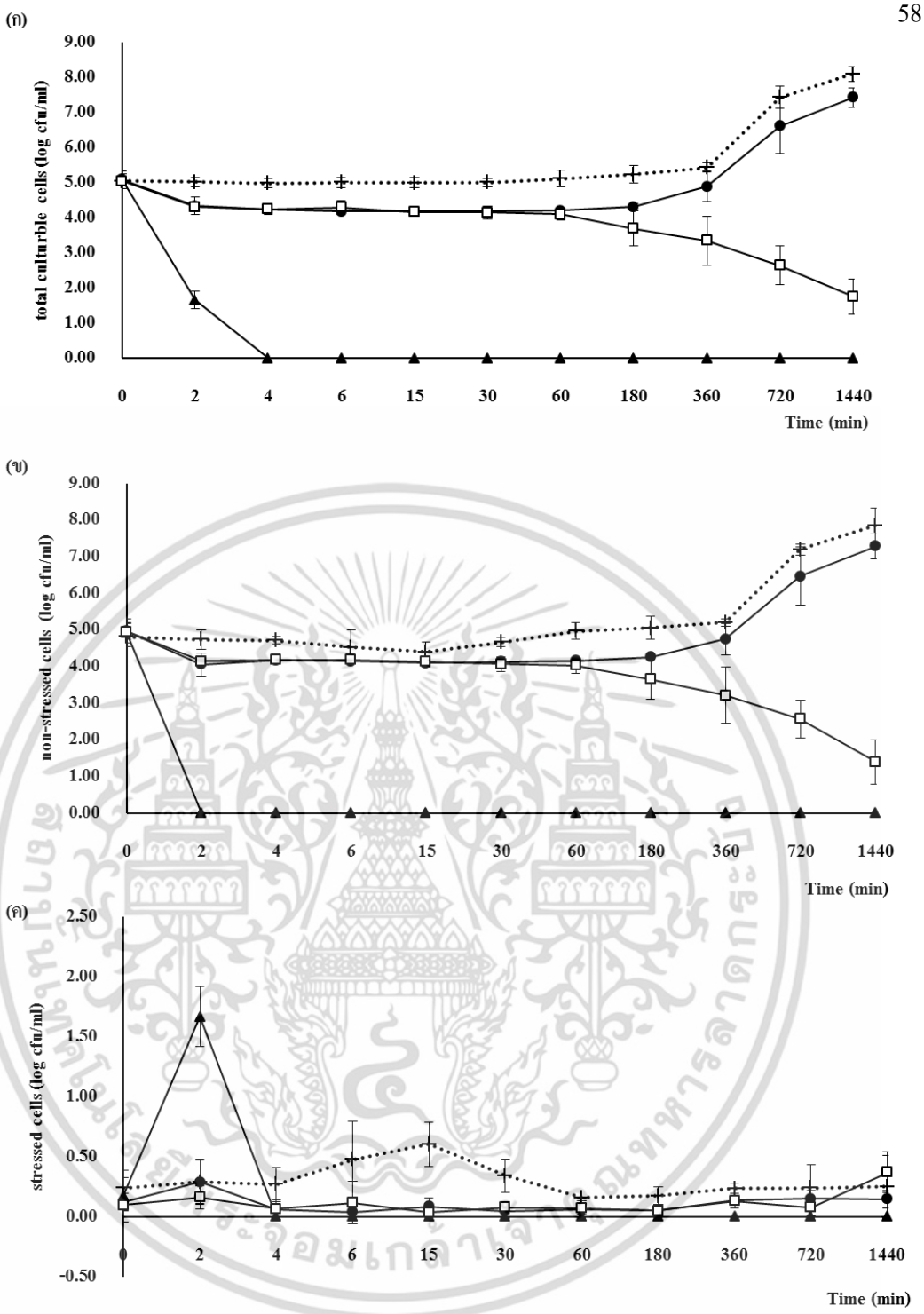
4.1.4.1 การศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 15, 30, 60, 180, 360, 720 และ 1440 นาที

จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 160 AU/ml) และค่า FBCI (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 10 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้ภายใน 4 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน KL-1 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. aureus ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 60 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 2 นาที จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 360 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 5.09 ± 0.07 และ 4.92 ± 0.28 log CFU/ml ตามลำดับ เหลือเพียง 1.67 ± 0.25 และไม่สามารถตรวจพบได้ ตามลำดับ โดยเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียดมากที่สุดจาก 0.17 ± 0.21 เพิ่มขึ้นเป็น 1.67 ± 0.25 log CFU/ml ในนาทีที่ 2 และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งสามสภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 4 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน KL-1 ที่ความเข้มข้น 160 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 360 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 360 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 10 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 5.05 ± 0.21 และ 4.96 ± 0.22 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงเวลาที่ 360 จากนั้นเชื้อมีแนวโน้มลดลงในนาทีที่ 720 เหลือเพียง 4.31 ± 0.13 และ 4.15 ± 0.13 log CFU/ml สอดคล้องกับสภาวะเครียด (stressed cells) ที่เพิ่มขึ้นในนาทีที่ 720 จาก 0.10 ± 0.02 เป็น 0.16 ± 0.10 log CFU/ml ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ ···+··· คือกลุ่มควบคุม, —▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 160 AU/ml และ —□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 10 AU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4.2 ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 (log CFU/ml) ภายหลังการสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6, 15, 30, 60, 180, 360, 720 และ 1440 นาที

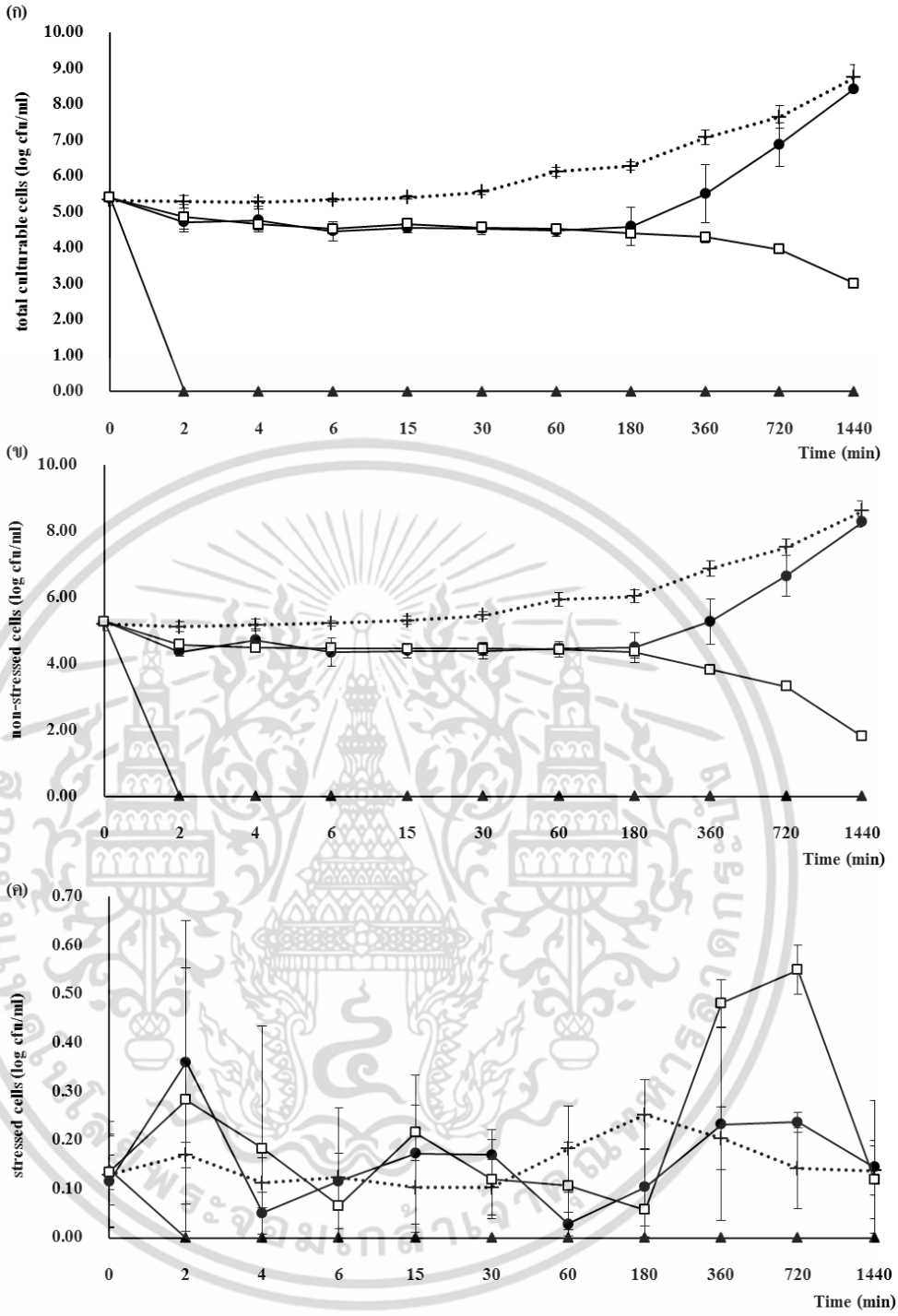
จากการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน โดยเลือกความเข้มข้นจากค่า MBC (50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและ 320 AU/ml) และค่า FBCI (6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + 40 AU/ml) พบว่า การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเพียงอย่างเดียวสามารถทำลายจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ภายใน 2 นาที ในขณะที่การใช้แบคเทอริโอซิน KL-1 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 สามารถลดจำนวนเชื้อ *S.* Typhimurium ได้หลังจากสัมผัสสารนาน 60 นาที ($P<0.05$) โดยกลุ่มควบคุม (ไม่สัมผัสสาร) ที่ระยะเวลา 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (total culturable cells) และจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด (non-stressed cells) มีค่าค่อนข้างคงที่ จนถึงนาทีที่ 30 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) จำนวนเชื้อที่สัมผัสสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยลดลงจาก 5.44 ± 0.04 และ 5.36 ± 0.11 log CFU/ml ตามลำดับ จนไม่สามารถตรวจนับได้ และหลังจากนั้นแบคทีเรียทั้ง 3 สภาวะมีจำนวนลดลงและถูกทำลายทั้งหมดภายหลังสัมผัสสารสกัดเป็นเวลา 2 นาที ($P<0.05$) ในขณะที่แบคเทอริโอซิน KL-1 ที่ความเข้มข้น 320 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 180 เชื้อมีจำนวนเพิ่มขึ้นและเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียเข้าสู่สภาวะเครียด (stressed cells) ภายหลังจากนาทีที่ 180 ขึ้นไป นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml ที่ระยะเวลาสัมผัส 2 นาที พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียที่อยู่ในสภาวะไม่เครียด ลดลงจาก 5.41 ± 0.04 และ 5.27 ± 0.01 log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีจำนวนค่อนข้างคงที่จนถึงเวลาที่ 180 จากนั้นเชื้อมีแนวโน้มลดลงในนาทีที่ 360 เหลือเพียง 4.87 ± 0.35 และ 4.58 ± 0.16 log CFU/ml สอดคล้องกับสภาวะเครียด (stressed cells) ที่เพิ่มขึ้นในนาทีที่ 360 จาก 0.13 ± 0.03 เป็น 0.28 ± 0.27 log CFU/ml ($P<0.05$) เมื่อระยะเวลาผ่านไปเชื้อที่บาดเจ็บจะสามารถฟื้นฟูและกลับมาเจริญเติบโตใหม่ได้ (Slavik *et al.* 1995) ดังแสดงในภาพที่ 4.2

เนื้อสัตว์เป็นแหล่งที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Salmonella* spp และ *S. aureus* ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (คมแข พิลาสมบัติ. 2550) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นว่าสารสกัดจากดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระเจี๊ยบแดงมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยมีสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบสำคัญในการยับยั้ง โดยสารดังกล่าวจะเข้าไปทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งการบาดเจ็บหรือเซลล์ที่บาดเจ็บของจุลินทรีย์นั้น สามารถเกิดขึ้นได้โดยทั่วไปทางกายภาพ เคมีหรือในสภาวะที่มีสารอาหารที่ไม่เพียงพอ ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของจุลินทรีย์ อีกทั้งยังสามารถเกิดขึ้นได้ในระหว่างการเก็บรักษาหรือเมื่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ไม่เหมาะสม เช่น ได้รับความร้อน แช่แข็งหรือทำละลาย การสัมผัสสารบางชนิด เป็นต้น โดยปกติแบคทีเรียจะมีอยู่ในสภาวะ non-stressed cells แต่เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม แบคทีเรียจะมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ โดยแบคทีเรียจะมีการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาค สรีระวิทยา และระบบ metabolism ทำให้แบคทีเรียอยู่ในสภาวะ stressed cells เพื่ออยู่รอดในสภาวะนั้นๆ ได้ ซึ่งการปรับเปลี่ยนสภาวะนี้อาจส่งผลให้แบคทีเรียมีความสามารถทนต่อสารเคมี และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ มากขึ้น stressed cells ทำให้แบคทีเรียบาดเจ็บ และหากยังอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมนั้นต่อจะทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด (ผุสดี ตังวัชรินทร์ และอรุณพร อิฐรัตน์. 2552) ความสำคัญของการหาจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บนั้น เนื่องจากในการตรวจสอบคุณภาพอาหารทั่วไปอาจตรวจไม่พบจำนวนเซลล์ที่บาดเจ็บดังกล่าว ทำให้เซลล์เหล่านั้นอาจปรับตัวและซ่อมแซมตนเองเพื่อการเจริญเติบโตและก่อให้เกิดการเน่าเสียและสร้างสารพิษในผลิตภัณฑ์ได้ เป็นที่ทราบกันดีว่า *Salmonella* spp. และ *S. aureus* นั้นเป็นจุลินทรีย์ก่อให้เกิดโรคที่สำคัญในอาหาร สามารถมีชีวิตรอดจากการบาดเจ็บและซ่อมแซมตัวเองเพื่อการเจริญเติบโตในอาหารได้ (Wesche *et al.* 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่อยู่ในสภาวะ total culturable cells (ก) non-stressed cells (ข) และ stressed cells (ค) เมื่อ···+·· คือกลุ่มควบคุม, —▲— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, —●— คือกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน 320 AU/ml และ —□— คือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด

4.2.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้ง *S. aureus* ในเนื้อสุกรบด

จากผลการทดลองพบว่าในวันแรกของการเก็บรักษาทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนเชื้อ 3.26, 3.20, 3.11, 3.16, 3.11 และ 3.16 ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) ในวันที่ 2 กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 ไม่สามารถลดจำนวนเชื้อได้ ในขณะที่กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml สามารถลดจำนวนเชื้อ *S. aureus* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยมีจำนวนเชื้อ 3.35, 3.59 และ 3.66 log cfu/g ตามลำดับ ในวันที่ 4 และ 6 ทุกกลุ่มการทดลองสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เก็บเนื้อสุกรบดเป็นระยะเวลา 8-10 วัน กลุ่มควบคุมมีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นทุกระยะเวลา ($P<0.05$) ในขณะที่กลุ่มการทดลองอื่นจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นช้ากว่ากลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.4

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ แต่แบคเทอริโอซิน KL-1 ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* แสดงให้เห็นถึงการเสริมฤทธิ์กัน ทั้งสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ โดยสารทั้งสองชนิดจะไปทำลายที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่มีอยู่ในสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สามารถทำลายผนังเซลล์ทำให้คุณสมบัติของผนังเซลล์เปลี่ยนไป เกิดการเปลี่ยนแปลงในส่วน outer membrane ของเซลล์ทำให้ outer membrane ถูกทำลายและเกิดรูรั่วก่อให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์และทำให้ยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ (Ncube *et al.* 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันหลังเติมเชื้อ *S. aureus* (log cfu/g) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$3.26 \pm 0.08^{a,E\dagger,\ddagger,\S}$	$3.20 \pm 0.11^{a,B}$	$3.11 \pm 0.10^{a,D}$	$3.16 \pm 0.06^{a,E}$	$3.11 \pm 0.15^{a,C}$	$3.16 \pm 0.08^{a,D}$
2	$4.16 \pm 0.37^{a,D}$	$3.35 \pm 0.05^{c,B}$	$3.90 \pm 0.23^{ab,C}$	$3.95 \pm 0.16^{ab,D}$	$3.59 \pm 0.14^{bc,BC}$	$3.66 \pm 0.21^{bc,CD}$
4	$4.53 \pm 0.18^{a,C}$	$3.64 \pm 0.20^{d,AB}$	$4.11 \pm 0.05^{bc,C}$	$4.33 \pm 0.25^{ab,CD}$	$3.71 \pm 0.09^{d,BC}$	$3.88 \pm 0.02^{cd,BC}$
6	$4.86 \pm 0.03^{a,B}$	$3.73 \pm 0.23^{c,AB}$	$4.29 \pm 0.25^{b,BC}$	$4.49 \pm 0.19^{b,BC}$	$3.95 \pm 0.17^{c,AB}$	$3.97 \pm 0.03^{c,ABC}$
8	$5.07 \pm 0.16^{a,B}$	$4.17 \pm 0.74^{a,A}$	$4.59 \pm 0.30^{a,AB}$	$4.82 \pm 0.33^{a,AB}$	$4.41 \pm 0.51^{a,A}$	$4.43 \pm 0.49^{a,AB}$
10	$6.42 \pm 0.06^{a,A}$	$4.43 \pm 0.65^{b,A}$	$4.85 \pm 0.37^{b,A}$	$5.11 \pm 0.28^{b,A}$	$4.51 \pm 0.57^{b,A}$	$4.53 \pm 0.51^{b,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบดโดยการเติมเชื้อก่อโรค *S.* Typhimurium

จากการทดลองพบว่า ในวันแรกของการเก็บรักษาทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนเชื้อ 3.12, 3.07, 3.09, 3.21, 3.18 และ 2.92 log cfu/g ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) โดยทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนเชื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ผลดังกล่าวเกิดจากแบคทีเรียแกรมลบมีส่วนประกอบทางเคมีและโครงสร้างของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีสารประกอบพวกฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ลิโพโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) ลิโพโปรตีน ซี (lipoprotein c) และชั้นของเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) จึงส่งผลให้สารสกัดเข้าไปทำลายบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Solomakosa *et al.* 2008b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันหลังเติมเชื้อ *S.* Typhimurium (log cfu/g) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	3.12 ± 0.17 [a,E†,‡,§]	3.07 ± 0.08 [a,F]	3.09 ± 0.13 [a,E]	3.21 ± 0.21 [a,E]	3.18 ± 0.21 [a,F]	2.92 ± 0.17 [a,F]
2	4.30 ± 0.18 [ab,D]	4.05 ± 0.05 [b,E]	4.08 ± 0.02 [b,D]	4.15 ± 0.09 [ab,D]	4.07 ± 0.01 [b,E]	4.14 ± 0.06 [ab,E]
4	5.20 ± 0.10 [a,C]	4.75 ± 0.07 [a,D]	4.53 ± 0.62 [a,D]	4.83 ± 0.71 [a,C]	4.67 ± 0.04 [a,D]	4.82 ± 0.08 [a,D]
6	5.84 ± 0.03 [a,B]	5.26 ± 0.01 [d,C]	5.30 ± 0.02 [cd C]	5.49 ± 0.12 [b,B]	5.41 ± 0.06 [bc,C]	5.47 ± 0.07 [b,C]
8	6.98 ± 0.38 [a,A]	6.25 ± 0.39 [b,B]	6.22 ± 0.36 [b B]	6.38 ± 0.03 [ab,A]	6.39 ± 0.43 [ab,B]	6.40 ± 0.12 [ab,B]
10	7.41 ± 0.68 [a,A]	6.77 ± 0.12 [a,A]	6.89 ± 0.06 [a,A]	6.87 ± 0.08 [a,A]	6.90 ± 0.03 [a,A]	7.09 ± 0.39 [a,A]

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบด

4.3.1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบดแช่เย็น

4.3.1.1 คุณภาพด้านจุลินทรีย์

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) (log cfu/g) พบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 4.99, 4.79, 4.93, 4.85, 5.06 และ 4.97 log cfu/g ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเมื่อเก็บรักษานาน 10 วัน ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยในวันที่ 2 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 5.29, 4.61, 4.65, 4.75, 4.73 และ 4.84 log cfu/g ตามลำดับ วันที่ 4 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 5.86, 5.25, 5.34, 5.44, 5.32 และ 5.43 log cfu/g ตามลำดับ วันที่ 6 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 6.11, 5.77, 5.74, 5.87, 5.61 และ 5.63 log cfu/g ตามลำดับ ในวันที่ 10 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 8.73, 7.28, 7.47, 7.55, 7.29 และ 7.25 log cfu/g ตามลำดับ โดยพบว่ากลุ่มควบคุมเนื้อเริ่มเน่าเสียในวันที่ 8 ของการเก็บรักษา โดยมีจำนวนจุลินทรีย์รวม 7.31 log cfu/g ซึ่งจำนวนเชื้อที่เริ่มเน่าเสียคือ log 7 cfu/g ทำให้เนื้อมีกลิ่นผิดปกติ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549; Olaoye and Ntuen. 2011) นอกจากนี้เนื้อจะเริ่มเกิดเมือกเมื่อตรวจนับจุลินทรีย์ได้ log 7.5- log 8 (ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา) ซึ่งการเกิดเมือกบนเนื้อสดเป็นปัญหาการเน่าเสียของเนื้อที่เก็บในตู้เย็นมากที่สุด (สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549) ซึ่งกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 เนื้อเริ่มเน่าเสียในวันที่ 10 อย่างไรก็ตามกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 พบว่าจำนวนเชื้อไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

การวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic) (log cfu/g) พบจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ 4.23, 4.15, 4.09, 4.17, 4.23 และ 4.22 log cfu/g ตามลำดับ สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาและมากที่สุดในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.7

การวิเคราะห์หายีสต์และรา (log cfu/g) พบจำนวนยีสต์รา 3.54, 3.54, 3.41, 3.58, 3.60 และ 3.68 log cfu/g ตามลำดับ ในวันแรกของการเก็บรักษาทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 มีจำนวนเชื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ในวันที่ 2 โดยมีจำนวนเชื้อ 3.91, 3.49,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.49, 3.41, 3.61 และ 3.64 log cfu/g ตามลำดับ และวันที่ 4 มีจำนวนเชื้อ 4.06, 3.46, 3.44, 3.64, 3.66 และ 3.72 log cfu/g ตามลำดับ ในวันที่ 6 และ 8 จำนวนเชื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนในวันที่ 10 พบว่ากลุ่มที่เติมสารแบคเทอริโอซิน KL-1 และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 มีจำนวนเชื้อต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงเพียงอย่างเดียว โดยมีค่า 5.34, 5.21, 5.00, 5.11,5.19 และ 5.11 log cfu/g ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ยกเว้นกลุ่มควบคุมที่มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการเก็บรักษาและมากที่สุดในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.8

การวิเคราะห์จำนวน Coliform (log cfu/g) พบจำนวน Colifom 3.90, 3.91, 3.94, 3.93, 4.04 และ 4.11 log cfu/g ตามลำดับ ในวันแรกของการเก็บรักษาทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนเชื้อไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้ในวันที่ 2, 4, 6 และ 8 ทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวน Coliform ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml มีผลในการลดจำนวน Coliform ในวันที่ 2 สำหรับกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน มีผลในการลดจำนวน Coliform ในวันที่ 10 เท่านั้น โดยมีค่า 6.82, 5.82, 6.37, 6.40, 6.00 และ 6.24 log cfu/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.9

การวิเคราะห์หา *E. coli* (cfu/g) พบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 10 วัน ทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวน *E. coli* ต่ำกว่าค่าที่สามารถตรวจพบได้ (<1 lof cfu/g) ดังแสดงในตารางที่ 4.10

จากการสุ่มตัวอย่างชี้ให้เห็นว่า เนื้อสุกรมีสุขลักษณะในการผลิตที่ดี เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเริ่มต้นอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของมาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ 6000-2547) เนื้อสุกร. 2547) ซึ่งกำหนดไว้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 5×10^5 โคโลนี (CFU) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ พบว่าไม่สามารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์มีหลายชนิด บางชนิดสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ไม่สามารถยับยั้งได้ ซึ่งหากมีจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถยับยั้งได้มาก ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (Jazani *et al.* 2007) ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ และชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (Almajano *et al.* 2008) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองของ Babatunde and Adewumi (2015) ทำการศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลในแพตตี้ไก่ พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 14 วัน มีจำนวนเพิ่มขึ้น ผลดังกล่าวอาจส่งผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัด เนื่องจากในเนื้อสัตว์มีปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัด เช่น สารอินทรีย์ต่างๆ ไขมัน หรือเชื้อชนิดอื่นๆ ทำให้สิ่งเหล่านี้ไปขัดขวางการทำงานของสารสกัดทำให้สารสกัดออกฤทธิ์ได้ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เต็มที่ อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของสารสกัด (นิพัฒน์ ลิ้มสงวน. 2547) นอกจากนี้การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่ำสามารถลดอัตราการแลกเปลี่ยนของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้กรดไขมันที่ปกติเป็นสายยาวเปลี่ยนเป็นผลึกทิ่มแทงเซลล์ทำให้เซลล์ตาย โดยเชื้อจะเปลี่ยนสภาวะจากปกติไปเป็นเซลล์ที่บาดเจ็บ (ผุสดี และคณะ. 2553) แต่เมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เช่น เนื้อสัตว์ จะทำให้เชื้อสามารถปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในผลิตภัณฑ์ได้ เช่นเดียวการทดลองผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 จำนวนเชื้อไม่มีจำนวนที่ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	4.99 ± 0.31 ^{a,D†,‡,§}	4.79 ± 0.01 ^{a,E}	4.93 ± 0.25 ^{a,E}	4.85 ± 0.19 ^{a,E}	5.06 ± 0.20 ^{a,DE}	4.97 ± 0.21 ^{a,C}
2	5.29 ± 0.18 ^{a,D}	4.61 ± 0.01 ^{b,E}	4.65 ± 0.03 ^{b,F}	4.75 ± 0.03 ^{b,E}	4.73 ± 0.23 ^{b,E}	4.84 ± 0.02 ^{b,C}
4	5.86 ± 0.01 ^{a,C}	5.25 ± 0.01 ^{d,D}	5.34 ± 0.02 ^{c,D}	5.44 ± 0.12 ^{b,D}	5.32 ± 0.03 ^{c,DE}	5.43 ± 0.02 ^{b,BC}
6	6.11 ± 0.11 ^{a,C}	5.77 ± 0.26 ^{bc,C}	5.74 ± 0.04 ^{bc,C}	5.87 ± 0.02 ^{b,C}	5.61 ± 0.03 ^{c,C}	5.63 ± 0.29 ^{c,B}
8	7.31 ± 0.65 ^{a,B}	6.24 ± 0.71 ^{b,B}	6.55 ± 0.03 ^{b,B}	6.52 ± 0.53 ^{b,B}	6.36 ± 0.69 ^{b,B}	6.67 ± 0.57 ^{ab,A}
10	8.73 ± 0.17 ^{a,A}	7.28 ± 0.02 ^{b,A}	7.47 ± 0.05 ^{b,A}	7.55 ± 0.01 ^{b,A}	7.29 ± 0.01 ^{b,A}	7.25 ± 0.98 ^{b,A}

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.7 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrophilic) (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$4.23 \pm 0.33^{a,D\dagger,\ddagger,\S}$	$4.15 \pm 0.15^{a,CD}$	$4.09 \pm 0.19^{a,E}$	$4.17 \pm 0.05^{a,E}$	$4.23 \pm 0.36^{a,E}$	$4.22 \pm 0.03^{a,E}$
2	$4.51 \pm 0.71^{a,D}$	$3.95 \pm 0.77^{a,D}$	$4.22 \pm 0.02^{a,E}$	$4.33 \pm 0.04^{a,E}$	$4.22 \pm 0.22^{a,E}$	$4.25 \pm 0.10^{a,E}$
4	$5.56 \pm 0.02^{a,C}$	$5.05 \pm 0.86^{a,C}$	$5.10 \pm 0.85^{a,D}$	$5.24 \pm 0.46^{a,D}$	$5.23 \pm 0.23^{a,D}$	$5.32 \pm 0.09^{a,D}$
6	$7.01 \pm 0.39^{a,B}$	$6.49 \pm 0.92^{a,B}$	$6.68 \pm 0.02^{a,C}$	$6.75 \pm 0.04^{a,C}$	$6.65 \pm 0.25^{a,C}$	$6.82 \pm 0.07^{a,C}$
8	$8.12 \pm 0.13^{a,A}$	$7.62 \pm 0.53^{a,A}$	$7.70 \pm 0.01^{a,B}$	$7.80 \pm 0.48^{a,B}$	$7.80 \pm 0.48^{a,B}$	$7.81 \pm 0.49^{a,B}$
10	$8.87 \pm 1.19^{a,A}$	$8.36 \pm 0.86^{a,A}$	$8.40 \pm 0.29^{a,A}$	$8.50 \pm 1.02^{a,A}$	$8.53 \pm 0.85^{a,A}$	$8.41 \pm 0.82^{a,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.8 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวนยีสต์และรา (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$3.54 \pm 0.03^{a,E\dagger,\ddagger,\S}$	$3.54 \pm 0.32^{a,C}$	$3.41 \pm 0.21^{a,C}$	$3.58 \pm 0.23^{a,CD}$	$3.60 \pm 0.20^{a,C}$	$3.68 \pm 0.08^{a,C}$
2	$3.91 \pm 0.01^{a,D}$	$3.49 \pm 0.36^{b,C}$	$3.49 \pm 0.33^{b,C}$	$3.41 \pm 0.45^{b,D}$	$3.61 \pm 0.29^{ab,C}$	$3.64 \pm 0.18^{ab,C}$
4	$4.06 \pm 0.03^{a,C}$	$3.46 \pm 0.04^{c,C}$	$3.44 \pm 0.10^{c,C}$	$3.64 \pm 0.18^{b,CD}$	$3.66 \pm 0.02^{b,C}$	$3.72 \pm 0.04^{b,C}$
6	$4.11 \pm 0.02^{a,C}$	$3.92 \pm 0.12^{a,BC}$	$3.82 \pm 0.54^{a,BC}$	$3.87 \pm 0.28^{a,BC}$	$3.99 \pm 0.24^{a,BC}$	$3.89 \pm 0.40^{a,C}$
8	$4.35 \pm 0.12^{a,B}$	$4.15 \pm 0.31^{a,B}$	$4.24 \pm 0.49^{a,B}$	$4.26 \pm 0.48^{a,B}$	$4.25 \pm 0.55^{a,B}$	$4.30 \pm 0.30^{a,B}$
10	$5.34 \pm 0.01^{a,A}$	$5.21 \pm 0.06^{ab,A}$	$5.00 \pm 0.02^{c,A}$	$5.11 \pm 0.02^{bc,A}$	$5.19 \pm 0.18^{b,A}$	$5.11 \pm 0.17^{bc,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.9 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวน Coliform (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$3.90 \pm 0.34^{a,D\dagger,\ddagger,\S}$	$3.91 \pm 0.18^{a,D}$	$3.94 \pm 0.05^{a,D}$	$3.93 \pm 0.05^{a,D}$	$4.04 \pm 0.11^{a,C}$	$4.11 \pm 0.13^{a,D}$
2	$4.18 \pm 0.37^{a,D}$	$3.95 \pm 0.15^{ab,D}$	$3.81 \pm 0.21^{b,D}$	$3.92 \pm 0.11^{ab,D}$	$4.01 \pm 0.16^{ab,C}$	$4.08 \pm 0.21^{ab,D}$
4	$4.28 \pm 0.35^{a,D}$	$4.30 \pm 0.37^{a,CD}$	$4.12 \pm 0.35^{a,D}$	$4.13 \pm 0.35^{a,D}$	$4.19 \pm 0.21^{a,C}$	$4.21 \pm 0.46^{a,D}$
6	$4.94 \pm 0.48^{a,C}$	$4.54 \pm 0.67^{ab,C}$	$4.70 \pm 0.55^{ab,C}$	$4.92 \pm 0.22^{ab,C}$	$4.34 \pm 0.24^{b,C}$	$4.99 \pm 0.28^{ab,C}$
8	$5.92 \pm 0.39^{a,B}$	$5.15 \pm 0.49^{b,B}$	$5.49 \pm 0.43^{ab,B}$	$5.55 \pm 0.14^{ab,B}$	$5.24 \pm 0.45^{b,B}$	$5.65 \pm 0.35^{ab,B}$
10	$6.82 \pm 0.31^{a,A}$	$5.82 \pm 0.40^{d,A}$	$6.37 \pm 0.28^{bc,A}$	$6.40 \pm 0.15^{ab,A}$	$6.00 \pm 0.24^{cd,A}$	$6.24 \pm 0.21^{bcd,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.10 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อจำนวน *E. coli* (log cfu/g) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	<1*	<1	<1	<1	<1	<1
2	<1	<1	<1	<1	<1	<1
4	<1	<1	<1	<1	<1	<1
6	<1	<1	<1	<1	<1	<1
8	<1	<1	<1	<1	<1	<1
10	<1	<1	<1	<1	<1	<1

* น้อยกว่า 1 log cfu/g (ต่ำกว่าระดับที่ตรวจนับได้)

4.3.1.2 คุณภาพด้านกายภาพ

(1) ค่าสี (L*a*b*)

จากการวิเคราะห์ค่าความสว่าง (Lightness, L*) พบว่าในวันแรกมีค่าเท่ากับ 46.62, 45.86, 47.91, 48.85, 46.67 และ 46.33 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าความสว่างน้อยที่สุด ($P<0.05$) และกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 320 Au/ml มีค่าความสว่างสูงที่สุด ($P<0.05$) ในขณะที่กลุ่มอื่นมีค่าไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ในวันที่ 4 ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าความสว่างแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าค่าความสว่างมีค่าสูงขึ้น และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ค่าสีแดง (Redness, a*) ในวันแรกมีค่าเท่ากับ 6.06, 6.80, 7.03, 6.23, 6.65 และ 6.68 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าทุกกลุ่มการทดลองค่าสีแดงมีค่าลดลงในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.12

อย่างไรก็ตามค่าสีเหลือง (Yellowness, b*) ในวันแรกมีค่าเท่ากับ 13.03, 13.39, 15.04, 14.74, 13.95 และ 13.80 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml มีค่าสีเหลืองสูงที่สุดในวันแรกของการเก็บรักษา ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อเก็บรักษาในวันที่ 2, 6 และ 10 พบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมีค่าสีเหลืองต่ำที่สุด และกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml มีค่าสูงที่สุดแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าค่าสีเหลืองมีค่าลดลง และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรและกลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml ค่าสีเหลืองลดลงในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) กลุ่มที่เติมแบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml ค่าสีเหลืองลดลงในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.13

จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2546) ทำการศึกษาการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในหมูแผ่น โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่เติม BHT ร้อยละ 0.01 กลุ่มที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงร้อยละ 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 สำหรับเปลือกส้มก็ใช้กลุ่มการทดลองเช่นเดียวกันและระดับความเข้มข้นของสารสกัดก็เช่นเดียวกับสารสกัดกระเจี๊ยบแดง เก็บรักษาผลิตภัณฑ์นาน 28 วัน พบว่าหมูแผ่นดิบและสุกที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับร้อยละ 0.05–0.1 โดยน้ำหนัก มีค่าสีแดง (a*) ไม่แตกต่างจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างควบคุม ส่วนค่าความสว่าง (L*) และค่าสีเหลือง (b*) มีค่าการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยซึ่งไม่ได้รายงานค่าไว้ นอกจากนี้ลักษณะของแบคเทอริโอซินที่เติมลงในเนื้อสุกรบดมีลักษณะใส จึงไม่มีผลต่อค่าสี อีกทั้งตัวอย่างเนื้อสุกรบดมีส่วนผสมของไขมันจึงทำให้การสุ่มตัวอย่างไม่สม่ำเสมอจึงทำให้ผลดังกล่าวมีค่าไม่คงที่

(2) ค่าความเป็นกรด-ด่าง

การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ในวันแรกมีค่าเท่ากับ 5.70, 5.49, 5.76, 5.80, 5.59 และ 5.61 ตามลำดับ ในแต่ละกลุ่มการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเนื้อสุกรบดนานขึ้นเป็นเวลา 10 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าใกล้เคียงกันแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.14 แม้ว่าสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3-4 แต่การเติมลงไปเพียงเล็กน้อยในเนื้อสุกรบดไม่ได้ส่งผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง นอกจากนี้ สุภาพ นนทะสันต์ (2556) ที่ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกลีบดอกกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.6 พบว่าไม่มีผลกระทบต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าความสว่าง (Lightness, L*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	46.62 ± 0.81 ^{ab,A†,‡,§}	45.86 ± 0.78 ^{b,B}	47.91 ± 1.41 ^{ab,A}	48.85 ± 1.88 ^{a,A}	46.67 ± 0.69 ^{ab,A}	46.33 ± 2.24 ^{ab,A}
2	46.83 ± 1.30 ^{a,A}	47.03 ± 1.69 ^{a,AB}	47.58 ± 2.60 ^{a,A}	48.39 ± 2.10 ^{a,A}	47.41 ± 1.14 ^{a,A}	46.58 ± 1.70 ^{a,A}
4	45.93 ± 1.40 ^{b,A}	46.37 ± 0.93 ^{b,B}	48.80 ± 0.20 ^{a,A}	48.89 ± 1.30 ^{a,A}	47.29 ± 0.36 ^{ab,A}	46.59 ± 0.69 ^{b,A}
6	47.94 ± 1.32 ^{a,A}	47.21 ± 0.81 ^{a,AB}	49.51 ± 1.13 ^{a,A}	48.74 ± 2.52 ^{a,A}	47.66 ± 1.51 ^{a,A}	46.78 ± 1.06 ^{a,A}
8	48.37 ± 2.85 ^{a,A}	49.12 ± 1.45 ^{a,A}	49.42 ± 2.72 ^{a,A}	48.96 ± 2.97 ^{a,A}	48.36 ± 2.23 ^{a,A}	48.53 ± 0.84 ^{a,A}
10	46.94 ± 3.44 ^{a,A}	47.50 ± 2.19 ^{a,AB}	48.47 ± 3.53 ^{a,A}	48.20 ± 3.45 ^{a,A}	47.12 ± 2.74 ^{a,A}	48.34 ± 2.88 ^{a,A}

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.12 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าสีแดง (Redness, a*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	6.06 ± 1.08 ^{a,AB†,‡,§}	6.80 ± 0.51 ^{a,A}	7.03 ± 0.79 ^{a,A}	6.23 ± 0.52 ^{a,AB}	6.65 ± 1.01 ^{a,A}	6.68 ± 0.69 ^{a,A}
2	7.42 ± 1.97 ^{a,A}	6.18 ± 0.32 ^{a,AB}	6.69 ± 1.53 ^{a,A}	7.28 ± 1.80 ^{a,A}	6.57 ± 1.71 ^{a,A}	6.60 ± 1.38 ^{a,A}
4	6.90 ± 2.40 ^{a,AB}	6.02 ± 0.93 ^{a,AB}	6.50 ± 1.66 ^{a,A}	6.59 ± 1.88 ^{a,AB}	5.94 ± 1.54 ^{a,AB}	6.53 ± 1.15 ^{a,A}
6	5.48 ± 2.00 ^{a,AB}	5.13 ± 0.83 ^{a,BC}	5.43 ± 1.54 ^{a,A}	5.59 ± 1.11 ^{a,AB}	5.14 ± 1.09 ^{a,AB}	5.21 ± 1.16 ^{a,AB}
8	3.92 ± 0.54 ^{a,B}	4.17 ± 1.29 ^{a,C}	4.52 ± 0.94 ^{a,A}	4.47 ± 0.71 ^{a,B}	4.06 ± 0.86 ^{a,B}	4.07 ± 1.33 ^{a,B}
10	4.52 ± 0.78 ^{a,AB}	4.23 ± 0.29 ^{a,C}	4.63 ± 0.94 ^{a,A}	4.73 ± 0.97 ^{a,B}	4.47 ± 0.27 ^{a,AB}	4.17 ± 0.63 ^{a,B}

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.13 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าสีเหลือง (Yellowness, b*) ของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	13.03 ± 1.30 ^{c,A†,‡,§}	13.39 ± 0.57 ^{bc,A}	15.04 ± 0.27 ^{a,A}	14.74 ± 0.48 ^{ab,A}	13.95 ± 0.97 ^{abc,A}	13.80 ± 0.53 ^{abc,A}
2	14.16 ± 0.87 ^{a,A}	12.59 ± 0.17 ^{b,AB}	13.91 ± 0.94 ^{ab,AB}	14.80 ± 0.71 ^{a,A}	13.79 ± 0.53 ^{ab,A}	13.66 ± 0.98 ^{ab,A}
4	13.86 ± 1.65 ^{a,A}	12.87 ± 0.60 ^{a,AB}	14.42 ± 0.50 ^{a,AB}	14.45 ± 1.02 ^{a,A}	13.26 ± 1.13 ^{a,A}	13.52 ± 0.50 ^{a,A}
6	13.60 ± 0.81 ^{ab,A}	12.37 ± 0.60 ^{b,AB}	13.83 ± 1.14 ^{a,AB}	13.62 ± 0.31 ^{ab,AB}	12.80 ± 0.51 ^{ab,A}	12.87 ± 0.45 ^{ab,A}
8	12.81 ± 1.36 ^{a,A}	12.37 ± 0.99 ^{a,AB}	13.97 ± 1.46 ^{a,AB}	13.25 ± 1.65 ^{a,AB}	12.52 ± 1.25 ^{a,A}	12.35 ± 1.74 ^{a,A}
10	12.30 ± 0.11 ^{ab,A}	11.99 ± 0.39 ^{b,B}	13.13 ± 0.88 ^{a,B}	12.55 ± 0.38 ^{ab,B}	12.22 ± 0.77 ^{ab,A}	12.41 ± 0.22 ^{ab,A}

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4.14 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อสุกรบดแช่เย็น 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร+ แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	$5.70 \pm 0.26^{a,A\dagger,\ddagger,\S}$	$5.49 \pm 0.29^{a,A}$	$5.76 \pm 0.22^{a,A}$	$5.80 \pm 0.21^{a,A}$	$5.59 \pm 0.24^{a,A}$	$5.61 \pm 0.23^{a,A}$
2	$5.73 \pm 0.20^{a,A}$	$5.55 \pm 0.14^{a,A}$	$5.78 \pm 0.16^{a,A}$	$5.78 \pm 0.20^{a,A}$	$5.61 \pm 0.19^{a,A}$	$5.62 \pm 0.18^{a,A}$
4	$5.83 \pm 0.28^{a,A}$	$5.58 \pm 0.25^{a,A}$	$5.86 \pm 0.26^{a,A}$	$5.87 \pm 0.29^{a,A}$	$5.73 \pm 0.25^{a,A}$	$5.69 \pm 0.27^{a,A}$
6	$5.76 \pm 0.20^{a,A}$	$5.51 \pm 0.24^{a,A}$	$5.80 \pm 0.25^{a,A}$	$5.84 \pm 0.23^{a,A}$	$5.66 \pm 0.22^{a,A}$	$5.64 \pm 0.23^{a,A}$
8	$5.85 \pm 0.12^{a,A}$	$5.51 \pm 0.18^{a,A}$	$5.78 \pm 0.17^{a,A}$	$5.82 \pm 0.14^{a,A}$	$5.58 \pm 0.13^{a,A}$	$5.63 \pm 0.17^{a,A}$
10	$6.10 \pm 0.26^{a,A}$	$5.69 \pm 0.35^{a,A}$	$6.01 \pm 0.44^{a,A}$	$6.12 \pm 0.35^{a,A}$	$5.83 \pm 0.41^{a,A}$	$5.82 \pm 0.46^{a,A}$

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกัน เพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ในเนื้อสุกรบดแช่แข็ง

วิเคราะห์ความสามารถของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมเพื่อทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (1,1-Diphenyl-2 picrylhydrazyl) พบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันมีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่เติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml และเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 เดือน พบว่าพบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันมีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระคงที่ตลอดอายุการเก็บรักษา ($P>0.05$) ยกเว้นกลุ่มควบคุมที่มีค่า DPPH ลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับการการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เนื้อสุกรบดที่เติม BHT ร้อยละ 0.02 มีค่าการกำจัดอนุมูลอิสระเพียง 48.71 ดังแสดงในตารางที่ 4.15

สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่นำมาศึกษาครั้งนี้มีปริมาณฟีอลิกทั้งหมด 675.80 มิลลิกรัมแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม นอกจากนี้ยังมีค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระเท่ากับ 937.20 ppm กลไกการต้านอนุมูลอิสระ DPPH เกิดจากการรับอิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ DPPH ของสารจำพวกฟีนอล ซึ่งจะได้เป็นสาร DPPH ที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระอีกต่อไป ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระหยุดลง (บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556) ค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ (DPPH) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์ค่าความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ เป็นค่าที่บอกถึงศักยภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ หรือพืชที่ใช้ หากมีค่าสูงหมายความว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง (วิไลพร ปองเพียร. 2550) Mohd-Esa *et al.* (2010) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในส่วนต่างๆของกระเจี๊ยบแดง (กลีบดอก ใบ เมล็ดและลำต้น) สกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 โดยทำการศึกษาสารประกอบฟีโนลิก ค่า DPPH และนำผลที่ได้ไปศึกษาการต้านออกซิเดชันของไขมันในเนื้อวัวบด (Lipid oxidation) เมื่อเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ผลการศึกษาพบว่า ส่วนของเมล็ดที่สกัดด้วยน้ำและเอทานอลร้อยละ 80 มีค่าฟีโนลิก สูงที่สุด (2.97 ± 0.17 mg GAE /g และ 4.87 ± 0.14 mg GAE /g) มีค่า DPPH สูงที่สุด คือร้อยละ 65.1 ± 2.58 และ 91.8 ± 1.05 เนื่องจากในส่วนของเมล็ดมีปริมาณค่าฟีโนลิกและการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าทุกๆส่วน สุภาพ นนทะสันต์ (2556) ทำการศึกษาการประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเพื่อศึกษาผลของการเติมสารสกัดกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยเอทานอลปริมาณต่างๆ ได้แก่ร้อยละ 0.2, 0.4 และ 0.6 และศึกษาผลต่อคุณภาพทางด้านเคมี ได้แก่ ปริมาณแอนโทไซยานิน ค่า DPPH (2,2-Diphenyl-I-Picrylhydrazyl, ความสามารถในการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระ) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารสกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณแอนโทไซยานิน เพิ่มขึ้นเป็น 4.34, 8.90 และ 14.64 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 12.57, 24.24 และ 31.24 ตามลำดับ เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงของแอนโธไซยานินซึ่งมีอยู่ในสารสกัดที่เติมลงไป อีกทั้ง Christian and Jackson (2009) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกระเจี๊ยบ 3 ช่วงการเจริญเติบโตตลอดระยะเวลา 35 วัน (traditional bearing red:TRED, early bearing red:ERED และ white:WHTE) โดยศึกษาสารประกอบฟีนอลิก ปริมาณแอนโธไซยานินและการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) พบว่าในกระเจี๊ยบในช่วง ERED มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด (ร้อยละ 79) เนื่องมาจากสารประกอบพวกฟีนอลิก รวมทั้งสารแอนโทไซยานินและสารที่ไม่ใช่แอนโทไซยานิน และหากนำไปใช้ร่วมกับ BHA จะทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากถึงร้อยละ 86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของเนื้อสุกรบดแช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน

ระยะเวลาการเก็บรักษา (เดือน)	ควบคุม	กระเจี๊ยบ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	แบคเทอริโอซิน KL-1 320 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 640 AU/ml	กระเจี๊ยบ 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน KL-1 40 AU/ml
0	15.85 ± 1.05 ^{e,A†,‡,§}	94.77 ± 0.71 ^{a,A}	20.11 ± 0.95 ^{d,C}	19.71 ± 1.56 ^{d,B}	76.85 ± 0.13 ^{b,A}	70.73 ± 0.34 ^{c,B}
1	15.29 ± 1.59 ^{e,AB}	92.70 ± 1.92 ^{a,A}	22.35 ± 0.88 ^{d,A}	22.44 ± 0.22 ^{d,A}	66.24 ± 0.97 ^{c,C}	72.26 ± 0.21 ^{b,A}
2	14.74 ± 0.64 ^{d,AB}	93.21 ± 1.44 ^{a,A}	21.75 ± 1.08 ^{c,AB}	20.47 ± 0.33 ^{c,B}	72.14 ± 0.01 ^{b,B}	71.00 ± 0.93 ^{b,B}
3	11.65 ± 0.38 ^{d,C}	93.74 ± 1.62 ^{a,A}	20.92 ± 0.23 ^{c,ABC}	20.81 ± 0.54 ^{c,AB}	70.72 ± 1.43 ^{c,E}	70.81 ± 0.17 ^{b,B}
4	13.59 ± 1.11 ^{e,B}	93.83 ± 0.17 ^{a,A}	20.59 ± 0.13 ^{d,BC}	21.01 ± 1.26 ^{d,AB}	70.68 ± 0.40 ^{c,B}	72.86 ± 0.10 ^{b,A}

† ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างจำนวน 3 รอบการผลิต

‡ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

§ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย พบว่า

1. สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ (ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ) ด้วยค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางยับยั้ง 23.33–20.66 มิลลิเมตร

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อ (MIC) สำหรับ *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358 และ *E. coli* TISTR 780 คือ ที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR 292 ที่ไม่สามารถหาค่า MIC ได้ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายเชื้อ (MBC) สำหรับเชื้อดังกล่าวคือ ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 50 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3. ค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมระหว่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 เพื่อยับยั้งแบคทีเรีย (FICI) สำหรับ *S. aureus* TISTR 118, *P. fluorescens* TISTR 358 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 คือ 0.31 (ออกฤทธิ์เสริมกัน), 0.75 (ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน) และ 0.75 (ออกฤทธิ์เสริมกันบางส่วน) ตามลำดับ และค่าดัชนีการออกฤทธิ์ร่วมระหว่างสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 เพื่อทำลายแบคทีเรีย (FBCI) สำหรับเชื้อดังกล่าวคือ 0.31 (ออกฤทธิ์เสริมกัน), 0.37 (ออกฤทธิ์เสริมกัน) และ 0.25 (ออกฤทธิ์เสริมกัน) ตามลำดับ

4. ระยะเวลาที่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *S.* Typhimurium TISTR 292 พบว่าการใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงสามารถทำลายได้ในเวลา 2 และ 4 นาที นอกจากนี้การใช้แบคเทอริโอซิน KL-1 เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดจำนวนเชื้อทั้งสองได้ ในขณะที่การใช้ร่วมกันของสารทั้งสองสามารถลดจำนวนเชื้อได้ในเวลา 60 นาที

การทดลองที่ 2 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดและแบคเทอริโอซิน KL-1 ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในเนื้อสุกรบด (*In vitro*) พบว่ากลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับแบคเทอริโอซิน 640 AU/ml และกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 6.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับแบคเทอริโอซิน 40 AU/ml สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มควบคุม ($P<0.05$) แต่สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซินไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *S.* Typhimurium โดยทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$)

การทดลองที่ 3 ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงและแบคเทอริโอซิน KL-1 ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และกายภาพของเนื้อสุกรบดแช่เย็น พบว่าทุกกลุ่มการทดลองค่าสี ค่าความเป็นกรด-ด่างและจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ผลของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง แบคเทอริโอซิน KL-1 และการใช้ร่วมกันในการกำจัดอนุมูลอิสระของเนื้อสุกรบดแช่แข็ง พบว่าทุกกลุ่มการทดลองที่มีการเติมสารมีค่า DPPH สูงกว่ากลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยกลุ่มที่เติมสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมีค่า DPPH สูงที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากการศึกษาของคุณสมบัติของสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ จึงอาจนำไปประยุกต์ใช้ในทางเภสัชกรรม เพื่อใช้เป็นยาต้านจุลชีพ

5.2.2 ควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีหรือสารที่ออกฤทธิ์ที่แน่นอนของกระเจี๊ยบแดงเพื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้อย่างเหมาะสม

5.2.3 ควรมีการศึกษาสารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่นหรือแบบผงเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียเพิ่มเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณะสุข. 2543. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 205 (พ.ศ. 2543) เรื่อง น้ำมันและไขมัน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : www.elib.fda.moph.go.th/.../ประกาศกระทรวงสาธารณสุข/47_No205.doc. [สืบค้นวันที่ 3 ตุลาคม 2557]

กฤตพร รำจวนเกียรติ. 2552. **การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารของปลา**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คมแข พิลาสมบัติ. 2550. **สุขศาสตร์เนื้อสัตว์.** ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

คมแข พิลาสมบัติ และมณทินี ธีรารักษ์. 2557. **การใช้สารสกัดพืชพื้นเมืองไทยในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยืดอายุการเก็บรักษา และความปลอดภัยในการบริโภค.** รายงานการวิจัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

จามรี พระสุนิล. 2557. **พฤติกรรมการบริโภคอาหารเสริมสุขภาพของผู้สูงอายุในเขตเมือง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาศิลปศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาพัฒนาสังคม, บัณฑิตมหาวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2542. **การจัดการโรงฆ่าสัตว์.**ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

ชัยณรงค์ คันธพินิจ. 2529. **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์.** กรุงเทพมหานคร : ไทยวัฒนาพานิช.

นิพัฒน์ ลิ้มสงวน. 2547. **การศึกษากระบวนการสกัด คุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์และสารต้านอนุมูลอิสระของคาเทชินจากชาเขียวของไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยศิลปากร. กรุงเทพมหานคร.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2552. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** สงขลา : มหาวิทยาลัยทักษิณ.

บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2552. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** นครปฐม : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร.

บุหรัน พันธุ์สวรรค์. 2556. “อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ.” **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 21(3) : 275-286.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผุสดี ตังวัชรินทร์ และ อรุณพร อิฐรัตน์. 2552. **คุณสมบัติความคงตัวและการต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกมังคุดต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่แยกได้จากเนื้อสุกร.** รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง

ผุสดี ตังวัชรินทร์ วิภา รักษ์ทอง และธัญพิสิษฐ์ พรหมศิริวรกุล. 2553. "อิทธิพลของกรดแอสคอร์บิกและความเย็นต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Salmonella* Rissen ในเนื้อสันนอกสุกร." **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.** 28(3) : 44-51.

มาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ 6000-2547). 2547. **เนื้อสุกร.** สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพมหานคร

มาลัยพร ศรีวิระ. 2551. **ผลของสารแบคทีริโอซินและสารสกัดโรสแมรีต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ไมตรี สุทธจิตต์ และศิริวรรณ สุทธจิตต์. 2545. "แอนติออกซิแดนท์ : สารป้องกันโรคและเสริมสุขภาพ." **วารสารมหาวิทยาลัยมหาสารคาม.** 21(1) : 57-62.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2546. **การใช้สารสกัดจากดอกกระเจี๊ยบแดง เปลือกและเมล็ดส้มเขียวหวานเป็นสารต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันธรรมชาติในหมูแผ่น.** รายงานการวิจัย. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.

รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. 2532. **เคมีอาหาร.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์อักษรไทย.

วิไลพร ปองเพียร. 2552. **ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแอนโทไซยานิน และสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในพืชพื้นบ้านที่มีสีม่วงแดง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตรศึกษา (เคมี) บัณฑิตศึกษา, มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์.

วีรสิงห์ เมืองมั่น. 2522 "การใช้สมุนไพรการรักษาโรคนิ่วและทางเดินปัสสาวะอักเสบ." **วารสารามาธิบดี.** 10 : 62-63.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2535. **วัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร.** นครปฐม : ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภร อังศุจินดา. 2549. **สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดง เปลือก และเมล็ดส้มเขียวหวาน**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สารานุกรมสมุนไพร. 2543. **สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ**. ภาควิชาเภสัชพฤกศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร : อมรินทร์พริ้นพับลิชชิ่ง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุภาพ นนทะสันต์. 2556. “การประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต.” วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. หน้า 627-636. ใน **การประชุมทางวิชาการ “มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ครั้งที่ 9.** มหาสารคาม : มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** กรุงเทพฯ : จามจุรีโปรดักท์.

Abee, T. 1995. “Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms.” **FEMS Microbiol. Lett.** 129 : 1-10.

Ahmed, Z.S. and Abozed, S.S. 2015. “Functional and antioxidant properties of novel snack crackers in corporated with *Hibiscus sabdariffa* by-product.” **J. Adv. Res.** 6 : 79-87.

Almajano, M.P., Rosa, C.J., Angel, L.J. and Michael, H.G. 2008. “Antioxidant and antimicrobial activity of tea infusions.” **Food Chem.** 108 : 55-63.

Al-Hashimi, A.G. 2012. “Antioxidant and antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* L. extract.” **J. Food Sci.** 6 : 506-511.

AOAC. 2005. Chapter 17 AOAC Official Method 940. 36B. p. 2. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. **Official methods of analysis of AOAC International**. Maryland.

AOAC. 2006. Chapter 17 AOAC Official Method 966. 23c-24. p. 5-6. In Horwitz, W. and Latimer, G.W. **Official methods of analysis of AOAC international.** Maryland.

Awe, F.B., Fagbemi, T.N., Ifesan, B.O.T. and Badejo, A A. 2013. “Antioxidant properties of cold and hot water extracts of cocoa, Hibiscus flower extract, and ginger beverage blends.” **Food Res. Int.** 52 : 490-495.

Babatunde, O. A. and Adewumi, A. O. 2015. “Effects of ethanolic extract of garlic, roselle and ginger on quality attributes of chicken patties.” **Afr. J. Biotechnol.** Vol. 14 : 688-694.

BAM. 2001. Bacteriological Analytical Manual online, Chapter 12 on *Staphylococcus aureus*. U.S. Food and Drug Administration. January2001. http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ LaboratoryMethods/Bacteriological. Analytical Manual BAM. [สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2557]

BAM. 2014. Bacteriological Analytic Manual Online. Salmonella. U.S. Food and Drug Administration. [Online]. Available: http://www.fda.gov/Food/Food ScienceResearch/ Laboratory Methods/ucm070149.htm. [สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2557]

Borch, E., Kant-Muermans, M., and Blixt, Y. 1996. “Bacterial spoilage of meat and cured meat products.” **Int. J. Food Microbiol**. 33: 103-120.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bokaeian, M., Sheikh, M., Shahi, Z. and Saeidi, S. 2014. "Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffal* extract sgainst human pathogen." **Int. J. Adv. Biol. Biom. Res.** 2 : 433-439.

Brand-Williams, N., Cuvelier, M.E. and Berset, C. 1995 "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity." **Food Sci. Tech.** 28: 25-30.

Bruno, M.E.E. and Montville, T.J. 1993. "Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria." **Appl. Environ. Microbiol**. 59 : 3003-3010.

Carney, E.S.B., O'Brien, J.J., Sheridan, D.A., McDowell, Blair, I.S. and Duffy, G. 2006. "Prevalence and level of *Escherichia coli* 0157 on beef trimming, carcasses and boned head meat at beef slaughter plant." **Food Microbiol.** 23 : 52-59.

Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. "Food fermentations : role of microorganism in food product and preservation." **Int. J. Food. Microbiol**. 50 : 131-149.

Carpenter, R., O'Grady, M.N., O'Callaghan, Y.C., O'Brien, M.N. and Kerry, J.P. 2007. "Evaluation of the antioxidant potential of grape seed and bearberry extracts in raw and cooked pork." **Meat Sci.** 76 : 604-610.

Christian, K.R. and Jackson, J.C. 2009. "Changes in total phenolic and monomeric anthocyanin composition andantioxidant activity of three varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) during maturity." **J. Food Compos. Analy.** 22 : 663-667.

Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. and Nes, I.F. 1997. "Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum." **Appl. Environ. Microbiol.** 63 : 4321-4330.

CLSI. 2002. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 7th ed. Villanova, PA: NCCLS, Approved standard. M7-A7.

Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-160. In S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria.** Marcel Dekker, Inc., New York.

Diliello, L.R. 1982. **Method in food and dairy microbiology**. The Avi Pubish Company. Connecticut.

Ennahar, S., Sashihara, T. Sonomoto, K. And Ishizaki, A. 2000. "Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity." **FEMS Microbiol. Rev**. 24 : 85-106.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Class IIa bacteriocins from food preservation." **J. Biosci. Bioeng**. 6 : 705-716.

Frankel, E.N. and Meyer, A.S. 2000. "The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants." **J. Sci. Food Agric.** 80 : 1925-1941.

Fullerton, M., Khatiwada, J., Johnson, J.U., Davis, S. and Williams, L.L. 2011. "Determination of Antimicrobial Activity of Sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from Food, Veterinary, and Clinical Samples." **J. Med. Food.** 14 : 950-956.

Govaris, A., Solomakos, N., Pexara, A. and Chatzopoulou, P.S. 2010. "The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage." **Int. J. Food Microbiol.** 137 : 175-180.

Gupta, P., Sharma, A. and Verma, A.K. 2012. "GC/MS profiling and antimicrobial effect of six Indian tropical fruit residues against clinically pathogenic bacterial strain." **Int. J. Adv. Pharm. Res.** 3 : 1229-1235.

Hudson, B.J.F. 1990. **Food antioxidant : Natural antioxidant not exploited commercially.** New York : Elsevier science publishing.

Jazani, N.H., Shahabi, S.H., Ali, A.A. and Zartoshti, M. 2007. "Antibacterial effects of water soluble green tea extracts on multi-antibiotic resistant isolate of *Acinetobacter* sp." **Pak. J. Biol. Sci.** 10 : 1477-1780.

Jime´nez-Colmenero, F., Carballo, J. and Cofrades, S. 2001. "Healthier meat and meat products: their role as functional foods." **Meat Sci.** 59 : 5-13.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2003a. **Butylatedhydroxyanisole.** [Online]. Available : http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-068.pdf. 3 October 2014.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2003b. **Butylatedhydroxytoluene.** [Online]. Available : http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-069.pdf. 3 October 2014.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2003c. **Propylgallate.** [Online]. Available: http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-357.pdf. 3 October 2014.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2003d. **Tertiarybutylhy hydroquinone.** [Online]. Available : http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-dditives/specs/Monograph1 /Additive-459.pdf. 3 October 2014.

Jung, E., Kim, Y. and Joo, N. 2013. "Physicochemical properties and antimicrobial activity of roselle (*Hibiscus abdariffa* L.)." **J. Sci. Food Agric.** 93 : 3769-3776.

Khalaphallah, R. and Soliman, W. S. 2014. "Effect of henna and roselle extracts on pathogenic bacteria." **Asian. Pac. J. Trop. Dis.** 4 : 292-296.

Klaenhammer, T.R. 1993. "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **FEMS Microbiol. Rev**. 12 : 39-85.

Loliger, J and Wille, H.J. 1993. "Natural antioxidant." **Oil Fat Int.** 9 : 18-22.

Lorian, V. 2005. **Antibiotics in laboratory medicine**. 5th ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins

Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 1987. Sensory evaluation techniques. Florida. CRC Press

Mohd-Esa, N., Hern, F.S., Ismail, A. and Yee, C.L. 2010. "Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extractsand potential exploitation of the seeds." **Food Chem.** 122 : 1055–1060.

Morales-Cabrera, M., Hernández-Morales, J., Leyva-Rúelas, G., Salinas-Moreno, Y., Soto-Rojas, L. and Castro-Rosas, J. 2013. "Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus abdariffa* L.) calyxes." **J. Med. Plants Res.** 7 : 2319-2322.

Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Dominguez, J.M., sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M.J. and Parajo, J.C. 2001. "Natural antioxidants from residual sources." **Food Chem.** 72 : 145-171.

Michael, H. 2001. "Antioxidant and food stability." Eds. Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M. **In : Antioxidant in food.** New York : CRC Press.

Miková, K. 2001. **"**Practical applications." Eds. Pokorny, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M. **In : Antioxidant in food.** New York : CRC Press.

Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J. and Langsrud, T. 2002. "Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from busherra: a Ugandan traditional fermented beverage." **Int. J. Food Microbiol**. 80 : 201-210.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M. and Hara, Y. 1996. "Scavenging effect of tea catechins and their devivatives on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical." **Free Radical Biol. Med.** 21 : 895-902.

Ncube, B., Finnie, J.F. and Van Staden, J. 2012. "*In vitro* antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs." **J. Ethnopharmacology.** 139 : 81-89.

Nielsen, W.J., Dickson, J.S. and Crouse, J.D. 1990. "Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat." **Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 2142-2145.

Olaoye, O.A. and Ntuen, I.G. 2011. "Spoilage and preservation of meat: a general appraisal and potential of lactic acid bacteria as biological preservatives." **Int. J. Biotech.** 2 : 33-46.

Ouwehand, A.C. and Vesterlund, S. 2004. **Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. (Eds.). Marcel Dekker, New York

Parente, E., Brienza, C., Moles, M. and Ricciardi, A. 1995. "A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity." **J. Microbiol. Methods.** 22 : 95-108.

Perez, C., Paul, M. and Bazerque, P. 1990. "Antibiotic assay by agar-well diffusion method." **Acta Biol Med Exp.** 15 : 113-115.

Pilasombut, K., Rumjuankiat, K., Ngamyeesoon, N. and Doan Duy, L.N. 2015. "*In vitro* characterization of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from Nem Chua, a traditional vietnamese fermented pork." **Korean J. Food Sci. An.** 35 : 473-478.

Qwele, K., Hugo, A., Oyedemi, S.O., Moyo, B., Masika, P.J. and Muchenje, V. 2013. "Chemical composition, fatty acid content and antioxidant potential of meat from goats supplemented with Moringa (*Moringa oleifera*) leaves, sunflower cake and grass hay." **Meat Sci.** 93 : 455-462.

Rajalakshmi, D. and Narasimhan. S. 1996. "Sources and methods of evaluation." Eds**.** Madhavi, D.L, Deshpande, S.S. and Salunkheeds, D.K. **In : Food Antioxidants.** New York : Marcel Dekker.

Rodríguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N. and Dodd, H.M. 2003. "Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria." **Int. J. Food Microbiol**. 81 : 101-116.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Samelis, J., Kakouri, A. and Rementzic, J. 2000. "Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4^{o} C." **Food Microbiol.** 17: 329-340.

Samuel N. Osei-Djarbeng, S.N., Amonoo-Neizer, J., Boadi, P., Opoku, P.N.A. and Osei-Asante, S. 2014. "Comparative antimicrobial activities of different solvent extracts and a refreshing drink (*Sobolo*) made from *Hibiscus sabdariffa* Linn." **Int. J. Herb. Med.** 2 : 1-4.

Shah, M.A., Bosco, S.J.D. and Mir, S.A. 2014. "Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat product." **Meat Sci.** 98 : 21-33.

Simonetta, C.A., De Velasco, M.L.G. and Frisón, L.N. 1997. "Antibacterial activity of Enterococci strains against *Vibrio cholera*." **Leetts. Appl. Microbiol.** 24 : 139-143.

Slavik, F.M., Kim, J.W. and Walker, J.T. 1995. "Reduction of *Salmonella* and *Campylobacter* on chicken carcass by changing scalding temperature." **J. Food Prot.** 58 : 658-691.

Solomakosa, N., Govarisa, A, Koidisb, P and Botsoglou, N. 2008a. "The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage." **Food Microbiol.** 25 : 120-127.

Solomakosa, N., Govarisa, A, Koidisb, P and Botsoglou, N. 2008b. "The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage" **Meat Sci.** 80 : 159-166.

Somaatmadja, D., Powers, J.J. and Hamdy, M.K. 1964. "Anthocyanins. VI. Chelation studies on anthocyanins and other related compounds." **J. Food Sci.** 29 : 655-660.

Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P. and Griffiths, M.W. 2006. "Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress." **J. Food Prot**. 69 : 2747-2753.

Taylor, R.J. 1980. **Food additives. : The character of additives.** USA : Jonn Wiley and Sons.

Tokarskyy, O. and Marshall, D.L. 2008. "Mechanism of synergistic inhibition of *Listeria moncytogenes* growth by lactic acid, monolaurin and Nisin." **Appl. Environ. Microbiol.** 74 : 7126-7129.

Tolulope, O.M. 2007. "Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*." **J. Med. Plants Res.** 1 : 9-13.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tongnuanchan, P., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2013. "Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils." **J. Food Eng.** 117 : 350–360.

Turgis, M., Dang Vu, K. Dupont, C. and Lacroix, M. 2012. "Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria." **Food Res. Int.** 48 : 696-702.

Van Damme, I., Berkvens, D., Vanantwerpen, G., Bare, J., Houf, K., Wauters, G. and De. Sutter, L. 2015. "Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with enteropathogenic *Yersinia* spp. : distribution, quantification and identification of risk factors." **Int. J. Food Microbiol.** 204 : 33-40.

Yang, L., Gou, Y., Zhao, T., Zhao, J., Li, F. Zhang, B. and Wu, X. 2012. "Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)." **Afr. J. Biotechnol.** 11 : 4063-4068.

Yanishieva-Maslarova, N.V. 2001. Inhibiting oxidation. Pp. 22-57. In : **Antioxidants in food : practical applications.** Eds. Pokorny, J., Yanishlieva, N.V. and Gordon, M. New York : CRC Press.

Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P., and Ryser, E.T. 2009. "Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens." **J. Food Prot.** 72 : 1121-1138.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

Sodium chloride (NaCl)	8.50	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70

95% ethanol	737.00	มิลลิลิตร
Distilled water	233.00	มิลลิลิตร

สารละลายเอทานอลผสมกับน้ำกลั่น และเขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาปิดฝาสนิท

3. การเตรียมสารละลาย 0.2 mM DPPH (40 มิลลิลิตร)

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	0.0032	กรัม
Methanol	40	มิลลิลิตร

ทำการละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 0.0032 กรัม ใน เมทานอล 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน

4. การเตรียม 60 µM Trolox

Trolox	0.0015	กรัม
95% ethanol	10	มิลลิลิตร

ทำการละลาย trolox 0.0015 กรัม ใน 95% ethanol 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระด้วย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

1) สุ่มชั่งตัวอย่างเนื้อสุกรบด 2 กรัม แล้วเติมเอทานอลร้อยละ 99 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2) นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็วรอบ 13, 000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3) จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำมากรรองด้วยกระดาษ whatman No.1

4) แบ่งหลอดทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแบ่งส่วนใส (supernatant) ดังนี้ (i) เป็นหลอดของตัวอย่าง ดูดส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 mM DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลตร ผสมให้เข้ากัน (ii) ดูดส่วนใส 1 มิลลิลิตร ผสมกับ เมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เป็น blank) และ (iii) หลอดควบคุมที่ผสมระหว่าง 0.2 mM DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับ 100% เมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5) วางหลอดทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

6) เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร

7) คำนวณค่าการกำจัดอนุมูลอิสระ ด้วยสูตรการคำนวณ

$$\% \text{ Inhibition of DPPH} = 1 - \frac{(\text{absorbance of sample} - \text{absorbance of blank})}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird-Parker agar (BP)

ประกอบด้วย	Peptone from casein	10.0	กรัม
	Meat extract	5.0	กรัม
	Yeast extract	1.0	กรัม
	Sodium pyruvate	10.0	กรัม
	Glycine	12.0	กรัม
	Lithium chloride	5.0	กรัม
	Agar-agar	15.0	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 950 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ± 0.2 จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

การเตรียม egg yolk solution

(i) นำไข่ไก่สดมาล้างเปลือกให้สะอาด จากนั้นนำไปแช่ใน 70% ethyl alcohol เป็นเวลา 15 นาที

(ii) นำไข่ไก่มาวางในบีกเกอร์ที่มีกระดาษกรองรองปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ให้แอลกอฮอล์ระเหย

(iii) ตอกไข่ไก่ในตู้ปลอดเชื้อ ทำการแยกไข่ขาวออกให้หมดโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกส่วนที่เป็นไข่แดงลงในบีกเกอร์ปลอดเชื้อ เติมไข่แดงลงในดูแรนขนาดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีน้ำเกลือร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้ออยู่ 140 มิลลิลิตร ใส่ไข่แดงจนมีปริมาตร 200 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

การเตรียมร้อยละ 1 potassium tellurite (PT)

(i) ชั่ง Potassium tellurite 1 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์แก้ว ใส่น้ำกลั่นทำการคนจนสารละลายหมด แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

(ii) นำ Potassium tellurite ที่ปรับปริมาตรแล้ว ทำให้สารละลายปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองปลอดเชื้อใส่ลงในขวดดูแรนปลอดเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การผสม egg yolk-tellurite emulsion

(i) นำร้อยละ 1 Potassium tellurite ที่เตรียมไว้ปริมาตร 40 มิลลิลิตร (ใช้กระบอกตวงปลอดเชื้อ) ผสมกับ egg yolk solution ที่เตรียมไว้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ii) ทำการเขย่าให้เข้ากันจะได้ egg yolk tellurite 240 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ (เตรียมใหม่ทุกครั้ง)

การเตรียม Baird-Parker medium

(i) เตรียมอาหาร Baird-Parker agar 285 มิลลิลิตร นำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

(ii) นำขวดอาหารไปแช่ในอ่างปรับอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลง เติม egg yolk tellurite ลงในขวดอาหาร 15 มิลลิลิตร

2. Chromocult

Chromocult	26.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ : ในการเตรียมอาหาร Chromocult โดยนำอาหารมาผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปผ่านความร้อนให้อาหารละลาย โดยไม่ต้องนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพของอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม

3. Hekoten-Entero-Agar

ประกอบด้วย	Peptic digest of animal tissue	12.00	กรัม
	Lactose	12.00	กรัม
	Sucrose	12.00	กรัม
	Bile salt	9.00	กรัม
	Sodium chloride	5.00	กรัม
	Sodium Thiosulfate	5.00	กรัม
	Yeast Extract	3.00	กรัม
	Salicin	2.00	กรัม
	Ferric ammonium citrate	1.50	กรัม
	Acid fuchsin	0.10	กรัม
	Bromothymol Blue	0.064	กรัม
	Agar	1.00	กรัม
	น้ำกลั่นปลอดจุลินทรีย์	1000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ : ในการเตรียมอาหาร Hekoten-Entero-Agar โดยนำอาหารมาผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปผ่านความร้อนให้อาหารละลาย โดยไม่ต้องนำอาหารไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เพราะจะทำให้ประสิทธิภาพของอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม รอให้เย็น เติมยาปฏิชีวนะ novomyocin 1 มิลลิลิตร

4. Malt agar

ประกอบด้วย	Malt	30.0	กรัม
	Agar	15.0	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เติมกรดแลคติก (ความเข้มข้น 85%) ปริมาตร 360 ไมโครลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5

5. Lysine-Indole-Motility medium (LIM)

ประกอบด้วย	Peptone	10.0	กรัม
	Pancreatic Digest of Casein	10.0	กรัม
	Yeast extract	3.0	กรัม
	L-lysine HCI	10.0	กรัม
	Dextrose	1.0	กรัม
	Ferric Ammonium Citrate	0.5	กรัม
	Bromcresol Purple	0.02	กรัม
	Agar	2.0	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปทำการละลายด้วยการต้มหรือใช้ไมโครเวฟ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.6 ± 0.2 จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

6. MRS broth

ประกอบด้วย	Peptone from casein	10.0	กรัม
	Meat extract	8.0	กรัม
	Yeast extract	4.0	กรัม
	D(+)Glucose	20.0	กรัม
	di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tween 80	1.0	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.04	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 5.7 ± 0.2 จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

7. MRS agar + 0.5% CaCO3

ประกอบด้วย			
	Peptone from casein	10.0	กรัม
	Meat extract	8.0	กรัม
	Yeast extract	4.0	กรัม
	D(+)Glucose	20.0	กรัม
	di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
	Tween 80	1.0	กรัม
	di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
	Sodium acetate	5.0	กรัม
	Magnesium sulfate	0.2	กรัม
	Manganese sulfate	0.04	กรัม
	Calcium carbonate	5.0	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

8. Plate count agar (PCA)

ประกอบด้วย			
	Peptone from casein	5.0	กรัม
	Yeast extract	2.5	กรัม
	D(+)Glucose	1.0	กรัม
	Agar-Agar	14.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.0 ± 0.2 จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

9. Simmons citrate agar

ประกอบด้วย			
	$NH_4H_2PO_4$	1.0	กรัม
	K_2HPO_4	1.0	กรัม
	Sodium chloride	5.0	กรัม
	Sodium cetrate	2.0	กรัม
	Manganese sulfate	0.20	กรัม
	Bromothymol blue	0.08	กรัม
	Agar	13.00	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 6.6 จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

10. Tryptic Soy Agar (TSA)

ประกอบด้วย			
	Peptone from casein	17.0	กรัม
	Peptone from soymeal	3.0	กรัม
	D(+)Glucose	2.5	กรัม
	Sodium chloride	5.0	กรัม
	di-potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
	Agar	15.0	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.3 ± 0.2 จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

11. Tryptic Soy Broth (TSB)

ประกอบด้วย			
	Peptone from casein	17.0	กรัม
	Peptone from soymeal	3.0	กรัม
	D(+)Glucose	2.5	กรัม
	Sodium chloride	5.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	di-potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เป็น 7.3 ± 0.2 จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

12. Triple sugar iron agar (TSI agar)

ประกอบด้วย	Peptone from casein	15.0	กรัม
	Peptone from meat	5.0	กรัม
	Meat extract	3.0	กรัม
	Yeast extract	3.0	กรัม
	Sodium chloride	5.0	กรัม
	Lactose	10.0	กรัม
	Sucrose	10.0	กรัม
	D(+)Glucose	1.0	กรัม
	Ammonium iron (III) citrate	0.5	กรัม
	Sodium thiosulfate	0.5	กรัม
	Phenol red	0.024	กรัม
	Agar-agar	12.0	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปทำการละลายด้วยการต้มหรือใช้ไมโครเวฟแล้วใส่ในหลอดทดลอง ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.4 ± 0.2 จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นนำมาวางเอียงให้เย็น

13. Mueller Hinton Broth (MHB)

ประกอบด้วย	Beef infusion solid	2.0	กรัม
	Casein hydrolyses	15.0	กรัม
	Starch powder	1.5	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (auto clave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. Mueller Hinton Agar (MHA)

ประกอบด้วย	Beef infusion solid	2.0	กรัม
	Casein hydrolyses	15.0	กรัม
	Starch powder	1.5	กรัม
	Agar	15	กรัม

วิธีการเตรียม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้ปลอดจุลินทรีย์ด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (auto clave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางวิเคราะห์จุลินทรีย์

ตารางภาคผนวกที่ ค 1 การตรวจผลของเชื้อ *Salmonella* spp.โดยวิธีทางชีวเคมี

TSI				LIM		
Slant	Butt	H_2S	Gas	Lysine	Indole	Motile
K	A	+/-	+/-	+	-	+/-

K = การเกิด alkaline โดยบริเวณปลายหลอด (slant) ของอาหาร TSI จะมีสีชมพู บานเย็น-แดง

A = การเกิด Acid บริเวณก้นหลอด (butt) ของ TSI จะมีสีเหลือง

H_2S (+) = ภายในหลอดอาหาร TSI เกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟต์ ซึ่ง *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่จะให้ผล +

H_2S (-) = ภายในหลอดอาหาร TSI ไม่เกิดตะกอนสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟต์

Gas (+) = มีฟองอากาศดันวุ้นของอาหาร TSI เนื่องจาก *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วได้กรดและแก๊สเพียงเล็กน้อย

Gas (-) = ภายในหลอดอาหารไม่มีฟองอากาศดันวุ้นของ TSI

Lysine (+) = หลอดอาหารจะมีสีม่วงทั้งหลอดเนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. มีเอนไซม์ Lysine decarboxylase ไปย่อย Lysine ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความเป็นด่างมากขึ้น มีผลทำให้ Brom cresol purple ซึ่งใช้เป็น Indicator ในอาหารดังกล่าวและมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำเป็นกลาง มีสีม่วงเข้มขึ้นซึ่ง *Salmonella* spp. จะมีเอนไซม์นี้

Lysine (-) = หลอดอาหารจะมีสีเหลืองเนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. มีเอนไซม์ Lysine decarboxylase ไปย่อย Lysine ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีความเป็นด่างต่ำมากขึ้น มีผลทำให้ Brom cresol purple เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

Indole (+) = อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีแดงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลังหยดน้ำยา Kovac ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Indole (-) = อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิดสีแดงบนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อหลังหยดน้ำยา Kovac ซึ่ง *Salmonella* spp. ไม่มีเอนไซม์ tryptophanase จึงไม่เกิดปฏิกิริยากับ Kovac

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Motile (+) = หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM จะขุ่นทั้งหลอด ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. ส่วนมากจะมีแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่ดังนั้น เมื่อทำการ Stab เชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดการเคลื่อนที่จากรอย Stab ไปทุกทิศทุกทางจึงทำให้หลอดขุ่น

Motile (-) = หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LIM จะมีการเจริญบริเวณรอย Stab เท่านั้น ส่วนบริเวณอาหารรอบรอย Stab จะใสทั้งนี้เนื่องจากเชื้อไม่มีแฟลกเจลลาในการเคลื่อนที่เชื้อจึงเจริญบริเวณรอย Stab เท่านั้น

การอ่านค่าองศาของสี มีรายละเอียด ดังนี้

L* = The lightness factor (value)

ค่า L* แสดงค่าความสว่าง

- วัตถุมีสีขาวเมื่อมีค่าเท่ากับ 100
- วัตถุมีสีดำเมื่อมีค่าเท่ากับ 0

a*, b* = The Chromaticity coordinates (Hue, Chroma)

ค่า a* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีแดง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีเขียว

ค่า b* - มีค่าบวก หมายถึง วัตถุมีสีเหลือง

- มีค่าลบ หมายถึง วัตถุมีสีน้ำเงิน

ทั้ง a* และ b* หากมีค่าเป็นศูนย์ หมายถึง วัตถุมีสีเทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนภาพร กองกาญจน์
วัน เดือน ปีเกิด	27 กรกฎาคม พ.ศ. 2534
ที่อยู่	69 ม. 13 ต. แตล อ. ศีขรภูมิ จ. สุรินทร์ 32110
ประวัติการศึกษา	2552 มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนสิรินธร
	2556 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
	2559 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ “Antibacterial Activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) Flower Extract” 2nd International Symposium on Agricultural Technology. A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand. July 1-3, 2015
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีการศึกษา 2558 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนภาพร กองกาญจน์
วัน เดือน ปีเกิด	27 กรกฎาคม พ.ศ. 2534
ที่อยู่	69 ม. 13 ต. แตล อ. ศีขรภูมิ จ. สุรินทร์ 32110
ประวัติการศึกษา	2552 มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนสิรินธร
	2556 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
	2559 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ "Antibacterial Activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) Flower Extract" 2nd International Symposium on Agricultural Technology. A-One The Royal Cruise Hotel Pattaya, Thailand. July 1-3, 2015
ทุนวิจัยที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีการศึกษา 2558 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้