

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาฟิล์มและสารเคลือบจากเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ของ *Weissella confusa* NH02

ที่ผสมสารยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บเนื้อหมูแช่เย็น

Development of Film and Coating from Exopolysaccharide of *Weissella confusa* NH02

Containing Antimicrobial Agent for Prolong Shelf Life of Refrigerated Pork

คณะนักวิจัย

รศ.ดร.ศุภศิลา ป๋ มณีรัตน์

ผศ.ดร.ธรรมนุญ โปรดปราน

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
ประจำปีงบประมาณ 2553

1. ชื่อโครงการ : การพัฒนาฟิล์มและสารเคลือบจากเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ของ *Weissella confusa* NH02 ที่ผสมสารยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บเนื้อหมูแช่เย็น

Development of Film and Coating from Exopolysaccharide of *Weissella confusa* NH02
Containing Antimicrobial Agent for Prolong Shelf Life of Refrigerated Pork

2. คณะนักวิจัย

- 2.1 รศ.ดร.ศุภศิลา ปิรมณีรัตน์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

- 2.2 ผศ.ดร.ธรรมนุญ ไปรคปราน

ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	3
LIST OF TABLES.....	5
LIST OF FIGURES.....	7
LIST OF ABBREVIATIONS.....	9
กิตติกรรมประกาศ.....	11
บทคัดย่อ.....	12
บทนำ	14
วัตถุประสงค์.....	15
การตรวจเอกสาร	16
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ.....	57
วิธีการทดลอง.....	59
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
สมบัติของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) จากเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02.....	67
ผลการเติมไคโตซาน (CS) ต่อสมบัติฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) จากเชื้อ <i>W. confusa</i> NH02.....	77
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย.....	82
ความเข้มข้นต่ำสุดของสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย.....	84
ผลของการเติมไทมอลต่อสมบัติของฟิล์มผสมเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS).....	86
การประยุกต์ใช้ฟิล์มและสารเคลือบเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมไทมอลในการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็น.....	92
ความคงตัวของสารเคลือบและฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซานที่มีการเติมไทมอล....	105
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	115

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง.....	117
ภาคผนวก.....	135

LIST OF TABLE

Table		Page
1.	Potential antimicrobial agents for antimicrobial food packaging systems.....	33
2.	Antimicrobial agents for preservation and shelf-life extension of foods.....	35
3.	Inhibition of bacterial and yeast growth by grape seed extract (GSE).....	46
4.	Effect of exopolysaccharides (EPS) concentration on thickness, tensile strength, elongation at break and water vapor permeability (WVP) of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	69
5.	Effect of exopolysaccharides (EPS) concentration on transparency value, solubility and film color of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	71
6.	Effect of exopolysaccharides (EPS) concentration on light transmission (%T) of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	71
7.	Effect of plasticizer on thickness, water vapor permeability (WVP), tensile strength and elongation at break of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	74
8.	Effect of plasticizer on solubility, transparency value and film color of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	76
9.	Effect of plasticizer on light transmission (%T) of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	77
10.	Effect of chitosan (CS) on thickness, tensile strength, elongation at break, water vapor permeability (WVP) and solubility of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	80
11.	Effect of chitosan (CS) on transparency value and film color of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	81
12.	Effect of chitosan (CS) on light transmission (%T) of EPS film from <i>Weissella confusa</i> NH02.....	82
13.	Characteristics of spoilage bacteria isolated from refrigerated pork.....	83
14.	Minimal inhibitory concentration (MIC) of nisin and thymol against the growth of <i>Acinetobacter iwoffii</i> MA02 and <i>Pseudomonas fragi</i> MA07 by agar well diffusion method.....	85
15.	Effect of thymol on thickness, water vapor permeability (WVP), tensile strength, elongation at break and solubility of EPS/CS film.....	88

LIST OF TABLE (Cont.)

Table		Page
16	Effect of thymol on transparency value and color of EPS/CS film.....	90
17	Effect of thymol on light transmission (%T) of EPS/CS film.....	90
18	Effect of EPS/CS film incorporated with thymol against <i>Acinetobacter iwoffii</i> MA02.....	92
19	Effect of EPS/CS film incorporated with thymol against <i>Pseudomonas fragi</i> MA07.....	92
20	Appearance and odor of sliced pork wrapped witout and with EPS/CS film and EPS/CS film incorporated with thymol during storage at 4±0.5 °C for 15 days.....	95
21	Appearance and odor of sliced pork coated with out and with EPS/CS coating solution and EPS/CS coating solution incorporated with thymol during storage at 4±0.5 °C for 15 days....	101
22	Properties of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) at days 0 and 40 of storage at 25 °C and 50%RH	108
23	Light transmittance (%) of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) films during 40 days of storage at 25 °C and 50%RH.....	112
24	Antimicrobial activity against <i>Acinetobacter iwoffii</i> MA02 of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) during 40 days of storage at 25 °C and 50%RH.....	114
25	Antimicrobial activity against <i>Pseudomonas fragi</i> MA07of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) during 40 days of storage at 25 °C and 50%RH.....	114

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Locations and mechanisms in the bacterial cell thought to be sites of action for essential oil components.....	40
2	Structural formulae of thymol.....	41
3	Structural formulae of eugemol.....	43
4	Hurdle technology in antimicrobial packaging system compared to the conventional packaging system	48
5	Antimicrobial packaging system (A) conventional packaging system (B) coating system	50
6	Concentration profile at the surface of foods: (A) unconstrained free diffusion system and (B) monolithic system.....	52
7	Appearance of exopolysaccharides films from <i>Weissella confusa</i> NH02 using polyethylene glycol (PEG) as plasticizer.....	72
8	Appearance of film prepared from 3% EPS with 25% glycerol (A) EPS film; (B) EPS film covered on slice pork.....	78
9	Appearance of sliced pork without film (A) wrapped with EPS/CS film (B) and EPS/CS film incorporated with thymol (C) at day 0 of storage.....	93
10	Effect of EPS/CS film incorporated with and without thymol (2.5 mg/ml) on total viable count (TVC) of sliced pork during storage at 4±0.5 °C for 15 days.....	97
11	Effect of EPS/CS film incorporated with and without thymol (2.5 mg/ml) on psychrophilic bacteria of sliced pork during storage at 4±0.5 °C for 15 days.....	98
12	Effect of EPS/CS film incorporated with and without thymol (2.5 mg/ml) on pH of sliced pork during storage at 4±0.5 °C for 15 days.....	99
13	Appearance of sliced pork coated with EPS/CS coating solution (A), EPS/CS coating solution incorporated with thymol (2.5 mg/ml) (B) and uncoated (C).....	100
14	Effect of EPS/CS coating solutions incorporated with thymol (2.5 mg/ml) on total viable count (TVC) of sliced pork during storage at 4±0.5 °C for 15 days.....	103
15	Effect of EPS/CS coating solutions incorporated with thymol (2.5 mg/ml) on psychrophilic bacteria of sliced pork during storage at 4±0.5 °C for 15 days.....	104

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
16	Effect of EPS/CS coating solutions incorporated with thymol (2.5 mg/ml) on pH of sliced pork during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days.....	105
17	Antimicrobial activity of EPS/CS coating solution incorporated with thymol (2.5 mg/ml) against <i>Acinetobacter iwoffii</i> MA02 (A) and <i>Pseudomonas fragi</i> MA07 (B) during storage for 40 days.....	106
18	Appearance of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) at day 0 (A) and 40 (B) of storage at 25 °C and 50%RH.....	110
19	Changes in L*, a* and b* values of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) during storage of 40 days at 25 °C and 50%RH.	111
20	Changes in transparency value of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) films during 40 days of storage at 25 °C and 50%RH	113

LIST OF ABBREVIATIONS

<i>Aer</i>	=	<i>Aeromonas</i>
<i>A.</i>	=	<i>Aspergillus</i>
<i>B.</i>	=	<i>Bacillus</i>
<i>Bro.</i>	=	<i>Brochothrix</i>
<i>Cam.</i>	=	<i>Campylobacter</i>
<i>Can.</i>	=	<i>Candida</i>
<i>Car.</i>	=	<i>Carnobacterium</i>
<i>En.</i>	=	<i>Enterobacter</i>
<i>Ent.</i>	=	<i>Enterococcus</i>
<i>E.</i>	=	<i>Escherichia</i>
<i>Lb.</i>	=	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lac.</i>	=	<i>Lactococcus</i>
<i>Lis.</i>	=	<i>Listeria</i>
<i>Leu.</i>	=	<i>Leuconostoc</i>
<i>M.</i>	=	<i>Micrococcus</i>
<i>Ped.</i>	=	<i>Pediococcus</i>
<i>Pen.</i>	=	<i>Penicillium</i>
<i>P.</i>	=	<i>Proteus</i>
<i>Pseu.</i>	=	<i>Pseudomonas</i>
<i>R.</i>	=	<i>Rahnella</i>
<i>Rhi.</i>	=	<i>Rhizobium</i>
<i>Sac.</i>	=	<i>Saccharomyces</i>
<i>Sal.</i>	=	<i>Salmonella</i>

LIST OF ABBREVIATIONS (Cont.)

<i>Sar.</i>	=	<i>Sarcina</i>
<i>Ser.</i>	=	<i>Serratia</i>
<i>S.</i>	=	<i>Staphylococcus</i>
<i>Strep.</i>	=	<i>Streptococcus</i>
<i>W.</i>	=	<i>Weissella</i>
<i>Xan.</i>	=	<i>Xanthomonas</i>
<i>Y.</i>	=	<i>Yarrowia</i>
<i>Yer.</i>	=	<i>Yersinia</i>
<i>Z.</i>	=	<i>Zygosaccharomyces</i>

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยและขอขอบคุณคณะ
อุตสาหกรรมเกษตร ที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

ศุภศิลป์ มณีรัตน์

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) จากแบคทีเรียแลกติก *Weissella confusa* NH02 โดยทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของ EPS ชนิดและความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ต่อสมบัติของฟิล์ม EPS พบว่า ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.5 ถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) สามารถขึ้นรูปฟิล์มได้ โดยฟิล์ม EPS ที่มีสมบัติดีเตรียมได้จากสารละลาย EPS ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับพลาสติกไซเซออร์ที่เหมาะสม คือ กลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS โดยฟิล์มที่ได้มีลักษณะใส มีความยืดหยุ่นแข็งแรง และสามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร จึงได้พัฒนาฟิล์ม EPS เพื่อลดความสามารถในการละลายน้ำ โดยเตรียมฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS กับ โคลโคซาน (CS) ที่อัตราส่วนเท่ากับ 1:1 (โดยน้ำหนัก) สามารถลดความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มได้ดีที่สุด ซึ่งค่าการละลายน้ำลดลงจาก 41.28 เป็น 14.95 เปอร์เซ็นต์ และผลการศึกษาประสิทธิภาพของไนซินและไทมอลในการยับยั้งการเจริญของ *Acinetobacter iwoffii* MA02 และ *Pseudomonas fragi* MA07 ซึ่งคัดแยกจากเนื้อหมูแช่เย็นที่เน่าเสีย โดยไนซินสามารถยับยั้งได้เฉพาะการเจริญของเชื้อ *A. iwoffii* MA02 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้ง *Pseu. fragi* MA07 และ *A. iwoffii* MA02 มีค่า MIC เท่ากับ 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และผลการเตรียมฟิล์มยับยั้งจุลินทรีย์โดยเติมไทมอลความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 2 เท่าของ MIC ลงในฟิล์ม EPS/CS แล้วทดสอบสมบัติและความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseu. fragi* MA07 และ *A. iwoffii* MA02 พบว่าการเติมไทมอลส่งผลให้ฟิล์มมีความหนาและมีสีเหลืองเพิ่มขึ้น ขณะที่ความโปร่งใสของฟิล์มลดลง นอกจากนี้ฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าฟิล์มซุกควบคุม (ฟิล์ม EPS/CS ที่ไม่เติมไทมอล) และจากการนำฟิล์มและสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็น พบว่าสารเคลือบสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็นได้เพิ่มขึ้นจาก 2 วัน เป็น 9 วัน ในขณะที่ฟิล์มสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็นได้เพิ่มขึ้นจาก 2 วัน เป็น 11 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อหมูที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มหรือสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอล นอกจากนี้ผลการศึกษาความคงตัวของฟิล์มและสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 วัน พบว่าค่าต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มและประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียลดลงหลังการเก็บรักษาฟิล์มเป็นเวลา 40 วัน และเมื่อพิจารณาสีของฟิล์ม พบว่าฟิล์มมีสีเข้มและมีสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ นอกจากนี้ระยะเวลา (40 วัน) และอุณหภูมิในการเก็บสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย

ABSTRACT

In the present work, the film-forming ability of exopolysaccharide (EPS) from lactic acid bacteria, *Weissella confusa* NH02, and the effects of EPS concentration and type and concentration of plasticizer on film properties were evaluated. EPS was able to form films at EPS concentration ranging from 1.5 to 3.5% (w/v). Glycerol was the best plasticizer. The optimal EPS and glycerol concentration for film forming were 3% (w/v) and 25% of EPS, respectively. The obtained EPS film was transparent, flexible, strength and high solubility. However, the limiting factor for using obtained EPS film was the poor vapor resistance. Chitosan (CS) was used to reduce the solubility of the film. The optimal ratio of EPS and CS was 1:1. As a result, the solubility of film decreased from 47.71% to 14.95%. The effectiveness of antimicrobial agents (nisin and thymol) against *Acanitobacter iwoffii* MA02 and *Pseudomonas fragi* MA07 which was isolated from spoilage refrigerated pork was determined. Thymol could inhibit both strains and had minimal inhibitory concentration (MIC) at 1.25 and 2.5 mg/ml, respectively. Nisin inhibited only *A. iwoffii* MA02 and had MIC at 5 mg/ml. Thymol concentrations at MIC and higher than MIC 2 folds were incorporated into the EPS/CS film-forming solution. The physical properties and antimicrobial activities of the film were tested. The EPS/CS film incorporated with thymol had higher thickness and more yellowish however, lower transparency. In addition, EPS/CS film with thymol could enhance the antimicrobial properties of the film compared with the control film (without addition of thymol). The optimal thymol concentration for EPS/CS film forming was 2.5 mg/ml. Application of EPS/CS film and EPS/CS coating solution incorporated with thymol in refrigerated pork were studied. The results showed that EPS/CS coating solution incorporated with thymol could extend the shelf life of refrigerated pork from 2 days to 9 days while EPS/CS film incorporated with thymol could extend the shelf life of refrigerated pork from 2 days to 11 days compared with control (sliced pork uncoated and without film). Moreover, storage stability of EPS/CS film and EPS/CS coating solution incorporated with thymol were investigated. During storage, tensile strength of EPS/CS film incorporated with thymol increased continuously. However, elongation at break and antimicrobial activity decreased markedly when storage time increased up to 40 days. The film became darker and more yellowish as storage time increased. Furthermore, the EPS/CS coating solution incorporated with thymol had no change in antimicrobial activity when storage time increased up to 40 days.

บทนำ

อาหารชนิดต่างๆ ที่เรานำมาบริโภคเมื่อเก็บรักษาไว้ระยะหนึ่งจะเกิดการเสื่อมเสียได้จากปัจจัยหลายประการด้วยกัน เช่น การเสื่อมเสียทางกายภาพ การเสื่อมเสียเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาเคมี และการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่มีความสำคัญเนื่องจากทำให้อาหารเกิดการสูญเสียคุณภาพทางประสาทสัมผัสและอาจก่อให้เกิดอันตรายจากสารพิษที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร การใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์เติมลงในอาหารเป็นวิธีการหนึ่งนอกเหนือไปจากการถนอมอาหารด้วยวิธีการอื่นๆ เช่น การใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ หรือการใช้ความเย็น ที่สามารถป้องกันหรือลดการเสื่อมเสียของอาหารจากจุลินทรีย์ได้ แต่เนื่องจากในปัจจุบันความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีบวกกับความต้องการของผู้บริโภคต่ออาหารที่มีคุณภาพและความปลอดภัยเพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดการพัฒนาระบบบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟ (Active packaging) ซึ่งเป็นบรรจุภัณฑ์ที่มีสมบัติพิเศษด้านอื่นๆ ในการช่วยยืดอายุการเก็บของอาหารให้ยาวนานยิ่งขึ้น นอกเหนือไปจากหน้าที่ในการปกป้องอาหารขั้นพื้นฐานของบรรจุภัณฑ์โดยทั่วไป ในการปกป้องผลิตภัณฑ์อาหารที่อยู่ในบรรจุภัณฑ์จากสิ่งแวดล้อมภายนอก (Rooney, 2005) บรรจุภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์เป็นบรรจุภัณฑ์แบบแอคทีฟประเภทหนึ่งที่จะช่วยลดการเสื่อมเสียของอาหารจากจุลินทรีย์ได้โดยการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ลงในบรรจุภัณฑ์เพื่อให้สารต่อต้านจุลินทรีย์เข้าไปทำปฏิกิริยากับเซลล์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ที่บริเวณพื้นผิวของอาหาร ทำให้การเจริญของเซลล์หยุดชะงักและจุลินทรีย์ถูกทำลายในที่สุด (Han, 2003) การเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ลงในภาชนะบรรจุแทนการเติมลงในอาหารนอกจากจะเป็นการช่วยลดปริมาณสารที่ต้องใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารแล้วยังเป็นการลดความเสี่ยงของผู้บริโภคต่ออันตรายจากการได้รับสารต่อต้านจุลินทรีย์ในอาหารได้อีกด้วย

ปัจจุบันวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตบรรจุภัณฑ์ใช้วัตถุดิบที่ย่อยสลายได้ยากจึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน จึงมีความพยายามที่จะหาวัตถุดิบในการผลิตบรรจุภัณฑ์ที่มีความคงทนในการใช้งาน ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอาหารที่บรรจุ และลดปัญหาขยะที่เกิดจากบรรจุภัณฑ์ (Garcia *et al.*, 1998) ทำให้ผู้ผลิตหันมาให้ความสนใจในการผลิตบรรจุภัณฑ์ที่ใช้วัตถุดิบพอลิเมอร์ทางชีวภาพมากขึ้น เช่น คาร์โบไฮเดรต ไลปิด และ โปรตีน เป็นต้น (Tapia-Blacido *et al.*, 2007) ทั้งนี้เพราะเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ในธรรมชาติ ไม่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต และไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Phisalaphong and Jatupaiboon, 2008)

สำหรับการนำสารยับยั้งจุลินทรีย์ไปใช้ร่วมกับสารเคลือบหรือฟิล์มที่สามารถบริโภคได้ เช่น โคลโตแซน โซเดียม-อัลจินต คาราจีแนน และเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ เป็นต้น มีข้อดีที่ฟิล์มและสารเคลือบช่วยควบคุมการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหารระหว่างการเก็บรักษา เช่น ควบคุมการถ่ายเทความชื้น การแลกเปลี่ยนแก๊ส และกระบวนการสุกของผักและผลไม้ (Cagri *et al.*, 2004) ในขณะที่สารยับยั้งจุลินทรีย์ช่วยในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร (Han, 2003) นอกจากนี้การใช้สารเคลือบหรือฟิล์มร่วมกับสารยับยั้งจุลินทรีย์ยังสามารถเพิ่มอายุการเก็บของอาหารได้นานยิ่งขึ้นกว่าการใช้สารเคลือบหรือฟิล์ม หรือสารยับยั้งจุลินทรีย์อย่างเดียว

หนึ่งเพียงชนิดเดียว เพราะสารเคลือบหรือฟิล์มช่วยควบคุมการแพร่ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ไปสู่ผิวของอาหาร เพื่อให้คงความเข้มข้นอยู่ในระดับที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ให้ได้นานขึ้น (Han, 2003)

แบคทีเรียแลกติกหลายสายพันธุ์สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ได้และเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตแล้วถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (Exopolysaccharide) จึงง่ายต่อการนำเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกมาประยุกต์ใช้ ดังนั้นเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกจึงได้รับความนิยมและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้หลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมการผลิตยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารนิยมใช้เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลกติกมาประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่างๆ เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ ซุป โยเกิร์ต เป็นต้น (De Vuyst and Degeest, 1999) ทั้งนี้เนื่องมาจากเป็นแบคทีเรียที่ได้การยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) (Laws *et al.*, 2001) นอกจากนี้การศึกษาเกี่ยวกับการนำเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มาขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพและบริโภคได้ ซึ่งกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน (Garcia *et al.*, 1998; Sorrentino *et al.*, 2007) วรารัตน์ วงศ์สุภชาติ (2551) แยกเชื้อ *Weissella confusa* NH02 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกจากไส้กรอกอีสานที่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้ พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1.13×10^6 และสารละลายเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์มีค่าความหนืดเท่ากับ 9,363 cP จะเห็นได้ว่าเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *W. confusa* NH02 มีความหนืดและน้ำหนักโมเลกุลสูงน่าจะมีศักยภาพในการนำมาผลิตฟิล์มชีวภาพได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาการเตรียมและสมบัติของฟิล์ม รวมทั้งการพัฒนาฟิล์มต่อต้านจุลินทรีย์จากเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดย *W. confusa* NH02 โดยเน้นการใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ให้มีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดเน่าเสียของอาหาร และศึกษาสมบัติทางกลและสมบัติทางกายภาพของฟิล์มต่อต้านจุลินทรีย์ที่ได้ เพื่อนำไปพิจารณาถึงแนวโน้มการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารจริง เพื่อให้สามารถชะลอการเสื่อมเสียของอาหารอันเนื่องมาจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ทำให้อาหารมีอายุการเก็บที่ยาวนานขึ้นได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์และพลาสติกไซเซอร์ในสารละลายฟิล์มต่อสมบัติของฟิล์มที่ผลิตจากเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เนื่อหมูแซ่เย็นเน่าเสีย
3. เพื่อเตรียมและศึกษาสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ
4. เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้ฟิล์มจากเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อ *W. confusa* NH02 ที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็น

การตรวจเอกสาร

1. เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS) คือ พอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในขณะที่มีการเจริญและขับออกมานอกเซลล์ ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากจุลินทรีย์โดยกระบวนการหมักจะได้เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่มีความหลากหลายและมีสมบัติเฉพาะตัวมากกว่าพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากพืช การผลิตพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อแบคทีเรียมีข้อดี คือ สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์ได้จำนวนมาก และสามารถควบคุมคุณภาพของพอลิแซคคาไรด์ได้ โดยควบคุมสภาวะในกระบวนการหมัก การผลิตพอลิแซคคาไรด์จากพืชมีข้อจำกัด คือ พืชชนิดหนึ่งๆ สามารถผลิตพอลิแซคคาไรด์หลายชนิดพร้อมๆ กัน ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการแยกพอลิแซคคาไรด์ที่ต้องการออกมาซึ่งทำให้มีค่าใช้จ่ายสูงขึ้น (Whitsler *et al.*, 1998)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ อาหาร อุณหภูมิ พีเอช แหล่งคาร์บอน และสภาวะในการหมักตลอดจนสายพันธุ์แบคทีเรีย เช่น แบคทีเรียแลคติกจะมีความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ อาจเป็นเพราะกลไกการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อแตกต่างกัน เช่น การผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มีความสัมพันธ์กับการเจริญ (Growth-associate) เช่น *Ped. pentosaceus* (Manca de Nadra and Strasser de Saad, 1995) และ *Lb. plantarum* EP56 (Tallon *et al.*, 2003) โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์เพื่อให้ได้ปริมาณมากควรเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการที่จะทำให้ช่วงเวลาในการเจริญของเชื้อเป็นไปได้นาน ในขณะที่เชื้อมีอัตราการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์สูง ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์มีการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์สัมพันธ์กับการเจริญและเชื้อจะหยุดการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์เมื่อการเจริญสิ้นสุด ในขณะที่การผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากเชื้อบางสายพันธุ์ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ (Non-growth associate) เช่น *Xanthomonas* spp. และ *Alcaligenes* spp. โดยมีอัตราการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในสภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจน และเชื้อมีการเจริญอยู่ในช่วง Stationary (De Vuyst and Degeest, 1999)

Tallon และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดยเชื้อ *Lb. plantarum* EP56 พบว่าเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มี 2 รูปแบบ คือ เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สร้างติดอยู่กับตัวเซลล์และเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สร้างออกมาภายนอกเซลล์ โดยปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ทั้ง 2 รูปแบบเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในระยะ Stationary phase โดยในช่วงเวลา 25 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สร้างติดอยู่กับตัวเซลล์ผลิตได้สูงถึง 73.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่หลังจาก 25 ชั่วโมง ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ลดลงเหลือ 44.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สร้างออกมาภายนอกเซลล์ที่เวลา 25 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ มีค่าเท่ากับ 36.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 97 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้เพิ่มขึ้นด้วยเท่ากับ 79.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สร้างติดอยู่กับตัวเซลล์ลดลง

ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก พบว่า เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดยใช้น้ำตาลต่างชนิดกัน โดยส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบหลักของอาหารนั้นๆ ที่เป็นแหล่งในการแยกเชื้อในการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ เช่น เชื้อ *Ped. pentosaceus* จากไวน์สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้จากน้ำตาลหลายชนิด คือ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส แต่ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากน้ำตาลซูโครสจะสูงที่สุด (Manca de Nadra and Strasser de Saad, 1995)

วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ (2551) แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก *W. confusa* NH02 จากไส้กรอกอีสาน พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS (พีเอช 7.0) ที่ประกอบด้วยซูโครสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ Tryptone 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มีความสัมพันธ์กับการเจริญ โดยเชื้อมีการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมงแรก เช่นเดียวกับการเจริญ ซึ่งวัดปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เท่ากับ 18.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 37.60 และเมื่อนำเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มาละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าค่าความหนืดของสารละลายเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้อยู่ในช่วง 8,500-9,400 cP โดยที่เวลา 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ค่าความหนืดของสารละลายเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 9,363 cP ซึ่งมีความมากกว่า Xanthan gum ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (1,113 cP) และจากการวิเคราะห์หาน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดยใช้ HPLC พบว่าเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้เป็นพอลิแซคคาไรด์ชนิดโฮโมพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Van der Meulen และคณะ (2007) ที่พบว่า *W. confusa* หรือ *W. cibaria* 38.2 ที่แยกได้จาก Sourcream สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ชนิดโฮโมพอลิแซคคาไรด์ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบได้เท่ากับ 8.6 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาวิธีการตกตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ด้วยตัวทำละลาย 2 ชนิด คือ เอทานอลและอะซิโตน พบว่าการตกตะกอนด้วยเอทานอลต่อน้ำหนักในอัตราส่วน 0.5:1 สามารถตกตะกอนเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้มากที่สุด และจากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์โดย Gel Permeation Chromatography (GPC) พบว่าเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1.13×10^6

Wang และคณะ (2008) คัดแยกเชื้อ *Lb. kefirifaciens* ที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้จาก Tibet kefir grain พบว่าเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้เป็น Heteropolysaccharide และมีสมบัติเป็นสารช่วยในการตกตะกอน (Flocculant) ใกล้เคียงกับ Xanthan gum (Flocculation activity เท่ากับ 80 unit/ml) แต่ดีกว่า Guar gum (Flocculation activity เท่ากับ 70 unit/ml) และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 93.38 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่า Xanthan gum (153.4 องศาเซลเซียส) และ Guar gum (490.11 องศาเซลเซียส)

Freitas และคณะ (2009) ศึกษาสมบัติเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Pseu. oleovorans* NRRL B-14682 พบว่าค่าความหนืดของสารละลายเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มีค่าใกล้เคียงกับ Guar gum และมีสมบัติเป็นสาร

ช่วยในการตกตะกอน นอกจากนี้พบว่าเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มีสมบัติทำให้เกิดอิมัลชันและมีความสามารถในการขึ้นรูปเป็นฟิล์ม

1.1 ชนิดและสมบัติของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์

การจำแนกชนิดของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์อาศัยเกณฑ์ในการแบ่งได้ดังนี้

1.1.1 จำแนกตามลักษณะการสร้าง

การผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างของเซลล์ ได้แก่ เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างภายนอกเซลล์ มี 2 รูปแบบ คือ ในรูปของแคปซูลที่อยู่รอบผนังเซลล์จะมีความหนาและคงรูป (Argira *et al.*, 1992) และแบบที่สองอยู่ในรูปของเมือกที่สร้างแล้วถูกปล่อยออกมาจากเซลล์มีลักษณะเหนียว รูปร่างไม่แน่นอน (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2530)

1.1.2 จำแนกตามมอนอเมอร์ แบ่งได้ 4 ประเภท ดังนี้

1.1.2.1 พอลิแซคคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์ สารอินทรีย์ที่พบ ได้แก่ อะซิเตท ไพรูเวท เป็นต้น โดยสารอินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อประจุรวมบนโมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์ และโครงสร้างของพอลิแซคคาไรด์ บางตัวพบว่ามีการอะมิโนเป็นองค์ประกอบด้วย (Sutherland, 1995)

1.1.2.2 พอลิแซคคาไรด์ที่มีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ โดยจะอยู่ในรูปของ Phosphorylated exopolysaccharide โดยพบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Sutherland, 1995)

1.1.2.3 โฮโมพอลิแซคคาไรด์ (Homopolysaccharide) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์เพียงชนิดเดียว เช่น เด็กซ์แทรน (Dextran) เป็นโฮโมพอลิแซคคาไรด์ที่มีแอลฟา-กลูแคน เป็นองค์ประกอบ โดยเชื่อที่สามารถผลิตเด็กซ์แทรน คือ *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* และ *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (De Vuyst and Degeest, 1999)

1.1.2.4 เฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์ (Heteropolysaccharide) เป็นพอลิแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยมอนอเมอร์ต่างชนิดกัน

แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเฮเทอโรพอลิแซคคาไรด์เป็นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มเทอร์โมฟิลิก (Thermophilic) ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง เจริญเติบโตได้ดีที่ 45-80 องศาเซลเซียส เช่น *Lb. acidophilus*, *S. thermophilus* เป็นต้น และแบคทีเรียแลคติกกลุ่มมีโซฟิลิก (Mesophilic) ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง เจริญเติบโตได้ดีที่ 20-50 องศาเซลเซียส เช่น *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lac. lactis* subsp. *cremoris* เป็นต้น (De Vuyst

and Degeest, 1999) โดยสหเทอโรพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นเมือกไม่คงรูป และผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้ปริมาณน้อย และมีความยืดหยุ่นน้อยกว่าพอลิเมอร์กลุ่มอื่น

2. พิล์มจากพอลิเมอร์ชีวภาพ (Film from biological polymers)

2.1 การเกิดฟิล์ม (Film formation)

ฟิล์มมีองค์ประกอบหลัก คือ พอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (ประมาณ 10^4 - 10^6) ซึ่งมีสมบัติเกิดฟิล์มได้ ตัวทำละลายและสารเจือปนซึ่งเติมลงไปเพื่อปรับปรุงสมบัติของฟิล์ม ในการเตรียมฟิล์มมีแรง 2 แรงที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ แรงโคฮีชัน (Cohesion) เป็นแรงระหว่างพอลิเมอร์ด้วยกันเอง เกิดขึ้นระหว่างการเกิดฟิล์ม ทำให้เกิดการเชื่อมตัวของผิววัตถุเดียวกันสร้างพันธะที่แข็งแรง ซึ่งช่วยป้องกันหรือต้านทานการแยกออกจากกัน ปัจจัยที่มีผลต่อแรงโคฮีชัน ได้แก่ โครงสร้างและสมบัติทางเคมีของพอลิเมอร์ ระบบการละลายและสภาวะในการเตรียมฟิล์ม โดยแรงโคฮีชันมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักโมเลกุล ความสม่ำเสมอของโครงสร้างสายโซ่ การแผ่กิ่งก้านสาขา และการกระจายของกลุ่มเคมีที่มีขั้วบนสายพอลิเมอร์ โดยสายพอลิเมอร์ที่ยาวจะทำให้เกิดการยึดเกาะกันได้ดี การกระจายของกลุ่มขั้วอย่างมีระเบียบในสายพอลิเมอร์จะช่วยให้เกิดพันธะไฮโดรเจนและพันธะไอออนิกระหว่างสายโซ่ทำให้มีความแข็งแรง การละลายของพอลิเมอร์ในการเตรียมฟิล์มยังมีผลต่อแรงโคฮีชัน คือ ถ้าโมเลกุลของพอลิเมอร์ละลายหรือคลายตัวได้มากที่สุด จะได้โครงสร้างซึ่งเชื่อมกันด้วยแรงโคฮีชันที่มาก ฟิล์มที่ได้มีความแข็งแรง ส่วนแรงอีกชนิดหนึ่งคือแรงแอดฮีชัน (Adhesion) เป็นแรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์กับสารอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเตรียมฟิล์ม ทำให้เกิดโครงสร้างของฟิล์มได้ เช่น แรงระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์กับพลาสติกไซเซออร์ ซึ่งจะมีผลต่อสมบัติต่างๆ ของฟิล์มเช่นกัน (Banker, 1966)

Xiao และคณะ (2000) ผสมโคโคซานกับแป้งบุกแล้วทำการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มเพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงกลและความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มโคโคซาน พบว่าอัตราส่วนของฟิล์มโคโคซานกับแป้งบุกที่ 7:3 สามารถผสมเข้ากันได้ดีที่สุดในฟิล์มที่ได้มีความใสรวมทั้งมีสมบัติทางความร้อน ค่าความต้านทานแรงดึงขาด (Tensile strength) และค่าการยืด ณ จุดขาด (Elongation at break) สูงที่สุดด้วย

Li และคณะ (2006) ศึกษาลักษณะทางกลและทางกายภาพของฟิล์มที่เตรียมจาก Konjac glucomannan และโคโคซาน พบว่าการใช้ Konjac glucomannan ต่อโคโคซานในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ให้ฟิล์มที่มีความต้านทานแรงดึงขาดมากที่สุด (102.8 ± 3.8 MPa) และมีความโปร่งใส สามารถละลายน้ำ และอัตราการซึมผ่านของไอน้ำที่ดี จากการวิเคราะห์โครงสร้างของฟิล์มโดยเทคนิค Differential scanning calorimetry (DSC) และ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) พบว่าภายในโมเลกุลโคโคซานเชื่อมกับ Konjac glucomannan ด้วยพันธะไฮโดรเจน

Colla และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตฟิล์มแป้ง Amaranth จาก *Amaranthus cruentus* ร่วมกับกรดสเตียริก (Stearic acid) พบว่ากรดสเตียริกช่วยเพิ่มสมบัติการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่มีกรดสเตียริก (Tapia-Blacido *et al.*, 2007)

Cheng และคณะ (2008) ศึกษาการเตรียมฟิล์มจากสารละลายอิมัลชันของ Konjac glucomannan และ Carboxymethylcellulose ที่เติมและไม่เติมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่าการเติมโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ ช่วยเพิ่มความคงตัวของสารละลายอิมัลชัน เพราะโปตัสเซียมไฮดรอกไซด์ที่เติมจะไปทำปฏิกิริยากับ Palm olein lipid ทำให้เกิดสารที่มีทั้งส่วนที่มีขั้ว (COO) สามารถละลายได้ในน้ำจะขึ้นออกมานอกผิวของอนุภาคน้ำมันเพื่อละลายอยู่ในน้ำ และส่วนที่ไม่มีขั้วละลายได้ในอนุภาคน้ำมัน ดังนั้นจะทำให้อนุภาคน้ำมันมีประจุลบเหมือนกันหมดทุกอนุภาค ทำให้น้ำมันกระจายตัวแขวนลอยตัวอยู่ในน้ำเป็นอิมัลชันที่มีความคงตัว และเมื่อเติม Palm olein lipid ลงในสารละลายอิมัลชัน พบว่ามีไลปิดขนาดเล็กแพร่กระจายเป็นเนื้อเดียวกันภายในสารละลายอิมัลชัน ซึ่งไลปิดนี้ช่วยเพิ่มสมบัติไม่ชอบน้ำของฟิล์ม ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำผ่านฟิล์มลดลง

Fabra และคณะ (2008) ศึกษาผลของโครงสร้างบริเวณผิวและผิวด้านในของฟิล์มจาก Sodium caseinate ที่มีกลีเซอรอลและของผสมไลปิด คือ กรดโอเลอิก และจีฟังก์ โดยใช้อัตราส่วน โปรตีน:กลีเซอรอล:ไลปิด เท่ากับ 1:0.3:0.5 พบว่าฟิล์มควบคุม (ไม่มีไลปิด) มีความโปร่งใสและความมันวาวสูงที่สุด ขณะที่ไลปิดมีผลต่อการทึบแสงและการสูญเสียความมันวาวของฟิล์ม โดยเฉพาะเมื่อปริมาณจีฟังก์เพิ่มขึ้นในของผสมไลปิด เนื่องจากเกิดการเกาะตัวของไลปิดบริเวณผิวด้านหน้าและผิวด้านในของฟิล์ม

Elizondo และคณะ (2008) ศึกษาสมบัติทางกลของฟิล์มที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพโดยการผสมแป้ง Amaranth จาก *Amaranthus cruentus* และ Polyvinyl alcohol (PVA) พบว่าฟิล์มที่เติม PVA 325 ที่มีระดับไฮโดรไลซิสต่ำ (98 เปอร์เซ็นต์) มีความยืดหยุ่น, ค่าการยืด ณ จุดขาด (89 เปอร์เซ็นต์) และลักษณะการเปลี่ยนรูปแบบยืดหยุ่น (16.3 เปอร์เซ็นต์) ดีกว่าการใช้ PVA ที่มีระดับไฮโดรไลซิสสูง (98.8 เปอร์เซ็นต์) และพบว่าการเติม PVA ร่วมกับแป้ง Amaranth ส่งผลให้สมบัติทางกล (ค่าต้านทานแรงดึงขาดเท่ากับ 44.8 MPa และค่าการยืด ณ จุดขาดเท่ากับ 84.4 เปอร์เซ็นต์) ของฟิล์มดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่มีแป้ง Amaranth เพียงอย่างเดียว (ค่าต้านทานแรงดึงขาดเท่ากับ 5.8 MPa และค่าการยืด ณ จุดขาด เท่ากับ 13.8 เปอร์เซ็นต์)

Rao และคณะ (2010) ศึกษาการเตรียมฟิล์มจากไคโตซาน (CH) และ Guar gum (GG) ที่อัตราส่วนต่างๆ โดยใช้ GG ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่าการเติม GG ส่งผลให้สมบัติด้านความโปร่งใสของฟิล์มมีการเปลี่ยนแปลง แต่ไม่ส่งผลต่อการซึมผ่านของไอน้ำผ่านแผ่นฟิล์ม และการเติม GG ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่งผลให้ค่าการซึมผ่านของออกซิเจนผ่านแผ่นฟิล์มมีค่าลดลง แต่มีค่าแรงต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้น

Trinetta และคณะ (2011) ศึกษาสมบัติของฟิล์ม Pullulan ที่มีการผสมของสาร 4 ชนิด คือ Pullulan (Pul), Glycerin (Gly), Xanthan gum (Xa) และ Locust bean gum (Lb) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการขึ้นรูปฟิล์ม Pullulan มากที่สุด คือ Pul เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร Gly เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร Xa เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร และ Lb เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร โดยการผสมระหว่าง Pul และ Gly จะส่งผลต่อสมบัติของฟิล์ม Pullulan ทั้งนี้เนื่องจากการสร้างพันธะที่แข็งแรงระหว่าง Pul-Gly และ Xa-Gly ซึ่งผลจากการศึกษานี้สามารถนำฟิล์ม Pullulan ไปพัฒนาเป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารได้

Chinnma และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตและสมบัติของฟิล์ม โดยการผสมแป้งมันสำปะหลังและโปรตีนจากถั่วเหลือง (SPC) ร่วมกับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการเติม SPC และกลีเซอรอลความเข้มข้น 30 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่งผลให้ความเหนียวของฟิล์มลดลง สีและลักษณะปรากฏของฟิล์มดีขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลต่อสมบัติทางกลของฟิล์ม คือ ค่าต้านทานแรงดึงขาด ค่ามอดูลัสความยืดหยุ่น (Elastic modulus) และค่าการยืดเมื่อขาดของฟิล์มเพิ่มขึ้น ขณะที่ความสามารถในการละลาย และค่าการซึมผ่านของไอน้ำผ่านแผ่นฟิล์มมีค่าลดลง

Rachtanapun และคณะ (2012) ศึกษาการเตรียมฟิล์ม Carboxymethyl cellulose (CMC₄) ที่สกัดจากเปลือกทุเรียนด้วยปฏิกิริยา Carboxymethylation โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (20-60 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) พบว่าฟิล์ม CMC₄ ที่ผลิตได้จากเปลือกทุเรียนที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 30 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร มีค่าต้านทานแรงดึงขาด (140.77 MPa) และมีค่าการซึมผ่านของไอน้ำ (220.85 g/day m²) สูงสุด ส่วนค่าการยืดตัวเมื่อขาด มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างนัยสำคัญ

2.2 วิธีการขึ้นรูปแผ่นฟิล์ม

การขึ้นรูปแผ่นฟิล์มจากพอลิเมอร์ชีวภาพสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นกับวัตถุดิบที่ใช้ และต้องมีการควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อให้ฟิล์มไม่ขึ้นรูปเร็วเกินไป มิฉะนั้นผิวของฟิล์มจะขรุขระ และแตกง่าย (Banker, 1966) วิธีการขึ้นรูปฟิล์มที่สำคัญ มีดังนี้

2.2.1 การขึ้นรูปโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent casting)

การทำให้เกิดแผ่นฟิล์มโดยการนำสารละลายพอลิเมอร์ที่เตรียมเทลงในแบบหรือเบ้า แล้วทำให้แห้งด้วยลมร้อน ฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพที่ได้จะมีลักษณะโปร่งแสง และส่วนใหญ่จะละลายน้ำได้ (ขึ้นอยู่กับชนิดของพอลิเมอร์ชีวภาพ) อาจมีการเคลือบฟิล์มซ้ำด้วยสารที่มีสมบัติในด้านการปรับปรุงคุณภาพฟิล์ม เช่น การเคลือบทับด้วยไฮพาราฟิน เพื่อช่วยเพิ่มสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของน้ำให้ดีขึ้น (Zhong and Li, 2011)

Rao และคณะ (2010) เตรียมฟิล์มไคโตซาน (CH) ผสมกับ Guar gum (GG) ที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งใช้เทคนิคการเทหล่อจากสารละลายในการขึ้นรูปฟิล์ม โดยเตรียมสารละลาย CH ในกรดอะซิติกความเข้มข้นเท่ากับ 1

เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) และเตรียมสารละลาย GG โดยละลาย GG ในน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายทั้งสองมาผสมกันที่อัตราส่วน 8.5:1.5 (โดยปริมาตร) และเทลงในเพลท Teflon พบว่าฟิล์มที่ได้มีค่าการซึมผ่านของออกซิเจนต่ำ และมีสมบัติทางกลของฟิล์มที่ดี

Rachtanapun และคณะ (2012) เตรียมฟิล์ม Carboxymethyl cellulose (CMC_d) ที่สกัดจากเปลือกทุเรียนด้วยปฏิกิริยา Carboxymethylation โดยใช้สารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งใช้เทคนิคการเทหล่อจากสารละลายในการขึ้นรูปฟิล์ม เตรียมสารละลาย CMC_d โดยละลาย CMC_d ในน้ำกลั่น แล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วเทสารละลายฟิล์ม CMC_d ลงในเพลท Cellulose acetate พบว่าฟิล์ม CMC_d ที่สกัดด้วย NaOH ความเข้มข้น 30 กรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าต้านทานแรงดึงขาด (140.77 MPa) และมีค่าการซึมผ่านของไอน้ำผ่านแผ่นฟิล์ม (220.85 g/day.m²) สูงสุด ส่วนค่าการยืดตัวเมื่อขาดมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

2.2.2 การขึ้นรูปโดยกระบวนการทางความร้อน (Thermal process)

Cunningham และคณะ (2000) เตรียมฟิล์ม โปรตีนถั่วเหลืองที่ผสมกลีเซอรอลโดยใช้เทคนิคการอัดเบ้าร้อน พบว่า สภาวะเหมาะสมที่ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์ม คือ การกดอัดที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ความดัน 10 MPa เป็นเวลา 2 นาที โปรตีนถั่วเหลืองเกิดการสลายตัวทางความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส (Ogale *et al.*, 2000) สภาวะการขึ้นรูปดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการขึ้นรูปแผ่นฟิล์มโปรตีนไอโซเลตจากเวย์ได้เช่นกัน โดยพบว่าโปรตีนจากเวย์เกิดการสลายตัวในสภาวะการกดอัดที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานกว่า 2 นาที

Sothornvit และคณะ (2003) รายงานว่าแผ่นฟิล์ม โปรตีนเวย์ที่เติมน้ำเป็นพลาสติกไซเซออร์ (ที่ระดับ 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด) ที่ขึ้นรูปด้วยเทคนิคการอัดเบ้ามีลักษณะแข็งเปราะและไม่ละลายน้ำในขณะที่แผ่นฟิล์มโปรตีนเวย์ที่มีกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์ (ที่ระดับ 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด) มีความยืดหยุ่น โดยความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการขึ้นรูปฟิล์ม

Sothornvit และ Songtip (2012) เตรียมฟิล์มแป้งจากกล้วยและฟิล์มแป้งจากกล้วยที่ผ่านการตัดแปรที่ผสมกลีเซอรอล โดยใช้เทคนิคการอัดเบ้าร้อน กดอัดที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที แล้วให้ความดัน 5 MPa เป็นเวลา 3 นาที พบว่าฟิล์มแป้งจากกล้วยที่ผ่านการตัดแปรมีความสามารถในการละลายน้ำสูงกว่าฟิล์มแป้งจากกล้วย ในขณะที่มีค่าต้านทานแรงดึงขาดต่ำกว่า

2.3 สมบัติสำคัญของฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพ

2.3.1 สมบัติทางเคมีเชิงฟิสิกส์

2.3.1.1 ความหนา (Thickness) หมายถึง ระยะตั้งฉากระหว่างผิวหน้าทั้งสองของฟิล์ม มีหน่วยเป็น ไมโครเมตร หรือมิลลิเมตร ความหนาของฟิล์มจะมีส่วนสัมพันธ์กับสมบัติอื่น เช่น การต้านทานแรงดึงขาด อัตราการซึมผ่านของไอน้ำ เป็นต้น

2.3.1.2 อัตราการซึมผ่านไอน้ำ (Water vapor transmission rate) คือ ปริมาณไอน้ำที่ซึมผ่านจากผิวหน้าไปยังผิวอีกด้านหนึ่งต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวฟิล์ม ในระยะเวลาที่กำหนด และภายใต้สภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ มีหน่วยเป็น น้ำหนัก/พื้นที่×เวลา

เมื่อคำนวณอัตราการซึมผ่านของไอน้ำเปรียบเทียบกับผลต่างความดันไอของแต่ละด้านของฟิล์ม เรียกค่านี้ว่า Water vapor permeance และเมื่อคำนวณค่านี้ของฟิล์มที่ทดสอบผ่านความหนาของฟิล์ม เรียกค่านี้ว่า Water vapor permeability หรือความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำ (Guilbert, 1986)

2.3.1.3 อัตราการซึมผ่านก๊าซ (Gas transmission rate) คือ ปริมาณของก๊าซที่ซึมผ่านจากผิวหน้าไปยังผิวอีกด้านหนึ่งต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวฟิล์ม ในระยะเวลาที่กำหนด และภายใต้ผลต่างของความดัน มีหน่วยเป็น ปริมาตร/พื้นที่×เวลา โดยก๊าซที่ซึมผ่านได้ที่สำคัญ เช่น ก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซไนโตรเจน เป็นต้น ซึ่งก๊าซเหล่านี้เกี่ยวข้องกับอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และอัตราการหายใจของผลิตภัณฑ์ที่ห่อหุ้ม และเมื่อคำนวณหาอัตราการซึมผ่านของก๊าซผ่านความหนาของฟิล์มที่ใช้ทดสอบ เรียกว่า Gas permeability หรือความสามารถในการซึมผ่านของก๊าซผ่านฟิล์ม (Guilbert, 1986)

2.3.1.4 การละลายของฟิล์ม (Water solubility) คือ การคำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำหนักของฟิล์มแห้งหลังจากนำไปละลายน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักฟิล์มเริ่มต้นก่อนทำการละลาย (Gontard *et al.*, 1992)

2.3.2 สมบัติทางกล

2.3.2.1 ความต้านทานแรงดึงขาด (Tensile strength) คือ ความเค้นที่ใช้ในการดึงฟิล์มที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของแผ่นฟิล์มที่ทดสอบที่มีความกว้างคงที่ จนแผ่นฟิล์มนั้นขาดภายใต้สภาวะการทดสอบที่กำหนด มีหน่วยเป็น นิวตันต่อตารางเมตร การเติมพลาสติกไซเซอร์ลงไป ในโครงสร้างตาข่ายมีผลทำให้ความต้านทานแรงดึงขาดลดลง เมื่อเทียบกับฟิล์มที่ไม่ได้เติมพลาสติกไซเซอร์ (Guilbert, 1986)

2.3.2.2 การยืดตัว (Elongation) คือ ร้อยละของระยะทางที่ฟิล์มถูกยืดออกด้วยแรงดึงจนขาดต่อความยาวเดิม ถ้าความยืดของฟิล์มน้อย ฟิล์มมีลักษณะเปราะ ไม่ยืดหยุ่น การเติมพลาสติกไซเซอร์ทำให้ความแข็งแรงของพันธะระหว่างสายโซ่โมเลกุลลดลง แต่ส่งผลให้สายโซ่พอลิเมอร์เคลื่อนที่ได้มากขึ้น

3. พลาสติกไซเซอร์ (Plasticizer)

3.1 สมบัติและประเภทของพลาสติกไซเซอร์

พลาสติกไซเซอร์ ตามนิยามของ IUPAC หมายถึง สารที่เข้าไปรวมกับพอลิเมอร์แล้วช่วยเพิ่มความอ่อนตัว ความคงทนต่อการใช้งาน และการยืดตัว สมบัติของพลาสติกไซเซอร์ที่สำคัญ คือ ต้องรวมเป็นเนื้อเดียวกับพอลิเมอร์ที่ใช้ทำฟิล์ม โดยมีแรงระหว่างโมเลกุลทั้งสองคล้ายคลึงกัน มีจุดเดือดสูง ระเหยยาก ละลายในตัวทำละลายที่ใช้ได้ดี นอกจากนี้ควรจะไม่มีสี กลิ่น รส ไม่เป็นพิษ และไม่ติดไฟ พลาสติกไซเซอร์อาจแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. พลาสติกไซเซอร์ภายนอก (External plasticizer) เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ระเหยได้ยาก สามารถผสมรวมตัวเข้ากับพอลิเมอร์ได้ดี โดยจะแทรกตัวระหว่างสายโซ่โมเลกุล ทำให้อันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของพอลิเมอร์ลดลง สายโซ่พอลิเมอร์จึงเคลื่อนที่ได้ง่ายขึ้น (Pommet *et al.*, 2005; Sothornvit and Krochta, 2005)

2. พลาสติกไซเซอร์ภายใน (Internal plasticizer) เป็นสารที่เติมลงไปเพื่อทำหน้าที่เป็นสารร่วมช่วยในการเกิดพอลิเมอร์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของพอลิเมอร์ (Guilbert *et al.*, 1996)

3.2 ชนิดของพลาสติกไซเซอร์

ตัวอย่างของพลาสติกไซเซอร์ที่ใช้สำหรับเตรียมฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพ ได้แก่

3.2.1 พอลิออล (Polyols) หรือ พอลิไฮดรอกซีแอลกอฮอล์ เป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลหรือหมู่แอลดีไฮด์ถูกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล พอลิออลมีสมบัติคงทนต่อสารเคมี และความร้อนได้ดีจึงไม่สลายตัวง่าย สามารถดูดซับ เก็บความชื้น และละลายน้ำได้

Arvanitoyannis และคณะ (1998) เติมพอลิออลลงในฟิล์มที่เตรียมจากไคโตซานร่วมกับเจลาติน พบว่าพอลิออลช่วยลดความเปราะของฟิล์มและเพิ่มสมบัติในการต้านทานแรงดึง และความสามารถในการซึมผ่านของไอน้ำและก๊าซได้

Wu และคณะ (2010) เติมพอลิออลในฟิล์ม polyvinyl alcohol (PVA) พบว่า การเติมพอลิออลช่วยเพิ่มความสามารถในการยืดตัวและความแข็งแรงของฟิล์ม PVA ในขณะที่ส่งผลให้สมบัติการต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์ม PVA ลดลง

3.2.2 กลีเซอรอล (Glycerol) เป็นพอลิแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 3 อะตอม มีสูตรเคมี $C_3H_8O_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 92 มีสมบัติเป็นของเหลวที่มีความหนืด เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่น้ำมันสามารถละลายได้ดีพอสมควร ความชื้นจากอากาศได้ปานกลาง กลีเซอรอลเป็นพลาสติกไฮดรอกซีที่นิยมใช้มากที่สุดในการเตรียมฟิล์มจากพอลิเมอร์ชีวภาพ

Tong และคณะ (2008) เติมกลีเซอรอลในฟิล์มที่เตรียมจากพอลิเมอร์ผสมระหว่าง Pullulan, Alginate และ Carboxymethylcellulose พบว่าการเติมกลีเซอรอลลดการต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์ม เพิ่มค่าการยึดตัวจน จุดขาด ลดความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำ แต่เพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์ม

Piermaria และคณะ (2009) เติมกลีเซอรอลในฟิล์มที่เตรียมจาก Kefiran พบว่า ฟิล์มที่ไม่มีกลีเซอรอลมีลักษณะเปราะและแข็ง โดยมีค่ามอดูลัสยืดหยุ่น (Elastic modulus) และค่าการต้านทานแรงดึงขาดสูง และมีการเปลี่ยนรูปแบบยืดหยุ่นต่ำ การเติมกลีเซอรอลทำให้ค่าการยึดตัวสูงขึ้น และให้ความยืดหยุ่นใกล้เคียงกับฟิล์มจากพอลิเมอร์สังเคราะห์

Ghasemlou และคณะ (2011) เติมกลีเซอรอลในฟิล์มที่เตรียมจาก Kefiran พบว่าการเติมกลีเซอรอลทำให้ฟิล์ม Kefiran มีค่าต้านทานแรงดึงขาดต่ำ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าฟิล์มสังเคราะห์ เช่น LDPE, Polyester และ Cellophane แต่ส่งผลให้ฟิล์ม Kefiran มีค่าการยึดตัวเมื่อขาดสูงขึ้น ซึ่งมีค่าสูงกว่าฟิล์มสังเคราะห์ เช่น Polyester และ Cellophane นอกจากนี้การเติมกลีเซอรอลส่งผลให้ค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์ม Kefiran มีค่าเพิ่มขึ้น

Matta และคณะ (2011) เติมกลีเซอรอลในฟิล์มที่เตรียมจากแป้งถั่วเขียวร่วมกับ Xanthan gum พบว่าการเติมกลีเซอรอลทำให้ความสามารถในการเกิดผลึกของฟิล์มลดลง และส่งผลต่อสมบัติทางกลของฟิล์ม คือ ทำให้ฟิล์มมีค่าต้านทานแรงดึงขาดลดลง แต่มีค่าการยึดตัวเมื่อขาดสูงขึ้น

3.2.3 ซอร์บิทอล (Sorbitol) เป็นพอลิแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 6 อะตอม น้ำหนักโมเลกุล 182 ซอร์บิทอลละลายน้ำได้ดี สารละลายที่ได้มีความหนืดต่ำ เป็นสารละลายน้ำมันที่ไม่ดี เมื่อใช้ความเข้มข้นของซอร์บิทอล 30 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ สามารถรักษาความชื้นและคงลักษณะของความยืดหยุ่นของฟิล์มไว้ได้

Ryu และคณะ (2002) ศึกษาผลของพลาสติกไฮดรอกซี 2 ชนิด คือ กลีเซอรอล และซอร์บิทอล ต่อสมบัติของฟิล์มจากแป้ง High-amylose corn พบว่าค่าการซึมผ่านไอน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลเพิ่มขึ้น แต่ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน พบว่าค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มที่เติมซอร์บิทอลมีค่าต่ำกว่ากลีเซอรอล ซึ่งค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มที่เติมพลาสติกไฮดรอกซีทั้งสองชนิดอยู่ในช่วง 11.7×10^{-9} - 14.7×10^{-9} g/m² s Pa

Srinivasa และคณะ (2007) ศึกษาผลของพลาสติกไฮดรอกซี 3 ชนิด คือ กลีเซอรอล ซอร์บิทอล และพอลิเอธิลีนไกลคอล ต่อสมบัติของฟิล์มไคโตซาน พบว่าค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มไคโตซานมีค่าลดลงเมื่อเติมกลีเซอรอล แต่มีค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มเพิ่มขึ้นเมื่อเติมซอร์บิทอล และพอลิเอธิลีนไกลคอล นอกจากนี้การ

เติมพลาสติกไซเซอรส์ทั้ง 3 ชนิด ส่งผลให้ค่าต้านทานแรงดึงขาดของฟิล์มลดลง แต่ค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น

Ehivet และคณะ (2011) ศึกษาผลของพลาสติกไซเซอรส์ 4 ชนิด คือ ซูโครส กลีเซอรอล ซอร์บิทอล และพอลิเอธิลีนไกลคอล ต่อสมบัติของฟิล์มแป้งมันเทศ พบว่าการเติมซอร์บิทอลในฟิล์มแป้งมันเทศส่งผลให้ฟิล์มมีสมบัติที่ดีที่สุด คือ มีค่าต้านทานแรงดึงขาด ค่าการยืดตัวเมื่อขาด และการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มมีค่าเท่ากับ 7.96 MPa, 77.92 เปอร์เซ็นต์ และ 0.212 g/ms Pa ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับพลาสติกไซเซอรส์ชนิดอื่นๆ

4. การใช้ประโยชน์ของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ในการผลิตฟิล์ม

ปัจจุบันมีการนำเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น โดยนำเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์มาใช้เป็นตัวดูดซับทางชีวภาพ และนำส่งยา เป็นต้น (Bender *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1997; Sutherland, 1998)

เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ เด็กซ์แทรน (Dextran), แซนแทน (Xanthan), เจลแลน (Gellan), พุลลูลาน (Pullulan), กลูแคนจากยีสต์ (Yeast glucan) และอัลจินเตจากแบคทีเรีย (Bacterial alginate) (De Vuyst and Degeest, 1999) มีการนำแซนแทนที่ผลิตโดย *Xan. campestris* (Garciagaribay and Marshall, 1991) และเจลแลนที่ผลิตโดย *Pseu. elodea* เดิมลงในอาหารเพื่อปรับปรุงลักษณะปรากฏของอาหารหลายชนิด (Matsukawa and Watanable, 2007)

Peirmaria และคณะ (2009) เตรียมฟิล์มจาก Kefiran ซึ่งเป็นเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ใน Kefir grain พบว่า Kefiran สามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์มได้ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ถึง 10 กรัมต่อกิโลกรัม และพบว่าการขึ้นฟิล์มโดยใช้ Kefiran ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อกิโลกรัม สามารถลอกฟิล์มออกจากเบ้าได้ง่ายที่สุด ฟิล์ม Kefiran สามารถละลายน้ำได้โดยความสามารถในการละลายขึ้นกับอุณหภูมิ

Freitas และคณะ (2009) ศึกษาลักษณะของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจาก *Pseu. oleovorans* NRRL B-14682 โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบหลัก มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเท่ากับ 1×10^6 ถึง 5×10^6 และพบว่าเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ยังมีสมบัติทำให้เกิดอิมัลชันและสามารถขึ้นรูปเป็นฟิล์ม (ไม่เติมพลาสติกไซเซอรส์) ได้

Alves และ คณะ (2011) เตรียมฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) ที่ผลิตจาก *Pseu. oleovorans* NRRLB-14682 พบว่า EPS สามารถขึ้นรูปฟิล์มได้ โดยฟิล์ม EPS ที่ได้มีลักษณะโปร่งใส ไม่ค่อยมีความยืดหยุ่น ทั้งนี้เนื่องมาจากมีค่าการยืดตัวเมื่อขาดต่ำ และมีค่ามอดูลัสสูง ในขณะที่ฟิล์มมีค่าการซึมผ่านไอน้ำสูง แต่มีค่าการซึมผ่านของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำ

Ghasemlou และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตและสมบัติของฟิล์ม Kefiran ซึ่งเป็นเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ใน Kefir grain ร่วมกับพลาสติกไซเซออร์ 2 ชนิด คือ กลีเซอรอล และซอร์บิทอล พบว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์ให้สมบัติของฟิล์มดีกว่าซอร์บิทอล และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอล ส่งผลให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่น และมีค่าการซึมผ่านไอน้ำสูงขึ้น แต่มีค่าต้านทานแรงดึงขาดลดลง

Piermaria และคณะ (2011) ศึกษาสมบัติของฟิล์ม Kefiran ซึ่งเป็นเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ใน Kefir grain ร่วมกับพลาสติกไซเซออร์ 2 ชนิด คือ น้ำตาล (กลูโคส, กาแลคโตส และซูโคส) และพอลิออล (กลีเซอรอล และซอร์บิทอล) พบว่าการเติมพลาสติกไซเซออร์ส่งผลให้สมบัติของฟิล์มดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่มีการเติมพลาสติกไซเซออร์ (มีลักษณะเปราะและแข็ง) ซึ่งฟิล์ม Kefiran ที่มีการเติมกลูโคสเป็นพลาสติกไซเซออร์ให้ค่าการซึมผ่านไอน้ำต่ำที่สุด ในขณะที่ฟิล์ม Kefiran ที่มีการเติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์ให้สมบัติทางกลดีที่สุด

ปัจจุบันวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตบรรจุภัณฑ์ เช่น ฟิล์ม ใข้วัตถุดิบที่ย่อยสลายได้ยากจึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลกระทบต่อภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตบรรจุภัณฑ์ชีวภาพ ที่สามารถรับประทานและ/หรือย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Garcia *et al.*, 1998; Sorrentino *et al.*, 2007)

5. การเน่าเสียของอาหาร

การเน่าเสียของอาหาร คือ การที่อาหารมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นทั้งทางเคมีและทางกายภาพทำให้อาหารมีกลิ่น รสชาติ สี และลักษณะเนื้อสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไป (ปริยา วิบูลเศรษฐ์, 2540) การเน่าเสียหรือการเสื่อมสภาพของอาหารมีด้วยกัน 3 แบบ ได้แก่ (1) การเน่าเสียทางกายภาพ เช่น การเหี่ยวเนื่องจากการสูญเสียน้ำ การช้ำของผลไม้ (2) การเน่าเสียทางเคมี เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) การเกิดปฏิกิริยาบราว닝 (Browning reaction) การย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) และ (3) การเน่าเสียโดยจุลินทรีย์ เป็นต้น

จุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับอาหารเมื่อมีการปนเปื้อนมาในอาหาร จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารหรือบางชนิดไม่สามารถเจริญได้แต่ไม่ตาย การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ทำให้อาหารเน่าเสียและเกิดโรคอาหารเป็นพิษ จุลินทรีย์ที่มีบทบาทดังกล่าวนี้ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ (บุษกร อุดรภิชาติ, 2547) อาหารประเภทต่างๆ เช่น อาหารทะเล เนื้อสัตว์ ไข่ นม สามารถเกิดการเสื่อมเสียได้จากแบคทีเรียหลายชนิดด้วยกัน เช่น *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus* และ *Streptococcus* ผักและผลไม้สามารถเกิดการเสื่อมเสียได้จากแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น *Erwinia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Botrytis* และ *Penicillium* อาหารกระป๋องส่วนใหญ่มักเกิดการเสื่อมเสียจาก *Clostridium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงและสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีก๊าซออกซิเจน ยีสต์เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถเจริญได้ดีในน้ำผลไม้ แยม ผลไม้แห้ง เช่น *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* และ

Hansenula ทำให้เกิดกลิ่นหมักในอาหาร มีเมือกและฝ้าเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าอาหาร เกิดฟองก๊าซหรือความขุ่นในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ในกรณีของเชื้อรา เช่น *Penicillium* นอกจากเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารแห้ง ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และผักผลไม้เกิดการเน่าเสีย มีสีและกลิ่นผิดปกติแล้ว ยังสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ได้อีกด้วย เชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความชื้นเพียงเล็กน้อยและในสภาพที่ค่อนข้างเป็นกรด ทำให้เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดปัญหาทางอุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมาก (ปรีชา วิบูลเศรษฐ์, 2540)

5.1 แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในอาหาร

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์พวกโพรคาริโอต (Prokaryote) จึงไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear membrane) แบคทีเรียมีขนาดเล็กมากจึงมองไม่เห็นด้วยตาเปล่า โดยมีขนาดตั้งแต่ 0.5-5 ไมโครเมตร หรือบางชนิดอาจใหญ่กว่านี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติรวมทั้งในอาหาร และทำให้อาหารหลายชนิด เช่น ผัก ผลไม้ แป้ง ไข่ นม และเนื้อสัตว์เกิดการเน่าเสีย แบคทีเรียบางชนิดก่อโรคโดยการสร้างสารพิษในอาหาร เช่น สารพิษของเชื้อ *S. aureus* เป็นต้น ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีความสำคัญและพบได้ทั่วไปในอาหาร ได้แก่ *Bacillus*, *Escherichia*, *Listeria* และ *Staphylococcus* ซึ่งมีรายละเอียดของแบคทีเรียแต่ละชนิดดังนี้

5.1.1 *Bacillus*

เซลล์มีรูปร่างท่อน ดิสแกรมบวกแต่เมื่อมีอายุมากขึ้นจะดิสแกรมผันแปร (Gram variable) เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เป็นเชื้อที่สร้างเอนโดสปอร์ (Endospore) ที่ทนความร้อนสูงและความแห้งได้ดี เชื้อ *Bacillus* ส่วนใหญ่ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิ 35-75 องศาเซลเซียส เป็นเชื้อที่มีบทบาทสำคัญในอาหาร มักพบเชื้อนี้ในอาหารหลายชนิด เช่น กล้วยพืชและผลิตภัณฑ์ (สุมนทาว วัฒนสินธุ์, 2545) เชื้อบางชนิดสามารถสร้างสารพิษก่อโรคทางเดินอาหารได้ เช่น *B. cereus* ซึ่งสามารถเจริญได้ในข้าว ผลิตภัณฑ์อาหารจำพวกแป้งที่มีความชื้นสูงและผลิตภัณฑ์เนื้อ การสร้างสารพิษของเชื้อ *B. cereus* จะเกิดขึ้นเมื่อปริมาณเชื้อมากกว่า 10^5 เซลล์ต่ออาหาร 1 กรัม สารพิษถูกทำลายด้วยความร้อนอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีนเนส (Protinase) ทำให้อาหารจำพวกโปรตีนเน่าเสียได้

5.1.2 *Escherichia*

Escherichia จัดเป็นแบคทีเรียในตระกูล Enterobacteriaceae (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น แกรมลบ สามารถสร้างสารสี (Pigments) เช่น สีเหลือง ส้ม แดง เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เป็นเชื้อที่ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 30 องศาเซลเซียส พบทั่วไปตามธรรมชาติในอาหารประเภทผัก นม และเป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อหมู (Lee et al., 2004) *E. coli* ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ การเจริญต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe มีถิ่นที่อยู่ในลำไส้ของมนุษย์ สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์ปีก *E. coli* จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม (Coliform bacteria) ซึ่งใช้เป็นจุลินทรีย์ดัชนี

(Index microorganisms) ป่งชี้การปนเปื้อนของอุจจาระในอาหารเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normol flora) ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์เลื้อยคุ่น อาหารที่ตรวจพบเชื้อโคลิฟอร์ม แสดงว่าอาหารนั้นไม่สะอาด อาจมีสิ่งโสโครก เช่น อุจจาระลงไปปะปน และอาจมีเชื้อโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารอาหารเจริญในอาหารนั้น ทำให้ไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค

5.1.3 *Listeria*

Listeria เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้น เมื่อมีอายุน้อยจะติดสีแกรมบวก แต่เมื่อมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ แต่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ได้ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ พบได้ในนม เนื้อไก่ อาหารทะเล และน้ำ เป็นเชื้อก่อโรคในคนได้ (Rojas *et al.*, 2007) เช่น เชื้อ *Lis. monocytogenes* ก่อโรคอาหารเป็นพิษหรือโรค Listeriosis (McLauchlin *et al.*, 2004) เกิดจากการรับประทานอาหารที่ทำจากเนื้อสัตว์และพืชที่มีเชื้อชนิดนี้เข้าไปทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารและอาจรุนแรงจนถึงขั้นเสียชีวิต *Lis. monocytogenes* สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้ในอาหารแช่เย็น (Trivedi *et al.*, 2008) แม้ว่าจะมีการปนเปื้อนเพียงเล็กน้อย สามารถพบเชื้อชนิดนี้ได้ทั่วไปในสภาพแวดล้อม เช่น ดิน น้ำ สิ่งโสโครก ซากพืช และจากลำไส้ของสัตว์เลี้ยงรวมทั้งสัตว์ปีกต่างๆ มีการตรวจพบในอาหารที่ปรุงไม่สุก เช่น นม ไข่ อาหารทะเลต่างๆ รวมทั้งปลา พืชผักชนิดหัว โดยเฉพาะมันฝรั่ง หัวผักกาดขาว อาจพบเชื้อนี้ในอาหารที่ผ่านความร้อนแล้ว เช่น นมและผลิตภัณฑ์นมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์แล้ว รวมทั้งเนื้อปรุงสำเร็จ เป็นต้น

5.1.4 *Staphylococcus*

Staphylococcus จัดอยู่ในตระกูล Micrococcaceae (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ, 2547) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ อาจใช้คาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิดโดยเฉพาะในสภาพที่มีออกซิเจน สร้างกรดแต่ไม่สร้างก๊าซภายใต้สภาพที่ไม่มีออกซิเจน มีการสร้างเอนไซม์และสารพิษที่ขับออกนอกเซลล์ ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 40-45 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 7-47.8 องศาเซลเซียส (Smith *et al.*, 1983) ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 7.0-7.5 ค่าพีเอชที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 4.2-9.3 พบตามผิวหนัง รูขุมขน และตามเยื่อบุของสัตว์เลื้อยคุ่น มีหลายสายพันธุ์ที่เป็นเชื้อโรค เช่น *S. aureus* จะก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร โดยสร้างสารพิษออกมา เมื่อมีผู้รับประทานอาหารที่มีสารพิษนั้นโดยไม่จำเป็นต้องได้รับเชื้อเข้าไปจะทำให้มีอาการป่วยได้

เนื่องจาก *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามส่วนต่างๆของร่างกายมนุษย์ เช่น จมูก มือ แผลเรื้อรัง ผิวหนัง รวมทั้งบนเสื้อผ้า อากาศ และฝุ่นละออง (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2542) จึงมีโอกาสที่แบคทีเรียชนิดนี้จะแพร่จากมนุษย์และสัตว์ลงสู่อาหารได้ การปนเปื้อนในอาหารมาจากการไอ จาม หรือการได้รับเชื้อจากผิวหนัง หรือได้รับเชื้อจากอาหารภายหลังผ่านการพาสเจอร์ไรส์ อาหารที่ไม่ผ่านการหุงต้มหรืออาหารสุกๆ ดิบๆ สารพิษที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้สามารถทนความร้อนได้ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที และ 143.3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วินาที สารพิษที่

ผลิตจากเชื้อชนิดนี้ไม่ทำให้รูปสัมผัสของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไปเป็น เวลาประมาณ 1-6 ชั่วโมง จะมีอาการเป็นพิษเกิดขึ้น เนื่องจากสารพิษไปออกฤทธิ์ที่เยื่อลำไส้ทำให้เกิดอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง และท้องเดิน (Evenson *et al.*, 1988) อาหารที่พบเชื้อนี้ คือ อาหารที่ทำด้วยแป้ง ขนมอบบี้ที่มี คริมหรือคัสตาร์ด ขนมอบหวานต่างๆ แสม เนื้อสัตว์ และสัตว์ปีก เป็นต้น

5.2 การเน่าเสียของเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์มีพีเอช (pH) Water activity (a_w) และสารอาหารเหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดจึง เน่าเสียได้ง่าย โดยเฉพาะบริเวณผิวหนังของเนื้อจะเน่าเสียก่อนส่วนอื่นเนื่องจากแบคทีเรียที่ต้องการอากาศเป็นสำคัญ เนื้อก้อน โตการเน่าเสียภายในจะเกิดที่บริเวณรอบๆ กระดูกก่อน ทำให้เนื้อเปื่อยว แแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุได้แก่ แแบคทีเรียในจีส *Clostridium* และ *Enterococcus* ส่วนเนื้อที่หั่นเป็นชิ้นๆ การเน่าเสียมักเกิดบริเวณผิวหนังของชิ้น เนื้อ เมื่อเนื้อเริ่มเน่าเสีย บริเวณผิวจะลื่นเพราะเกิดเมือกขึ้น โดยเนื้อจะเริ่มมีกลิ่นผิดปกติ เมื่อตรวจจะพบจุลินทรีย์ที่ ต้องการอากาศบนผิวหนังได้ประมาณ $7 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ ถึง $7.5 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ และเนื้อเริ่มจะเกิดเมือกเมื่อตรวจนับ จุลินทรีย์บนผิวหนังได้ $7.5 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ ถึง $8 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$ การเกิดเมือกบนเนื้อสดเป็นปัญหาการเน่าเสียของเนื้อที่ เกือบในตู้เย็นมากที่สุด ลักษณะนี้เรียกว่าเกิด Biofilm ขึ้น (Parsek *et al.*, 2008)

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญให้เนื้อสัตว์เน่าเสีย เช่น *Pseudomonas* (Coates *et al.*, 1995) ซึ่งสามารถ ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์ได้ที่อุณหภูมิต่ำ และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *Pseu. fluorescens* แแบคทีเรียพวกนี้จึงมีบทบาทสำคัญในการทำให้เนื้อสัตว์ที่เก็บที่อุณหภูมิต่ำเกิดการเน่าเสีย (Lebert *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการสร้างสารเมือกที่บริเวณผิวหนังอาหาร เช่น การเกิดเมือกที่ผิวหนังเนื้อที่เก็บใน สภาพมีออกซิเจน และเก็บไว้ในที่มีความชื้นสูง อุณหภูมิต่ำ

Sakala และคณะ (2002) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของเนื้อวัว แช่เย็นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบแบคทีเรียทั้งหมด 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bro. thermosphacta*, *Car. divergens*, *Car. piscicola*, *Lb. algidus*, *Lactobacillus* sp., *Lac. piscium*, *Leu. gelidum*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* และ *Psychrobacter* โดย เชื้อ *Leu. gelidum*, *Lac. piscium* และ *Lb. algidus* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจาก 5×10^3 CFU/g เป็น 10^8 CFU/g ในช่วง 3 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา ในขณะที่เชื้อ *Car. divergens* และ *Car. piscicola* จะมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5×10^7 CFU/g หลังการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ ส่วนเชื้อ *Bro. thermosphacta* สามารถตรวจพบในช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา เท่านั้น ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 7×10^5 CFU/g

Olsson และคณะ (2003) เปรียบเทียบสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของเนื้อหมู ก่อนและหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) พบว่าเนื้อหมูก่อนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบแบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่

Acinetobacter, *Staphylococcus* และ *Macrocococcus* และหลังจากเก็บรักษาเนื้อหมูที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สามารถตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas*, *Aeromonas* และ *Acinetobacter*

Ercolini และคณะ (2006) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เนื้อวัวเกิดการเน่าเสียกับการเก็บรักษาเนื้อวัวในสภาวะต่างๆ 3 สภาวะ ได้แก่ (1) มีอากาศ (MAP1) (2) มี O₂ 60 และ CO₂ 40 เปอร์เซ็นต์ (MAP2) และ มี O₂ 20 และ CO₂ 40 เปอร์เซ็นต์ (MAP3) โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) และการตรวจนับเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *R. aquatilis*, *Rahnella* spp., *Pseudomonas* spp., และ *Car. divergens* ในสภาวะการเก็บรักษาแบบ MAP1 และตรวจพบเชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Lb. sakei* ในสภาวะการเก็บรักษาแบบ MAP2 ในขณะที่ตรวจพบเชื้อ *Rahnella* spp. และ *Lb. sakei* ในสภาวะการเก็บรักษาแบบ MAP3

Li และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของเนื้อหมูแช่เย็นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 4 และ 7 วัน โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE พบว่าในวันที่ 7 ความหลากหลายของแบคทีเรียลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 2 โดยพบแบคทีเรียทั้งหมด 9 สายพันธุ์ คือ *Arthrobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Moraxella* sp., *Pseudomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Bro. thermosphacta* และแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย คือ *Pseudomonas* sp. และ *Bro. thermosphacta*

Liu และคณะ (2006) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูเกิดการเน่าเสียกับการเก็บรักษาเนื้อหมูที่สภาวะต่างๆ พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ *Bro. thermosphacta* และ Coliforms ในทุกสภาวะที่เก็บรักษาเนื้อหมู คือ -2, 4 และ 10 องศาเซลเซียส มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่ *Pseudomonas* จะเจริญในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น เพราะเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดย *Bro. thermosphacta*, *Pseudomonas* และ Coliforms จะมีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอากาศในการเก็บรักษาเนื้อหมู

Jiang และคณะ (2011) ศึกษาแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการเน่าเสียของเนื้อหมูแช่เย็นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE และ Real-time PCR พบว่าการใช้เทคนิคทั้ง 2 เทคนิค สามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย

Pennacchia และคณะ (2011) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เนื้อวัวแช่เย็นเกิดการเน่าเสียกับการเก็บรักษาเนื้อวัวที่สภาวะต่างๆ (มีอากาศและระบบสุญญากาศ) โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE และการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทั้งหมดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (Bulk cells extraction) พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* spp., *Car.*

divergens, *Bro. thermosphacta*, *Rahnella* spp. และ *Ser. grimesii* ในวันที่ 0 ของการเก็บรักษา และผลจากการสกัด DNA จากเนื้อวุ้นโดยตรงกับการสกัด DNA จากตัวเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์แตกต่างกัน คือ สามารถตรวจพบเชื้อ *Photobacterium* spp. จากการสกัด DNA จากเนื้อวุ้นโดยตรง ในขณะที่ตรวจพบเชื้อ *Ser. grimesii*, *Rahnella* spp. และ *Leuconostoc* spp. จากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อทั้งหมดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การเก็บรักษาเนื้อวุ้นแช่เย็นในระบบสุญญากาศส่งผลให้ปริมาณเชื้อ *Bro. thermosphacta*, *Pseudomonas* spp. และ Enterobacteriaceae มีปริมาณลดลง แต่ไม่ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก

6. สารยับยั้งจุลินทรีย์

ผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่เกิดการเสื่อมคุณภาพภายหลังกระบวนการเก็บเกี่ยว และก่อนการเก็บรักษาเนื่องจากอาหารนั้นมิได้มีการนำมาแปรรูปเพื่อทำลายจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมา หรือทำลายปฏิกิริยาทางเคมีที่มีอยู่ในอาหารนั้นๆ ด้วยกรรมวิธีที่ถูกต้องเสียก่อน หรือมิได้ใช้ภาชนะบรรจุและวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสมกับอาหารชนิดนั้นๆ เมื่อมีการเก็บอาหารนั้นไว้เป็นเวลานานจึงทำให้อาหารนั้นเสื่อมคุณภาพหรือเน่าเสียได้ ซึ่งลักษณะการเสื่อมคุณภาพหรือเน่าเสียของอาหารแสดงให้เห็นจากการที่อาหารมีกลิ่น รส ลักษณะเนื้อสัมผัส หรือลักษณะปรากฏของอาหารผิดปกติไป เนื่องจากการเน่าเสียของอาหารส่วนใหญ่มักเกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร การใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดการเน่าเสียของอาหารจากจุลินทรีย์ได้ สารยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial agents) เป็นสารประกอบเคมีหรือของผสมของสารประกอบเคมีที่ใช้เติมลงในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อชะลอการเน่าเสียหรือช่วยยืดอายุการเก็บของอาหาร หรือเพื่อยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร (ศิวาพร ศิวเวช , 2546)

Table 1. Potential antimicrobial agents for antimicrobial food packaging systems.

Classes	Antimicrobial agents
Organic acids	Acetic acid, benzoic acids, lactic acid, citric acid, malic acid, propionic acid
Acid salts	Potassium sorbate, sodium benzoate
Acid anhydrides	Sorbic anhydride, benzoic anhydride
Para benzoic acids	Propyl paraben, methyl paraben, ethyl paraben
Alcohol	Ethanol
Bacteriocins	Nisin, pediocin, subtilin, lacticin
Fatty acids	Lauric acid, palmitoleic acid
Fatty acid esters	Glycerol mono-laurate
Chelating agents	EDTA, citrate, lactoferrin
Enzymes	Lysozyme, glucose oxidase, lactoperoxidase
Metals	Silver, copper, zirconium
Antioxidant Antibiotic	BHA, BHT, TBHQ, irons salts
Fungicides	Natamycin
Sanitizing gas	Benomyl, imazalil, sulfur dioxide, ozone, chlorine dioxide, carbon dioxide Cetyl pyridinium chloride, acidified NaCl, triclosan
Sanitizers	Chitosan
Polysaccharide	Catechin, cresol, hydroquinone
Phenolics	Cinnamaldehyde, eugenol, linalool, terpineol, thymol, carvacrol, pinene
Plant volatiles	Grape seed extract, grapefruit seed extract, hop beta acid, brassica erucic
Plant/ spice extracts	acid oil, rosemary oil, oregano oil, basil oil, other herb/spice extracts
Probiotics	Lactic acid bacteria

ที่มา: Han (2005)

สารยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถนำมาเติมลงในวัสดุทางการบรรจุหรือบรรจุภัณฑ์อาหารเพื่อสร้างระบบบรรจุยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้น Table 1 แสดงตัวอย่างสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยแบ่งแยกประเภทตามกลุ่มต่างๆ สารยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มสารสังเคราะห์ที่ได้รับความนิยมนำมาใช้มากที่สุดได้แก่ กรดอินทรีย์ และสารฆ่ารา เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับราคาต่อหน่วย แต่เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคนิยมบริโภคอาหารที่มีส่วนประกอบจากวัตถุดิบจากธรรมชาติ ทำให้การนำสารยับยั้งจุลินทรีย์สังเคราะห์มา

ใช้ในอาหารมีการเปลี่ยนแปลงในอัตราที่ลดลง และเริ่มหันมานิยมใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติมากขึ้น (Davidson, 1997) เช่น สารยับยั้งจุลินทรีย์จากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ แบคทีริโอซิน (Bacteriocin) หรือ เอนไซม์ การนำสารยับยั้งจุลินทรีย์มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ยา เครื่องสำอางและบรรจุภัณฑ์ ต้องได้รับการอนุญาต และเป็นไปตามข้อกำหนดตามกฎหมายของแต่ละประเทศในการจำกัดปริมาณการใช้เพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เช่น สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทยกำหนดปริมาณการใช้ในจีนเป็นวัตต์กันเสียในอาหารไม่เกิน 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หรือไม่เกิน 255 ppm ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งซึ่งกำหนดโดย U.S. FDA (U.S. food and drug administration) สำหรับไทมอลและยูจีนอลได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) ให้สามารถใช้ในอาหารได้ แต่ยังไม่มีการกำหนดปริมาณการใช้โดย U.S. FDA (Burt, 2004) สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบว่ามีให้นำมาใช้ในทางการค้ากับอาหารประเภทต่างๆ แสดงใน Table 2

สารยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับกลไกการทำงานของสารและสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ สารยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดแสดงการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ในขณะที่บางชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากสารยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน การใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์มากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกันอาจแสดงลักษณะการเสริมฤทธิ์ซึ่งกันและกันได้ ดังนั้นการเลือกชนิดและปริมาณของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอัตราส่วนที่เหมาะสมอาจเพิ่มความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ให้สูงขึ้นได้ (Han, 2003)

7. สารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติและการประยุกต์ใช้ในฟิล์มและบรรจุภัณฑ์

สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในปัจจุบันมีอยู่มากมาย มักใช้กันในอาหาร ยารักษาโรค และเครื่องสำอาง โดยแหล่งของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์บางชนิด (Davidson and Zivanovic, 2003) สารยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อแตกต่างกันจึงส่งผลต่อจุลินทรีย์ไม่เหมือนกัน ไม่มีสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใดที่สามารถต่อต้านจุลินทรีย์ได้ทุกชนิด จึงควรเลือกสารยับยั้งจุลินทรีย์ให้เหมาะสมต่อเชื้อเป้าหมายที่ต้องการยับยั้ง สิ่งสำคัญที่ควรพิจารณา คือ ชนิดเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย และลักษณะกลไกการทำงานของต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ (Han, 2003) ตัวอย่างสารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีการศึกษาและนำไปใช้ในการยับยั้งเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด ดังนี้

Table 2. Antimicrobial agents for preservation and shelf-life extension of foods.

Antimicrobials	Meat/poultry	Dairy	Seafood	Product	Bakery	Beverage	Minimally processed
Organic acids and their salts	Fresh meat	Cheese		Fruits		Fruit	Precut salad
	Sausage			Vegetable		juice	Noodles
	Ham			Jam/jelly		Wine	Pasta
	Chicken						Steamed rice
Ethanol			Fish		Bread		Noodles
			Shellfish		Cake		Pasta
					Cookies		Sandwiches
Bacteriocins	Fresh meat	Cheese	Fish	Nuts			Ham/Egg-
	Sausage		Shellfish				Sandwiches
	Ham						
	Chicken						
Enzymes	Fresh meat	Cheese	Fish				Ham/Egg-
	Sausage		Shellfish			sandwiches	
	Ham					Meatball	
	Chicken					pasta	
Chelating Agent	Fresh meat	Cheese	Fish	Fruits		Fruit	Precut fruits
	Sausage		Shellfish	Jam/jelly		juice	Sauce
Fungicides	Ham			Citrus			
	Chicken			Berries			
				Nuts			
Sanitizers	Fresh meat		Fish	Fruits			Precut salad
	Chicken		Shellfish	Vegetables			

ที่มา: Han (2005)

Table 2. (Cont.)

Antimicrobials	Meat/poultry	Dairy	Seafood	Product	Bakery	Beverage	Minimally processed
Volatile essential oils	Fresh and processed meats	Shredded cheese	Fish	Berries	Bread	Fruit juice	Noodle
	Ground beef		Dried fish	Nuts	Cakes		Pasta
	Chicken			Jam/ jelly	Cookies		Steamed rice
	Nugget						Sandwiches
							Hamburgers
Spices	Fresh and processed meats	Cheese	Fish			Fruit juice	Noodle
	Fresh and cooked chicken		Shellfish				Pasta
			Dried				Steamed rice
			Fish				Sandwiches
Probiotics	Fresh and processed meats	Cheese Yogurt		Fermented			Deli mix
	Cured meat			Vegetables			
Oxygen scavengers	Fresh and processed meats	Shredded cheese	Dried fish	Nuts	Bread	Fruit Juice Wine	Noodles
	Ground beef			Jam/jelly	Cakes		Pasta
	Dried meats				Cookies		Steamed rice
	Chicken						Sandwiches
							Sauce
					Hamburgers		

ที่มา: Han (2005)

7.1 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการสร้างสารที่มีผลในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ หลายชนิด จากกระบวนการหมักโดยลดปริมาณคาร์โบไฮเดรต ทำให้เกิดกรดอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก และสารอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์, ไดอะซีทิล (Diacetyl) และสารโมเลกุลต่ำ เช่น Reuterin, Reutericyclin, 2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid และแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งแบคเทอริโอซินเป็นสารประเภทโปรตีนมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้นๆ (สุริย์รัตน์ เภสัชกร, 2545; Ouwehand and Vesterlund, 2004)

ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ ไนซิน เป็นสารประกอบพอลิเปปไทด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lac. lactis* spp. *lactis* บางสายพันธุ์ กระบวนการสังเคราะห์ไนซินเริ่มต้นจากเปปไทด์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบด้วยการ Dehydration ของ Serine และ Threonine ไปเป็นกรด Didehydroalanine และ Didehydroaminobutyric จากนั้นมีการเติมหมู่ Cysteine sulfhydryl แบบ Stereospecific เพื่อสร้างพันธะคู่ที่ตำแหน่งอัลฟาและเบต้า (α , β -double bond) โดยอยู่ในรูปของกรดอะมิโนที่มี Thioether เช่น Lanthionine และ β -methylanthionine แต่ไม่มีความคงตัวจึงเปลี่ยนไปอยู่ในรูปวงแหวน 5 เหลี่ยมซึ่งเป็นโครงสร้างสุดท้าย จากนั้นเคลื่อนตัวออกจากเซลล์ที่ตำแหน่ง C-terminal leader peptide แล้วถูกตัดแยกออกสุดท้ายเป็น Mature nisin หลุดออกนอกเซลล์ (Adams, 2003) ซึ่งไนซินมีสมบัติเป็นกรด มีความคงตัวและละลายได้ดีในสารละลายที่เป็นกรด ความสามารถในการละลายที่พีเอช 2.2 คือ 56 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายได้ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอชเท่ากับ 5.0 และละลายได้เพียง 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ที่พีเอชเท่ากับ 11 สำหรับความคงตัวต่อความร้อนของไนซินนั้น สารละลายไนซินที่มีค่าพีเอชต่ำจะทนความร้อนได้ดีกว่าสารละลายไนซินที่มีค่าพีเอชสูง สารละลายไนซินที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 จะคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 115.6 องศาเซลเซียส ในขณะที่สารละลายที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 5 จะมีประสิทธิภาพลดลงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิเดียวกันและจะลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.8 ส่วนการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทโปรตีนนั้น พบว่า สามารถช่วยป้องกันการเสื่อมประสิทธิภาพของไนซินได้ (สิวพร สิ่วเวช, 2546) ในกลุ่มของสารต่อต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ ไนซินได้รับความนิยมมากที่สุดในการนำมาใช้เป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์เติมแต่งในบรรจุภัณฑ์ประเภทฟิล์ม เนื่องจากมีความปลอดภัยและถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme) ในร่างกายมนุษย์ (Lee, 2005)

ไนซินทำหน้าที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น กลไกการทำงานของไนซิน คือ การเข้าทำปฏิกิริยาแล้วจัดเรียงทำให้เกิดรูตรงตำแหน่งเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไวต่อไนซิน ทำให้ Proton motive force เสียไปและเกิดการไหลของส่วนประกอบอื่นๆ ในเซลล์ เป็นเหตุให้การควบคุมสารผ่านเข้า-ออกเมมเบรนของเซลล์ทำงานบกพร่องจนกระทั่งเซลล์ตาย แต่ไนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบไม่ยอมให้สารโมเลกุลสูงกว่า 700 ดาลตัน ผ่าน ซึ่งไนซินมีขนาดโมเลกุลถึง 3353 ดาลตัน ดังนั้น

จึงไม่สามารถผ่านเข้าไปทำงานได้และในจีนยังไม่มีผลในการยับยั้งยีสต์และราอีกด้วย (Adams, 2003) นอกจากนี้มีการศึกษาการนำในจีนมาผสมกับพอลิเมอร์หลายชนิดเพื่อพัฒนาเป็นฟิล์มยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ไคโตซาน (Chitosan) โซเดียมอัลจิเนต (Na-alginate) คาราจีแนน (Kcarrageenan) กลูโคแมนแนนผสมไคโตซาน Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), Methylcellulose (MC), โปรตีนถั่วเหลือง และโปรตีนข้าวโพด เป็นต้น (Padgett *et al.*, 1998; Coma *et al.*, 2001; Cha *et al.*, 2002; Cha *et al.*, 2003; Pranoto *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006)

Ko และคณะ (2001) ทดลองเติมในจีนในฟิล์มบริโกลได้ (Edible film) พบว่าในจีนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 120 IU/แผ่นฟิล์ม และพีเอชเท่ากับ 3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lis. monocytogenes* strain V7 ได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเชื้อลดลง 2.42 logCFU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ฟิล์มบริโกลได้ที่ไม่เติมในจีน) ซึ่งมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 5.73 logCFU/ml

Jin และคณะ (2009) ศึกษาผลของการเติมในจีนในฟิล์ม Polylactic acids (PLA) ในการยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 และ *Sal. Enteritidis* โดยศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ Brain Heart Infusion (BHI) broth, สารละลายไข่ขาว และน้ำส้มคั้น พบว่าฟิล์ม PLA ที่เติมในจีนสามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* ได้ในอาหาร BHI broth และสารละลายไข่ขาว และสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 ในน้ำส้มคั้น ซึ่งมีปริมาณเชื้อลดลงจาก 7.5 เป็น 3.5 logCFU/ml ในขณะที่เชื้อ *E. coli* O157:H7 ในน้ำส้มคั้น (ชุดควบคุม) มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 6 logCFU/ml หลังบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ฟิล์ม PLA ที่เติมในจีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sal. Enteritidis* ในสารละลายไข่ขาวได้ โดยมีปริมาณเชื้อลดลง 2 logCFU/ml หลังบ่ม 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Sal. Enteritidis* ในสารละลายไข่ขาวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังบ่มเป็นเวลา 21 วัน โดยมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 3.5 logCFU/ml ในขณะที่ชุดควบคุมมีปริมาณเชื้อเท่ากับ 6.8 logCFU/ml

Nguyen และคณะ (2008) ศึกษาการนำฟิล์มเซลลูโลสที่มีการเติมในจีนมาห่อหุ้มไส้กรอก โดยนำไส้กรอกจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี *Lis. monocytogenes* (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/ml) แล้วนำไส้กรอกที่ผ่านการจุ่มเชื้อแล้วมาห่อหุ้มด้วยฟิล์มเซลลูโลสที่มีการเติมในจีน พบว่าฟิล์มเซลลูโลสที่มีการเติมในจีนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lis. monocytogenes* ได้ โดยมีเชื้อลดลงประมาณ 2 logCFU/g หลังจากเก็บไส้กรอกไว้ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ฟิล์มเซลลูโลสที่มีการเติมในจีนสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด โดยมีปริมาณเชื้อลดลง 3.3 logCFU/g หลังจากเก็บไส้กรอกไว้ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Jin และคณะ (2009) ศึกษาผลของการเติมในจีนในฟิล์ม PLAs ร่วมกับ Pectin ในการยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* โดยศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ Brain Heart Infusion (BHI) broth, สารละลายไข่ขาว และน้ำส้มคั้น พบว่าในสารละลายไข่ขาว ฟิล์ม Pectin/PLA ที่เติมในจีน (1000 IU/mL) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* ได้ดีที่สุด คือ มีปริมาณเชื้อลดลง 4.5 log units/mL หลังจากบ่ม 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส

Imran และคณะ (2010) ศึกษาผลของการเติมไนซินในฟิล์ม Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Listeria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* และ *Bacillus* spp. พบว่าฟิล์ม HPMC ที่เติมไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lis. ivanovi* CIP 12510 และ *B. subtilis* ได้ โดยมีขนาดวงใสเท่ากับ 3.4 และ 1.4 เซนติเมตร ตามลำดับ

7.2 สารสกัดจากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ

ปัจจุบันทั่วโลกให้ความสนใจกับพืชสมุนไพรเป็นอย่างมากทั้งด้านอุตสาหกรรมยา อาหาร และเครื่องสำอาง เนื่องจากเริ่มประจักษ์ถึงอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียงและความเป็นพิษของสารสังเคราะห์หรือยาแผนปัจจุบันกันมากขึ้น พืชสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมียาหลายชนิด คุณภาพของพืชสมุนไพรจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น สภาพแวดล้อมในการปลูก ฤดูกาล และช่วงเวลาที่เก็บสมุนไพรเป็นต้น (Holley and Patel, 2005) ในยาสมุนไพรประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (Pharmacological action) ซึ่งมักเรียกว่าเป็น Active constituents ที่สามารถนำมาใช้เป็นยาได้ (รัตน อินทรานุปกรณ์, 2547) การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสิ่งใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในการศึกษาพัฒนา เนื่องจากสามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้ง่ายและผู้บริโภคให้การยอมรับมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารต่อต้านจุลินทรีย์สังเคราะห์ (Han, 2003) เครื่องเทศหรือสมุนไพรหรือสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพรนั้นนอกจากจะให้กลิ่นรสแล้วยังสามารถช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ด้วย ส่วนที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดของเครื่องเทศและสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ คือ น้ำมันหอมระเหย อย่างไรก็ตามการใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์ในรูปสารสกัดหรือน้ำมันหอมระเหย มักจะพบปัญหาจากการที่สารดังกล่าวมีการระเหยเร็วมาก ทำให้ปริมาณที่เหลืออยู่น้อยไม่พอที่จะยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ได้

สารประกอบจากน้ำมันหอมระเหยมีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากสารประกอบจากน้ำมันหอมระเหยนี้มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) ซึ่งสามารถเข้าไปรวมอยู่กับส่วนไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์และไมโทคอนเดรียของเซลล์แบคทีเรียได้ มีผลให้การผ่านเข้าออกของสารจากเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการรั่วของไอออนและสารประกอบที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ รบกวนระบบ Proton motive force และเกิดการตกตะกอนของสารต่างๆ ในเซลล์จนทำให้เซลล์ตาย (Figure 1) สารประกอบจากน้ำมันหอมระเหยสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมเมมเบรน เช่น ATPases ซึ่งอยู่ในไซโตพลาสซึมเมมเบรนและอยู่ติดกับโมเลกุลไขมัน โดยส่วนวงแหวนไฮโดรคาร์บอน (Cyclic hydrocarbon) ของสารประกอบจากน้ำมันหอมระเหยและมีสมบัติชอบไขมัน (Lipophilic) จะไปทำปฏิกิริยากับ ATPases และเมื่อสะสมอยู่มากๆ มีผลทำให้โครงสร้างของไขมัน-โปรตีนของเซลล์เสียรูป สารประกอบจากน้ำมันหอมระเหยสามารถเร่งการเจริญของ Pseudomycelia ในยีสต์เป็นผลให้เซลล์ที่สร้างใหม่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้สารประกอบจากน้ำมันหอมระเหยยังสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานหรือการสังเคราะห์โครงสร้างเซลล์ (Burt, 2004) อย่างไรก็ตามสารประกอบฟีนอลิกมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในอาหาร เพราะเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้อาหารมีกลิ่นรสที่

เปลี่ยนแปลงและไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงเริ่มมีการนำน้ำมันหอมระเหยจากพืชและสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยไปใช้ร่วมกับสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ไนซิน และ Lysozyme เป็นต้น (Yamazaki *et al.*, 2004) ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารประกอบฟีนอลิกขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นและปัจจัยแวดล้อม เช่น a_w และค่าพีเอช (Lopez-Malo *et al.*, 2005) ตัวอย่างสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่มักใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร มีดังนี้

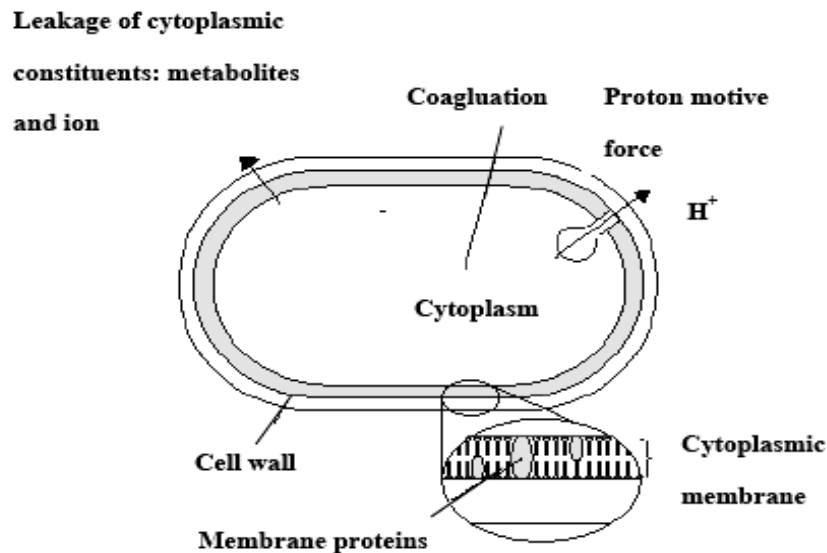


Figure 1. Locations and mechanisms in the bacterial cell thought to be sites of action for essential oil components.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Burt (2004)

7.2.1 ไทมอล

ไทมอล หรือ 5-methyl-2-isopropyl-1-phenol เป็น Cyclohexane ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมาเกาะ (Figure 2) เป็นสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจาก Thyme ซึ่งเป็นมีน้ที่ชนิดหนึ่ง นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องเทศในการเตรียมอาหารในประเทศแถบยุโรป เช่น ชุป และไส้กรอก เป็นต้น โดยพบว่า *Thymus vulgaris*, L. มีไทมอลเป็นองค์ประกอบประมาณ 31.19-41.06 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากดอกของ *Thymus vulgaris*, L. ที่ความเข้มข้น 800 ppm สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *E. coli*, *E. coli* O157:H, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Sal. Typhimurium*, *Ser. marcescens*, *Yer. enterocolitica*, *Pseu. fluorescens*, *Pseu. putida*, *Micrococcus* spp., *Sar. flava*, *S. aureus*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis* และ *Lis. innocua* ได้อย่างสมบูรณ์ (Marino *et al.*, 1999)

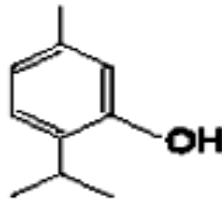


Figure 2. Structural formulae of thymol.

ที่มา: Burt (2004)

กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไทมอล คือ ไทมอลจะเข้าทำลายผนังชั้นนอกของเซลล์จุลินทรีย์และทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านของ Cytoplasmic membrane (Delgado *et al.*, 2004) สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ ไทมอลสามารถทำลายเมมเบรนชั้นนอก (Outer membrane) ของแบคทีเรียแกรมลบได้ จนทำให้เกิดการไหลออกของ Lipopolysaccharides (LPS) และเพิ่มอัตราการซึมผ่านของสารต่างๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Halander *et al.*, 2000) ไทมอลจะมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาพกรด เนื่องจากโมเลกุลจะมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) สูง ซึ่งอาจทำให้ไปเกาะที่ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนและยังสามารถละลายในไขมันได้ดีขึ้น มีผลต่ออัตราการแพร่ของสารเข้าหรือออกจากเซลล์ (Juven *et al.*, 1994) จากการศึกษาและนำไปใช้ประโยชน์ของไทมอล เนื่องจากไทมอลมีสมบัติเป็นสารลดอาหารตามธรรมชาติ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย รา และจุลินทรีย์อื่นๆ ในอาหาร เช่น *Lis. monocytogenes*, *S. aureus*, *As. flavus* และแบคทีเรียในช่องปาก (Ettayebi *et al.*, 2000; Lopez-Mallo *et al.*, 2005)

Nostro และคณะ (2004) รายงานว่าไทมอลความเข้มข้น 0.03-0.06 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ได้ ในขณะที่เชื้อ *B. cereus* INRA-AVZ421 และ *B. cereus* INRA-AVTZ415 มีปริมาณลดลงเมื่อใช้ไทมอลที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4 และ 0.8 มิลลิโมล/ลิตร ตามลำดับ แต่สำหรับเชื้อ *E. coli*, *Sal. Typhimurium*, *S. aureus*, *Rhi. leguminosarum* และ *B. subtilis* ความเข้มข้นของไทมอลที่ใช้ในการยับยั้งต้องสูงมากขึ้น (Delgado *et al.*, 2004)

Yamazaki และคณะ (2004) ปรับปรุงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของไทมอลโดยการใช้ร่วมกับไนซิน พบว่าไทมอลความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (3.3 มิลลิโมล/ลิตร) สามารถยับยั้งเชื้อ *Lis. monocytogenes* ได้ เช่นเดียวกับการผสมไทมอลที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (1.3 มิลลิโมล/ลิตร) ร่วมกับไนซินความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (0.036 มิลลิโมล/ลิตร) จึงช่วยลดปริมาณการใช้ไทมอลลงเนื่องจากข้อจำกัดในการนำไปใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเพราะอาจทำให้กลิ่นรสของอาหารเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้การใช้ไทมอลร่วมกับไนซินยังให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าการใช้ไทมอลหรือไนซินเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงถึงผลการเสริมฤทธิ์ (Synergism) ของไทมอลกับไนซิน นอกจากนี้การใช้ไทมอลร่วมกับไนซินยังเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Sal. Typhimurium* และ *E. coli* O157:H7 โดยไทมอลจะช่วยทำลายเมมเบรนชั้นนอก ทำให้ไนซินสามารถเข้าไปยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ (Adams, 2003)

Hosseini และคณะ (2008) ศึกษาผลการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ ไทมอล และ Clove (ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ EDTA (ความเข้มข้น 5 มิลลิโมล) ในฟิล์มไคโตซานต่อประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *Lis. monocytogenes* PTCC 1298, *S. aureus* PTCC 1431, *Sal. Enteritidis* PTCC 1318 และ *Pseu.aeruginosa* PTCC 1247 โดยวิธี Agar disc diffusion พบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติมไทมอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อดีกว่าฟิล์มไคโตซานที่เติม Clove และผลจากการเติม EDTA ส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์เพิ่มขึ้น

Del Nobile และคณะ (2008) ศึกษาผลการเติมไทมอล (ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 35 เปอร์เซ็นต์) ในฟิล์ม Zein ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (*B. cereus*, *Can. lusitaniae*, *Pseudomonas* spp. และ *S. thermophilus*) พบว่าการเติมไทมอลความเข้มข้น 10, 20 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ในฟิล์ม Zein สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*, *Can. lusitaniae* และ *Pseudomonas* spp. แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. thermophilus*

Gitrakou และคณะ (2010) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซาน ไทมอล และการใช้ไทมอลร่วมกับไคโตซาน ในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อไก่สำเร็จรูปพร้อมปรุง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าการใช้ไทมอล (ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)) ร่วมกับไคโตซาน (ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ pseudomonads ได้ โดยมีปริมาณเชื้อลดลง $1.5 \log\text{CFU/g}$ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแล็กติก *Bro. thermosphacta* และ Enterobacteriaceae ได้ โดยมีปริมาณเชื้อลดลง $2-3 \log\text{CFU/g}$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์)

Gniewosz และคณะ (2011) ศึกษาผลการเติมไทมอลในฟิล์ม Pullulan ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *Sal. Enteritidis* ATCC 13076 และ *E. coli* ATCC 25922 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไทมอลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้น โดยฟิล์ม Pullulan ที่เติมไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 ได้ดีที่สุด

Kuorwel และคณะ (2011) ศึกษาผลการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ Linalool, Carvacrol และไทมอลในฟิล์มแป้ง ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยวิธี Agar disc diffusion พบว่าฟิล์มแป้งที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ซึ่งไทมอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.38 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) มีขนาดวงใสเท่ากับ 23.8 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ Linalool ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มีขนาดวงใสเท่ากับ 18.6 มิลลิเมตร

Ramos และคณะ (2012) ศึกษาผลการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ ไทมอล และ Carvacrol ในฟิล์ม Polypropylene (PP) ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC

6538P โดยใช้วิธี Agar disc diffusion พบว่าไทมอลมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่า Carvacrol ซึ่งสารทั้ง 2 ตัว สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538P ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 โดยฟิล์ม PP ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด มีขนาดวงใสเท่ากับ 3.70 เซนติเมตร ในขณะที่ฟิล์ม PP ที่เติม Carvacrol และไทมอลร่วมกับ Carvacrol ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดวงใสเท่ากับ 2.75 และ 3.25 เซนติเมตร ตามลำดับ

7.2.2 ยูจีนอล

ยูจีนอล หรือ 2-Methoxy-4-(2-propenyl) phenol (Figure 3) เป็นสารประกอบฟีนอลิกที่พบมากในกานพลู (*Syzygium aromaticum*) ประมาณ 75-85 เปอร์เซ็นต์ (Burt, 2004) มีรายงานพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อ *Cam. jejuni*, *E. coli*, *Sal. Enteritidis*, *Lis. monocytogenes*, *S. aureus* และ *Pen. citrinum* ทั้งยังช่วยชะลอการสร้างสรรค์สารพิษของเชื้อราได้อีกด้วย (Davidson and Zivanovic, 2003)

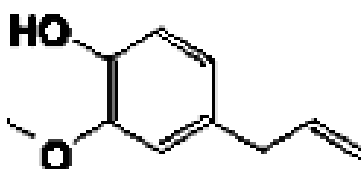


Figure. 3 Structural formulae of eugenol.

ที่มา: Burt (2004)

จากโครงสร้างของยูจีนอลซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลของยูจีนอลสามารถไปเกาะกับโปรตีน ทำให้ลดการทำงานของเอนไซม์ลง เช่น เอนไซม์ในเชื้อ *En. aerogenes* (Wendakoon and Sakaguchi, 1995) นอกจากนี้ยังยับยั้งการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและโปรตีนเอสของเชื้อ *B. cereus* และยังมีผลต่อผนังเซลล์ ทำให้เกิดการแตกของเซลล์ (Thoroski *et al.*, 1989)

Yamazaki และคณะ (2004) พบว่ายูจีนอลที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (6.1 มิลลิโมล/ลิตร) และยูจีนอลความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ (3.0 มิลลิโมล/ลิตร) ผสมร่วมกับไนซินความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิตร (0.036 ไมโครโมล/ลิตร) สามารถยับยั้งเชื้อ *Lis. monocytogenes* ได้พอๆ กันกับการใช้ไทมอล

Garcia-Garcia และคณะ (2011) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติ 3 ชนิด ได้แก่ Carvacrol ไทมอล และยูจีนอล พบว่าการใช้ยูจีนอลผสมร่วมกับไทมอล และ Carvacrol

(ความเข้มข้นเท่ากับ 56.25, 31.25 และ 75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Lis. innocua* ได้ดีที่สุด

Sanla-Ead และคณะ (2012) ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 10 สายพันธุ์ คือ *Aer. hydrophila* DMST 2798, *B. cereus* DMST 5040, *E. coli* DMST 4212, *E. coli* O157:H7 DMST 12743, *Lis. monocytogenes* DMST 17303, *M. luteus* DMST 15503, *Pseu. aeruginosa* DMST 4739, *Sal* Enteritidis DMST 15676, *Ent. faecalis* TISTR 379 และ *S. aureus* DMST 8840) และยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Can. albicans* TISTR 5779, *Sac. cerevisiae* TISTR 5240 และ *Z. rouxii* TISTR 5044) โดยใช้เทคนิค Agar-well diffusion พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (MIC) ของยูจีนอลมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.78 ถึง 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร โดยมีขนาดวงใสตั้งแต่ 8.7 ถึง 30.1 มิลลิเมตร

7.2.3 สารสกัดจากเมล็ดองุ่น

สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract, GSE) ได้มาจากการสกัดเมล็ดองุ่น ซึ่งสารสกัดจากเมล็ดองุ่นประกอบด้วยสาร Flavonoids, Ascorbic acid, Tocopherols, Citric acid, Limonoids, Sterols และแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งจากการที่สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีสารประกอบฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบ ทำให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะเข้าไปทำลายการสังเคราะห์เซลล์เมมเบรนของแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียมีการเจริญช้าลง นอกจากนี้สารประกอบฟีนอลิกสามารถเข้าไปจับโปรตีนบนผนังเซลล์ และแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกได้ โดยสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย รา และยีสต์ได้ ซึ่งจะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในช่วง 2.06 ถึง 16.50 เปอร์เซ็นต์ (โมล/ปริมาตร) (Table 3) (Cvetnic and Vladimir-Knezevic, 2004)

Cvetnic และ Vladimir-Knezevic (2004) ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และยีสต์ (Table 3) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นเท่ากับ 2.06-16.50 เปอร์เซ็นต์ (โมล/ปริมาตร) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ คือ สารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นเท่ากับ 2.06 เปอร์เซ็นต์ (โมล/ปริมาตร) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sal. Enteritidis* ได้ และสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นเท่ากับ 4.13 เปอร์เซ็นต์ (โมล/ปริมาตร) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes*, *Streptococcus* และ *E. coli* ได้ ส่วนผลการยับยั้งการเจริญของยีสต์ พบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้นตั้งแต่ 8.26-16.50 เปอร์เซ็นต์ (โมล/ปริมาตร) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sac. cerevisiae*, *Can. krusei* และ *Can. albicans* ทั้งสองสายพันธุ์ได้

Theivendran และคณะ (2006) ศึกษาผลของไนซินและสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* ใน Phosphate buffer solution (PBS) ซึ่งมีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^9 CFU/ml พบว่าการใช้สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (1 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับไนซิน (10,000 IU/ml) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* ได้

ดีกว่าการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่น หรือไนซินเพียงอย่างเดียว คือ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* ได้อย่างสมบูรณ์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Theivendran และคณะ (2008) ศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดคองุ่น (GSE 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)) ไนซิน (10,000 IU/g) และ EDTA (0.16 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)) ร่วมกับฟิล์มโปรตีนจากถั่วเหลืองต่อการยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 และ *Sal. Typhimurium* พบว่าฟิล์มโปรตีนจากถั่วเหลืองที่มีการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่น ไนซิน และ EDTA ร่วมกันให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* ดีที่สุด คือ การเจริญลดลง 2.9 log CFU/ml ส่วนผลการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7 และ *Sal. Typhimurium* พบว่ามีการเจริญลดลง 1.8 และ 0.6 log CFU/ml ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (6 logCFU/ml)

Corrales และคณะ (2009) ศึกษาผลการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นในฟิล์มแป้งในการห่อหุ้มเนื้อหมูที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *Bro. thermosphacta* พบว่าฟิล์มแป้งที่เติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นสามารถลดการเจริญของเชื้อได้ 1.3 log CFU/ml (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 3 log CFU/ml) หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Hong และคณะ (2009) ศึกษาผลการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นร่วมกับฟิล์ม *Gelidium corneum-gelatin* (GCC) ในการห่อหุ้มเนื้อหมูที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *Lis. monocytogenes* พบว่าฟิล์ม GCC ที่มีการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่น (ความเข้มข้น 0.08 เปอร์เซ็นต์) สามารถลดการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *Lis. monocytogenes* ได้เท่ากับ 0.69-1.11 และ 1.05-1.14 log CFU/g ตามลำดับ (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 5.16 และ 4.80 log CFU/ml ตามลำดับ) หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Lim และคณะ (2010) ศึกษาผลการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่น (GSE) ร่วมกับฟิล์ม *Gelidium corneum* (GC)/nano-composite film (Na^+ และ 30B) ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *Lis. monocytogenes* โดยใช้วิธี Agar disc diffusion พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GSE ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเพิ่มขึ้น โดยฟิล์ม GC/Cloisite Na^+ ที่เติม GSE ความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* และ *E. coli* O157:H7 มีขนาดวงใสเท่ากับ 31.43 และ 12.43 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ฟิล์ม GC/Cloisite 30B ที่เติมไทมอลความเข้มข้นเท่ากับ 1.2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดวงใสเท่ากับ 31.43 และ 12.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ

Table 3. Inhibition of bacterial and yeast growth by grape seed extract (GSE).

Microorganisms	GSE concentration (% <i>m/V</i>)				
	16.5	8.25	4.13	2.06	1.03
Bacteria					
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	-	±	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 8236	-	±	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	-	-	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MFBF	-	-	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 20201	-	-	-	+	+
<i>Streptococcus sp.</i> MFBF	-	-	-	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> MFBF	-	-	-	+	+
<i>Escherichia coli</i> O:157 MFBF	-	±	±	+	+
<i>Escherichia coli</i> O:128 MFBF	-	-	±	+	+
<i>Salmonella enteritidis</i> MFBF	-	-	-	-	+
Yeast					
<i>Candida albicans</i> MFBF 1	-	+	+	+	+
<i>Candida krusei</i> MFBF	-	-	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i> MFBF T1	-	+	+	+	+
<i>Candida parapsilosis</i> MFBF	-	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MFBF V1	-	-	+	+	+

- no growth of microorganism (bactericidal/fungicidal activity of GSE)

± slight growth of microorganism (bacteristatic activity of GSE)

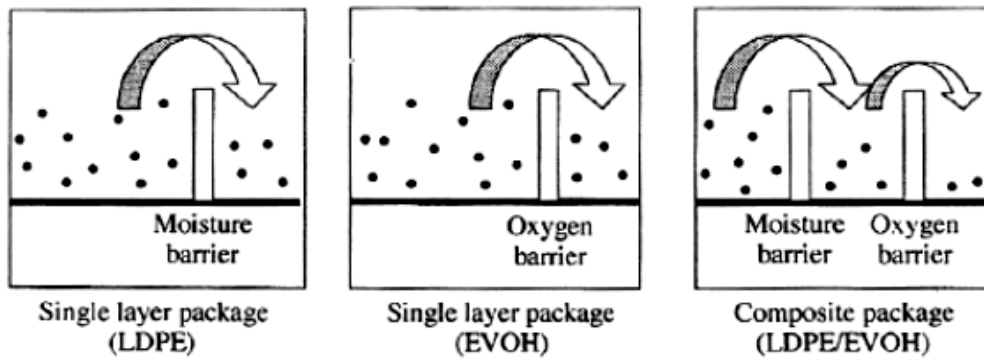
+ normal growth of microorganism (no activity of GSE)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cvetnic และ Vladimir-Knezevic (2004)

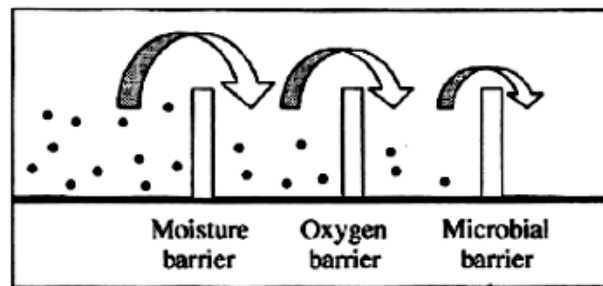
8. บรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์

บรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ คือ บรรจุภัณฑ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารหรือจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้โดยใช้พอลิเมอร์ที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หรือการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ลงในบรรจุภัณฑ์หรือระบบบรรจุ ซึ่งมีเป้าหมายหลักในการประกันความปลอดภัยของอาหาร รักษาคุณภาพของอาหาร และยืดอายุการเก็บของอาหารให้ยาวนานยิ่งขึ้น (Mauriello *et al.*, 2005) บรรจุภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยยืดเวลาการเจริญในระยะเริ่มต้น และลดจำนวนหรือลดอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

วัตถุประสงค์ของบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อเป็นการรับประกันความปลอดภัย คงคุณภาพ และยืดอายุการเก็บของอาหาร ซึ่งให้ลำดับความสำคัญสลับกันกับวัตถุประสงค์ของบรรจุภัณฑ์ทั่วไปที่ต้องการเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา คงคุณภาพ และประกันความปลอดภัย ปัจจุบันนี้การประกันความปลอดภัยของอาหารถือว่าเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง บรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์จึงเข้ามามีบทบาทมากขึ้น (Han, 2003) เมื่อเปรียบเทียบสมบัติระหว่างบรรจุภัณฑ์ทั่วไปกับบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ดัง Figure 4 แสดงให้เห็นว่า บรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์นอกจากสามารถป้องกันได้ทั้งความชื้น ออกซิเจน เนื่องจากสมบัติของฟิล์มแต่ละชนิดแล้ว เช่น ฟิล์ม Low density polyethylene (LDPE) ช่วยป้องกันการซึมผ่านของความชื้น ฟิล์ม Ethylene vinyl alcohol (EVOH) ช่วยป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจน และต้องใช้ร่วมกันเพื่อป้องกันการซึมผ่านของทั้งความชื้นและออกซิเจน บรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ยังสามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เข้าสู่อาหารได้ เนื่องจากมีสารยับยั้งจุลินทรีย์อยู่ในฟิล์ม (Han, 2003)



(A) Conventional packaging system



(B) Antimicrobial packaging system

Figure 4. Hurdle technology in antimicrobial packaging system compared to the conventional packaging system.

ที่มา: Han (2003)

8.1 รูปแบบการทำงานของบรรจุภัณฑ์ต่อต้านจุลินทรีย์

ลักษณะการทำงานของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใส่ลงในบรรจุภัณฑ์มี 3 ลักษณะ คือ การปลดปล่อย (Release) การดูดซึม (Absorption) และอิมโมบิไลเซชัน (Immobilisation) การปลดปล่อย เกิดขึ้นจากสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีทั้งประเภทสารละลายหรือแก๊ส ถ้าเป็นแก๊สจะเคลื่อนที่ไปสู่อาหารหรือช่องว่างระหว่างอาหารกับบรรจุภัณฑ์ได้ แต่หากเป็นสารละลายจะไม่สามารถทำได้ การดูดซึมมีหลักการทำงาน คือ เคลื่อนย้ายปัจจัยที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ออกจากบรรจุภัณฑ์และต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น ระบบ Oxygen-absorber สามารถที่จะป้องกันการเจริญของเชื้อรา ซึ่งต้องการออกซิเจนภายในบรรจุภัณฑ์ และการอิมโมบิไลเซชันจะต่อต้านการเจริญของเชื้อที่ผิวอาหารเฉพาะบริเวณที่สัมผัสกับบรรจุภัณฑ์ เมื่อใช้บรรจุอาหารแข็งจึงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งน้อยกว่าอาหารเหลว เพราะโอกาสในการสัมผัสระหว่างผิวอาหารกับบรรจุภัณฑ์น้อยกว่า (Han, 2003) ดังนั้นการสัมผัสระหว่างบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์กับผิวอาหารจึงมีความสำคัญอย่างมาก จึงมักใช้การบรรจุอาหารด้วยสุญญากาศ หรือใช้การเคลือบผิวโดยการสเปรย์หรือจุ่ม (Devlieghere *et al.*, 2004)

8.2 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์

ปัจจัยที่สำคัญที่ควรพิจารณาในการออกแบบระบบบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ คือ กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) การต้านทานของเชื้อจุลินทรีย์ การควบคุมการปลดปล่อยและกลไกการปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์ การละลายของสารยับยั้งจุลินทรีย์สู่ผิวอาหาร ธรรมชาติทางเคมีของอาหารและสารยับยั้งจุลินทรีย์ สภาพการเก็บรักษาและการจัดจำหน่าย สภาพของกระบวนการขึ้นรูปบรรจุภัณฑ์ สมบัติทางกายภาพและทางกลของบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ลักษณะทางประสาทสัมผัสและความเป็นพิษของสารยับยั้งจุลินทรีย์ และกฎหมายข้อบังคับ (Han, 2003)

8.2.1 กิจกรรมจำเพาะของสารยับยั้งจุลินทรีย์

สารยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้อย่างจำเพาะดังนั้นการที่จะเลือกใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใดจึงขึ้นกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายที่ต้องการยับยั้ง เพราะอาหารแต่ละชนิดมีคุณลักษณะแตกต่างกัน ได้แก่ ค่าพีเอช ค่า a_w ส่วนประกอบอาหารและอุณหภูมิในการเก็บรักษา สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ต้องสามารถทำงานได้ภายใต้สภาวะของอาหารในบรรจุภัณฑ์

8.2.2 การควบคุมการปลดปล่อยและกลไกการปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์

อัตราการปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์ควรออกแบบให้เหมาะสมกับอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ไม่ควรเร็วหรือช้ากว่าอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เพราะหากอัตราการปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์เร็วกว่าจะทำให้ความเข้มข้นของสารยับยั้งจุลินทรีย์ต่ำลงและอาจหมดก่อนอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหาร เชื้อจุลินทรีย์จึงเจริญได้ภายหลังสารยับยั้งจุลินทรีย์หมด และหากอัตราการปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์ช้ากว่าอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อจุลินทรีย์จะเจริญก่อนที่สารยับยั้งจะทำงาน Figure 5 แสดงระบบบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์แบบบรรจุภัณฑ์ทั่วไป (Conventional packaging system) และแบบสารเคลือบผิว (Coating system) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผิวของอาหาร ดังนั้นการเคลื่อนที่ของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากบรรจุภัณฑ์ไปสู่ผิวอาหารจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญ เมื่อระยะเวลาในการปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์ตามระยะเวลาจะทำให้ความเข้มข้นของสารลดลงและลดลงจนต่ำกว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง บรรจุภัณฑ์จึงไม่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของบรรจุภัณฑ์ทั่วไปจะเกิดขึ้นที่ผิวของอาหารภายในบรรจุภัณฑ์ ขณะที่การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ของบรรจุภัณฑ์แบบเคลือบผิวจะเกิดขึ้นบนผิวของสารเคลือบที่เคลือบอยู่ด้านนอกของอาหาร (Han, 2003) ดังนั้นสิ่งสำคัญของบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ต้องแนบติดกับผิวอาหาร จึงจะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

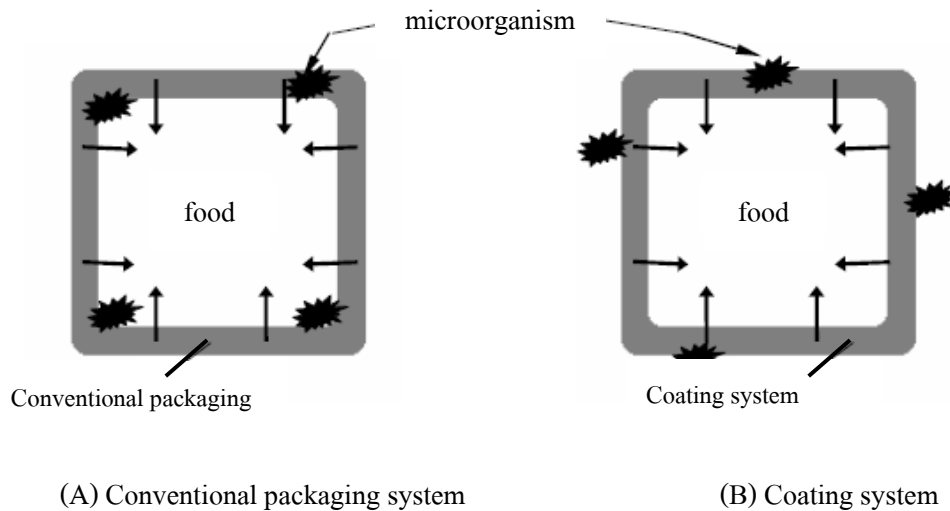


Figure 5. Antimicrobial packaging systems: (A) conventional packaging system and (B) coating system.

ที่มา: ดัดแปลงจาก Han (2003)

8.2.3 ธรรมชาติทางเคมีของสารยับยั้งจุลินทรีย์

ความสามารถในการละลายน้ำของสารยับยั้งจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับความสามารถในการผสมได้ระหว่างสารยับยั้งจุลินทรีย์กับพอลิเมอร์หรือพลาสติก เพราะจะส่งผลกระทบต่อสมบัติทางกายภาพของบรรจุภัณฑ์ นอกจากนี้ยังต้องพิจารณาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการยับยั้งเชื้อของสารยับยั้งจุลินทรีย์ เพื่อเลือกใช้ให้เหมาะสมกับพีเอชของพอลิเมอร์และอาหาร เพราะประสิทธิภาพในการทำงานของสารยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับค่าพีเอชด้วย

Cha และคณะ (2002) พบว่าฟิล์มโซเดียม-อัลจิเนต (Na-alginate) ที่ผสมสารยับยั้ง Etylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 5 มิลลิโมล ในชินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Lysozyme ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) หรือสารสกัดจากเมล็ด Grape fruit (grape fruit seed extract; GFSE) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลยับยั้งสูงกว่าฟิล์มโพแทสเซียม-คาร์ราจีแนน (K-carragenan) เมื่อผสมสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นเดียวกัน เนื่องจากความเป็นไฮโดรฟิลิก (Hydrophilic) ของโซเดียม-อัลจิเนตสูงกว่าโพแทสเซียม-คาร์ราจีแนน เป็นผลให้ฟิล์มชนิดนี้ดูดซับน้ำได้เร็วกว่า และพองตัวเป็นเจลได้ง่าย ดังนั้นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในโซเดียม-อัลจิเนตจึงถูกปลดปล่อยออกจากฟิล์มเร็วกว่าโพแทสเซียม-คาร์ราจีแนน

8.2.4 การละลายของสารยับยั้งจุลินทรีย์สู่อาหาร

การละลายของสารยับยั้งจุลินทรีย์ไปสู่อาหารถือเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งเพราะมีผลต่อประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อของบรรจุภัณฑ์ จาก Figure 6 ถ้าสารยับยั้งจุลินทรีย์ละลายได้ดีในอาหาร ระบบบรรจุภัณฑ์ชนิดนี้ คือ ระบบชนิด Unconstrained free diffusion (A) แต่ถ้าสารยับยั้งจุลินทรีย์ละลายได้ต่ำในอาหาร จะ

เรียกว่าระบบชนิด Monolithic system (B) จาก Figure 6 ภายในรูปสี่เหลี่ยม ด้านซ้ายที่เป็นสีเทา คือ ตัวบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ด้านขวาสีขาว คือ อาหาร และเส้นประ คือ ความเข้มข้นต่ำสุดของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ระบบชนิด Unconstrained free diffusion สารยับยั้งจุลินทรีย์จะละลายสู่อาหารได้สูง ความเข้มข้นของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผิวอาหาร (C_s) จะลดลงเท่ากับ ความเข้มข้นของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในบรรจุภัณฑ์ จนกระทั่งมีความเข้มข้นต่ำกว่า MIC จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ขณะที่ระบบชนิด Monolithic system มีสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ละลายสู่อาหารได้ต่ำ C_s จึงมีความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในบรรจุภัณฑ์ซึ่งระดับของความเข้มข้น C_s นี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารยับยั้งจุลินทรีย์ไปสู่อาหาร C_s จะคงที่ไปจนกระทั่งปริมาณของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในบรรจุภัณฑ์หมด นั่นคือ ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อยังคงที่จนกระทั่งปริมาณของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในบรรจุภัณฑ์หมดเช่นกัน (Han, 2003)

Coma และคณะ (2001) ศึกษาเกี่ยวกับกรดไขมันต่อสมบัติในการยับยั้งเชื้อของไนซินในฟิล์ม Hydroxypropylmethylcellulose พบว่ากรดสเตียริกซึ่งเป็นกรดไขมันเมื่อเติมลงในฟิล์มช่วยเพิ่มการป้องกันการผ่านเข้าออกของไอน้ำของฟิล์มได้ดีกว่ากรดไขมันและอีเทอร์ชนิดอื่นๆ เช่น โอเลอิก (Oleic acid), Methylpalmitate และ Methylstearate แต่เมื่อความเข้มข้นของกรดสเตียริกเพิ่มขึ้นมีผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งของฟิล์มที่ผสมไนซินลดลง เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างประจุลบของกรดสเตียริกกับประจุบวกของไนซิน ทำให้ไนซินตรึงอยู่ในฟิล์ม ไม่สามารถกระจายออกมาเพื่อทำหน้าที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้

Lee และคณะ (2004) ศึกษาเกี่ยวกับการแพร่ของไนซินและ α -tocopherol ผสม Vinyl acetate-ethylene copolymer ที่เคลือบบนแผ่นกระดาษ พบว่าการแพร่ของไนซินและ α -tocopherol มีความสัมพันธ์กับชนิดของอิมัลชัน โดยไนซินซึ่งมีหมู่ชอบน้ำจึงแพร่ได้ดีเมื่ออิมัลชันเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil/Water emulsion) แต่แพร่ได้น้อยเมื่ออิมัลชันเป็นชนิดน้ำในน้ำมัน (Water/Oil emulsion) ขณะที่ α -tocopherol มีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) จะแพร่ได้น้อยกว่าเมื่ออิมัลชันเป็นชนิดน้ำมันในน้ำ ดังนั้นส่วนประกอบในอาหาร เช่น ไขมัน แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น มีผลต่อการแพร่ของสารยับยั้งจุลินทรีย์

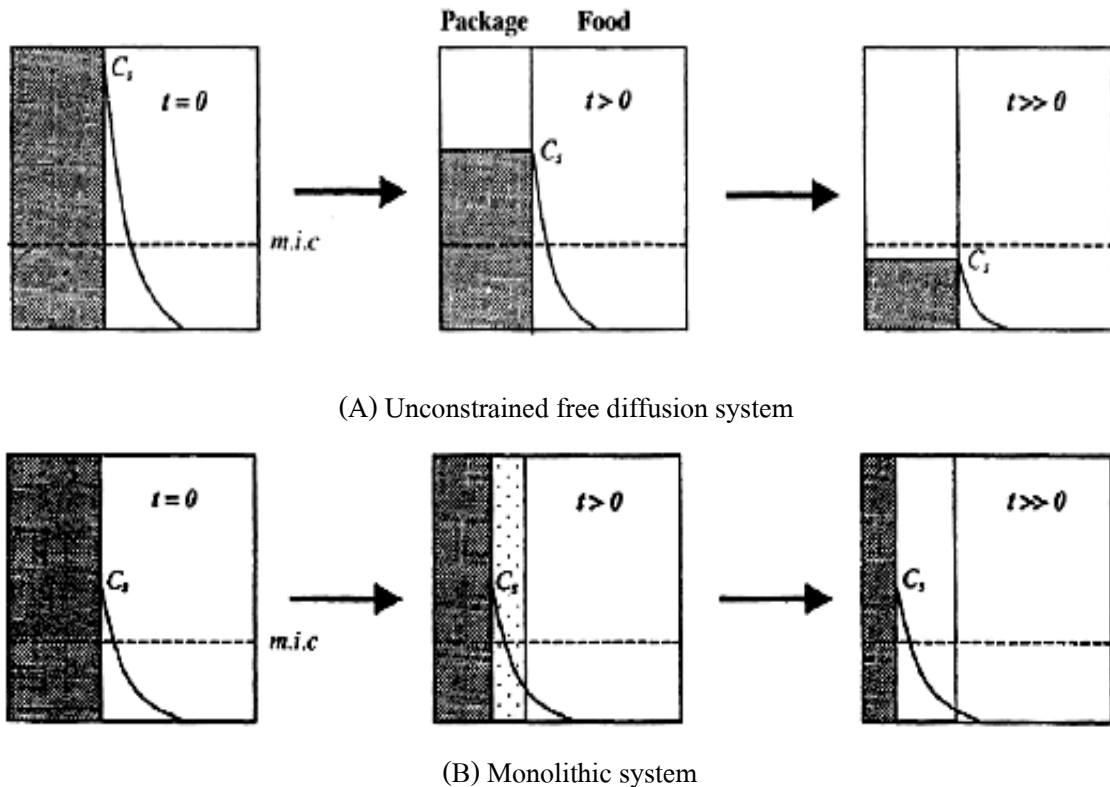


Figure 6. Concentration profile at the surface of foods: (A) unconstrained free diffusion system and (B) monolithic system.

ที่มา: Han (2003)

8.2.5 สถานะการเก็บรักษาและการจัดจำหน่าย

อุณหภูมิและเวลาในการเก็บรักษาและจัดจำหน่ายมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงควรเลือกใช้ อุณหภูมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารที่สามารถป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Han, 2003)

Lee และคณะ (2004) พบว่าอุณหภูมิการเก็บรักษานมและน้ำส้มที่เก็บรักษาไว้ในกล่องกระดาษที่เคลือบด้วยสารเคลือบไคโตซานที่ 3 และ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 14 วัน สามารถลดการเจริญของ Aerobic bacteria และยีสต์ได้ เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่เคลือบผิวกล่องกระดาษด้วยไคโตซานและไนซิน แต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีผลในการยับยั้ง โดยมีจำนวนจุลินทรีย์เจริญไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุม ซึ่ง อุณหภูมิการเก็บรักษาอาจมีผลต่ออัตราการแพร่ของสารยับยั้งจุลินทรีย์และการเจริญของจุลินทรีย์

8.2.6 สถานะของกระบวนการขึ้นรูปบรรจุภัณฑ์

กระบวนการขึ้นรูปบรรจุภัณฑ์มี 2 วิธีที่สำคัญ คือ กระบวนการใช้ความร้อน เช่น กระบวนการเอ็กซ์ทรูชัน (Extrusion) และกระบวนการเทหล่อจากสารละลาย (Casting solution) กรณีการขึ้นรูปโดยการเอ็กซ์ทรูชัน สิ่ง

สำคัญที่ควรพิจารณาคือ ความสามารถในการทนต่อความร้อนและสภาวะที่รุนแรงของสารยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากสภาวะของการเอ็กซ์ตรีโมฟิลิและอุณหภูมิและความดันค่อนข้างสูง ขณะที่การขึ้นรูปโดยการหล่อจากสารละลายมีสิ่งสำคัญคือ ตัวทำละลายที่เลือกใช้ต้องสามารถละลายได้ทั้งสารยับยั้งจุลินทรีย์และพอลิเมอร์ เพื่อให้สารยับยั้งเชื้อกระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกันกับพอลิเมอร์ ซึ่งจะส่งผลถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Han, 2003)

8.2.7 สมบัติทางกายภาพและทางกลของบรรจุภัณฑ์ยับยั้งจุลินทรีย์

ปริมาณสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผสมกับพอลิเมอร์ต้องมีปริมาณที่เหมาะสม ไม่มากเกินไปจนทำให้มีผลต่อสมบัติทางกายภาพ เช่น ความโปร่งใสและสี และสมบัติทางกลของบรรจุภัณฑ์

8.2.8 ลักษณะทางประสาทสัมผัสและความเป็นพิษของสารยับยั้งจุลินทรีย์

สารยับยั้งจุลินทรีย์เป็นสารที่มีกลิ่นหรือรสชาติที่รุนแรงซึ่งมีผลต่อสมบัติทางประสาทสัมผัส รวมทั้งวัตถุประสงค์สำหรับผลิตฟิล์มหรือสารเคลือบที่สามารถรับประทานได้ควรคำนึงถึงสารก่อภูมิแพ้ เช่น โปรตีนถั่วลิสง โปรตีนถั่วเหลือง และโปรตีนข้าวสาลี

8.2.9 กฎหมายข้อบังคับ

การใส่สารยับยั้งจุลินทรีย์ในบรรจุภัณฑ์ต้องพิจารณาถึงกฎหมายข้อบังคับเนื่องจากสารยับยั้งจุลินทรีย์ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ในอาหาร ต้องมีความปลอดภัยต่อการอุปโภคและบริโภค ดังนั้นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเมื่อเทียบกับสารยับยั้งจุลินทรีย์สังเคราะห์

9. ฟิล์มยับยั้งจุลินทรีย์

Kim และคณะ (2002) ศึกษาการแพร่ของไนซินในสารละลาย Acrylic และ Vinyl acetate-ethylene ที่เคลือบบนกระดาษในแบบจำลองอาหาร และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ, นมพาสเจอร์ไรส์ และน้ำส้ม พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการอากาศทั้งหมดและยีสต์ในตัวอย่างอาหารได้

Cha และคณะ (2003) ศึกษาผลการเติมไนซินในสารละลายฟิล์มไคโตซานที่ผสมเมทิลเซลลูโลสต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค Agar disc diffusion พบว่าไนซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *M. luteus* ATCC 10240 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเนื่องจากโครงสร้างของไนซินและไคโตซานมีประจุบวกจึงไม่เกิดอันตรกิริยาระหว่างประจุของสารทั้งสองชนิด ทำให้ไนซินแพร่ออกจากฟิล์มและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ดี โดยพบว่ามีขนาดของวงใสใหญ่ที่สุด 7 มิลลิเมตร หลังจากบ่ม 6 ชั่วโมง

Pranoto และคณะ (2005) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากไคโตซานโดยการเติม Garlic oil (GO), Potassium sorbate (PS) และ Nisin (N) ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้นของ GO สูงกว่า 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของ PS เท่ากับ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือความเข้มข้นของ N เท่ากับ 51,000 IU/กรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Lis. monocytogenes* และ *B. cereus* ได้

Zivanovic และคณะ (2005) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* และ *E. coli* 0157:H7 ของฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากยี่ห่วย กระเพรา ผักชี และออริกาโน ความเข้มข้น 1, 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเนื้อสัตว์ พบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากออริกาโนความเข้มข้นอย่างน้อย 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ของสารละลายฟิล์มไคโตซาน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* และ *E. coli* เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยจากยี่ห่วย โหระพา และผักชี โดยสามารถลดปริมาณเชื้อ *Lis. monocytogenes* และ *E. coli* เริ่มต้นที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์ที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เป็นจำนวน 3.6 log₁₀-4 log₁₀ cycle และ 3 log₁₀ cycle ตามลำดับ

Li และคณะ (2006) ผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จาก Konjac glucomannan ร่วมกับไคโตซาน และไนซิน พบว่าที่ความเข้มข้นของไนซินเท่ากับ 42,000 IU/กรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *Lis. monocytogenes*, และ *B. cereus* ได้

Geraldine และคณะ (2008) ผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากวุ้น ร่วมกับไคโตซานและกรดอะซิติกในการห่อหุ้มกระเทียม พบว่า ฟิล์มสามารถยับยั้งการเจริญของ Filamentous fungi และ Aerobic mesophilic และหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 6 วัน พบว่ามีจำนวนของ Filamentous fungi และ ยีสต์ เท่ากับ 10² และ 10³ CFU/g ตามลำดับ ซึ่งในชุดควบคุม คือ กระเทียมที่ไม่ได้ห่อหุ้มด้วยฟิล์มมีจำนวนของ Filamentous fungi และยีสต์ เท่ากับ 10⁶ CFU/g

Lopez-Carballo และคณะ (2008) ผลิตฟิล์มและสารเคลือบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากเจลาติน ร่วมกับ Sodium magnesium chlorophyllin (E-140) และ Sodium copper chlorophyllin (E-141) พบว่าฟิล์มและสารเคลือบสามารถลดการเจริญของ *S. aureus* และ *Lis. monocytogenes* และเมื่อนำฟิล์มและสารเคลือบมาห่อหุ้มและเคลือบไส้กรอก พบว่าฟิล์มและสารเคลือบสามารถลดการเจริญของ *S. aureus* และ *Lis. monocytogenes* ได้เช่นกัน

Theivendran และคณะ (2008) ผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากโปรตีนถั่วเหลืองร่วมกับ Grape seed extract (GSE) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ไนซินความเข้มข้น 10,000 IU/กรัม และ EDTA ความเข้มข้น 0.16 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) พบว่าสามารถลดการเจริญของ *Lis. monocytogenes*, *E. coli* 0157:H7 และ *Sal. Typhimurium* ได้

Portes และคณะ (2009) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากไคโตซานร่วมกับ Tetrahydrocurcuminoids (THCs) ซึ่ง Tetrahydrocurcuminoids (THCs) แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ THC1 (5-hydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hept-4-en-3-one) และ THC2 (5-hydroxy-1,7-bis (4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)hept-4-en-3-one) พบว่าฟิล์มไคโตซานที่มีการเติมสาร THCs สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. innocua* ได้

Vasconez และคณะ (2009) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากไคโตซานร่วมกับแป้งมันสำปะหลังที่มีการเติมและไม่เติม Potassium sorbate พบว่าจากการวิเคราะห์การยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์โดยวิธี Agar well diffusion สารละลายไคโตซานที่เติม Potassium sorbate สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* spp. และเมื่อนำไคโตซานมาขึ้นรูปฟิล์มร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *Z. bailii* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* spp.

Emiroglu และคณะ (2010) ผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากโปรตีนถั่วเหลือง (SPEF) ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด ได้แก่ Oregano (OR) และ Thyme (TH) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าฟิล์ม SPEF ที่เติม OR หรือ TH สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *Pseu. aeruginosa* และ *Lb. plantarum* และเมื่อนำฟิล์ม SPEF ที่เติม OR, TH หรือสารผสมระหว่าง OR และ TH (ORT) มาห่อหุ้มเนื้อวัวเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่า ฟิล์ม SPEF ที่เติม OR, TH หรือสารผสมระหว่าง OR และ TH (ORT) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable counts) แบคทีเรียแลคติก และ *Staphylococcus* spp. แต่สามารถยับยั้งการเจริญของ Coliform และ *Pseudomonas* spp. ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Ojagh และคณะ (2010) ศึกษาผลการเติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยต่อสมบัติ และประสิทธิภาพ การยับยั้งจุลินทรีย์ในฟิล์มไคโตซาน พบว่าการเติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (ความเข้มข้นเท่ากับ 0.4, 0.8 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)) ส่งผลให้สมบัติของฟิล์มไคโตซานเปลี่ยนแปลง คือ ทำให้ค่าการยึดตัวเมื่อขาดความสามารถในการละลายน้ำ การซึมผ่านไอน้ำ ความโปร่งใส และความชื้นของฟิล์มไคโตซานมีค่าลดลง แต่ส่งผลให้ค่าต้านทานแรงดึงขาด และความหนาของฟิล์มไคโตซานมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย) ในขณะที่ฟิล์มไคโตซานที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยมีประสิทธิภาพ ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าชุดควบคุม ซึ่งวิเคราะห์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar disc diffusion พบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lis. monocytogenes* PTCC1163, *E. coli* PTCC1399, *Lb. plantarum* PTCC1058, *Lb. sakei* PTCC1272 และ *Pseu. fluorescens* ATCC 17482 ได้

Pintado และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากเวย์โปรตีนที่เติม Malic acid, ไนซิน และ Natamycin ร่วมกับ Tween80, EDTA และ Sucrose ester พบว่าการเติม Tween80 และ EDTA ไม่

สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseu. aeruginosa* และ *Y. lipolytica* แต่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes*, *Pen. commune* และ *Pen. chrysogenum* ส่วนการเติม Sucrose ester ลดประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Y. lipolytica* และ *Penicillium* spp.

Ehivet และคณะ (2011) ศึกษาการผลิตฟิล์มที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์จากเปঁงมันเทศ โดยเติม Origanum oil (OG) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Sal. Enteritidis*, *E. coli* O157:H7 และ *Lis. monocytogenes* พบว่าฟิล์มเปঁงมันเทศที่เติม OG สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ OG ส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

Ahmad และคณะ (2012) ศึกษาผลการเติมน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด ได้แก่ Bergamot (BO) และ Lemongrass oil (LO) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (5-25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก)) ต่อสมบัติและประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในฟิล์มเจลาติน พบว่าการเติม BO และ LO ส่งผลให้สมบัติของฟิล์มเจลาตินเปลี่ยนแปลง คือ ทำให้ค่าการยึดตัวเมื่อขาด ค่าต้านทานแรงดึงขาด ความสามารถในการละลายน้ำ ความโปร่งใส และการส่องผ่านแสงของแผ่นฟิล์มเจลาตินมีค่าลดลง ในขณะที่การเติม BO ในฟิล์มเจลาตินส่งผลให้ค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น แต่การเติม LO ทำให้ค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มมีค่าลดลง นอกจากนี้การเติม LO และ BO ในฟิล์มเจลาตินเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติม LO และ BO) โดยการเติม LO ในฟิล์มเจลาตินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli*, *Lis. monocytogenes*, *S. aureus* และ *Sal. Typhimurium* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseu. aeruginosa* ในขณะที่การเติม BO ในฟิล์มเจลาตินยับยั้งได้เฉพาะการเจริญของเชื้อ *Lis. monocytogenes*

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS)

- *Weissella confusa* NH02 แยกได้จากไส้กรอกอีสาน (วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ, 2551)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Modified MRS มีองค์ประกอบ (กรัม/ลิตร) คือ Di-ammonium hydrogen citrate, 2; Tryptone, 10; Sucrose, 40; Manganese sulfate, 0.04; Meat extract, 8; Di-potassium hydrogen phosphate, 2; Sodium acetate, 5; Tween 80,1; Magesium sulfate, 0.2 ปรับพีเอชเท่ากับ 7 โดยใช้ 1M HCl หรือ 1M NaOH (วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ, 2551)
- Nutrient agar ยี่ห้อ Hi Media บริษัท Hi Media Laboratories Pvt.Ltd., India
- ผงวุ้น (agar)

3. สารเคมี

- สารเคมีสำหรับย้อมแกรม ประกอบด้วย Crystal violet, Gram iodine, แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และ Safranin
- Glycerol ยี่ห้อ AnalaR[®] บริษัท VWR International Ltd., England
- Sorbitol ยี่ห้อ UNIVAR บริษัท Univar Australia Pty. Ltd., Australia
- Polyethylene glycol 400 ยี่ห้อ UNIVAR บริษัท Univar Australia Pty. Ltd., Australia
- Ethanol 95% ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- Glacial acetic acid ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- Hydrochloric acid ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- Sodium chloride ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- Di-ammonium hydrogen citrate ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- Tryptone ยี่ห้อ Hi Media บริษัท Hi Media Laboratories Pvt.Ltd., India
- Manganese sulfate ยี่ห้อ Labchem บริษัท Ajex Finechem, Australia
- Meat extract ยี่ห้อ Hi Media บริษัท Hi Media Laboratories Pvt.Ltd., India
- Di-potassium hydrogen phosphate ยี่ห้อ UNIVAR บริษัท Univar Australia Pty. Ltd., Australia
- Sodium acetate ยี่ห้อ UNIVAR บริษัท Univar Australia Pty. Ltd., Australia
- Tween 80 ยี่ห้อ Labchem บริษัท Ajex Finechem, Australia
- Magesium sulfate ยี่ห้อ UNIVAR บริษัท Univar Australia Pty. Ltd., Australia

- น้ำตาลทราย ยี่ห้อมิตรผล บริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด ประเทศไทย
- ไคโตซาน บริษัท โบนาฟิเคส มาร์เก็ตติ้ง จำกัด ประเทศไทย

4. สารยับยั้งจุลินทรีย์

- ไทมอล ยี่ห้อ Labchem บริษัท Ajex Finechem, Australia
- ไนซิน บริษัท Zhengzhou Chihon Biotechnology Co., Ltd, China

5. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ AND บริษัท A&D Weighting, Japan
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius บริษัท Sartorius AG, Germany
- เครื่องอบลมร้อน (Hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV.212 บริษัท Sanyo Electric Co.,Ltd.
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ยี่ห้อ TOMMY บริษัท Tommy Seiko Co.Ltd., Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044 บริษัท Hotpack, USA
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ CYBERSCAN บริษัท Cyberscan Technology, Inc, Germany
- ไมโครปิเปต ขนาด 200-1000 ไมโครลิตร, 20-100 ไมโครลิตร และ 1-10 ไมโครลิตร ยี่ห้อ Labmate บริษัท Pacific Science Co., Ltd., Thailand
- เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hettich รุ่น Model universal.32 บริษัท Andreas Hettich GmbH&Co.KG, Germany
- ไมโครมิเตอร์ รุ่น ID-S112 บริษัท Mitutoyo, Japan
- เตาไฟฟ้าพร้อมเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Hot plate stirrer) รุ่น RCTbasic IKAMAG บริษัท IKA-Werke GmbH, Germany
- เครื่องวัดค่าความต้านทานแรงดึงของวัสดุ รุ่น LR-30K บริษัท LLOYD Instruments Ltd., UK
- เครื่อง UV-Vis spectrophotometer รุ่น Genesys 10-s บริษัท Thermo, USA
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) ยี่ห้อ WiseMix[®] รุ่น VM-10 บริษัท Interlab Ltd., New Zealand
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ ยี่ห้อ WTB Binder, Germany
- เครื่องวัดค่าสี (CIE colorimeter) ยี่ห้อ Color Flex บริษัท HunterLab Reston, USA
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ WiseBath รุ่น WB-11 บริษัท Witeg Labortechnik GmbH, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon รุ่น YS2H บริษัท Nikon Corporation, Japan
- ตัวเจาะอาหารเล็กเชิงเขี้ยว (cork borers) เบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร
- แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar)
- เคซิเคเตอร์

- เบ้าซีลิโคนสำหรับขึ้นรูปฟิล์ม
- ชุดอุปกรณ์ทดสอบการซึมผ่านของไอน้ำ

วิธีการ

1. การผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) จากเชื้อ *Weissella confusa* NH02

ถ่ายเชื้อ *Weissella confusa* NH02 ที่เก็บในกลีเซอรอลที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงเซลล์ออกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนด้วยเอธานอล (อัตราส่วนเอธานอลต่อส่วนใสเท่ากับ 2 ต่อ 1 โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตะกอน EPS โดยทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วตะกอน EPS ทั้งหมด (จากเตรียม EPS ทั้งหมด 10 ครั้ง) มาทำแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน (วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ, 2551) จากนั้นนำ EPS ที่ได้มาวิเคราะห์ความชื้นตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1995) (ภาคผนวก ข)

2. ศึกษาการเตรียมฟิล์มและสมบัติของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS)

2.1 ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) ต่อการขึ้นรูปและสมบัติฟิล์ม

เตรียมสารละลายฟิล์ม EPS โดยคัดแปลงวิธีของ Peirmaria และคณะ (2009) โดยนำผง EPS ที่ได้จากข้อ 1 มาละลายในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) กวนผสมจน EPS ละลาย แล้วเติมกลีเซอรอลในปริมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS กวนผสมเป็นเวลา 15 นาที กำจัดฟองอากาศโดยการ Sonication เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายฟิล์มที่ได้มาขึ้นรูปฟิล์ม โดยเติมสารละลายฟิล์มลงในเบ้าซีลิโคนขนาด 5×5 ตารางเซนติเมตร ควบคุมให้มีปริมาณของแข็งเท่ากับ 18 มิลลิกรัมต่อ 5×5 ตารางเซนติเมตร ทำให้อแห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้อแห้งต่อในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ลอกแผ่นฟิล์มออกจากแผ่นซีลิโคน เพื่อทำการวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มดังนี้

2.1.1 ความหนาของแผ่นฟิล์ม

วัดด้วยไมโครมิเตอร์ตามมาตรฐาน ISO 4593:1993 (ISO standard, 1993) โดยสุ่มวัด 5 ตำแหน่งบนชิ้นทดสอบ (5×5 ตารางเซนติเมตร) แล้วหาค่าเฉลี่ยของความหนาของฟิล์มชิ้นทดสอบแต่ละชิ้น

2.1.2 สมบัติเชิงกลของฟิล์ม

ทำการปรับสภาพฟิล์มที่ได้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 50±5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนตรวจสอบค่าการต้านทานแรงดึง (Tensile strength: TS) และค่าการยืดตัวเมื่อขาด (Elongation at break: EAB) ตามวิธี ของ Iwata และคณะ (2000) โดยขนาดตัวอย่างเท่ากับ 2×3 ตารางเซนติเมตร ใช้ load cell ของเครื่องเท่ากับ 100 N และอัตราในการดึงเท่ากับ 30 มิลลิเมตรต่อนาที แล้วนำมาคำนวณการต้านทานแรงดึงและค่าการยืดตัวเมื่อขาด ตามสูตร

สูตรคำนวณ

$$TS = F_{\max}/A$$

TS คือ การต้านทานแรงดึงขาด (เมกะปาสกาล)

F_{\max} คือ แรงดึงขาดสูงสุด (นิวตัน)

A คือ พื้นที่หน้าตัดที่น้อยที่สุด ณ จุดเริ่มต้นของชิ้นงาน (ตารางเมตร)

$$EAB (\%) = \Delta L/L_0$$

EAB คือ การยืดตัวเมื่อขาด (เปอร์เซ็นต์)

ΔL คือ ความยาวที่เพิ่มขึ้น ณ จุดขาด (มิลลิเมตร)

L_0 คือ ความยาวเดิมของชิ้นทดสอบ (มิลลิเมตร)

2.1.3 การซึมผ่านไอน้ำ (Water vapor permeability: WVP)

ใช้วิธีตามมาตรฐาน ASTM E96-80 (1980) โดยใช้ซิลิกาเจลอบแห้ง (0%RH) เป็นตัวดูดความชื้นใส่ในถ้วยอลูมิเนียมสำหรับทดสอบการซึมผ่านไอน้ำ แล้วนำตัวอย่างฟิล์มปิดทับบนปากถ้วยแล้วปิดฝาและปิดสกรูให้แน่นเพื่อป้องกันรอยรั่ว นำถ้วยทดสอบไปชั่งน้ำหนักอย่างละเอียด แล้วนำไปป่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ โดยใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ บันทึกการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักถ้วยทดสอบทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างน้ำหนัก (แกน y) กับเวลา (แกน x) จากนั้นคำนวณหาความชันของกราฟ แล้วนำค่าความชันที่ได้มาคำนวณค่าการซึมผ่านไอน้ำ (WVP) ตามสูตร

$$WVP (\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}) = G l t^{-1} A^{-1} \Delta P^{-1}$$

$G t^{-1}$ คือ น้ำหนักที่เปลี่ยนแปลง (กรัมต่อเวลา (วินาที)) หาได้จากความชันของกราฟระหว่างน้ำหนัก (แกน y) กับเวลา (แกน x)

l คือ ความหนาของฟิล์ม (เมตร)

A คือ พื้นที่ของฟิล์ม (ตารางเมตร)

ΔP คือ Vapor pressure difference (1.583×10^3 Pa)

2.1.4 การส่องผ่านแสงของแผ่นฟิล์ม

วัดการส่องผ่านแสงของแผ่นฟิล์มที่ได้ตามมาตรฐาน ASTM D 1746-03 (ASTM, 2006) และอ้างอิงจาก Larena และ Villar (2001) ด้วยเครื่อง UV-vis spectrophotometer ช่วงความยาวคลื่นที่ตรวจวัด 200-800 นาโนเมตร

2.1.5 การละลายน้ำของฟิล์ม

ตรวจสอบการละลายน้ำของฟิล์มโดยดัดแปลงวิธีของ Gennadios และคณะ (1998) นำฟิล์มขนาดประมาณ 2×2 ตารางเซนติเมตร ที่ผ่านการชั่งน้ำหนักที่แน่นอนใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี Sodium azide 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แล้วทำการปิดปากหลอดด้วยพาราฟิน นำมาแช่ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนใสออก แล้วนำฟิล์มส่วนที่ไม่ละลายน้ำไปทำแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปชั่งน้ำหนักแห้ง และคำนวณหาน้ำหนักฟิล์มที่ละลาย

$$\text{Film solubility (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของแผ่นฟิล์ม} - \text{น้ำหนักแห้งของฟิล์มที่ไม่ละลายน้ำ}) \times 100}{\text{น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของแผ่นฟิล์ม}}$$

2.1.6 สีและความโปร่งใสของแผ่นฟิล์ม

ตรวจสอบสีของฟิล์มโดยใช้ระบบ CIE colorimeter ได้แก่ ค่า L^* , a^* และ b^* ($L^* = 0$ (Black) ถึง 100 (White), $a^* = -60$ (Green) ถึง +60 (Red) และ $b^* = -60$ (Blue) ถึง +60 (Yellow) โดยใช้เครื่องวัดสี และตรวจสอบความโปร่งใสของฟิล์มตามวิธี ของ Han และ Floros (1997) โดยค่าความโปร่งใสคำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\text{Transparency value} = -(\log T_{600})/X$$

T_{600} คือ Fractional transmittance ที่ความยาวคลื่น 600 nm

X คือ ความหนาของแผ่นฟิล์ม (มิลลิเมตร)

คัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายฟิล์ม EPS ที่ให้ฟิล์มที่มีความแข็งแรง มีความยืดหยุ่น และสามารถลอกแผ่นฟิล์มออกจากเบ้าซิลิโคนได้ง่าย เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของพลาสติกไซเซอรต์ต่อการขึ้นรูปฟิล์มและสมบัติของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS)

เตรียมสารละลายฟิล์มเช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยใช้ความเข้มข้นของ EPS ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาผสมกับพลาสติกไซเซอรต์ 3 ชนิด คือ กลิเซอรอล ซอร์บิทอล และพอลิเอธิลีนไกลคอล 400 ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 20,

25, 30, 35 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของ EPS แล้วทำการขึ้นรูปฟิล์มตามวิธีการในข้อ 2.1 วิเคราะห์สมบัติของฟิล์มตามข้อ 2.1.1-2.1.6 คัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ที่ให้ฟิล์มที่มีความแข็งแรง มีความยืดหยุ่น ไม่ฉีกขาดง่ายและผิวหน้าไม่เหนอะหนะจนเกินไป เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. ศึกษาสมบัติของฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) และไคโตซาน (CS)

เนื่องจากฟิล์ม EPS มีสมบัติการละลายน้ำค่อนข้างสูงซึ่งทำให้เกิดปัญหาการบวมตัวของฟิล์มสูงเมื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการห่อหุ้มเนื้อหมูแช่เย็นเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา จึงได้ทำการศึกษาการเตรียมฟิล์ม EPS ที่มีกรดไฮโดรคอลลอยด์ชนิดอื่น ได้แก่ ไคโตซาน (CS) โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง EPS ต่อ CS เท่ากับ 2:1, 1:1 และ 0:1 โดยน้ำหนัก เตรียมสารละลาย EPS ตามวิธีข้อ 2.1 และเตรียมสารละลาย CS โดยละลาย CS ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) (Hosseini *et al.*, 2008) ทำการเตรียมสารละลายฟิล์มจากพอลิเมอร์ผสมดังกล่าว โดยใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ผสมเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผสมกับพลาสติกไซเซออร์ที่คัดเลือกจากข้อ 2.2 โดยควบคุมให้มีปริมาณของแข็งเท่ากับ 18 มิลลิกรัมต่อ 5×5 ตารางเซนติเมตรทำการขึ้นรูปฟิล์มตามวิธีในข้อ 2.1 และนำฟิล์มที่ได้มาวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มตามวิธีข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.6 จากนั้นคัดเลือกอัตราส่วนผสมที่ให้ฟิล์มมีสมบัติการละลายน้ำต่ำสุด มีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของฟิล์มที่ดี เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย

ซื้อเนื้อหมูที่หั่นเป็นชิ้นที่วางในถาดโฟมและหุ้มด้วย Wrap ที่วางขายในห้างสรรพสินค้ามาเก็บในตู้เย็น (4 ± 0.5 องศาเซลเซียส) วางไว้จนเกิดการเน่าเสีย แล้วนำตัวอย่างหมูแช่เย็นที่เน่าเสีย (เกิดเมือกและมีสีเขียวคล้ำ) มา swab เชื้อบริเวณผิวหน้าของเนื้อหมูแล้วเจือจางในน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเจือจางต่อแบบ Ten-fold serial dilution ให้มีจำนวนเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นนำมา Spread plate บนอาหาร Nutrient agar (NA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน คัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกันมา Streak บนอาหาร NA ทำการ Streak ซ้ำ 2-3 รอบ เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำเชื้อที่แยกได้ไปเทียบเคียงชนิดด้วยการวิเคราะห์ 16S rDNA เก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่มีกลีเซอรอล 25 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

5. ศึกษาประสิทธิภาพของสารต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย

5.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียที่แยกได้จากข้อ 4 ที่เก็บไว้ในกลีเซอรอลที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร NB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6-7 log CFU/ml

5.2 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย

ทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อต้านจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ ไนซินและไทมอล ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของหมูแช่เย็นจากข้อ 4 ด้วยเทคนิค Agar well diffusion ดัดแปลงวิธีการของ Ireogbu และ Nkere (2005) โดยปีเปิดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ในข้อ 5.1 ลงในอาหาร NA soft agar อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อ ทำการผสมเชื้อให้กระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัวดีแล้วเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นหลุมด้วย Cork borers เบอร์ 2 ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จากนั้นเตรียมสารละลายไนซินและไทมอล โดยละลายไนซินในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) (Dawson *et al.*, 2003) และเตรียมไทมอลให้เป็นสารละลายอิมัลชัน โดยละลายไทมอลในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) (Nobile *et al.*, 2009) แล้วปรับให้มีความเข้มข้นของสารที่ระดับต่างๆ คือ 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 mg/ml ด้วยเทคนิค Two-fold serial dilution หยดสารละลายไนซินและไทมอลปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่ยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) และสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)) คัดเลือกชนิดของสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียสูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

6. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์

เตรียมฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS กับ CS ที่อัตราส่วนที่เหมาะสม (คัดเลือกจากข้อ 3) ที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ ชนิดและความเข้มข้นต่ำสุดของสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียได้ (MIC) (จากข้อ 5.2) และเพิ่มความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์เป็น 2 เท่าของ MIC

(เติม Tween 80 ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ในสารละลายฟิล์ม EPS ที่เติมโทมอลเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์) กวนผสมสารละลายฟิล์มเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายฟิล์มที่ได้ขึ้นรูปฟิล์มตามวิธีข้อ 2.1 วิเคราะห์สมบัติของฟิล์มที่ได้ตามวิธีข้อ 2.1.1 ถึง 2.1.6 และนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เนือหมูแช่เย็นเน่าเสียโดย คัดแปลงวิธีการของ Hong และคณะ (2009) ดังนี้ หยอดเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้ในข้อ 5.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $6-7 \log \text{ CFU/ml}$) ลงบนแผ่นฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS (ชุดควบคุม) และฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นฟิล์มมาเจือจางให้มีจำนวนเชื้อที่เหมาะสมในน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยเจือจางแบบ Ten-fold serial dilution จากนั้นหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตต่อกรัมของตัวอย่าง แล้วคำนวณหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (เปอร์เซ็นต์)

คัดเลือกความเข้มข้นของสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่เติมในฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่มีความแข็งแรง ความยืดหยุ่น สามารถลอกแผ่นฟิล์มออกจากเบ้าซิลิโคนได้ง่ายและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

7. การประยุกต์ใช้ฟิล์มและสารเคลือบพอลิเมอร์ผสมระหว่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไลโดซาน (EPS/CS) ที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ในการเก็บรักษาเนือหมูแช่เย็น

7.1 การประยุกต์ใช้ฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไลโดซาน (EPS/CS) ที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ในการเก็บรักษาเนือหมูแช่เย็น

นำเนือหมูมาตัดให้มีความยาวเท่ากับ 5 เซนติเมตร ความกว้างเท่ากับ 5 เซนติเมตร และมีความหนาเท่ากับ 0.1 เซนติเมตร (คัดแปลงจาก Zinoviadou *et al.*, 2009) ล้างและทำความสะอาด แล้วซับให้แห้ง จากนั้นนำมาห่อหุ้มด้วยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่มีการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 6 และฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่ไม่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ หลังจากห่อหุ้มแล้วนำเนือหมูมาเก็บไว้ในเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 7, 9, 11 และ 15 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏภายนอก การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของเนือหมู โดยเก็บตัวอย่างมาเจือจางในน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเจือจางต่อแบบ Ten-fold serial dilution ให้มีจำนวนเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และบ่มที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Psychrophilic bacteria ซึ่งค่า TVC ของเนือหมูต้องไม่เกิน $1 \times 10^5 \text{ CFU/g}$ (มกอช. 6000-2547) โดยใช้เนือหมูที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS เป็นชุดควบคุม

7.2 การเคลือบเนื้อหมูโดยสารเคลือบ (สารละลายฟิล์ม) พอลิเมอร์ผสมระหว่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์

นำเนื้อหมูมาตัดให้มีความยาว 5 เซนติเมตร ความกว้าง 5 เซนติเมตรและหนา 0.1 เซนติเมตร (คัดแปลงจาก Zinoviadou *et al.*, 2009) ล้างและทำความสะอาด แล้วซับให้แห้ง จากนั้นนำมาจุ่มลงในสารเคลือบพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ (คัดเลือกจากข้อ 6) และสารเคลือบพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่ไม่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วทำให้แห้งเป็นเวลา 30 นาที ภายในตู้ปลอดเชื้อ (คัดแปลงจาก Theivendran *et al.*, 2006) หลังจากเคลือบแล้วนำเนื้อหมูมาเก็บไว้ในเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 2, 4, 7, 9, 11 และ 15 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏภายนอก การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมู โดยนำตัวอย่างมาเจือจางในน้ำเกลือปราศจากเชื้อที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วเจือจางต่อแบบ Ten-fold serial dilution ให้มีจำนวนเชื้อที่เหมาะสม จากนั้นหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธีการ Drop plate บนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และบ่มที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Psychrophilic bacteria โดยค่า TVC ของเนื้อหมูต้องไม่เกิน 1×10^5 CFU/g (มกอช. 6000-2547) โดยใช้เนื้อหมูที่ไม่มีการเคลือบด้วยสารเคลือบพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS เป็นชุดควบคุม

8. ศึกษาความคงตัวของสารเคลือบ (สารละลายฟิล์ม) และฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์

8.1 ศึกษาความคงตัวของสารเคลือบ (สารละลายฟิล์ม) พอลิเมอร์ผสมระหว่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์

เตรียมสารเคลือบพอลิเมอร์ผสม EPS/CS ตามวิธีการในข้อ 3 และเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากข้อ 6 จากนั้นเก็บสารเคลือบพอลิเมอร์ผสม EPS/CS ที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ ไว้ที่อุณหภูมิห้อง และที่อุณหภูมิตู้เย็น โดยเก็บตัวอย่างสารเคลือบพอลิเมอร์ผสม EPS/CS ที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 40 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย (จากข้อ 4) ด้วยเทคนิค Agar well diffusion (ตามวิธีการข้อ 5.2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่มีการยับยั้งเกิดขึ้น

8.2 ศึกษาความคงตัวของฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมสารต่อต้านจุลินทรีย์

เตรียมฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์ (คัดเลือกจากข้อ 6) ตามวิธีการในข้อ 2.1 จากนั้นเก็บฟิล์มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 40 วัน มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการส่องผ่านแสง ค่าสี และความโปร่งใสของแผ่นฟิล์มตามวิธีการข้อ 2.1.4 และ 2.1.6 ตามลำดับ และเก็บตัวอย่างในวันที่ 0 และวันที่ 40 มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความหนา สมบัติเชิงกลของฟิล์ม ค่าการซึมผ่านไอน้ำ และค่าการละลายน้ำของฟิล์มตามวิธีการข้อ 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3 และ 2.1.5 ตามลำดับ ในขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย (จากข้อ 4) ของฟิล์มพอลิเมอร์ผสมที่เติมสารต่อต้านจุลินทรีย์วิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 6 โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 20 วัน เป็นเวลา 40 วัน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สมบัติของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) จากเชื้อ *W. confusa* NH02

1.1 ผลของความเข้มข้นของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ต่อสมบัติของฟิล์ม EPS

จากการศึกษาการผลิตฟิล์ม EPS จากสารละลายฟิล์มที่มีความเข้มข้นของ EPS เท่ากับ 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกลีเซอรอลซึ่งเป็นพลาสติกไซเซอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS ฟิล์มที่ได้มีสมบัติแตกต่างกัน ดังนี้

1.1.1 ความหนาและสมบัติเชิงกล

ฟิล์ม EPS ที่ได้มีความหนาอยู่ระหว่าง 0.031 ± 0.003 ถึง 0.063 ± 0.003 มิลลิเมตร (Table 4) โดยฟิล์ม EPS ที่ผลิตจาก EPS ความเข้มข้น 2, 2.5, 3 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) อยู่ในช่วง 0.060 ถึง 0.063 มิลลิเมตร ในขณะที่ฟิล์ม EPS ที่ผลิตจาก EPS ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีความหนาน้อยที่สุดเท่ากับ 0.031 มิลลิเมตร อาจเนื่องจากความเข้มข้นสารละลาย EPS ต่ำ โมเลกุล EPS อยู่ห่างจากกัน เป็นอิสระมากกว่า ซึ่งในขั้นตอนการทำแห้งฟิล์มจำเป็นต้องใช้เวลากว่า ส่งผลให้โมเลกุลของ EPS มีเวลาเพียงพอในการจัดเรียงโมเลกุลที่เป็นระเบียบ เกิดเป็นโครงสร้างฟิล์มที่เป็นระเบียบมากกว่าการเทหล่อจากสารละลายฟิล์มที่มี EPS ความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุลภายในโครงสร้างฟิล์มน้อยกว่า ฟิล์มจึงมีความหนาน้อยกว่า ในขณะที่ฟิล์มที่เทหล่อจากสารละลายความเข้มข้น EPS สูงกว่า โมเลกุลมีโอกาสเกิดการพันเกี่ยวกันระหว่างโมเลกุล (Molecule chain entanglement) มากกว่า ทำให้ขัดขวางการวางตัวขนานกัน ความเป็นระเบียบของโมเลกุล และเกิดช่องว่างระหว่างโมเลกุลมากกว่า ฟิล์มที่ได้จึงมีความหนามากกว่า อย่างไรก็ตาม Piermaria และคณะ (2009) ผลิตฟิล์มจากสารละลาย Kefiran ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Kefiran ส่งผลให้ความหนาของฟิล์มเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้น 5 กรัม/กิโลกรัมของ Kefiran มีความหนาเท่ากับ 1.9 ± 1.2 ไมโครเมตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 กรัม/กิโลกรัมของ Kefiran ฟิล์มมีความหนาเท่ากับ 21.0 ± 1.3 ไมโครเมตร ทั้งนี้เนื่องจากไม่ได้มีการควบคุมปริมาณเนื้อสาร (ปริมาณของแข็ง) ในการเทหล่อฟิล์มให้เท่ากัน ความหนาของฟิล์ม EPS ทุกการทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ทำถุงพลาสติกสำหรับบรรจุอาหาร ซึ่งระบุความหนาไว้ระหว่าง 0.010 ถึง 0.100 มิลลิเมตร (มอก. 1027-2553)

สมบัติเชิงกลของฟิล์ม EPS ที่ผลิตจากสารละลายฟิล์มที่มีความเข้มข้นของ EPS ต่างๆ แสดงดัง Table 4 พบว่าฟิล์ม EPS ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์มีค่าต้านทานแรงดึงน้อยที่สุด (4.05 MPa) แต่มีค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มมากที่สุด (68.63 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งลักษณะฟิล์ม EPS ที่ได้จะมีความยืดหยุ่นสูง แต่ไม่มีความแข็งแรง และยากแก่การลอกฟิล์ม EPS ออกจากเบ้าชิลิโคน จึงไม่เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ ในขณะที่ฟิล์มที่เตรียมจาก EPS ความเข้มข้นเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต้านทานแรงดึงสูงที่สุด (8.27 MPa) และมีค่าการยืดตัวเมื่อขาด

ของฟิล์มเท่ากับ 27.76 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งฟิล์ม EPS ที่ได้มีความแข็งแรง มีความยืดหยุ่นและสามารถลอกแผ่นฟิล์ม EPS ออกจากเบ้าซิลิโคนได้ง่ายกว่าฟิล์ม EPS ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ซึ่งจากการทดลอง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ EPS เพิ่มขึ้นในช่วง 1.5 ถึง 3 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มมีค่าต้านทานแรงดึงสูงขึ้น ($p < 0.05$) อาจเนื่องจากความสามารถในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลมากขึ้น ฟิล์มจึงมีความแข็งแรงสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นของ EPS สูงขึ้นเป็น 3.5 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์มที่ได้มีค่าต้านทานแรงดึงลดลง ในขณะที่ค่าการยึดตัวเมื่อขาด (EBA) ของฟิล์มที่ความเข้มข้นของ EPS เท่ากับ 2 ถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยฟิล์ม EPS ที่ผลิตได้มีค่าต้านทานแรงดึงอยู่ระหว่าง 4.05 ± 0.53 ถึง 8.27 ± 0.46 MPa (Table 4) ในขณะที่มีค่าการยึดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม EPS อยู่ระหว่าง 24.06 ± 5.65 ถึง 68.63 ± 8.60 เปอร์เซ็นต์ (Table 4) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าฟิล์มที่ผลิตจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ เช่น Low-density polyethylene (LDPE) (9-17 MPa), Polystyrene (35-55 MPa) และ Cellophane (114 MPa) (Smith, 1986) ซึ่งมีค่าสูงกว่าฟิล์มทางการค้า เช่น Cellophane (20%) และ Polystyrene (1%) (Shellhammer and Krochta, 1997) แต่มีค่าต่ำกว่า LDPE (500%) (Smith, 1986) และจากการศึกษาของ Alves และคณะ (2011) ได้ผลิตฟิล์มจากสารละลาย EPS ที่ผลิตจาก *Pseu. oleovorans* NRRLB-14682 พบว่าฟิล์ม EPS ที่ผลิตได้มีค่าต้านทานแรงดึงเท่ากับ 51 ± 3 MPa และมีค่าการยึดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 9.5 ± 3.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Ghasemlou และคณะ (2011) ผลิตฟิล์มจากสารละลาย Kefiran พบว่าฟิล์ม Kefiran ที่ผลิตได้มีค่าต้านทานแรงดึงเท่ากับ 11.18 ± 2.24 MPa และมีค่าการยึดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 36.59 ± 11.13 เปอร์เซ็นต์

1.1.2 การซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำของฟิล์ม

ค่าการซึมผ่านไอน้ำ (Water vapor permeability, WVP) คือ ปริมาณไอน้ำที่ซึมผ่านจากผิวหน้าด้านหนึ่งไปยังผิวอีกด้านหนึ่งต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ผิวฟิล์มในระยะเวลาที่กำหนด ภายใต้สภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ ซึ่งมีความสำคัญในการเลือกใช้ฟิล์มเป็นบรรจุภัณฑ์ ถ้ามีการซึมผ่านของไอน้ำสูง อายุการเก็บรักษาจะสั้นลง ซึ่งจากการศึกษาการผลิตฟิล์ม EPS จากสารละลายฟิล์มที่มีความเข้มข้นของ EPS เท่ากับ 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกลีเซอรอลซึ่งเป็นพลาสติกไซเซอร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS พบว่าฟิล์ม EPS ที่ได้มีค่าการซึมผ่านไอน้ำอยู่ระหว่าง $3.10 \pm 0.12 \times 10^{-10}$ ถึง $3.80 \pm 0.44 \times 10^{-10}$ g /ms Pa (Table 4) โดยทั่วไปพบว่าค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์ม EPS มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก โดยฟิล์มที่เตรียมจากสารละลาย EPS ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการซึมผ่านไอน้ำต่ำสุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุลที่เป็นระเบียบมากกว่าและมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อยกว่า ทำให้โมเลกุลน้ำเคลื่อนที่ผ่านโครงสร้างฟิล์มได้ยากกว่า ทำให้มีค่าการซึมผ่านไอน้ำต่ำกว่า ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลของความหนาที่เป็นผลมาจากการจัดเรียงโมเลกุลในระหว่างการทำแห้งฟิล์มดังที่อธิบายแล้วข้างต้น ซึ่งสามารถป้องกันการซึมผ่านไอน้ำได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ผลิตจากพอลิเมอร์ทางชีวภาพ เช่น ฟิล์มเวย์โปรตีน (1.34×10^{-9} g /ms Pa) (Shaw *et al.*, 2002) และฟิล์มเมทิลเซลลูโลส ($1.15 \pm 0.14 \times 10^{-10}$ g /ms Pa) (Park *et al.*, 1993) เป็นต้น ในขณะที่มีค่าใกล้เคียงกับฟิล์ม Gellan gum (2.08×10^{-10} g/ms Pa) (Yang and Paulson, 2000) แต่มีความสามารถในการป้องกันการซึมผ่านไอน้ำต่ำกว่ากับฟิล์มสังเคราะห์ Cellophane

(8.4×10^{-11} g /ms Pa) (Shellhammer and Krochta, 1997) พลาสติก LDPE (9.14×10^{-13} g /ms Pa) และพลาสติก HDPE (2.31×10^{-13} g /ms Pa) (Smith, 1986)

ค่าการละลายน้ำของแผ่นฟิล์มจะเป็นตัวบ่งชี้การนำฟิล์มไปประยุกต์ใช้ โดยแผ่นฟิล์มที่ไม่ละลายน้ำจะเป็นผลดีเมื่อใช้ในการห่อหุ้มอาหารที่ต้องการเก็บไว้ได้นาน แต่จะเป็นผลเสียกับการนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ที่ต้องการให้เกิดการละลายในน้ำ (Gounga *et al.*, 2007) จากการศึกษาค่าการละลายของ EPS ต่อความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์ม พบว่าฟิล์ม EPS ที่ผลิตได้มีค่าการละลายอยู่ระหว่าง 31.19 ± 3.39 ถึง 39.30 ± 2.78 เปอร์เซ็นต์ (Table 5) โดยทั่วไปพบว่า ฟิล์มที่เตรียมจากสารละลาย EPS ความเข้มข้นต่างๆ มีค่าการละลายน้ำไม่แตกต่างกัน ยกเว้นฟิล์มที่เตรียมจากสารละลาย EPS ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ฟิล์ม EPS ที่ผลิตได้สามารถละลายน้ำได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ผลิตจากพอลิเมอร์ชีวภาพชนิดอื่นๆ เช่น ฟิล์ม Kefiran (27.91 ± 1.11 เปอร์เซ็นต์) (Ghasemlou *et al.*, 2011) ฟิล์มแป้ง (23.76 เปอร์เซ็นต์) (Ghanbarzadeh *et al.*, 2010) ฟิล์มไคโตซาน (16.8 เปอร์เซ็นต์) (Rotta *et al.*, 2009) และฟิล์ม EPS จาก *Pseu. oleovorans* NRRLB-14682 (4 เปอร์เซ็นต์) (Alves *et al.*, 2011) เป็นต้น ในขณะที่มีค่าการละลายน้ำต่ำกว่าฟิล์มแป้ง Achira (40.6 เปอร์เซ็นต์) (Andrade-Mahecha *et al.*, 2012) ฟิล์ม Hydroxypropylmethylcellulose (100 เปอร์เซ็นต์) (Rotta *et al.*, 2009) และฟิล์มเวย์โปรตีน (50.58 เปอร์เซ็นต์) (Gounga *et al.*, 2007) เป็นต้น

Table 4. Effect of exopolysaccharides (EPS) concentration on thickness, tensile strength, elongation at break and water vapor permeability (WVP) of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

EPS conc. (%)	Thickness [#] (mm)	Tensile strength	Elongation at break	WVP
		(MPa)	(%)	($\times 10^{-10}$ g /ms Pa)
1.5	$0.031 \pm 0.003^{a\#\#}$	4.05 ± 0.53^a	68.63 ± 8.60^b	3.10 ± 0.12^a
2	0.060 ± 0.007^b	6.61 ± 0.69^{bc}	25.97 ± 6.56^a	3.56 ± 0.42^{ab}
2.5	0.062 ± 0.002^b	7.23 ± 0.52^c	24.06 ± 5.65^a	3.75 ± 0.28^b
3	0.063 ± 0.003^b	8.27 ± 0.46^d	27.76 ± 4.87^a	3.80 ± 0.44^b
3.5	0.063 ± 0.003^b	6.21 ± 0.40^b	28.63 ± 2.11^a	3.38 ± 0.45^{ab}

[#] Values are given as mean \pm SD from triplicate determinations.

^{\#\#} Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

1.1.3 ค่าสีของฟิล์ม

สีของฟิล์มเป็นสมบัติทางกายภาพที่สังเกตได้ชัดเจน ดังนั้นในการเลือกฟิล์มเป็นบรรจุภัณฑ์จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงสีของฟิล์มด้วย การวัดสีในระบบ CEI โดย L* แสดงความสว่างจาก 0-100 ถ้าค่า L* มาก แสดงว่า

มีความสว่างมาก ค่า a^* แสดงค่าสีแดง-สีเขียว โดยถ้าค่าบวกแสดงสีแดงและถ้าค่าลบแสดงสีเขียว และค่า b^* แสดงค่าสีเหลือง-น้ำเงิน โดยถ้าค่าบวกแสดงสีเหลืองและถ้าค่าเป็นลบแสดงสีน้ำเงิน จากการศึกษาการผลิตฟิล์ม EPS จากสารละลายฟิล์มที่มีความเข้มข้นของ EPS เท่ากับ 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกลีเซอรอลซึ่งเป็นพลาสติกไซเซออร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS พบว่าฟิล์ม EPS มีค่า L^* แตกต่างกันเล็กน้อยอยู่ระหว่าง 88.21 ± 0.01 ถึง 88.83 ± 0.10 (Table 5) ส่วนค่า a^* ของฟิล์ม EPS พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น EPS ไม่ส่งผลต่อค่า a^* ($p > 0.05$) ในขณะที่ค่า b^* ของฟิล์ม EPS มีค่าอยู่ระหว่าง 4.30 ± 0.01 ถึง 5.57 ± 0.08 โดยฟิล์มที่เตรียมจากสารละลาย EPS ความเข้มข้น 2 ถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า b^* ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ส่วนฟิล์มที่เตรียมจาก EPS ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่า b^* ต่ำที่สุด นั่นคือ ฟิล์มมีแนวโน้มที่จะมีสีเหลืองมากขึ้น เมื่อความเข้มข้น EPS เพิ่มขึ้นมากกว่า 2.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก EPS ที่ใช้ผลิตฟิล์มมีลักษณะขุ่นและมีสีเหลืองอ่อนรวมทั้งเมื่อความเข้มข้น EPS สูงขึ้นอาจมีโอกาสเกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลระหว่างองค์ประกอบต่างๆ ใน EPS เกิดเป็นรงควัตถุที่ให้สีน้ำตาลเกิดขึ้น

1.1.4 การส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์ม

การวัดค่าการส่องผ่านแสง (Light transmittance) โดยเลือกช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 200-800 นาโนเมตร ซึ่งเป็นทั้งช่วงที่แสง UV และตามองเห็นได้ จากการศึกษาการผลิตฟิล์ม EPS จากสารละลายฟิล์มที่มีความเข้มข้นของ EPS เท่ากับ 1.5, 2, 2.5, 3 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกลีเซอรอลซึ่งเป็นพลาสติกไซเซออร์ที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS พบว่าฟิล์ม EPS มีค่าการส่องผ่านแสงลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EPS จาก 1.5 เป็น 2 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) (Table 6) เนื่องจากฟิล์ม EPS ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์มีความหนามากกว่าฟิล์ม EPS 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความสามารถในการส่องผ่านของแสงลดลง ในขณะที่ฟิล์ม EPS ความเข้มข้น 2, 2.5, 3 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการส่องผ่านแสงไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เป็นผลมาจากมีความหนาไม่แตกต่างกัน (Table 4) โดยฟิล์ม EPS มีค่าการส่องผ่านแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นได้ (350-800 นาโนเมตร) อยู่ระหว่าง 46.35 ถึง 86.02 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าการส่องผ่านแสงในช่วงแสง UV (280 นาโนเมตร) มีค่าอยู่ระหว่าง 3.32 ถึง 7.92 เปอร์เซ็นต์ (Table 6) โดยฟิล์ม EPS ทุกความเข้มข้นมีค่าการส่องผ่านแสงต่ำที่สุดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร ดังนั้นฟิล์ม EPS ทุกความเข้มข้นจึงสามารถป้องกันแสงยูวีได้ดี

สำหรับความโปร่งใสของฟิล์ม พบว่าความเข้มข้นของ EPS ไม่ส่งผลต่อความโปร่งใสของฟิล์ม ($p > 0.05$) (Table 5) โดยฟิล์ม EPS มีค่าความโปร่งใสของฟิล์มอยู่ระหว่าง 1.90 ± 0.07 ถึง 2.22 ± 0.39 ซึ่งจากการทดลองสามารถบ่งชี้ได้ว่า ฟิล์ม EPS มีความโปร่งใสและเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มทางการค้า พบว่ามีความโปร่งใสมากกว่าฟิล์ม LDPE (ค่าความโปร่งใสเท่ากับ 3.05) แต่มีความโปร่งใสน้อยกว่าฟิล์ม OPP (ค่าความโปร่งใสเท่ากับ 1.67) (Shiku *et al.*, 2003)

จากผลการทดลองข้างต้นเลือก EPS ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากฟิล์มที่ได้มีสมบัติเชิงกลที่ดี คือ มีความแข็งแรง มีความยืดหยุ่น และสามารถลอกแผ่นฟิล์มออกจากเบ้าซิลิโคนได้ง่ายกว่าฟิล์ม EPS ที่ความเข้มข้นอื่นๆ

Table 5. Effect of exopolysaccharides (EPS) concentration on transparency value, solubility and film color of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

EPS conc. (%)	Solubility [#] (%)	Transparency value	Film color		
			L*	a*	b*
1.5	39.30±2.78 ^{b##}	2.22 ±0.39 ^a	88.83±0.10 ^d	-1.43±0.02 ^a	4.30±0.01 ^a
2	31.19±3.39 ^a	2.10±0.28 ^a	88.68±0.00 ^c	-1.41±0.03 ^a	5.21±0.53 ^b
2.5	36.80±3.69 ^b	1.91±0.25 ^a	88.38±0.02 ^b	-1.37±0.04 ^a	5.31±0.0 ^b
3	34.90±1.29 ^{ab}	1.94±0.20 ^a	88.21±0.01 ^a	-1.41±0.02 ^a	5.57±0.08 ^b
3.5	35.39±0.30 ^{ab}	1.90±0.07 ^a	88.27±0.02 ^{ab}	-1.38±0.00 ^a	5.50±0.33 ^b

[#] Values are given as mean ±SD from triplicate determinations.

^{##} Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

Table 6. Effect of exopolysaccharides (EPS) concentration on light transmission (%T) of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

EPS conc. (%)	Light transmission (%) at different wavelength (nm)							
	200	280	350	400	500	600	700	800
1.5	0	7.92 ^{b##}	63.90 ^b	73.35 ^b	80.47 ^b	83.95 ^b	85.50 ^b	86.02 ^b
2	0	3.45 ^a	46.35 ^a	57.67 ^a	68.20 ^a	75.37 ^a	78.15 ^a	79.72 ^a
2.5	0	4.00 ^a	51.15 ^a	62.45 ^a	72.90 ^a	77.80 ^a	80.85 ^a	82.97 ^{ab}
3	0	3.32 ^a	49.40 ^a	61.62 ^a	71.00 ^a	77.90 ^a	81.20 ^a	83.27 ^{ab}
3.5	0	4.37 ^a	50.67 ^a	62.17 ^a	72.90 ^a	78.00 ^a	80.87 ^a	82.62 ^{ab}

[#] Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

1.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของพลาสติไซเซอร์ต่อสมบัติของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) จากเชื้อ *W. confusa* NH02

การเติมพลาสติไซเซอร์จะส่งผลให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นมากขึ้น และลดความเปราะของฟิล์ม ทั้งนี้เนื่องจากพลาสติไซเซอร์จะไปลดแรงดึงดูระหว่างโมเลกุลของฟิล์ม ช่วยเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของสายพอลิเมอร์ (Pommet *et al.*, 2005) ซึ่งหากไม่เติมพลาสติไซเซอร์ฟิล์มที่ได้จะมีลักษณะเปราะ ไม่สามารถลอกแผ่นฟิล์มออกมาวิเคราะห์สมบัติของฟิล์มได้ สำหรับงานวิจัยนี้ได้ศึกษาพลาสติไซเซอร์ 3 ชนิด คือ กลีเซอรอล ซอร์บิทอล และพอลิเอทิลีนไกลคอลที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20, 25, 30, 35 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS พบว่าฟิล์ม EPS ที่เติมพอลิเอทิลีนไกลคอลเป็นพลาสติไซเซอร์ทุกระดับความเข้มข้น มีลักษณะแข็งและเปราะจนไม่

สามารถลอกแผ่นฟิล์มออกมาวิเคราะห์สมบัติได้ (Figure 7) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของพอลิเอธิลีน ไกลคอลมีขนาดใหญ่ ทำให้ความสามารถในการเข้าไปแทรกอยู่ระหว่างโมเลกุลของ EPS ทำได้ยากถึงแม้ว่าพอลิเอธิลีน ไกลคอลจะมีหมู่ไฮดรอกซิลมากก็ตาม (Dias *et al.*, 2010) ดังนั้นการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของพลาสติกไซเซอร์ต่อสมบัติของฟิล์ม EPS จึงทำการศึกษาได้เฉพาะกลีเซอรอลและซอร์บิทอลเท่านั้น ซึ่งมีผลการทดลองดังนี้

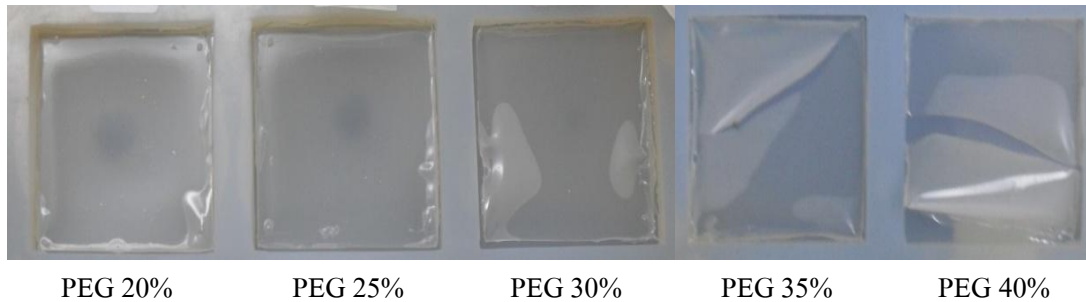


Figure 7. Appearance of exopolysaccharides films from *Weissella confusa* NH02 using polyethylene glycol (PEG) as plasticizer.

1.2.1 ความหนาและสมบัติเชิงกล

จากการศึกษาการผลิตฟิล์ม EPS จากสารละลายฟิล์มที่มีความเข้มข้นของ EPS เท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับพลาสติกไซเซอร์ ชนิดต่างๆ คือ กลีเซอรอลและซอร์บิทอล ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 20, 25, 30, 35 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS พบว่าการเติมพลาสติกไซเซอร์ทั้ง 2 ชนิด ทุกระดับความเข้มข้นไม่ส่งผลต่อความหนาของฟิล์ม EPS ($p > 0.05$) (Table 7) อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลมีขนาดเล็ก ไม่มีผลต่อการจัดเรียงโมเลกุลโดยรวมของโครงสร้างร่างแหของฟิล์ม ความหนาจึงไม่แตกต่างกัน โดยฟิล์ม EPS ที่เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซอร์มีความหนาอยู่ระหว่าง 0.063 ± 0.001 ถึง 0.065 ± 0.005 มิลลิเมตร ในขณะที่ฟิล์ม EPS ที่เติมซอร์บิทอลเป็นพลาสติกไซเซอร์มีความหนาอยู่ระหว่าง 0.062 ± 0.002 ถึง 0.065 ± 0.002 มิลลิเมตร

ผลการทดสอบการต้านทานแรงดึงและค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม EPS ที่เติม พลาสติกไซเซอร์ชนิดและปริมาณแตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 7 (Table 7) พบว่าค่าต้านทานแรงดึงของฟิล์ม EPS ที่เติมพลาสติกไซเซอร์ทั้ง 2 ชนิด มีค่าลดลง แต่ค่าการยืดตัวเมื่อขาดเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกไซเซอร์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลมีหมู่ไฮดรอกซิล ซึ่งสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของพลาสติกไซเซอร์กับโมเลกุลของ EPS ได้ จึงทำให้พลาสติกไซเซอร์ดังกล่าวสามารถเข้าไปแทรกกระหว่างสายโมเลกุลของ EPS ส่งผลให้แรงดึงคูระหว่างโมเลกุลของ EPS ลดลง มีปริมาตรอิสระ (Free volume) และความสามารถในการเคลื่อนที่ของสายโมเลกุลเพิ่มขึ้น (Sothornvit and Krochta, 2000) โดยฟิล์ม EPS ที่เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซอร์มีค่าต้านทานแรงดึงอยู่ระหว่าง 3.50 ± 0.03 ถึง 11.18 ± 1.06 MPa และค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มอยู่ระหว่าง 27.65 ± 4.27 ถึง 47.97 ± 2.42 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ฟิล์ม EPS ที่เติมซอร์บิทอลเป็นพลาสติกไซเซอร์มีค่าต้านทานแรงดึงอยู่ระหว่าง 12.04 ± 1.72 ถึง 28.50 ± 2.81 MPa และค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มอยู่ระหว่าง 2.37 ± 0.79 ถึง 22.20 ± 7.82

เปอร์เซ็นต์ (Table 7) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าฟิล์ม EPS ที่เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์ให้สมบัติของฟิล์มดีกว่าซอร์บิทอล โดยฟิล์มที่เติมกลีเซอรอลมีความอ่อนตัวและความยืดหยุ่นสูงกว่าเหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นฟิล์มชนิดอ่อน (Flexible film) ในการประยุกต์ใช้ได้ดีกว่า ในขณะที่ฟิล์มที่เติมซอร์บิทอลในระดับที่เท่ากันจะมีความยืดหยุ่นน้อยกว่าและค่อนข้างแข็งกว่า ทั้งนี้เพราะ โครงสร้างโมเลกุลของกลีเซอรอลมีขนาดเล็กกว่าและเข้ากันได้ดี (Compatibility) กับโมเลกุล EPS มากกว่าซอร์บิทอล ทำให้สามารถแทรกเข้าไประหว่างโมเลกุลของ EPS ได้ดีกว่า (Dias *et al.*, 2010)

1.2.2 การซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำของฟิล์ม

ผลการวัดค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์ม EPS ที่เติมพลาสติกไซเซออร์ชนิดและปริมาณต่างๆ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 (Table 7) พบว่าฟิล์ม EPS ที่เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์มีค่าการซึมผ่านไอน้ำสูงกว่าฟิล์ม EPS ที่เติมซอร์บิทอลเป็นพลาสติกไซเซออร์ ทั้งนี้เพราะกลีเซอรอลเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่าซอร์บิทอล ทำให้สามารถเข้าไปแทรกกระหว่างสายพอลิเมอร์ของ EPS ได้มากกว่าซอร์บิทอล ส่งผลให้ปริมาตรอิสระของพอลิเมอร์มีมากขึ้น ไอน้ำสามารถเคลื่อนที่ผ่านได้ง่ายขึ้น (Turhan *et al.*, 2007) และโครงสร้างโมเลกุลของกลีเซอรอลมีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าซอร์บิทอล ส่งผลให้ฟิล์ม EPS ที่เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์ดูดซึมน้ำได้ดีกว่าซอร์บิทอล (Zhang and Han, 2006) นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลและซอร์บิทอลส่งผลให้ค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) (Table 7) อันเนื่องมาจากสมบัติความชอบน้ำของพลาสติกไซเซออร์เอง รวมทั้งอาจเนื่องมาจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ ทำให้มีการแทรกตัวในสายพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้โครงสร้างของพอลิเมอร์ถูกเปิดออก ไอน้ำจึงสามารถผ่านเข้าไปในโครงสร้างฟิล์มได้มากขึ้น (Yang and Paulson, 2000) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Galdeano และคณะ (2009) พบว่าฟิล์มแป้งข้าวโอ๊ตที่เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์มีค่าการซึมผ่านของไอน้ำสูงกว่าซอร์บิทอล เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Ghasemlou และคณะ (2011) พบว่าการผลิตฟิล์ม Kefiran ที่เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์ ($5.55 \pm 0.21 \times 10^{-11}$ g /ms Pa) มีค่าการซึมผ่านของไอน้ำสูงกว่าซอร์บิทอล ($3.61 \pm 0.35 \times 10^{-11}$ g /ms Pa) และการเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลและซอร์บิทอล ส่งผลให้ค่าการซึมผ่านของไอน้ำของฟิล์ม Kefiran มีค่าสูงขึ้น

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ต่อสมบัติการละลายน้ำของฟิล์ม EPS พบว่าฟิล์ม EPS มีความสามารถในการละลายน้ำเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ (กลีเซอรอลและซอร์บิทอล) ($p < 0.05$) โดยฟิล์ม EPS ที่เติมกลีเซอรอลเป็นพลาสติกไซเซออร์มีค่าการละลายน้ำอยู่ระหว่าง 40.49 ± 4.95 ถึง 51.52 ± 0.52 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ฟิล์ม EPS ที่เติมซอร์บิทอลเป็นพลาสติกไซเซออร์มีค่าการละลายอยู่ระหว่าง 44.49 ± 0.05 ถึง 50.08 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ (Table 8) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ghasemlou และคณะ (2011) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลจาก 15 เป็น 35 เปอร์เซ็นต์ของ Kefiran ฟิล์ม Kefiran มีค่าการละลายน้ำเพิ่มขึ้นจาก 25.30 เป็น 28.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของโมเลกุลของกลีเซอรอลและ

ซอร์บิทอลมีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบ ส่งผลให้ฟิล์มมีสมบัติในการชอบน้ำ (Hydrophilic) เพิ่มขึ้น (Tong *et al.*, 2008)

Table 7. Effect of plasticizer types and concentrations on thickness, water vapor permeability (WVP), tensile strength and elongation at break of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

Plasticizer type	Plasticizer conc. (%)	Thickness (mm) [#]	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	WVP ($\times 10^{-10}$ g /ms Pa)
Glycerol	20	0.064 \pm 0.002 ^{a##}	11.18 \pm 1.06 ^c	27.65 \pm 4.27 ^d	4.27 \pm 0.38 ^d
	25	0.063 \pm 0.003 ^a	7.38 \pm 0.37 ^b	30.82 \pm 6.31 ^{de}	4.34 \pm 0.21 ^d
	30	0.064 \pm 0.001 ^a	6.82 \pm 0.63 ^b	34.46 \pm 3.00 ^e	4.80 \pm 0.43 ^e
	35	0.065 \pm 0.005 ^a	5.21 \pm 0.15 ^{ab}	45.53 \pm 4.68 ^f	5.27 \pm 0.28 ^d
	40	0.063 \pm 0.001 ^a	3.50 \pm 0.03 ^a	47.97 \pm 2.42 ^f	5.07 \pm 0.14 ^{ed}
Sorbitol	20	0.065 \pm 0.001 ^a	25.56 \pm 4.71 ^c	2.37 \pm 0.79 ^a	0.51 \pm 0.01 ^a
	25	0.065 \pm 0.001 ^a	28.50 \pm 2.81 ^f	2.95 \pm 0.22 ^a	0.89 \pm 0.01 ^{ab}
	30	0.065 \pm 0.002 ^a	27.43 \pm 1.13 ^{ef}	3.31 \pm 0.19 ^a	0.88 \pm 0.07 ^{ab}
	35	0.062 \pm 0.002 ^a	19.30 \pm 2.22 ^d	15.57 \pm 2.86 ^b	1.40 \pm 0.33 ^c
	40	0.063 \pm 0.002 ^a	12.04 \pm 1.72 ^c	22.20 \pm 7.82 ^c	1.16 \pm 0.10 ^{bc}

[#] Values are given as mean \pm SD from triplicate determinations.

^{##} Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

1.2.3 ค่าสีของฟิล์ม

ผลการวัดค่าสีของฟิล์ม EPS ที่เติมพลาสติกไซเซอรอลชนิดและปริมาณต่างๆ (Table 8) พบว่าชนิดของพลาสติกไซเซอรอลไม่ส่งผลต่อค่า L* และ b* ของฟิล์ม EPS ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่า L* อยู่ระหว่าง 87.54 \pm 0.17 ถึง 88.76 \pm 0.08 และ 5.76 \pm 0.48 ถึง 7.6 \pm 0.61 ตามลำดับ แต่ส่งผลต่อค่า a* ของฟิล์ม EPS โดยฟิล์ม EPS ที่เติมซอร์บิทอลเป็นพลาสติกไซเซอรอลมีค่า a* น้อยกว่ากลีเซอรอล ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง -1.65 \pm 0.04 ถึง -1.56 \pm 0.01 และ -1.45 \pm 0.05 ถึง -1.30 \pm 0.07 ตามลำดับ ในขณะที่ค่า b* ของฟิล์ม EPS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกไซเซอรอล (กลีเซอรอลและซอร์บิทอล) ($p < 0.05$) แต่ไม่ส่งผลต่อค่า L* และ a* ($p > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wang และคณะ (2011) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลจาก 0 เป็น 6.30 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ส่งผลให้ฟิล์ม Carrot puree มีค่า b* เพิ่มขึ้นจาก 43.91 เป็น 45.65 ตามลำดับ

1.2.4 การส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์ม

จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์ต่อการส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์ม EPS พบว่าพลาสติกไซเซออร์ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ฟิล์ม EPS ที่เติมซอร์บิทอลมีค่าการส่องผ่านแสงและความโปร่งใสมากกว่าการเติมกลีเซอรอล ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Leerahawong และคณะ (2012) พบว่าฟิล์มโปรตีนจากปลาหมึกที่เติมซอร์บิทอลเป็นพลาสติกไซเซออร์มีค่าการส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์มมากกว่าเติมกลีเซอรอล และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Piermaria และคณะ (2011) พบว่าฟิล์ม Kefiran ที่เติมซอร์บิทอล ($2.59A_{600}/\text{mm}$) เป็นพลาสติกไซเซออร์ มีความโปร่งใสของฟิล์มมากกว่ากลีเซอรอล ($2.71A_{600}/\text{mm}$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกลีเซอรอลมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าซอร์บิทอลแต่มีความเป็นขั้ว (Polarity) มากกว่าซอร์บิทอล (Leerahawong *et al.*, 2012) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์จาก 20 เป็น 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS พบว่าฟิล์ม EPS มีค่าการส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์มเพิ่มขึ้น แต่จะมีค่าการส่องผ่านแสงและความโปร่งใสลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์เป็น 35 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS ทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้ความเข้มข้นของพลาสติกไซเซออร์มากเกินไป ทำให้เกิดการแยกตัวของพลาสติกไซเซออร์ออกจากโครงสร้างภายในมาสู่บริเวณผิวหน้าของฟิล์ม ส่งผลให้บริเวณพื้นผิวของฟิล์มมีลักษณะเหนียว (Godbillot *et al.*, 2006) และมีผลทำให้แสงเกิดการหักเหที่บริเวณผิวหน้าของฟิล์ม แสงที่ส่องผ่านฟิล์มจึงน้อยลง ความใสของฟิล์มจึงลดลง โดยฟิล์ม EPS มีค่าการส่องผ่านแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นได้ (350-800 นาโนเมตร) อยู่ระหว่าง 34.2 ถึง 86.07 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าการส่องผ่านแสงในช่วงแสง UV (280 นาโนเมตร) มีค่าอยู่ระหว่าง 1.25 ถึง 2.72 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าการส่องผ่านแสงต่ำสุดเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร (Table 9) ดังนั้นฟิล์ม EPS ทุกการทดลองมีประสิทธิภาพในการป้องกันแสงยูวีได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มสังเคราะห์ทางการค้า เช่น ฟิล์ม LDPE (13.1 เปอร์เซ็นต์) และ ฟิล์ม Oriented polypropylene (OPP) (4.6 เปอร์เซ็นต์) (Shiku *et al.*, 2003) เป็นต้น ในขณะที่ค่าความโปร่งใสของฟิล์ม EPS มีค่าอยู่ระหว่าง 1.20 ± 0.08 ถึง 2.50 ± 0.23 (Table 8) ซึ่งมีความโปร่งใสมากกว่าฟิล์ม LDPE (ค่าความโปร่งใสเท่ากับ 3.05) และฟิล์ม Polyvinylidene chloride (PVDC) (ค่าความโปร่งใสเท่ากับ 4.58) (Shiku *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นฟิล์มจากพอลิเมอร์สังเคราะห์ทางการค้า

จากผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกใช้กลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS เป็นพลาสติกไซเซอร์ในการผลิตฟิล์ม EPS ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากให้ฟิล์มที่มีสมบัติโดยรวมที่ดี คือ มีความยืดหยุ่น และมีความแข็งแรงมากที่สุด และไม่มีลักษณะเหนียวเหนอะที่ผิวของฟิล์ม

Table 8. Effect of plasticizer types and concentrations on solubility, transparency value and film color of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

Plasticizer type	Plasticizer conc. (%)	Solubility [#] (%)	Transparency value	Film color		
				L*	a*	b*
Glycerol	20	40.49±4.95 ^{a##}	1.75 ±0.10 ^{cd}	87.92±0.18 ^{ab}	-1.41±0.03 ^{cd}	6.15±0.25 ^{ab}
	25	41.28±0.55 ^{ab}	1.82±0.23 ^d	88.33±0.23 ^{ab}	-1.35±0.03 ^{de}	5.76±0.48 ^a
	30	42.34±1.42 ^{ba}	1.74±0.11 ^{cd}	88.17±0.26 ^{ab}	-1.45±0.05 ^c	6.59±0.49 ^{bc}
	35	45.09±0.75 ^{bc}	2.40±0.45 ^e	87.54±0.17 ^a	-1.41±0.10 ^{cd}	7.60±0.61 ^d
	40	51.52±0.52 ^e	2.50±0.23 ^e	88.07±0.85 ^{ab}	-1.30±0.07 ^e	6.63±0.22 ^b
Sorbital	20	44.54±1.12 ^{bc}	1.44 ±0.05 ^{abc}	88.39±0.84 ^b	-1.64±0.02 ^{ab}	6.63±0.22 ^{bc}
	25	44.49±0.05 ^{bc}	1.45±0.12 ^{abc}	88.76±0.08 ^b	-1.59±0.03 ^{ab}	6.58±0.22 ^{bc}
	30	47.06±2.39 ^{cd}	1.20±0.08 ^a	88.57±0.26 ^b	-1.56±0.01 ^b	6.16±0.14 ^{ab}
	35	47.11±3.00 ^{cd}	1.34±0.25 ^{ab}	88.36±0.07 ^{ab}	-1.63±0.05 ^{ab}	7.00±0.29 ^c
	40	50.08±0.96 ^{de}	1.61±0.17 ^{bcd}	88.66±0.93 ^b	-1.65±0.04 ^a	6.78±0.33 ^c

[#] Values are given as mean ±SD from triplicate determinations.

^{##} Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

Table 9. Effect of plasticizer types and concentrations on light transmission (%T) of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

Plasticizers conc. (%)	Light transmission (%) at different wavelength (nm)							
	200	280	350	400	500	600	700	800
Glycerol 20	0	1.95 ^{a#}	44.75 ^b	58.25 ^b	70.70 ^b	76.30 ^{bcd}	79.47 ^b	81.15 ^b
Glycerol 25	0	2.72 ^b	44.20 ^b	56.67 ^b	69.20 ^b	75.45 ^b	79.30 ^b	81.60 ^{bc}
Glycerol 30	0	1.77 ^{ab}	42.70 ^b	56.77 ^b	69.85 ^b	75.77 ^{bc}	79.15 ^b	80.92 ^b
Glycerol 35	0	1.25 ^a	34.20 ^a	47.40 ^a	61.02 ^a	67.97 ^a	71.95 ^a	74.65 ^a
Glycerol 40	0	2.47 ^b	36.65 ^a	49.07 ^a	61.97 ^a	69.05 ^a	73.67 ^a	76.35 ^a
Sorbitol 20	0	1.90 ^{ab}	52.80 ^c	65.25 ^c	76.22 ^c	79.90 ^{de}	81.60 ^{bc}	82.70 ^{bcd}
Sorbitol 25	0	1.80 ^{ab}	52.57 ^c	65.87 ^c	76.62 ^c	80.37 ^e	82.32 ^{bcd}	83.07 ^b
Sorbitol 30	0	2.37 ^b	57.85 ^{de}	70.75 ^d	79.17 ^c	84.20 ^f	85.67 ^d	86.07 ^d
Sorbitol 35	0	2.35 ^b	58.82 ^e	70.10 ^d	80.10 ^c	83.22 ^{ef}	84.67 ^{cd}	85.10 ^{cd}
Sorbitol 40	0	2.00 ^{ab}	54.00 ^{cd}	65.90 ^c	76.45 ^c	79.45 ^{cde}	80.50 ^b	80.30 ^{bcd}

[#]Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

2. ผลการเติมโคโคซาน (CS) ต่อสมบัติฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) จากเชื้อ *W. confusa* NH02

จากการศึกษาการผลิตฟิล์ม EPS จากสารละลายฟิล์มที่มีความเข้มข้นของ EPS เท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS พบว่าฟิล์ม EPS มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี (41.28 ± 0.55 เปอร์เซ็นต์) (Figure 8A) และเมื่อนำมาห่อหุ้มเนื้อหมูแช่เย็น พบว่าฟิล์ม EPS บางส่วนมีการละลายติดกับเนื้อหมู และไม่สามารถลอกแผ่นฟิล์มออกจากเนื้อหมูได้ (Figure 8B) จึงไม่เหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในการห่อหุ้มเนื้อหมูแช่เย็นเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องลดความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์ม EPS ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้มีการเตรียมฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS กับ CS ที่อัตราส่วนต่างๆ จากสารละลายฟิล์มที่มีปริมาณพอลิเมอร์ผสม (EPS/CS) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของพอลิเมอร์ผสม โดยการเติม CS มีผลต่อสมบัติของฟิล์ม EPS ดังนี้

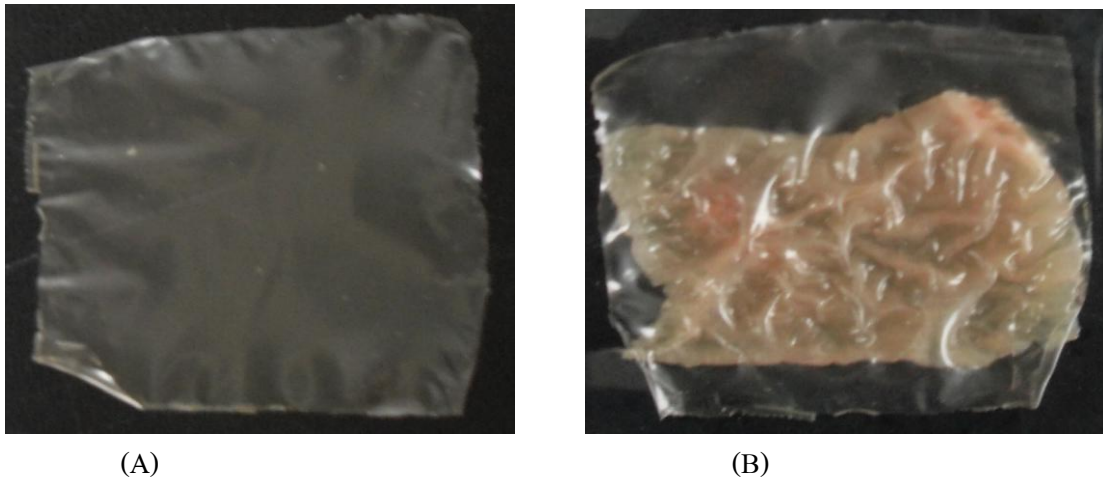


Figure 8. Appearance of EPS film plasticizer with 25% glycerol: (A) EPS film; (B) EPS film covered on pork slice.

2.1 ความหนาและสมบัติเชิงกล

จากการเตรียมฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่อัตราส่วน EPS:CS เท่ากับ 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก พบว่าการเติม CS ส่งผลให้ความหนาของฟิล์ม EPS เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์ม EPS ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) (Table 10) โดยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก มีความหนาเท่ากับ 0.051 ± 0.004 และ 0.049 ± 0.002 มิลลิเมตร ความหนาที่แตกต่างกันของฟิล์มที่ได้ขึ้นกับโครงสร้างโมเลกุลและขนาดของพอลิเมอร์ ตลอดจนการจัดเรียงโมเลกุลในระหว่างการทำแห้งฟิล์ม

ผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงกล (ค่าต้านทานแรงดึงและค่าการยืดตัวเมื่อขาด) ของฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก (Table 10) พบว่าฟิล์มผสม EPS/CS ส่งผลให้ฟิล์มมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นมากกว่าฟิล์ม EPS โดยอัตราส่วนระหว่าง EPS/CS ที่ 1:1 โดยน้ำหนัก ให้ฟิล์มที่มีค่าต้านทานแรงดึงสูงกว่า แต่มีค่าการยืดตัวต่ำกว่าฟิล์ม EPS/CS ที่อัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนัก ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Xu และคณะ (2005) พบว่าฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างแป้งกับ CS ที่อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก มีค่าต้านทานแรงดึงสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 40.25 MPa ในขณะที่ฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างแป้งกับ CS ที่อัตราส่วน 1.5:1 โดยน้ำหนัก มีค่าการยืดตัวเมื่อขาดสูงสุดเท่ากับ 61.1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์ม CS ซึ่งมีค่าต้านทานแรงดึงเท่ากับ 25 MPa และค่าการยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 33.3 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Rao และคณะ (2010) พบว่าค่าต้านทานแรงดึงของฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างสารละลาย CS กับ Guar gum ที่อัตราส่วน 85:15 โดยปริมาตร มีค่าสูงกว่าฟิล์ม CS ซึ่งมีค่าต้านทานแรงดึงเท่ากับ 10.54 และ 3.96 KPa ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของไคโตซานประกอบด้วยหมู่เอมีนอิสระ (NH_2) ซึ่งสามารถรับโปรตอนจากสารละลายกรดอะซิติกเกิดเป็น Cationic amino (NH_3^+) ในขณะที่โครงสร้างของ EPS จะถูกทำลายจากกระบวนการละลายพอลิเมอร์ EPS ทำให้หมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) ของพอลิเมอร์ EPS สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับ NH_3^+ ของไคโตซานได้ (Rao *et al.*, 2010) ส่งผลให้ฟิล์ม EPS ที่เติม CS (อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก) มีค่าต้านทานแรงดึงและมีความยืดหยุ่นมาก

ขึ้น (ฟิล์มมีความแข็งแรงและเหนียวมากขึ้น) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ EPS สูงกว่า CS (ฟิล์ม EPS/CS ที่อัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนักพบว่าฟิล์มมีค่าต้านทานแรงดึงไม่แตกต่างจากฟิล์ม EPS ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$) (Table 10) ทั้งนี้อาจเกิดจากพอลิเมอร์แต่ละชนิดมีแนวโน้มรวมตัวกันเองทำให้มีโอกาสเกิดพันธะภายในโมเลกุล (Intramolecular bonding) คือ พันธะไฮโดรเจนของ EPS กับ EPS หรือ CS กับ CS มากกว่าการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างพอลิเมอร์ (Xu *et al.*, 2005)

2.2 การซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำของฟิล์ม

ผลการวัดค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มพอลิเมอร์ผสม EPS/CS ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก ร่วมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณพอลิเมอร์ผสม พบว่าฟิล์ม EPS/CS ทั้งสองอัตราส่วนที่เตรียมจากสารละลายฟิล์มความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการซึมผ่านไอน้ำสูงกว่าฟิล์ม EPS ที่ความเข้มข้นเดียวกันเล็กน้อยแต่มีค่าต่ำกว่าฟิล์ม EPS ที่เตรียมจากสารละลายฟิล์มความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) (Table 10) เมื่ออัตราส่วน EPS/CS เพิ่มขึ้น พบว่าฟิล์มผสมมีค่าการซึมผ่านไอน้ำสูงขึ้น ($p < 0.05$) (Table 10) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของ EPS ส่งผลให้มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ (OH) มากขึ้น ฟิล์มจึงมีสมบัติในการชอบน้ำมากขึ้น (Pelissari *et al.*, 2012) โดยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก มีค่าการซึมผ่านไอน้ำเท่ากับ $2.78 \pm 0.22 \times 10^{-10}$ และ $3.33 \pm 0.27 \times 10^{-10}$ g/m s Pa ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม Vasconez และคณะ (2009) พบว่าการเตรียมฟิล์มแป้งมันสำปะหลังร่วมกับไคโตซาน ส่งผลให้ค่าการซึมผ่านไอน้ำมีค่าลดลงกว่าชุดควบคุม (ฟิล์มแป้งมันสำปะหลัง) โดยมีค่าการซึมผ่านไอน้ำเท่ากับ 2.3×10^{-10} และ 12.1×10^{-10} g/m s Pa ตามลำดับ และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Pelissari และคณะ (2012) พบว่าการเตรียมฟิล์มแป้งมันร่วมกับไคโตซาน ส่งผลให้ฟิล์มมีค่าการซึมผ่านไอน้ำลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ฟิล์มแป้งมัน) โดยมีค่าการซึมผ่านไอน้ำเท่ากับ 1×10^{-10} และ 2.2×10^{-10} g/m s Pa ตามลำดับ

จากการศึกษาความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก ร่วมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณพอลิเมอร์ผสม พบว่าการเติม CS ในฟิล์ม EPS ส่งผลให้ค่าการละลายน้ำฟิล์ม EPS ลดลง ($p < 0.05$) (Table 10) โดยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก มีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 14.95 ± 2.01 และ 21.68 ± 0.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ฟิล์ม EPS ที่เตรียมจากสารละลายฟิล์มความเข้มข้น 1.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 35.30 ± 2.75 และ 47.71 ± 0.21 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก CS มีสมบัติในการไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) สูงกว่า EPS และพันธะไฮโดรเจนที่เกิดระหว่างพอลิเมอร์ของ CS กับ EPS ส่งผลให้สมบัติในการชอบน้ำของฟิล์มลดลง การละลายน้ำของฟิล์มจึงลดลง (Vasconez *et al.*, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Rotta และคณะ (2009) พบว่าการเติม CS ในฟิล์ม Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) ส่งผลให้ค่าการละลายน้ำของฟิล์ม HPMC ลดลง โดยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง HPMC/CS ที่อัตราส่วน 70:30 โดยน้ำหนัก มีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 25.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ฟิล์ม HPMC มีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และสอดคล้องกับผลการ

ทดลองของ Vasconez และคณะ (2009) พบว่าการเติม CS ในฟิล์มแป้งมันสำปะหลัง ส่งผลให้ค่าการละลายน้ำของฟิล์มแป้งมันสำปะหลังลดลง โดยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างแป้งมันสำปะหลังกับ CS มีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ฟิล์มแป้งมันสำปะหลังมีค่าการละลายน้ำเท่ากับ 35 เปอร์เซ็นต์

Table 10. Effect of chitosan (CS) on thickness, tensile strength, elongation at break, water vapor permeability (WVP) and solubility of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

Film	Thickness [#] (mm)	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)	WVP ($\times 10^{-10}$ g/msPa)	Solubility (%)
EPS (conc.1.5%)	0.042 \pm 0.006 ^{a##}	4.85 \pm 0.38 ^a	25.22 \pm 6.56 ^a	2.30 \pm 0.12 ^a	35.30 \pm 2.75 ^c
EPS (conc.3%)	0.062 \pm 0.003 ^c	7.02 \pm 0.21 ^a	22.27 \pm 1.50 ^a	4.14 \pm 0.21 ^d	47.71 \pm 4.42 ^d
EPS/CS (conc.1.5%)					
1:1	0.051 \pm 0.004 ^b	14.24 \pm 2.62 ^b	51.05 \pm 1.70 ^b	2.78 \pm 0.22 ^b	14.95 \pm 2.01 ^a
2:1	0.049 \pm 0.002 ^b	5.35 \pm 1.71 ^a	62.63 \pm 2.11 ^c	3.33 \pm 0.27 ^c	21.68 \pm 0.92 ^b
CS (conc.1.5%)	0.066 \pm 0.007 ^d	25.01 \pm 2.40 ^c	76.77 \pm 4.55 ^d	3.20 \pm 0.26 ^c	12.76 \pm 0.75 ^a

[#]Values are given as mean \pm SD from triplicate determinations.

^{##}Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

2.3 ค่าสีของฟิล์ม

ผลการเตรียมฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก ร่วมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณพอลิเมอร์ผสม พบว่าการเติม CS ส่งผลให้ฟิล์ม EPS มีค่า a^* เพิ่มขึ้น แต่มีค่า b^* ลดลง ($p < 0.05$) ในขณะที่ไม่ส่งผลต่อค่า L^* ของฟิล์ม EPS เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์ม EPS ($p > 0.05$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฟิล์มผสม EPS/CS มีความเหลืองน้อยกว่าฟิล์ม EPS ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณการใช้ EPS ในฟิล์มผสม EPS/CS น้อยลง ซึ่ง EPS มีสีเหลืองมากกว่า CS จึงส่งผลให้ฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS มีสีเหลืองน้อยกว่าชุดควบคุม โดยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS มีค่า L^* อยู่ระหว่าง 88.82 \pm 0.21 ถึง 89.54 \pm 0.89 ค่า a^* อยู่ระหว่าง -1.58 \pm 0.09 ถึง -1.48 \pm 0.02 และค่า b^* อยู่ระหว่าง 4.74 \pm 0.30 ถึง 5.09 \pm 0.43 (Table 11)

2.4 การส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์ม

ผลการวัดค่าการส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS ที่อัตราส่วน 1:1 และ 2:1 โดยน้ำหนัก ร่วมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณพอลิเมอร์ผสม พบว่าการเติม CS ไม่ส่งผลต่อความโปร่งใสของฟิล์ม EPS เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์ม EPS ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$) (Table 11) โดยฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS มีค่าความโปร่งใสอยู่ระหว่าง 1.50 \pm 0.27 ถึง 1.84 \pm 0.41

ซึ่งมีความโปร่งใสมากกว่าฟิล์ม LDPE (ค่าความโปร่งใสเท่ากับ 3.05) และฟิล์ม Polyvinylidene chloride (PVDC) (ค่าความโปร่งใสเท่ากับ 4.58) (Shiku *et al.*, 2003) ซึ่งเป็นฟิล์มสังเคราะห์ทางการค้า ในขณะที่ฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS/CS มีค่าการส่องผ่านแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นได้ (350-800 นาโนเมตร) อยู่ระหว่าง 56.25 ถึง 86.27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าการส่องผ่านแสงในช่วงแสง UV (280 นาโนเมตร) มีค่าอยู่ระหว่าง 12.15 ถึง 15.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าฟิล์ม EPS ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 2.60 ถึง 4.95 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองข้างต้น จึงเลือกฟิล์มผสม EPS/CS ที่อัตราส่วนผสมเท่ากับ 1:1 โดยน้ำหนัก ที่เตรียมจากสารละลายฟิล์มความเข้มข้นพอลิเมอร์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณพอลิเมอร์ผสมเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากฟิล์มดังกล่าวมีสมบัติที่ต้องการ คือ มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ มีความยืดหยุ่น และมีความแข็งแรงมากที่สุด

Table 11. Effect of chitosan (CS) on transparency value and film color of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

Treatments (%)	Light transmission (%) at different wavelength (nm)							
	200	280	350	400	500	600	700	800
EPS (conc.1.5%)	0	4.95 ^{a#}	49.65 ^{ab}	59.57 ^a	72.55 ^a	77.27 ^a	80.15 ^{ab}	81.65 ^{abc}
EPS (conc.3%)	0	2.60 ^a	51.57 ^{bc}	63.02 ^a	75.59 ^{abc}	80.52 ^{ab}	83.22 ^{ab}	84.60 ^c
EPS/CS (conc.1.5%)								
1:1	0	15.67 ^c	58.05 ^d	72.12 ^b	81.20 ^c	83.95 ^b	85.27 ^c	86.27 ^c
2:1	0	12.15 ^b	56.25 ^{cd}	69.12 ^b	78.32 ^{abc}	81.47 ^{ab}	83.70 ^{bc}	84.85 ^c
CS (conc.1.5%)	0	19.30 ^d	46.82 ^{ab}	68.60 ^b	78.80 ^{bc}	81.57 ^{ab}	82.10 ^{ab}	82.75 ^{bc}

[#] Values are given as mean \pm SD from triplicate determinations.

^{##} Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 12. Effect of chitosan (CS) on light transmission (%T) of EPS film from *Weissella confusa* NH02.

Film	Transparency value [#]	Film color		
		L*	a*	b*
EPS (conc.1.5%)	3.38 ±0.48 ^{b###}	89.00±0.25 ^b	-1.80±0.21 ^a	6.10±0.91 ^{bc}
EPS (conc.3%)	1.46±0.21 ^a	88.55±0.10 ^b	-1.77±0.08 ^a	6.61±0.40 ^c
EPS/CS (conc.1.5%)				
1:1	1.50±0.27 ^a	89.54±0.89 ^b	-1.58±0.09 ^b	4.74±0.30 ^a
2:1	1.84±0.41 ^a	88.82±0.21 ^b	-1.48±0.02 ^{bc}	5.09±0.43 ^a
CS (conc.1.5%)	1.29±0.44 ^a	83.64±0.67 ^a	-1.93±0.15 ^a	5.76±0.46 ^b

[#] Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

3. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย

จากการทดลองนำตัวอย่างเนื้อหมูแช่เย็นที่เน่าเสีย (เกิดเมือกและมีสีคล้ำ) มา Swab เชื้อบริเวณผิวหน้าของเนื้อหมู พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของเนื้อหมูแช่เย็นได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต และเมื่อนำแบคทีเรียที่สามารถคัดแยกได้ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ การติดสีแกรมและการจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของเชื้อต่างกันคือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น (Short rod) 7 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลม (Cocci) 1 ไอโซเลต (Table 13) จากนั้นได้เลือกแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบได้ในทุก Dilution (10^{-1} - 10^{-6}) หรือใน Dilution ต่ำ (10^{-6}) และมีลักษณะโคโลนี และรูปร่างที่แตกต่างมา 2 ไอโซเลต (P1-2 และ P1-7) เพื่อเทียบเคียงชนิดโดยวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าลำดับเบส 16S rDNA ของไอโซเลต P1-2 และ P1-7 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Acinetobacter iwoffii* และ *Pseudomonas fragi* ตามลำดับ ซึ่งมีความเหมือน (Homology) เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 2 ไอโซเลต และได้นำไป Deposited ใน DDBJ/EMBL/GenBank โดยได้ Accession number คือ AB609072 และ AB609073 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและอุณหภูมิต่ำ (Psychrotrophic) (Dainty and Mackey, 1992) โดยทั่วไปสามารถตรวจพบ *A. iwoffii* ได้ในอาหารแช่เย็น เช่น เบคอน, ไช้, ไข่, หมู และนม โดย *Acinetobacter* sp. เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของเนื้อหมูแช่เย็น ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Li *et al.*, 2006) ในขณะที่ *Pseu. fragi* สามารถตรวจพบได้ในผลิตภัณฑ์นมและเนื้อสัตว์ (Lebert *et al.*, 1998) ซึ่งในงานวิจัยของ Olsson และคณะ (2003) พบว่า *Pseu. fragi* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุหลักในการเน่าเสียของเนื้อหมูแช่เย็น หลังการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองของ Sakala และคณะ (2002) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของเนื้อวัวแช่เย็นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยตรวจพบเชื้อ *Acinetobacter* และ *Pseudomonas* เช่นกัน และผลการทดลองของ Liu และคณะ (2006) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูเกิดการเน่าเสียกับการเก็บรักษาเนื้อหมูที่สภาวะต่างๆ สามารถตรวจพบเชื้อ *Pseudomonas* ในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น เพราะเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดย *Pseudomonas* จะมีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Jiang และคณะ (2011) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการเน่าเสียของเนื้อหมูแช่เย็นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน โดยใช้เทคนิค PCR-DGGE และ Real-time PCR ซึ่งเทคนิค PCR-DGGE เป็นเทคนิคใช้แยกความแตกต่างของโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยอาศัยตัวกลางเป็นเจล โดยจะแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกันได้แม้ว่าขนาดความยาวของดีเอ็นเอจะเท่ากัน ซึ่งจะอาศัยความแตกต่างของความเข้มข้นของสารที่มีคุณสมบัติในการแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturant) ที่มีสัดส่วนความเข้มข้นของสาร (Gradient) จากส่วนบนของเจลที่มีความเข้มข้นน้อย ไปสู่ส่วนล่างของเจลที่มีความเข้มข้นมาก รวมไปถึงการใช้อุณหภูมิสูงในการทำลายพันธะระหว่างคู่เบส G-C ซึ่งเป็นการจับกันโดยใช้พันธะที่เหนียวแน่น ซึ่งความเข้มข้นหรือปริมาณของคู่เบส G-C ที่มีในดีเอ็นเอแต่ละคู่ที่แตกต่างกันนี้ทำให้การเคลื่อนที่ในตัวกลางดังที่กล่าวมาข้างต้นแตกต่างกันจึงสามารถมองเห็นรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลต่างกัน (Nakatsu, 2007) ส่วนเทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคสามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตของ PCR ในแต่ละรอบโดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงไปพร้อมกับทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้พร้อมกัน (Durtschi *et al.*, 2007) ซึ่งจากผลการทดลอง พบว่าการใช้เทคนิคทั้ง 2 เทคนิค สามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อ *Pseudomonas* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย

Table 13. Characteristics of spoilage bacteria isolated from refrigerated pork.

Isolates	Gram stain*	Shape
P1-2	-	cocci
P1-3	-	short rod
P1-4	-	short rod
P1-5	-	short rod
P1-6	-	short rod
P1-7	-	short rod
P1-12	-	short rod
P1-13	-	short rod

*: - is Gram-negative bacteria.

4. ความเข้มข้นต่ำสุดของสารต่อต้านจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูเน่าเสีย

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของสารต่อต้านจุลินทรีย์วัดได้จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ (Minimal inhibitory concentration; MIC) โดยสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์สูงจะมีค่า MIC ต่ำ จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อต้านจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ ไนซิน และ ไทมอลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseu. fragi* MA07 และ *A. iwoffii* MA02 ด้วยเทคนิค Agar well diffusion พบว่าไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. iwoffii* MA02 แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseu. fragi* MA07 ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Table 14) โดยสารละลายควบคุม (กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.02 โมลาร์) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. iwoffii* MA02 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Laukova (2000) ที่ศึกษาประสิทธิภาพของไนซินในการยับยั้งเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี Agar well diffusion พบว่าไนซินความเข้มข้น 400 AU/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *Acinetobacter* ได้ โดยมีขอบเขตการยับยั้งเชื้อเท่ากับ 17 มิลลิเมตร ในขณะที่ไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseu. fragi* MA07 และ *A. iwoffii* MA02 ได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 14) โดยสารละลายควบคุม (เอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseu. fragi* MA07 และ *A. iwoffii* MA02 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Gniewosz และคณะ (2011) พบว่าไทมอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922 และ *Sal. Enteritidis* ATCC 13076 ได้ ซึ่งมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.012 ถึง 0.024 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับผลการทดลองของ Gutierrez-Larrainzar (2012) พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. coli* ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 400, 580 และ 255 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากเหตุผลดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่าไนซินและไทมอลสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในรูปของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

Nguyen และคณะ (2008) ทดลองนำฟิล์มเซลล์ูโลสที่มีการเติมไนซินมาห่อหุ้มไส้กรอกที่ผ่านการจุ่มเชื้อ *Lis. monocytogenes* (เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/ml) พบว่าฟิล์มเซลล์ูโลสที่มีการเติมไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lis. monocytogenes* ได้ โดยมีปริมาณเชื้อลดลง 2 logCFU/g หลังจากเก็บไส้กรอกไว้ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ฟิล์มเซลล์ูโลสที่มีการเติมไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด โดยมีปริมาณเชื้อลดลง 3.3 logCFU/g หลังจากเก็บไส้กรอกไว้ 14 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Giatrakou และคณะ (2010) ที่ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของไคโตซาน ไทมอล และการใช้ไทมอลร่วมกับไคโตซาน ในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อไก่สำเร็จรูปพร้อมปรุง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าการใช้ไทมอล (ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)) ร่วมกับไคโตซาน (ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonads* sp. ได้ โดยมีปริมาณเชื้อลดลง 1.5 logCFU/g นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรียแลคติก *Bro. thermosphacta* และ Enterobacteriaceae ได้ โดยมีปริมาณเชื้อลดลง 2-3 logCFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์) นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Kuorwel และคณะ (2011) ศึกษาผลการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ Linalool, Carvacrol และ ไทมอลในฟิล์มแข็งต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* พบว่าฟิล์มแข็งที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ ซึ่ง ไทมอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.38 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) มีขนาดวงใสเท่ากับ 23.8 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ Linalool ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มีขนาดวงใสเท่ากับ 18.6 มิลลิเมตร ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่า ไนซินและ ไทมอลสามารถนำไปใช้ในอาหารหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารระหว่างการเก็บรักษาได้ โดย ไทมอลและ ไนซินมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย คือ ไทมอลจะจับกับ Lipid bilayer ในส่วนของชั้น Cytoplasmic membranes ของแบคทีเรียได้ เนื่องจากโมเลกุลของ ไทมอลมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) สูง ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆ ภายในเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ได้ เช่น ไอออน ATP และ Nucleic acid (Mastromatteo *et al.*, 2009) ในขณะที่ ไนซินจะจับกับ Lipid II ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต Peptidoglycan โดย Peptidoglycan เป็นสารที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ส่งผลให้แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์ผนังเซลล์ได้ ทำให้เกิดรูบริเวณผนังเซลล์ เป็นเหตุให้การควบคุมสารผ่านเข้า-ออกเมมเบรนทำงานบกพร่อง ส่งผลทำให้เซลล์แบคทีเรียตายได้ (Arauz *et al.*, 2009)

จากผลการทดลองข้างต้น จึงเลือก ไทมอลเป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่นำไปใช้ในการศึกษาต่อไป โดยผสมลงในฟิล์ม EPS/CS เพื่อทำเป็นฟิล์มยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจาก ไทมอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียดีกว่า ไนซิน

Table 14. Minimal inhibitory concentration (MIC) of nisin and thymol against the growth of *Acinetobacter iwoffii* MA02 and *Pseudomonas fragi* MA07 by agar well diffusion method.

Strains	Minimal inhibitory concentration (MIC) (mg/ml)	
	Nisin	Thymol
<i>Acinetobacter iwoffii</i> MA02	5	1.25
<i>Pseudomonas fragi</i> MA07	-	2.5

-: not inhibited.

5. ผลของการเติมไทมอลต่อสมบัติของฟิล์มผสมเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS)

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูแช่เย็นเกิดการเน่าเสีย พบว่าไทมอลมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียดีกว่าไนซิน ดังนั้นจึงเลือกไทมอลผสมลงในฟิล์ม EPS/CS โดยใช้ไทมอลความเข้มข้นเท่ากับ MIC และ 2 เท่าของ MIC (2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของฟิล์ม EPS/CS ซึ่งการเติมไทมอลส่งผลต่อสมบัติของฟิล์ม EPS/CS ดังนี้

5.1 ความหนาและสมบัติเชิงกล

ผลการเตรียมฟิล์ม EPS/CS ที่มีการเติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการเติมไทมอลในฟิล์ม EPS/CS ส่งผลต่อความหนาของฟิล์ม โดยฟิล์มที่เติมไทมอลมีความหนามากกว่าฟิล์มที่ไม่เติมไทมอล (ชุดควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของไทมอลเพิ่มขึ้นจาก 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ส่งผลให้ฟิล์มมีความหนาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีความหนาอยู่ระหว่าง 0.063 ± 0.004 ถึง 0.065 ± 0.002 มิลลิเมตร ในขณะที่ชุดควบคุมมีความหนาเท่ากับ 0.056 ± 0.003 มิลลิเมตร (Table 15) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไทมอลมีลักษณะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิต่ำ และขนาดโมเลกุลของไทมอลมีขนาดใหญ่เมื่อแทรกตัวเข้าไปภายในโครงสร้างของฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ซึ่งมีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้ฟิล์มมีความหนาเพิ่มขึ้น (Kroll and Rawel, 2001) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Corrales และคณะ (2009) พบว่าการเติมสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในฟิล์มแป้งจากถั่ว ส่งผลให้ความหนาของฟิล์มเพิ่มขึ้น 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองของ Theivendran และคณะ (2008) ซึ่งศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ผสมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น พบว่าการเติมสารสกัดจากเมล็ดองุ่นส่งผลให้ความหนาของฟิล์มโปรตีนจากถั่วเหลืองเพิ่มขึ้นจาก 33.0 ไมโครเมตร (ฟิล์มโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ไม่เติมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น) เป็น 77.89 ไมโครเมตร (ฟิล์มโปรตีนจากถั่วเหลืองที่เติมสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์)

การนำฟิล์มจากพอลิเมอร์ชีวภาพไปประยุกต์ใช้ ฟิล์มจำเป็นต้องมีความแข็งแรงและทนต่อแรงกระทำที่เกิดขึ้นซึ่งความแข็งแรงของฟิล์มนั้นสามารถวัดได้จากค่าต้านทานแรงดึงที่มักกระทำ ทดสอบจากลักษณะการยืดตัวออกเมื่อได้รับแรงดึงจากภายนอก จากการเตรียมฟิล์ม EPS/CS ที่มีการเติมไทมอลที่ความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการเติมไทมอลส่งผลต่อสมบัติของฟิล์ม โดยฟิล์มที่ไม่เติมไทมอลมีค่าต้านทานแรงดึงของสูงที่สุด คือ 18.22 MPa เมื่อเติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้ค่าต้านทานแรงดึงลดลงจาก 18.22 MPa เป็น 17.18 MPa และ 16.58 MPa ตามลำดับ (Table 15) แสดงให้เห็นว่าการลดลงของค่าการต้านทานแรงดึงของฟิล์ม EPS/CS เกี่ยวข้องกับไทมอลที่เติมลงไปในฟิล์ม EPS/CS จากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Lim และคณะ (2010) ซึ่งทำการศึกษาผลของการเติมไทมอลในฟิล์มพอลิแซคคาไรด์

Gelidium corneum (GC) พบว่าไทมอลส่งผลต่อค่าต้านทานแรงดึงของฟิล์ม โดยทำให้ค่าต้านทานแรงดึงของฟิล์มมีค่าลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการเติมไทมอล ซึ่งมีสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ลงในฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ที่มีสมบัติในการชอบน้ำ (Hydrophilic) ทำให้ค่าการต้านทานแรงดึงของฟิล์มมีค่าลดลง เนื่องจากไขมันบางส่วนจะไปแทรกและกระจายอยู่ระหว่างโครงสร้างของฟิล์ม (Matrix) ส่งผลให้ความแข็งแรงของฟิล์มลดลง (Mastromatteo *et al.*, 2009) นอกจากนี้ปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลของไขมัน (Non-polar) ด้วยกัน และโมเลกุลที่มีขั้ว (Polar) ของพอลิเมอร์กับโมเลกุลของไขมันมีความแข็งแรงน้อยกว่าโมเลกุลของพอลิเมอร์ด้วยตัวเอง ดังนั้นฟิล์มพอลิแซคคาไรด์ที่มีการเติมไขมันลงไปจะส่งผลให้ความแข็งแรงของฟิล์มลดลง (Bertan *et al.*, 2005)

เมื่อพิจารณาผลของการเติมไทมอลต่อค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม EPS/CS พบว่าค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้นเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 58.12 เปอร์เซ็นต์ เป็น 70.48 และ 61.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p < 0.05$) (Table 15) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปได้ลักษณะเดียวกันกับการทดลองของ Pelissari และคณะ (2009) พบว่าการเติมน้ำมัน Oregano (OEO) ในฟิล์มแป้งมันสำปะหลัง-ไคโตซาน (Starch-chitosan film) ส่งผลให้ค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของ OEO เท่ากับ 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการยืดตัวเมื่อขาดเท่ากับ 27.18 เปอร์เซ็นต์ และ 40.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติม OEO (23.07 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้เนื่องจากการเติม OEO ในฟิล์มไคโตซานจะช่วยเพิ่มความสามารถในการเคลื่อนที่ของสายพอลิเมอร์ ซึ่งทำให้ฟิล์มมีความยืดหยุ่นดีขึ้น (Pelissari *et al.*, 2009)

5.2 การซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำของฟิล์ม

บทบาทโดยทั่วไปของฟิล์มที่ใช้ในการบริโภคหรือสารเคลือบผิวหน้าของอาหารหน้าที่หลักคือการขัดขวางการผ่านของความชื้นระหว่างอาหารและบรรยากาศโดยรอบ หรือส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งค่าการซึมผ่านไอน้ำที่คตินั้นไม่ควรมียค่าสูง ผลจากการเตรียมฟิล์ม EPS/CS ที่มีการเติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการเติมไทมอลในฟิล์ม EPS/CS ส่งผลต่อการซึมผ่านของไอน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเติมไทมอลความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากไทมอลมีสมบัติไม่ชอบน้ำ เมื่อไทมอลแทรกตัวในโครงสร้างตาข่ายของฟิล์ม EPS/CS จะขัดขวางการแพร่ของโมเลกุลไอน้ำผ่านฟิล์ม ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มลดลง โดยพบว่าค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์ม EPS/CS มีค่าลดลงจาก $2.58 \pm 0.18 \times 10^{-10}$ g/ms Pa เป็น $1.85 \pm 0.54 \times 10^{-10}$ g/ms Pa (Table 15) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pelissari และคณะ (2009) พบว่าการเติมน้ำมัน oregano (OEO) ในฟิล์มแป้งมันสำปะหลัง-ไคโตซาน (Starch-chitosan film) ส่งผลให้อัตราการซึมผ่านของไอน้ำลดลงจาก 1.00×10^{-10} g/ ms Pa (ไม่เติม OEO) เป็น 0.62×10^{-10} g/ ms Pa (เติม OEO 1 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ Guillen และคณะ (2009) ทำการศึกษาการเติมน้ำมันดอกทานตะวัน (ความเข้มข้น 0, 0.3, 0.6 และ 1 เปอร์เซ็นต์) ในฟิล์มเจลาติน พบว่าน้ำมันดอกทานตะวันส่งผลให้ฟิล์มมีสมบัติในการไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ฟิล์มดังกล่าวมีค่าการซึมผ่านไอน้ำลดลง และในงานวิจัยของ Hoque และคณะ (2011) พบว่าการเติมน้ำมันหอมระเหย 3 ชนิด ได้แก่ Cinnamon, Clove และ Star anise extracts ในฟิล์มเจลาติน ส่งผลให้ค่าการซึมผ่านไอน้ำของ

ฟิล์มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเจลาตินที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย (ชุดควบคุม) โดยฟิล์มเจลาตินที่เติมน้ำมันหอมระเหยมีค่าการซึมผ่านไอน้ำอยู่ระหว่าง 0.77×10^{-10} ถึง 0.90×10^{-10} g/ms Pa ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่าการซึมผ่านไอน้ำเท่ากับ 0.96×10^{-10} g/ms Pa

ความสามารถในการละลายน้ำเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งของฟิล์มในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเก็บรักษาอาหาร โดยทั่วไปแล้วค่าการละลายที่มีค่าสูงจะบ่งชี้ถึงความสามารถในการต้านทานน้ำได้ต่ำ อย่างไรก็ตามค่าการละลายที่สูงอาจเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในบางรูปแบบ (Rotta *et al.*, 2009) จากการศึกษาผลการเติมไทมอลต่อการละลายน้ำของฟิล์ม EPS/CS พบว่าค่าการละลายของแผ่นฟิล์มมีแนวโน้มลดลง แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยค่าการละลายของฟิล์มมีค่าลดลงจาก 12.27 เปอร์เซ็นต์ (ไม่เติมไทมอล) เป็น 11.31 เปอร์เซ็นต์ และ 10.97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีปริมาณไทมอลความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Table 15) ทั้งนี้เนื่องจากไทมอลมีสมบัติในการไม่ชอบน้ำทำให้ฟิล์มดังกล่าวมีค่าการละลายน้ำลดลง (Rhim *et al.*, 2000) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Seyed และคณะ (2010) พบว่าการเติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชยในฟิล์มไคโตซานส่งผลต่อสมบัติการละลายของฟิล์ม โดยค่าการละลายของฟิล์มมีค่าลดลงจาก 24.73 เปอร์เซ็นต์ (ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย) เป็น 3.58 เปอร์เซ็นต์ (เติมน้ำมันหอมระเหยจากอบเชย 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)) และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ahmad และคณะ (2012) พบว่าการเติมน้ำมันหอมระเหย (Bergamot และ Lemongrass oil) ในฟิล์มเจลาติน ส่งผลให้ฟิล์มมีค่าการละลายน้ำลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มเจลาตินที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย (ชุดควบคุม) โดยฟิล์มเจลาตินที่เติมน้ำมันหอมระเหยมีค่าการละลายอยู่ระหว่าง 89.16 ถึง 93.54 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่าการละลายเท่ากับ 97.8 เปอร์เซ็นต์

Table 15. Effect of thymol on thickness, tensile strength, elongation at break, water vapor permeability (WVP) and solubility of EPS/CS film.

Thymol (mg/ml)	Thickness [#] (mm)	Tensile strength (MPa)	WVP ($\times 10^{-10}$ g /ms Pa)	Solubility (%)	Elongation at break (%)
0	0.056 \pm 0.003 ^{###}	18.22 \pm 0.52 ^b	2.58 \pm 0.18 ^b	12.27 \pm 0.53 ^a	58.12 \pm 2.38 ^a
2.5	0.065 \pm 0.002 ^b	17.18 \pm 1.30 ^{ab}	2.42 \pm 0.062 ^b	11.31 \pm 0.49 ^a	70.48 \pm 5.88 ^b
5	0.063 \pm 0.004 ^b	16.58 \pm 0.78 ^a	1.85 \pm 0.54 ^a	10.97 \pm 1.37 ^a	61.59 \pm 5.01 ^a

[#] Values are given as mean \pm SD from triplicate determinations.

^{###} Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

5.3 ค่าสีของฟิล์ม

จากการวิเคราะห์ค่าสีของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมและไม่เติมไทมอล พบว่าการเติมไทมอลในฟิล์ม EPS/CS ส่งผลให้ฟิล์มมีสีเหลือง (ค่า b^*) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ฟิล์ม EPS/CS ที่ไม่

เติมไทมอล) ($p < 0.05$) (Table 16) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของไทมอลเพิ่มขึ้นจาก 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ส่งผลให้ฟิล์มมีสีเหลืองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีค่า b^* อยู่ระหว่าง 6.74 ± 0.60 ถึง 6.86 ± 0.35 ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่า b^* เท่ากับ 5.70 ± 0.65 (Table 16) ทั้งนี้อาจเนื่องจากไทมอลที่อยู่ในฟิล์มอาจถูกออกซิไดซ์ในสภาวะที่มีออกซิเจน (หรือสัมผัสกับอากาศ) เกิดเป็นควิโนน ซึ่งเป็นหมู่โครโมฟอร์ที่มีสีเหลือง/น้ำตาล มีผลให้ฟิล์มที่เติมไทมอลมีสีเหลืองกว่าฟิล์มที่ไม่เติมไทมอล Rattaya และคณะ (2009) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงสีของฟิล์มที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย (เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย) อาจเกิดจากรงควัตถุ (Pigment) ที่เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับการทดลองของ Theivendran และคณะ (2008) ซึ่งศึกษาสมบัติทางกายภาพของฟิล์มโปรตีนถั่วเหลืองที่ผสมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่น พบว่าฟิล์มโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นลักษณะฟิล์มจะมีความใส และเมื่อมีการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นลงในฟิล์มพบว่าส่งผลต่อลักษณะปรากฏและค่าสีของฟิล์ม โดยค่าสีมีแนวโน้มเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้น สังเกตได้จากค่า b^* ที่ความเข้มข้นสารสกัดจากเมล็ดคองุ่น 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 20.06 เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์มโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ไม่เติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นซึ่งมีค่า b^* เท่ากับ 4.68 นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ยังสอดคล้องกับผลการทดลองของ Corrales และคณะ (2009) ที่พบว่ามีการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นในฟิล์มแป้งจากถั่วจะส่งผลต่อลักษณะปรากฏของฟิล์ม และมีค่าสีเปลี่ยนไป โดยฟิล์มแป้งจากถั่วที่มีการเติมสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นมีแนวโน้มเป็นสีเหลืองมากขึ้น อาจเนื่องมาจากไทมอลและสารสกัดจากเมล็ดคองุ่นมีสารฟีนอลิก และสาร flavonoid เป็นองค์ประกอบ โดยสารทั้งสองชนิดมีสีส้มน้ำตาล ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร

5.4 การส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์ม

ผลการเตรียมฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการเติมไทมอลส่งผลให้ค่าการส่องผ่านแสงในช่วงความยาวคลื่น 280-800 นาโนเมตร ของฟิล์ม EPS/CS ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ฟิล์ม EPS/CS ที่ไม่เติมไทมอล) โดยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีค่าการส่องผ่านแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นได้ (350-800 นาโนเมตร) อยู่ระหว่าง 34.32 ถึง 77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าการส่องผ่านแสงในช่วงแสง UV (280 นาโนเมตร) มีค่าอยู่ระหว่าง 1.27 ถึง 7.97 เปอร์เซ็นต์ (Table 17) ซึ่งฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลสามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ได้ดีกว่าชุดควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างโมเลกุลของไทมอลประกอบด้วยหมู่เบนซีนซึ่งมีความสามารถในการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ได้ที่ความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร ในขณะที่การเติมไทมอลส่งผลให้ฟิล์ม EPS/CS มีความโปร่งใสน้อยกว่า (ค่า Transparency value สูงกว่า) ฟิล์มที่ไม่เติมไทมอลอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของไทมอลเพิ่มขึ้นจาก 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่ส่งผลให้ฟิล์มมีค่าความโปร่งใสมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีค่าความโปร่งใสอยู่ระหว่าง 2.39 ± 0.16 ถึง 2.37 ± 0.20 ในขณะที่ชุดควบคุมมีค่าความโปร่งใสเท่ากับ 1.23 ± 0.06 (Table 16) Bertan และคณะ (2005) กล่าวว่ามีการเติมสารที่มีสมบัติในการไม่ชอบน้ำหรือการเติมไขมันลงในฟิล์มที่ผลิตจากวัสดุชีวภาพเป็นสาเหตุให้ค่าการส่องผ่านแสงมีค่า

ลดลง และฟิล์มมีความทึบเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับผล การทดลองของ Siripatrawan และคณะ (2010) พบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติมสารสกัดจากใบชาเขียวมีความโปร่งใสน้อยกว่าฟิล์มไคโตซานที่ไม่เติมสารสกัดจากชาเขียว (ชุดควบคุม) และเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองของ Kanatt และคณะ (2012) พบว่าการเติมสารสกัดจากใบสะระแหน่ และเปลือกทับทิมในฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่างไคโตซานกับ Polyvinyl alcohol ส่งผลให้ฟิล์มมีการส่องผ่านแสงและความโปร่งใสลดลง

Table 16. Effect of thymol on transparency value and color of EPS/CS film.

Thymol (mg/ml)	Light transmission (%) at different wavelength (nm)							
	200	280	350	400	500	600	700	800
0	0	13.80 ^{bc#}	55.22 ^b	69.47 ^b	78.15 ^b	81.95 ^b	84.12 ^b	85.45 ^b
2.5	0	7.97 ^{ab}	34.32 ^a	48.25 ^a	61.70 ^a	68.62 ^a	73.12 ^a	75.70 ^a
5	0	1.27 ^a	37.07 ^a	50.30 ^a	63.27 ^a	70.20 ^a	74.07 ^a	77.00 ^a

Values are give as mean \pm SD from triplicate determinations.

Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

Table 17. Effect of thymol on light transmission (%T) of EPS/CS film.

Thymol (mg/ml)	Transparency value [#]	Film color		
		L*	a*	b*
0	1.23 \pm 0.06 ^{###}	88.66 \pm 0.47 ^a	-1.66 \pm 0.11 ^a	5.70 \pm 0.65 ^a
2.5	2.39 \pm 0.16 ^b	88.38 \pm 0.17 ^a	-1.68 \pm 0.03 ^a	6.86 \pm 0.35 ^b
5	2.37 \pm 0.20 ^b	88.14 \pm 0.22 ^a	-1.62 \pm 0.04 ^a	6.74 \pm 0.60 ^b

Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

5.5 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของฟิล์ม

ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย (*A. iwoffii* MA02 และ *Pseu. fragi* MA07) ที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมและไม่เติมโทมอลความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียที่แยกได้ ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถใช้วิธี Agar disc diffusion ในการวิเคราะห์ได้ เนื่องจากฟิล์ม EPS/CS ทุกการทดลองมีการม้วนงอของฟิล์มเมื่อสัมผัสกับ

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จึงทำการวิเคราะห์โดยการหาค่าเชื้อ *A. iwoffii* MA02 และ *Pseu. fragi* MA07 บนแผ่นฟิล์ม EPS/CS (มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6-7 log cfu/ml) แล้วนับปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตหลังจากบ่มเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าการเติมไทมอลในฟิล์ม EPS/CS ส่งผลให้ฟิล์มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียดีขึ้น ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. iwoffii* MA02 ได้ดีกว่า *Pseu. fragi* MA07 โดยมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 73.32 และ 78.62 เปอร์เซ็นต์ (ฟิล์มที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับฟิล์ม EPS/CS ที่ไม่เติมไทมอล (ชุดควบคุม) ซึ่งมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 99.58 และ 91.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 18, 19) การที่ชุดควบคุมมีปริมาณการรอดชีวิตของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ลดลง อาจเนื่องจากในแผ่นฟิล์ม EPS/CS มี CS ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Dutta *et al.*, 2009) และเมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของไทมอลเพิ่มขึ้นจาก 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไทมอลส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. iwoffii* MA02 และ *Pseu. fragi* MA07 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 51.35 และ 71.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 18, 19)

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไทมอลในฟิล์ม EPS/CS สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไทมอลสามารถจับกับ Lipid bilayer ในส่วนของชั้น Cytoplasmic membranes ของแบคทีเรียได้ ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของสารประกอบภายในเซลล์ออกมาทำให้สูญเสียสมบัติของโปรตีนและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์รวมถึงการสร้าง ATP ด้วย (Wenqiang *et al.*, 2007) โดยผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกับผลการทดลองของ Lim และคณะ (2010) ที่ศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของฟิล์มพอลิแซ็กคาไรด์ที่เตรียมจาก *Gelidium corneum* (GC) ที่มีการเติมและไม่เติมไทมอล พบว่าฟิล์ม GC ที่เติมไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* และ *E. coli* O157:H7 ได้ และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Gniewosz และคณะ (2011) ที่ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *Sal. Enteritidis* ATCC 13076 และ *E. coli* ATCC 25922 ของฟิล์ม pullulan ที่เติมและไม่เติมไทมอล พบว่าฟิล์ม pullulan ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *Sal. Enteritidis* ATCC 13076 และ *E. coli* ATCC 25922 และในงานวิจัยของ Kuorwel และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ Linalool, Carvacrol และไทมอลในฟิล์มแป็งต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยใช้วิธี Agar disc diffusion พบว่าไทมอลมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 2.38 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) มีขนาดวงใสเท่ากับ 23.8 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับ Linalool ที่ความเข้มข้นเดียวกัน มีขนาดวงใสเท่ากับ 18.6 มิลลิเมตร นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Ramos และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ 2 ชนิด ได้แก่ ไทมอล และ Carvacrol ในฟิล์ม Polypropylene (PP) ต่อประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 6538P โดยใช้วิธี Agar disc diffusion พบว่าไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 6538P ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 25922 โดย

ฟิล์ม PP ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด มีขนาดวงใสเท่ากับ 3.70 เซนติเมตร อย่างไรก็ตามไทมอลมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ในอาหาร เพราะเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้อาหารมีกลิ่นรสที่เปลี่ยนแปลงและไม่เหมาะสม ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้น ฟิล์มพอลิเมอร์ผสม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นฟิล์มที่นำไปใช้ในการศึกษาต่อไป เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ต้องการ คือ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย มีความแข็งแรง มีความยืดหยุ่นเพียงพอ และสามารถลอกแผ่นฟิล์มออกจากเบ้าชิลิโคนได้ง่าย ตลอดจนไม่มีปัญหาเกี่ยวกับกลิ่นของไทมอลที่รุนแรงมากนัก

Table 18. Effect of EPS/CS film incorporated with thymol against *Acinetobacter iwoffii* MA02.

Thymol (mg/ml)	Relative survival (%) of <i>Acinetobacter iwoffii</i> MA02*	
	0 h	6 h
0	100	99.58±0.14 ^{c**}
2.5	100	73.32±0.13 ^b
5	100	51.35±0.17 ^a

*Values are given as mean ±SD from triplicate determinations.

**Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

Table 19. Effect of EPS/CS film incorporated with thymol against *Pseudomonas fragi* MA07.

Thymol (mg/ml)	Relative survival (%) of <i>Pseudomonas fragi</i> MA07*	
	0 h	6 h
0	100	91.99±0.32 ^{c**}
2.5	100	78.62±0.76 ^b
5	100	71.47±0.23 ^a

*Values are given as mean ±SD from triplicate determinations.

**Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

6. การประยุกต์ใช้ฟิล์มและสารเคลือบเอ็กซ์พอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมไทมอลในการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็น

เนื้อสัตว์เป็นอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของมนุษย์ อย่างไรก็ตามเนื้อสัตว์เป็นสิ่งแวดล้อมที่ดีต่อการเจริญของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ยีสต์ และรา โดยทั่วไปจุลินทรีย์เหล่านี้จะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แต่มักก่อให้เกิดการเน่าเสีย โดยส่วนมากจุลินทรีย์จะอยู่บริเวณพื้นผิวของเนื้อสัตว์ และจะถูกปนเปื้อนในขั้นตอนการฆ่า

หรือตกแต่ง วิธีการทั่วไปที่ใช้ในการถนอมเนื้อสัตว์หลังการฆ่าและการทำความสะอาด คือ การใช้ความเย็น (เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ถึงแม้จะเก็บรักษาด้วยเทคนิคดังกล่าวแล้ว จุลินทรีย์ยังสามารถเจริญและก่อให้เกิดการเน่าเสียได้ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว จึงมีการใช้สารต่อต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติร่วมกับพอลิเมอร์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็น ในงานวิจัยนี้เลือกศึกษาผลของฟิล์มและสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการห่อหุ้มเนื้อหมู โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน มีผลการทดลองดังนี้

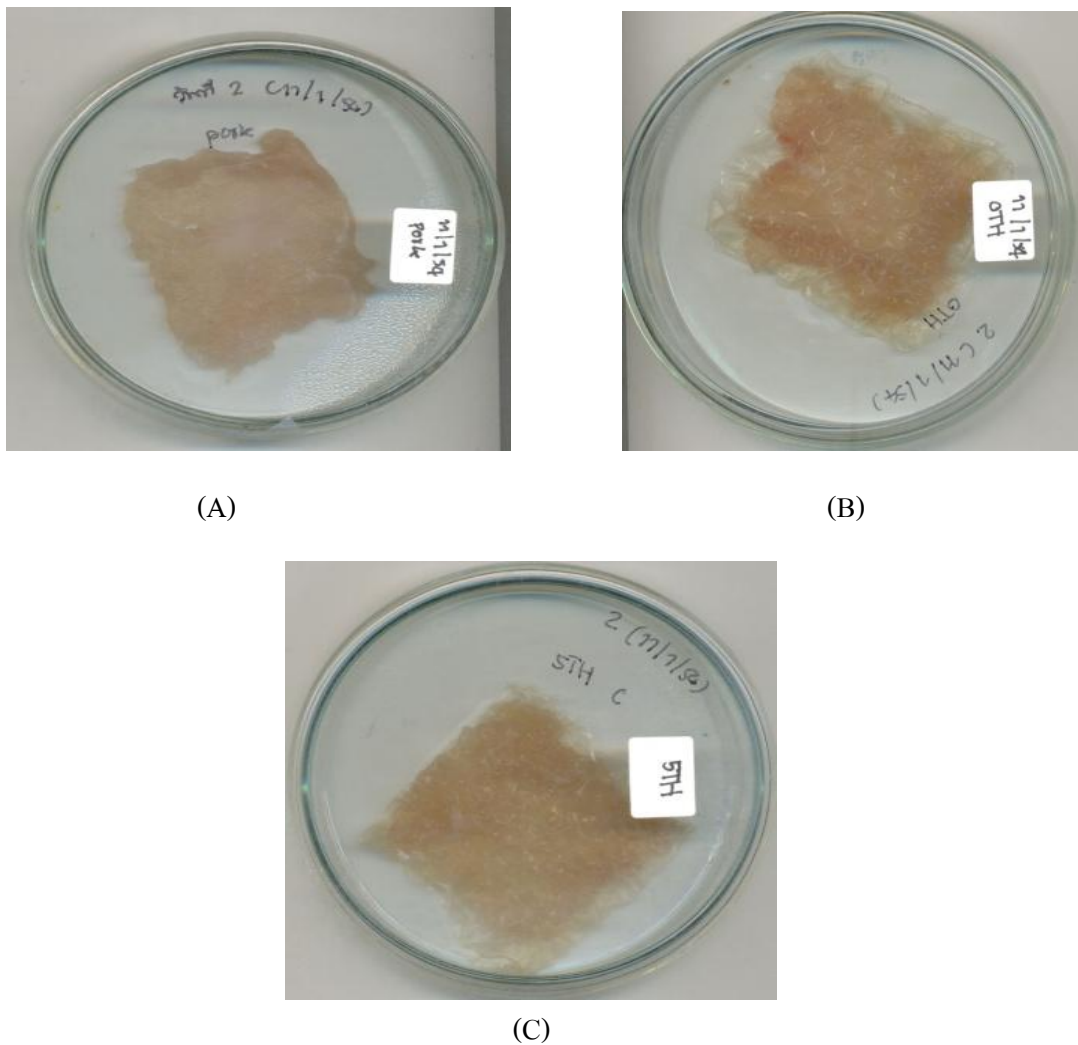


Figure 9. Appearance of sliced pork without film (A), wrapped with EPS/CS film (B) and EPS/CS film incorporated with thymol (C) at day 0 of storage.

6.1 การประยุกต์ใช้ฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมไทมอลในการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็น

ในการทดลองแบ่งเนื้อหมูออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ เนื้อหมูที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม (ชุดควบคุม) เนื้อหมูที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS (ชุดทดลองที่ 1) และเนื้อหมูที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร(ชุดทดลองที่ 2) (Figure 9) โดยมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2547) ระบุว่าเนื้อหมูต้องบรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่สะอาด และปิดมิดชิด มีความทนทานต่อการขนส่งและสามารถป้องกันการดูดซึมของกลิ่น ได้ ลักษณะเนื้อต้องอยู่ในสภาพปกติ สะอาด ไม่มีกลิ่นผิดปกติ กลิ่นแปลกปลอม หรือกลิ่นไม่พึงประสงค์ และต้องไม่มีรอยฟกช้ำ รอยขีดข่วน หรือแผลหนอง สีเนื้อหมูต้องมีสีชมพูปนเทาจนถึงสีชมพูเข้ม

6.1.1 การเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏและกลิ่นของเนื้อหมูแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

จากการสังเกตลักษณะปรากฏ (Appearance) ภายนอกของเนื้อหมูระหว่างการเก็บรักษา พบว่าลักษณะสีภายนอกของเนื้อหมูชุดควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 โดยจะเริ่มเกิดเมือกที่บริเวณผิวของเนื้อหมูและเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีจากบริเวณขอบของชิ้นเนื้อหมูในวันที่ 7 ซึ่งสีของผิวเนื้อหมูจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว ในขณะที่ลักษณะปรากฏของเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 และ 2 พบว่าลักษณะสีภายนอกของเนื้อหมูไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษา แต่เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อหมูระหว่างการเก็บรักษา โดยชุดการทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 เนื้อหมูมีความชุ่มน้ำลดลงระหว่างวันที่ 7 ถึงวันที่ 15 (Table 20) ทั้งนี้เนื่องจากสูญเสียความชื้นระหว่างการเก็บรักษาและจากการดูดซับน้ำเนื้อหมูของฟิล์ม EPS/CS ขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะฟิล์ม EPS/CS ที่ใช้ห่อหุ้มเนื้อหมู โดยฟิล์มเกิดการบวมตัวเนื่องจากฟิล์ม EPS/CS มีสมบัติในการชอบน้ำ ซึ่งสามารถดูดซับน้ำได้และส่งผลให้เกิดการบวมตัวของฟิล์ม

เมื่อพิจารณาคูณภาพด้านกลิ่น (Odor) พบว่าชุดควบคุมมีกลิ่นเนื้อหมูปกติในวันที่ 0 จากนั้นกลิ่นเนื้อหมูจะเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ (Figure 10) ที่มีปริมาณ TVC ของชุดควบคุมเท่ากับ 7.41 logCFU/g (วันที่ 2) เมื่อพิจารณาคูณภาพด้านกลิ่นของชุดทดลองที่ 1 พบว่ามีกลิ่นเนื้อหมูปกติในระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 จากนั้นกลิ่นเนื้อหมูจะลดลงตั้งแต่วันที่ 7 ถึงวันที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 มีค่า TVC เท่ากับ 7.38 logCFU/g (วันที่ 7) (Figure 10) ในขณะที่ชุดทดลองที่ 2 มีกลิ่นเนื้อหมูปกติในวันที่ 0 หลังจากนั้นในระหว่างวันที่ 2 ถึงวันที่ 7 มีกลิ่นของไทมอลผสมกับกลิ่นเนื้อหมู และในระหว่างวันที่ 9 ถึงวันที่ 15 กลิ่นเนื้อหมูจะลดลงและยังคงได้กลิ่นของไทมอลผสมอยู่นอกจากนี้ตรวจพบกลิ่นไม่สดของเนื้อหมูในวันที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูมีค่า TVC เท่ากับ 6.42 logCFU/g (วันที่ 15) (Figure 10) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การห่อหุ้มเนื้อหมูแช่เย็นด้วยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็นได้

Table 20. Appearance and odor of sliced pork wrapped without and with EPS/CS film and EPS/CS film incorporated with thymol during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days.

Days	Experiments	Appearance	Odor
0	Control [*]	Grayish pink	Fresh
	Treatment 1 ^{**}	Grayish pink	Fresh
	Treatment 2 ^{***}	Grayish pink	Fresh
2	Control	Grayish pink	Low freshness
	Treatment 1	Grayish pink	Fresh
	Treatment 2	Grayish pink	Fresh and thymol odor
4	Control	Grayish pink	Low freshness
	Treatment 1	Grayish pink	Fresh
	Treatment 2	Grayish pink	Fresh and thymol odor
7	Control	Surface slime, little green at edge	Low freshness
	Treatment 1	Grayish pink, a little dried surface	Low freshness
	Treatment 2	Grayish pink, a little dried surface	Fresh and thymol odor
9	Control	Surface slime, green color	Off flavor
	Treatment 1	Grayish pink, a little dried surface	Low freshness
	Treatment 2	Grayish pink, a little dried surface	Low freshness and little thymol odor
11	Control	Surface slime, green color	Off flavor
	Treatment 1	Grayish pink, a little dried surface	Low freshness Low
	Treatment 2	Grayish pink, a little dried surface	freshness and thymol odor

Table 20. (Cont.)

Days	Experiments	Appearance	Odor
15	Control	Surface slime, green color	Off flavor
	Treatment 1	Grayish pink, dried surface	Low freshness
	Treatment 2	Grayish pink, dried surface	Low freshness and little thymol odor

*Sliced pork without film

**Sliced pork wrapped with EPS/CS film

*** Sliced pork wrapped with EPS/CS film incorporated with thymol

6.1.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ ได้แก่ Total viable count (TVC) และ Psychrophilic bacteria ของเนื้อหมูที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม (ชุดควบคุม) เนื้อหมูที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS (ชุดทดลองที่ 1) และเนื้อหมูที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดทดลองที่ 2) ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส โดยการตรวจสอบ TVC ซึ่งเป็นการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง หากพบว่าจุลินทรีย์เกินค่ามาตรฐานหรือค่าที่กำหนดให้มีได้ในผลิตภัณฑ์แสดงว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบไม่ควรนำมาบริโภคหรือนำออกจำหน่าย โดยมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 6000-2547 ได้กำหนดค่า TVC ของเนื้อหมูต้องน้อยกว่า 5×10^5 CFU/g

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 ในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าค่า TVC ของเนื้อหมูชุดควบคุมในวันที่ 0 คือ $4.87 \log\text{CFU/g}$ เพิ่มขึ้นเป็น $11.48 \log\text{CFU/g}$ ในวันที่ 15 ของการเก็บรักษา (Figure 10) เมื่อนำมาพิจารณากับมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ ซึ่งกำหนดค่า TVC ต้องน้อยกว่า 5×10^5 CFU/g พบว่าเนื้อหมูชุดควบคุมสามารถเก็บรักษาได้ไม่เกิน 2 วัน (TVC เท่ากับ $7.41 \log\text{CFU/g}$)

เมื่อพิจารณาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 พบว่าไม่พบการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 แต่จะพบการเพิ่มขึ้นของเชื้อตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันที่ 15 โดยปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก $4.46 \log\text{CFU/g}$ (วันที่ 4) เป็น $7.97 \log\text{CFU/g}$ (วันที่ 15) (Figure 10) เมื่อนำมาพิจารณากับมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ พบว่าเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 สามารถเก็บรักษาได้ 4 วัน (TVC เท่ากับ $4.46 \log\text{CFU/g}$) โดยมีค่า TVC ไม่เกินค่ามาตรฐานที่กำหนด

เมื่อพิจารณาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูชุดทดลองที่ 2 พบว่าจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ลดลงในวันที่ 0 ถึงวันที่ 2 โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงจาก $4.87 \log\text{CFU/g}$ เป็น $3.68 \log\text{CFU/g}$ และพบการเพิ่มขึ้น

ของเชื้อตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 15 มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 3.68 logCFU/g เป็น 6.42 logCFU/g ตามลำดับ (Figure 10) เมื่อนำมาพิจารณาเทียบกับมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ พบว่าเนื้อหมูชุดทดลองที่ 2 สามารถเก็บรักษาได้ 11 วัน (TVC เท่ากับ 4.42 logCFU/g) โดยมีค่า TVC ไม่เกินค่ามาตรฐานที่กำหนด

ในขณะที่ผลการตรวจสอบปริมาณ Psychrophilic bacteria ของเนื้อหมูชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 (Figure 11) พบว่ามีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของ TVC (Figure 10) จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าเนื้อหมูที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม เนื้อหมูที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS และเนื้อหมูที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเก็บรักษาเนื้อหมูที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 2 วัน 4 วัน และ 11 วัน ตามลำดับ (โดยอ้างอิงปริมาณจุลินทรีย์จากมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 6000-254) ดังนั้นฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถใช้ห่อหุ้มเนื้อหมูและมีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ส่งผลให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูได้

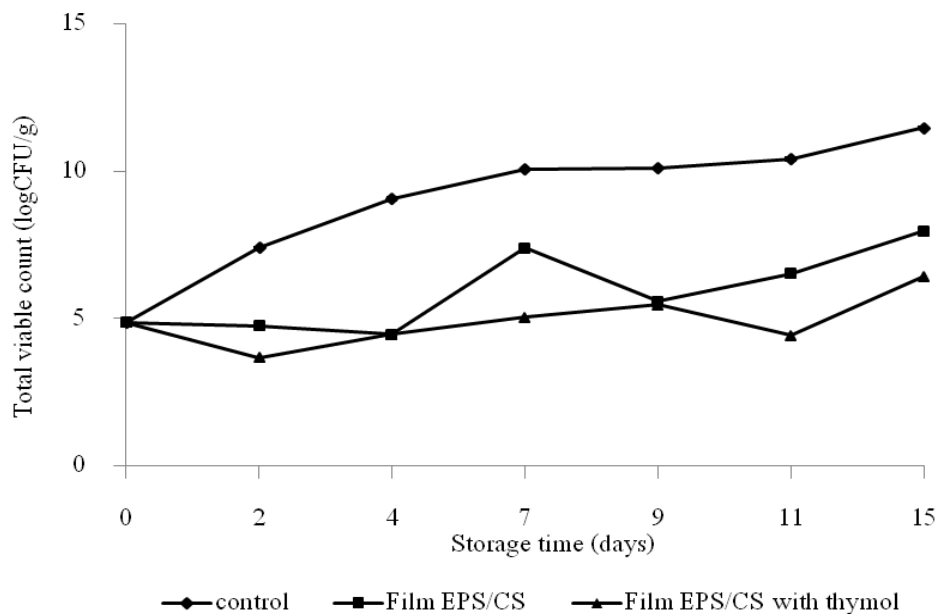


Figure 10. Effect of EPS/CS film incorporated with and without thymol (2.5 mg/ml) on total viable count (TVC) of sliced pork during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days.

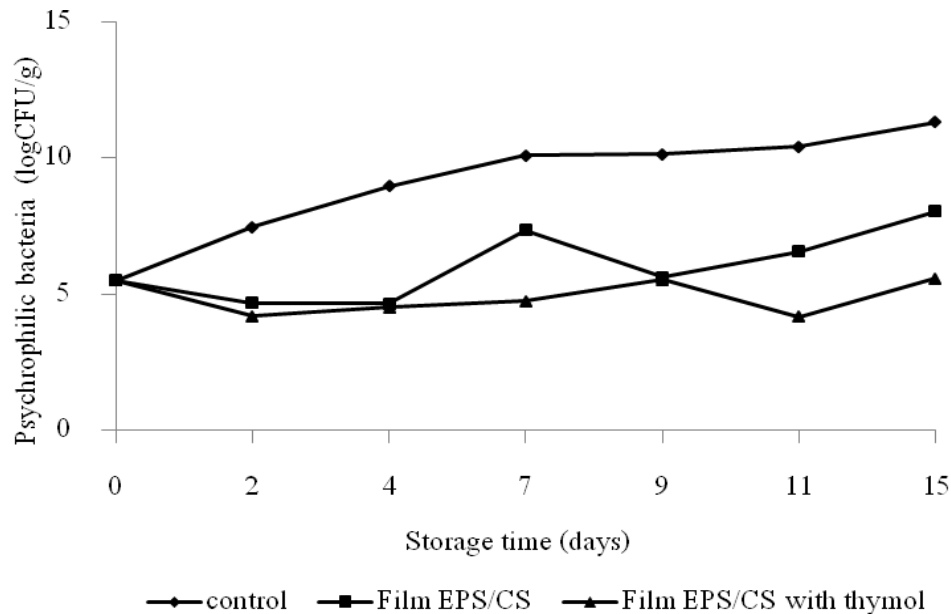


Figure 11. Effect of EPS/CS film incorporated with and without thymol (2.5 mg/ml) on psychrophilic bacteria of sliced pork during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days.

6.1.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของเนื้อหมูแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

การเน่าเสียของเนื้อสัตว์สามารถตรวจวัดได้จากปริมาณสารแอมโมเนียที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นสารหลักที่ได้จากการย่อยสลายกรดอะมิโนด้วยแบคทีเรีย ซึ่งการวัดค่าพีเอชเป็นการตรวจวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้นทางอ้อม จากผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเนื้อหมูที่ไม่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม (ชุดควบคุม) เนื้อหมูที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS (ชุดทดลองที่ 1) และเนื้อหมูที่ห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดทดลองที่ 2) ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส พบว่าเนื้อหมูชุดควบคุมมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.34 เป็น 7.65 ส่วนเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.34 เป็น 6.47 ในขณะที่เนื้อหมูชุดทดลองที่ 2 มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.34 เป็น 6.42 (Figure 12) เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชของเนื้อหมูทั้งสามชุดการทดลองระหว่างการเก็บรักษา พบว่าค่าพีเอชของเนื้อหมูทั้ง 3 ชุดการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บเนื่องจากเกิดการย่อยโปรตีนไปเป็นแอมโมเนียโดยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูเกิดการเน่าเสีย ซึ่งแอมโมเนียที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติเป็นด่าง ส่งผลให้ค่าพีเอชของเนื้อหมูเพิ่มขึ้น (Park and Chin, 2010) ซึ่งในงานวิจัยของ Ercolini และคณะ (2009) ได้คัดแยกเชื้อและศึกษาความสามารถในการย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อเกิดการเน่าเสีย พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 79 ไอโซเลต และมี 6 ไอโซเลตที่สามารถย่อยโปรตีนได้ คือ *Car. divergens* 17M, *Serratia proteamaculans* 42, *Stenotrophomonas maltophilia* 49M, *Car. maltaromaticum* 9P, *Pseudomonas* spp. Strain 28P และ *Pseu. fragi* 25P จากการทดลองพบว่า โดยเนื้อหมูชุดควบคุมมีค่าพีเอชสูงกว่าเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระยะเวลาการเก็บเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูชุดควบคุมที่มีปริมาณ TVC มากกว่าเนื้อหมูชุด

ทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 (Figure 10) แสดงให้เห็นว่าฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลสามารถชะลอการเน่าเสียของเนื้อหมูได้ ผลการทดลองดังกล่าวเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับการทดลองของ Park และคณะ (2010) ที่ศึกษาผลของสารสกัดจากหัวหอมต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและทางกายภาพของเนื้อหมูที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าค่าพีเอชของเนื้อหมูมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ โดยเนื้อหมูมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.54 (วันที่ 0) และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 28 วัน ค่าพีเอชของเนื้อหมูเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 7.15

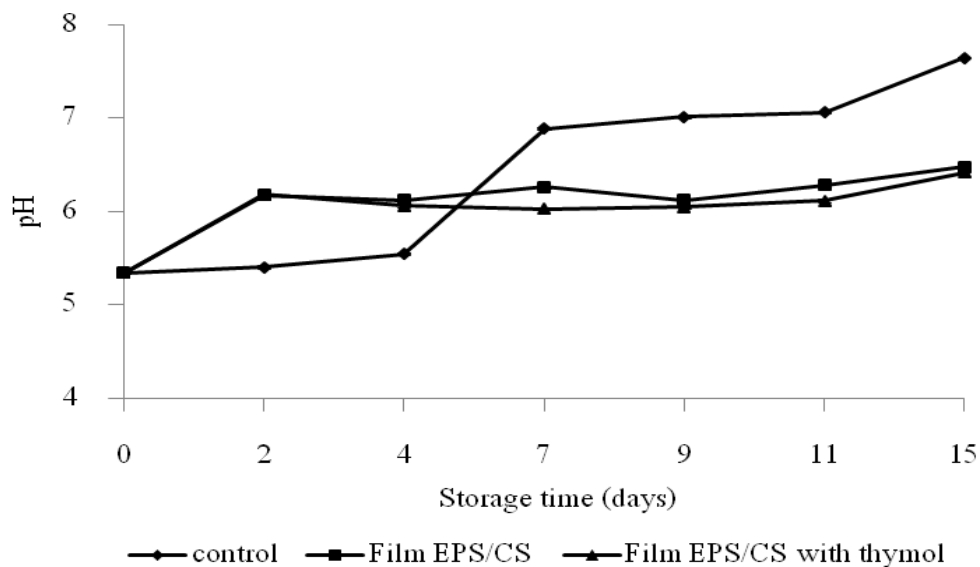


Figure 12. Effect of EPS/CS film incorporated with and without thymol (2.5 mg/ml) on pH of sliced pork during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days.

6.2 ผลการเคลือบเนื้อหมูโดยสารเคลือบเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมไทมอล

ในการทดลองแบ่งเนื้อหมูออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ เนื้อหมูที่ไม่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS (ชุดควบคุม) เนื้อหมูที่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS (ชุดทดลองที่ 1) และเนื้อหมูที่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดทดลองที่ 2) (Figure 13) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน มีผลการทดลองดังนี้

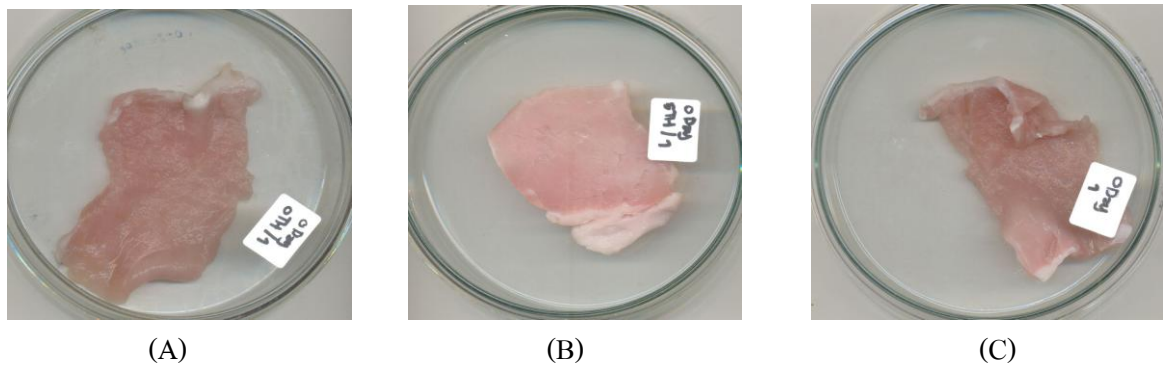


Figure 13. Appearance of sliced pork coated with EPS/CS coating solution (A), EPS/CS coating solution incorporated with thymol (2.5 mg/ml) (B) and uncoated (C) at day 0 of storage.

6.2.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อหมูแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

จากการสังเกตลักษณะปรากฏ (Appearance) ภายนอกของเนื้อหมูระหว่างการเก็บรักษา พบว่าลักษณะสีภายนอกของเนื้อหมูชุดควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 2 แต่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของสีบริเวณขอบของชิ้นเนื้อหมูจากสีชมพูเป็นสีเขียวในวันที่ 4 และเริ่มมีเมือกเกิดขึ้นที่บริเวณผิวหนังของเนื้อหมูในวันที่ 7 ส่วนลักษณะปรากฏของเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสีภายนอกของเนื้อหมูในระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 4 แต่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของสีบริเวณขอบของชิ้นเนื้อหมูจากสีชมพูเป็นสีเขียวในวันที่ 7 และเริ่มมีเมือกเกิดขึ้นที่บริเวณผิวของเนื้อหมูในวันที่ 9 ในขณะที่ลักษณะปรากฏของเนื้อหมูชุดทดลองที่ 2 พบว่าลักษณะสีภายนอกของเนื้อหมูไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 9 เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของสีบริเวณขอบของชิ้นเนื้อหมูจากสีชมพูเป็นสีเขียวในวันที่ 11 แต่ไม่พบการเกิดเมือกบริเวณผิวของเนื้อหมูตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (Table 21)

เมื่อพิจารณาคุณภาพด้านกลิ่น (Odor) ของชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 พบว่าชุดควบคุมมีกลิ่นเนื้อหมูปกติในวันที่ 0 จากนั้นกลิ่นเนื้อหมูสดจะเริ่มลดลงตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ (Figure 14) ที่มีปริมาณ TVC เท่ากับ 7.70 logCFU/g (วันที่ 2) ส่วนการพิจารณาคุณภาพด้านกลิ่นของชุดทดลองที่ 1 พบว่ามีกลิ่นเนื้อหมูปกติในระหว่างวันที่ 0 ถึงวันที่ 7 จากนั้นกลิ่นเนื้อหมูสดจะลดลงตั้งแต่วันที่ 9 ถึง 15 ซึ่งสอดคล้องกับคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูที่มีค่า TVC เท่ากับ 6.11 logCFU/g (วันที่ 9) (Figure 14) ในขณะที่ชุดทดลองที่ 2 มีกลิ่นเนื้อหมูปกติในวันที่ 0 หลังจากนั้นในระหว่างวันที่ 2 ถึงวันที่ 7 มีกลิ่นของไทมอลผสมกับกลิ่นเนื้อหมู และในระหว่างวันที่ 9 ถึงวันที่ 15 กลิ่นเนื้อหมูและไทมอลลดลง และตรวจพบกลิ่นไม่สดของเนื้อหมูในวันที่ 11 ซึ่งสอดคล้องกับคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูที่มีค่า TVC เท่ากับ 6.29 logCFU/g (วันที่ 1) (Figure 14)

Table 21. Appearance and odor of sliced pork coated with EPS/CS coating solution and EPS/CS coating solution incorporated with thymol during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days.

Days	Experiments	Appearance	Odor
0	Control [*]	Grayish pink	Fresh
	Treatment 1 ^{**}	Grayish pink	Fresh
	Treatment 2 ^{***}	Grayish pink	Fresh
2	Control	Grayish pink	Low freshness
	Treatment 1	Grayish pink	Fresh
	Treatment 2	Grayish pink	Fresh and thymol odor
4	Control	Little green at edge	Low freshness
	Treatment 1	Grayish pink	Fresh
	Treatment 2	Grayish pink	Fresh and thymol odor
7	Control	Surface slime, little green at edge	Low freshness
	Treatment 1	Little green at edge	Fresh
	Treatment 2	Grayish pink	Fresh and thymol odor
9	Control	Surface slime, green color	Off flavor
	Treatment 1	Surface slime, little green at edge	Low freshness
	Treatment 2	Grayish pink	Low freshness and little thymol odor
11	Control	Surface slime, green color	Off flavor
	Treatment 1	Surface slime, little green at edge	Low freshness
	Treatment 2	Little green at edge	Low freshness and little thymol odor

Table 21. (Cont.)

Days	Experiments	Appearance	Odor
15	Control	Surface slime, green color	Off flavor
	Treatment 1	Surface slime, little green at edge	Low freshness
	Treatment 2	Little green at edge	Low freshness and little thymol odor

*Sliced pork uncoated

**Sliced pork treated with EPS/CS coating solution

*** Sliced pork treat with EPS/CS coating solution incorporated with thymol

6.2.2 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ ได้แก่ Total viable count (TVC) และ Psychrophilic bacteria ของเนื้อหมูที่ไม่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS (ชุดควบคุม) เนื้อหมูที่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS (ชุดทดลองที่ 1) และเนื้อหมูที่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร (ชุดทดลองที่ 2) ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส โดยการตรวจสอบ TVC ซึ่งเป็นการตรวจปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง หากพบว่ามีจุลินทรีย์เกินค่ามาตรฐานหรือค่าที่กำหนดให้มีได้ในผลิตภัณฑ์แสดงว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบไม่ควรนำมาบริโภคหรือนำออกจำหน่าย โดยมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช. 6000-2547 ได้กำหนดค่า TVC ของเนื้อหมูต้องน้อยกว่า 5×10^5 CFU/g

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 ในระหว่างการเก็บรักษา พบว่าเนื้อหมูชุดควบคุมมีการเพิ่มขึ้นของเชื้อตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 15 ของการเก็บรักษา โดยปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก $4.84 \log\text{CFU/g}$ (วันที่ 0) เป็น $10.43 \log\text{CFU/g}$ (วันที่ 15) (Figure 14) และเมื่อพิจารณาคูณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในวันที่ 0 ถึงวันที่ 7 แต่มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกินกว่าค่าที่กำหนด ในขณะที่วันที่ 9 ของการเก็บรักษา พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินกว่าค่าที่กำหนด คือ $6.11 \log\text{CFU/g}$ และเมื่อพิจารณาคูณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูชุดทดลองที่ 2 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นในวันที่ 0 ถึงวันที่ 9 แต่มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกินกว่าค่าที่กำหนด โดยมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก $2.95 \log\text{CFU/g}$ เป็น $5.15 \log\text{CFU/g}$ ตามลำดับ ในขณะที่วันที่ 11 ของการเก็บรักษา พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินค่ามาตรฐาน คือ $6.29 \log\text{CFU/g}$ (Figure 14) เมื่อพิจารณาระยะเวลาการเก็บที่เท่ากัน พบว่าการเจริญของจุลินทรีย์ในเนื้อหมูชุดทดลองที่ 2 เพิ่มขึ้นช้ากว่าชุดทดลองที่ 1 และชุดควบคุมตามลำดับ ในขณะที่ผลการตรวจสอบปริมาณ Psychrophilic bacteria ของเนื้อหมูชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Psychrophilic bacteria แนวโน้มเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของ TVC (Figure 15) และเมื่อพิจารณาอายุการเก็บเนื้อหมูของชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 จากการตรวจปริมาณ

เชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร โดยอ้างอิงจากมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติมกช. 6000-2547 กำหนดค่า TVC ของเนื้อหมูต้องน้อยกว่า 5×10^5 CFU/g พบว่าเนื้อหมูชุดควบคุมสามารถเก็บรักษาได้ไม่เกิน 2 วัน (TVC เท่ากับ 7.70 logCFU/g) เนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 สามารถเก็บรักษาได้ 7 วัน (TVC เท่ากับ 5.09 logCFU/g) และเนื้อหมูชุดทดลองที่ 2 สามารถเก็บรักษาได้ 9 วัน (TVC เท่ากับ 5.15 logCFU/g) จากผลการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถใช้เคลือบเนื้อหมูและมีฤทธิ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย ส่งผลให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูได้

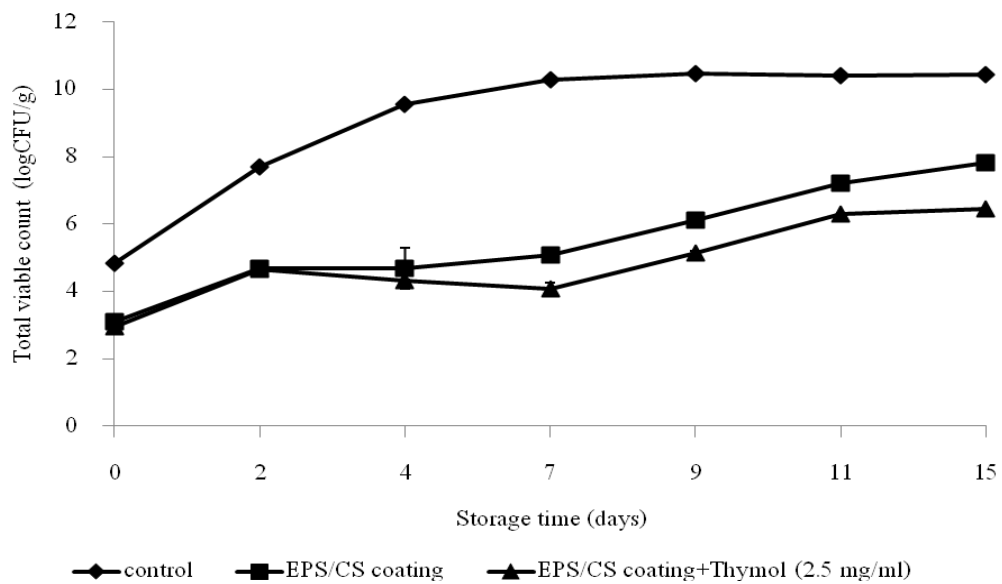


Figure 14. Effect of EPS/CS coating solutions incorporated with thymol (2.5 mg/ml) on total viable count (TVC) of sliced pork during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days

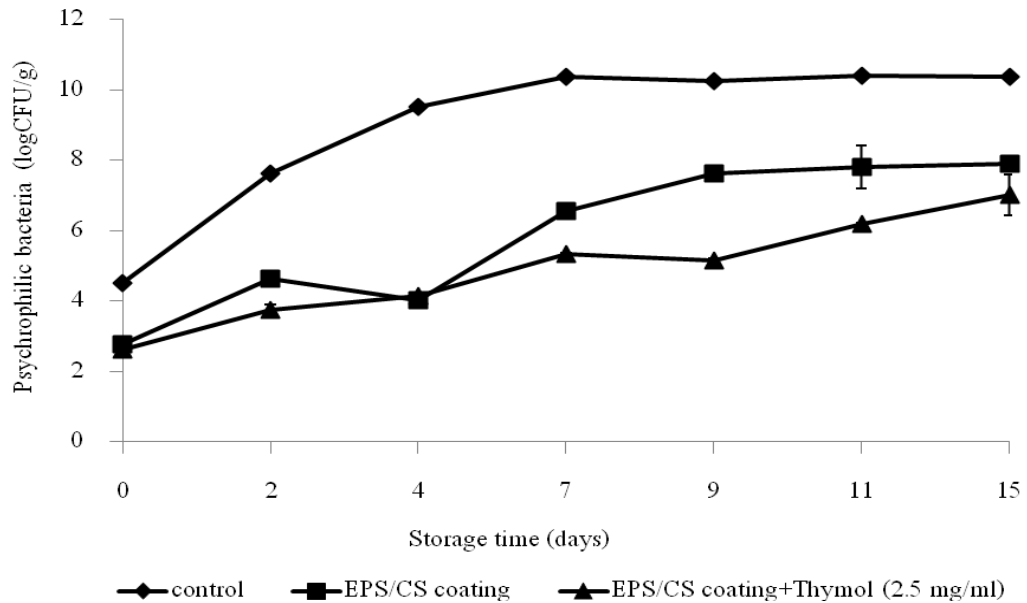


Figure 15. Effect of EPS/CS coating solutions incorporated with thymol (2.5 mg/ml) on psychrophilic bacteria of sliced pork during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days.

6.2.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของเนื้อหมูแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

จากผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของเนื้อหมูที่ไม่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS (ชุดควบคุม) เนื้อหมูที่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS (ชุดทดลองที่ 1) และเนื้อหมูที่เคลือบด้วยสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ชุดทดลองที่ 2) ระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4 ± 0.5 องศาเซลเซียส โดยคุณภาพทางเคมีได้แก่ ค่าพีเอช พบว่าเนื้อหมูชุดควบคุมมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.37 เป็น 7.67 ส่วนเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 4.92 เป็น 5.48 ในขณะที่เนื้อหมูชุดทดลองที่ 2 มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 4.95 เป็น 5.12 เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชของเนื้อหมูชุดควบคุม ชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 ที่ระยะเวลาการเก็บเท่ากัน พบว่าค่าพีเอชของเนื้อหมูชุดควบคุมมีค่าพีเอชสูงกว่าเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 ตามลำดับ (Figure 16) ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อหมูชุดควบคุมที่มีปริมาณ TVC มากกว่าเนื้อหมูชุดทดลองที่ 1 และชุดทดลองที่ 2 (Figure 14) จากเหตุผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลสามารถชะลอการเน่าเสียของเนื้อหมูได้

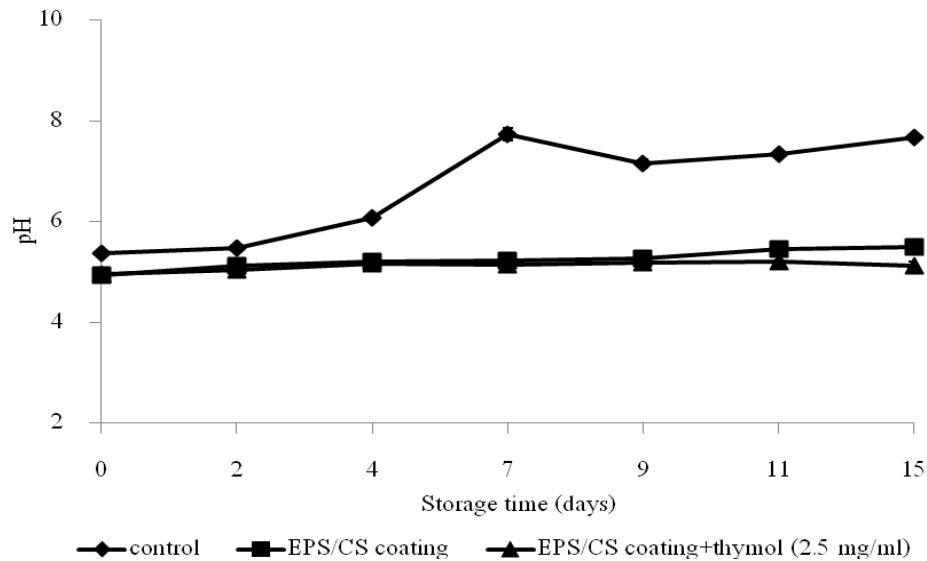


Figure 16. Effect of EPS/CS coating solutions incorporated with thymol (2.5 mg/ml) on pH of sliced pork during storage at 4 ± 0.5 °C for 15 days.

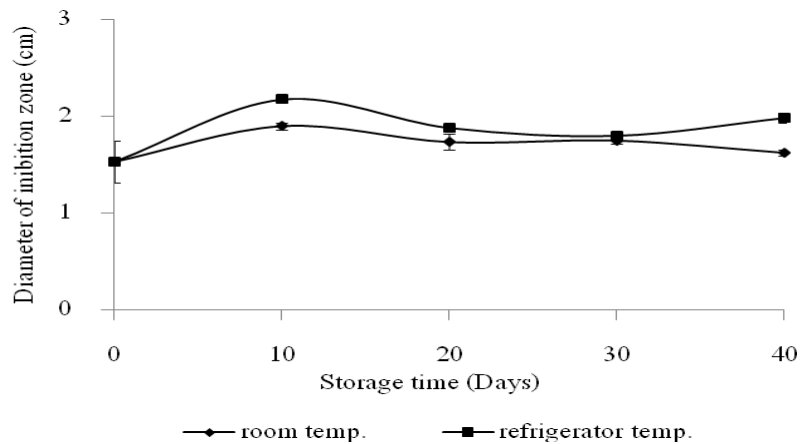
7. ความคงตัวของสารเคลือบและฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมไทมอล

สมบัติของฟิล์มอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษา โดยเฉพาะฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพซึ่งมีความคงตัวน้อยกว่าฟิล์มทางการค้า ทั้งนี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของพอลิเมอร์ชีวภาพที่ใช้ในการผลิตฟิล์มส่งผลให้สมบัติทางเคมีและทางกายภาพของฟิล์มเปลี่ยนไปจากเดิม การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของพอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ Sulfhydryl ของโปรตีนส่งผลให้พอลิเมอร์ของโปรตีนเกิดการย่อยสลาย (Micard *et al.*, 2000) การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพของพอลิเมอร์ชีวภาพ เช่น การเกิด Recrystallization ของพอลิเมอร์แป้งและพอลิแซคคาไรด์ ส่งผลให้เกิดการแยกตัวของสาร โมเลกุลเล็ก เช่น พลาสติไซเซอร์ออกจากสายพอลิเมอร์ของฟิล์ม (Anker *et al.*, 2001) ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น สมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ที่อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบในแผ่นฟิล์ม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความคงตัวฟิล์มพอลิเมอร์ชีวภาพ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความคงตัวของสารเคลือบและฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอล โดยเก็บรักษาเป็นเวลา 40 วัน มีผลการทดลองดังนี้

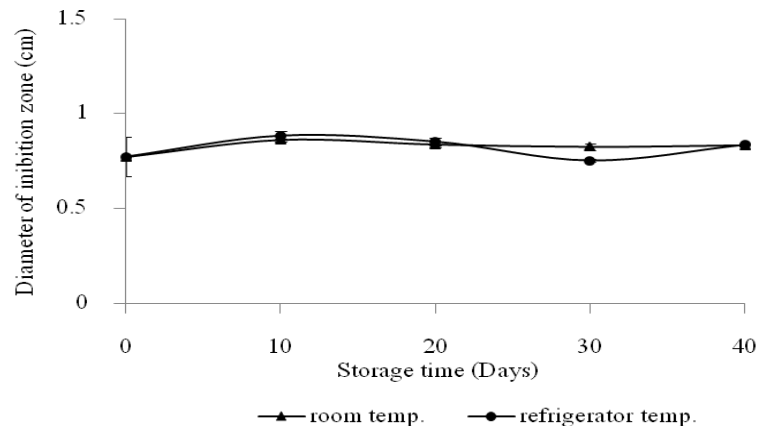
7.1 ความคงตัวของสารเคลือบเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมไทมอลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์

ในการศึกษาความคงตัวของสารเคลือบ EPS/CS นั้น ทำการเตรียมสารเคลือบ EPS/CS แล้วเติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลออกเป็น 2 ชุดทดลอง คือ ชุดทดลองที่ 1 เก็บสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลที่อุณหภูมิห้อง และชุดทดลองที่ 2 เก็บสารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลที่อุณหภูมิตู้เย็น จากนั้นนำมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ (*A. iwoffii* MA02 และ *Pseu. fragi*

MA07) โดยวิธี Agar well diffusion ทุกๆ 10 วัน เป็นเวลา 40 วัน พบว่าระยะเวลาในการเก็บไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยซุคทดลองที่ 1 มีขนาดวงใสของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 1.52 ถึง 1.89 เซนติเมตร และ 0.77 ถึง 0.86 เซนติเมตร ในขณะที่ซุคทดลองที่ 2 มีขนาดวงใสของการยับยั้งอยู่ระหว่าง 1.52 ถึง 2.17 เซนติเมตร และ 0.75 ถึง 0.88 เซนติเมตร สำหรับ *A. iwoffii* MA02 และ *Pseu. fragi* MA07 ตามลำดับ (Figure 17) และเมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาสารเคลือบ EPS/CS พบว่าสารเคลือบทั้ง 2 ซุคทดลองมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (Figure 17) ที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาเท่ากัน



(A)



(B)

Figure 17. Antimicrobial activity of EPS/CS coating solution incorporated with thymol (2.5 mg/ml) against *Acinetobacter iwoffii* MA02 (A) and *Pseudomonas fragi* MA07 (B) during storage for 40 days.

7.2 ความคงตัวของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์/ไคโตซาน (EPS/CS) ที่มีการเติมไทมอล

ในการศึกษาความคงตัวของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลนั้น ทำการเตรียมฟิล์ม EPS/CS โดยการเติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายฟิล์ม EPS/CS แล้วทำการขึ้นรูปฟิล์ม จากนั้นนำฟิล์มดังกล่าวมาทดสอบสมบัติของฟิล์มและวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ (*A. iwoffii* MA02 และ *Pseu. fragi* MA07) โดยเก็บรักษาฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 40 วัน มีผลการทดลองดังนี้

7.2.1 ความหนาและสมบัติเชิงกล

จากการทดลองเก็บรักษาฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 40 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาความคงตัวของฟิล์ม พบว่าระยะเวลาการเก็บฟิล์ม (40 วัน) ไม่ส่งผลต่อความหนาของฟิล์ม โดยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีความหนาเท่ากับ 0.065 ± 0.013 และ 0.067 ± 0.005 มิลลิเมตร สำหรับวันที่ 0 และ 40 ของการเก็บรักษาฟิล์ม ตามลำดับ (Table 22) โดยผลการทดลองเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองของ Tongnuanchan และคณะ (2011) พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาฟิล์มโปรตีนที่สกัดจากเนื้อปลานิลแดงเป็นเวลา 40 วัน ไม่ส่งผลต่อความหนาของฟิล์ม โดยมีความหนาเท่ากับ 0.030 ± 0.005 และ 0.031 ± 0.003 มิลลิเมตร สำหรับการเก็บรักษาฟิล์มในวันที่ 0 และ 40 ตามลำดับ

ผลการทดสอบการต้านทานแรงดึงและค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอล ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 และ 40 วัน พบว่าระยะเวลาของการเก็บรักษาฟิล์มส่งผลต่อค่าต้านทานแรงดึงและค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอล โดยค่าต้านทานแรงดึงของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มมีค่าลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเกิดการแยกตัวของกลีเซอรอลออกจากสายพอลิเมอร์ของฟิล์ม ส่งผลให้โมเลกุลของ EPS มีการรวมตัวหรือการจัดเรียงตัวของสายโซ่โมเลกุลมีความหนาแน่นมากขึ้น ทำให้ปริมาตรอิสระและความสามารถในการเคลื่อนที่ของสายพอลิเมอร์ลดลง (Artharn *et al.*, 2009) โดยวันที่ 0 และวันที่ 40 ของการเก็บฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีค่าต้านทานแรงดึงเท่ากับ 18.93 ± 4.63 และ 26.80 ± 0.78 MPa ส่วนค่ายืดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีค่าเท่ากับ 68.49 ± 6.29 และ 40.06 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 21) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Artharn และคณะ (2009) พบว่าฟิล์มโปรตีนที่เติมและไม่เติมน้ำมันหรือไคโตซานมีค่าต้านทานแรงดึงเพิ่มขึ้น ในขณะที่มีค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มลดลงหลังการเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 54 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองของ Tongnuanchan และคณะ (2011) ที่ศึกษาความคงตัวของฟิล์มโปรตีนที่สกัดจากเนื้อปลา โดยค่าต้านทานแรงดึงของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มมีค่าลดลงตามระยะเวลาการเก็บฟิล์ม โดยเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิห้อง (28-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 40 วัน นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Leerahawong และคณะ (2012) พบว่าฟิล์มจากเนื้อปลานิลที่เติมพลาสติกไซเซอร์ชนิดต่างๆ (กลีเซอรอล ซอร์บิทอล ฟรุคโตส และกลูโคส) มีค่า

ต้านทานแรงดึงเพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มลดลงตามระยะเวลาการเก็บ โดยเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน

7.2.2 การซึมผ่านไอน้ำและการละลายน้ำของฟิล์ม

ผลการทดสอบการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลหลังจากการเก็บฟิล์มเป็นเวลา 40 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาความคงตัวของฟิล์ม พบว่าระยะเวลาการเก็บฟิล์มเป็นเวลา 40 วัน ไม่ส่งผลต่อการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอล อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยวันที่ 0 ของการเก็บฟิล์มมีค่าการซึมผ่านไอน้ำเท่ากับ $2.83\pm 0.64 \times 10^{-10}$ g /ms Pa และหลังจากการเก็บเป็นเวลา 40 วัน ฟิล์มมีค่าการซึมผ่านไอน้ำเท่ากับ $2.61\pm 0.77 \times 10^{-10}$ g /ms Pa (Table 21) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Tongnuanchan และคณะ (2011) พบว่าค่าการซึมผ่านของไอน้ำฟิล์มโพรตีนที่สกัดจากเนื้อปลานิลแดงหลังการเก็บเป็นเวลา 20 วัน มีค่าไม่แตกต่างจากวันที่ 0 ของการเก็บรักษาฟิล์ม โดยมีค่าการซึมผ่านไอน้ำเท่ากับ $3.22\pm 0.16 \times 10^{-11}$ และ $3.15\pm 0.14 \times 10^{-11}$ g/ms Pa ตามลำดับ ซึ่งหากเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาฟิล์ม อาจส่งผลให้ค่าการซึมผ่านไอน้ำของฟิล์มมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้อาจเกิดการแยกตัวของกลีเซอรอลออกจากสายพอลิเมอร์ ทำให้ปริมาตรอิสระระหว่างสายพอลิเมอร์ลดลง ส่งผลให้ไอน้ำผ่านเข้าไปในฟิล์มได้น้อยลง (Anker *et al.*, 2001)

จากการศึกษาความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลในวันที่ 0 และวันที่ 40 ของการเก็บฟิล์ม เพื่อศึกษาความคงตัวของฟิล์ม พบว่าระยะเวลาในการเก็บฟิล์มเป็นเวลา 40 วัน ไม่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์ม โดยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีค่าการละลายน้ำของฟิล์มเท่ากับ 15.88 ± 0.09 และ 16.86 ± 0.38 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเก็บรักษาฟิล์มวันที่ 0 และวันที่ 40 ตามลำดับ (Table 22) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Artham และคณะ (2009) พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาฟิล์มโพรตีนที่เติมและไม่เติมน้ำมันหรือโคโคซาน ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 54 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ไม่ส่งผลต่อความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์ม

Table 22. Properties of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) at days 0 and 40 of storage at 25 °C and 50%RH.

Storage time (days)	Thickness* (mm)	TS (MPa)	Elongation at break (%)	WVP ($\times 10^{-10}$ g /ms Pa)	Solubility (%)
0	0.065 \pm 0.013	23.14 \pm 1.61	71.13 \pm 3.32	2.83 \pm 0.64	15.88 \pm 0.09
40	0.067 \pm 0.005	27.06 \pm 0.78	39.36 \pm 0.97	2.61 \pm 0.77	16.86 \pm 0.38

*Values are given as mean \pm SD from triplicate determinations.

7.2.3 ค่าสีของฟิล์ม

จากผลการวัดค่าสี (L^* , a^* และ b^*) ของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอล หลังการเก็บฟิล์มเป็นเวลา 40 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อศึกษาความคงตัวของฟิล์ม พบว่าค่า L^* และ a^* ของฟิล์มมีแนวโน้มลดลง (ฟิล์มมีความสว่างลดลงและมีสีแดงเพิ่มขึ้น) ซึ่งมีค่า L^* ลดลงจาก 88.12 ± 0.68 (วันที่ 0) เป็น 87.54 ± 0.46 (วันที่ 40) และมีค่า a^* ลดลงจาก -1.71 ± 0.02 (วันที่ 0) เป็น -2.28 ± 0.07 (วันที่ 40) ในขณะที่ค่า b^* ของฟิล์มมีค่าเพิ่มขึ้น (ฟิล์มมีสีเหลืองเพิ่มขึ้น) ตามระยะเวลาการเก็บอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Figure 13) ซึ่งมีค่า b^* เพิ่มขึ้นจาก 7.06 ± 0.18 (วันที่ 0) เป็น 14.11 ± 0.18 (วันที่ 40) (Figure 14) ทั้งนี้อาจเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (Browning reaction) ชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (Non enzymatic browning reaction) ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ของ EPS (น้ำตาลกลูโคส) กับหมู่เอมีนของ CS (Damodaran, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Artham และคณะ (2009) ที่ศึกษาความคงตัวของโปรตีนที่เติมและไม่เติมน้ำมันหรือโคโคซาน พบว่าฟิล์มมีสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ โดยเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) ความชื้นสัมพัทธ์ 54 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และเป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองของ Leerahawong และคณะ (2012) พบว่าฟิล์มจากเนื้อปลาหมึกที่เติมพลาสติกไซเซอร์ชนิดต่างๆ (กลีเซอรอล ซอร์บิทอล ฟรุคโตส และกลูโคส) มีสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ โดยทำการเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน



(A)



(B)

Figure 18. Appearance of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) at day 0 (A) and 40 (B) of storage at 25 °C and 50%RH.

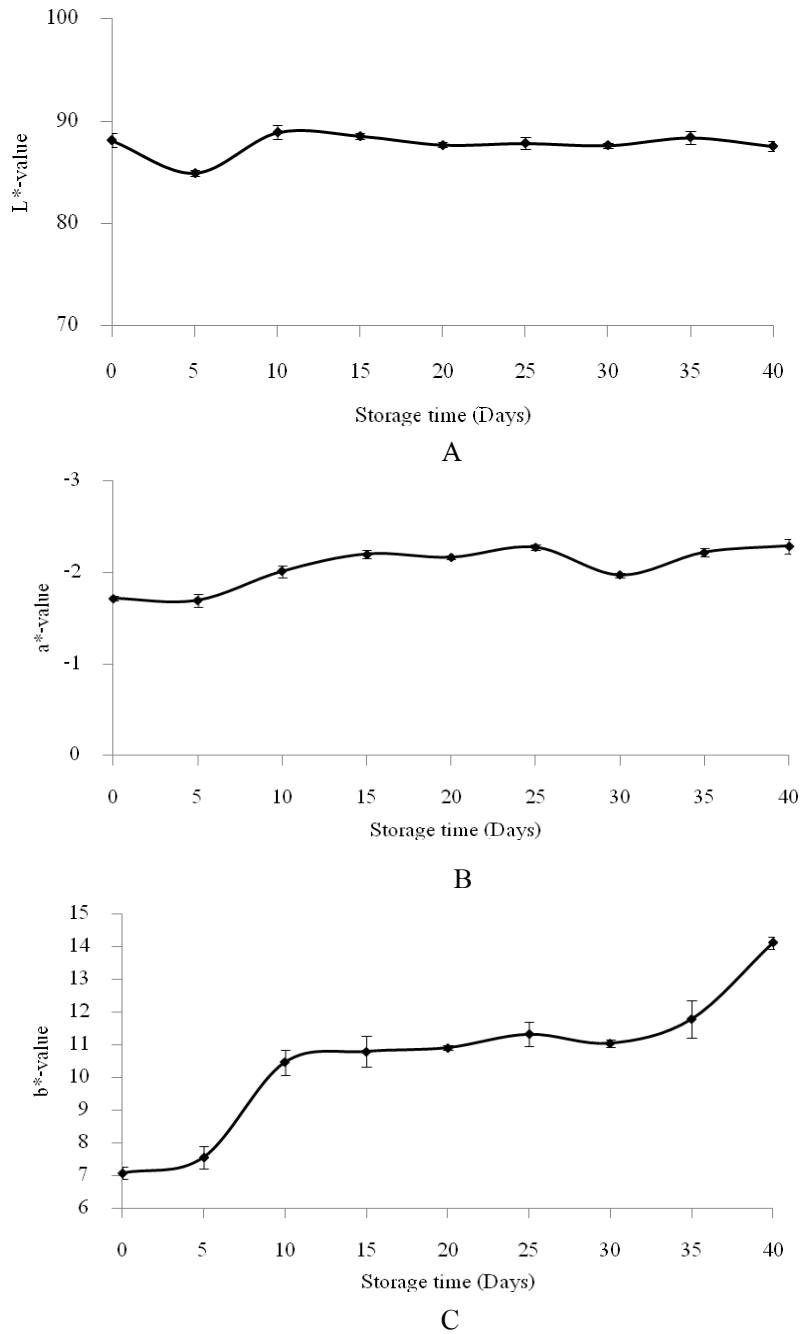


Figure 19. Changes in L*, a* and b* values of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) during storage of 40 days at 25 °C and 50%RH.

7.2.4 การส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์ม

ผลการวัดค่าการส่องผ่านแสงของแผ่นฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอล เพื่อศึกษาความคงตัวของแผ่นฟิล์มแสดงดัง Table. 23 โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 40 วัน พบว่าค่าการส่องผ่านแสงของฟิล์มมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเก็บ โดยฟิล์มมีค่าการส่องผ่านแสงในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็นได้ (350-800 นาโนเมตร) อยู่ระหว่าง 15.4 ถึง 75.97 เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าการส่องผ่านแสงในช่วงแสง UV (280 นาโนเมตร) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 0.42 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ค่า Transparency value ของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมี

นัยสำคัญ ($p < 0.05$) หลังการเก็บฟิล์มเป็นเวลา 5 วัน แสดงถึงฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีความโปร่งใสลดลง แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บฟิล์มจากวันที่ 10 ถึงวันที่ 40 ของการเก็บฟิล์ม พบว่าระยะเวลาการเก็บฟิล์มไม่ส่งผลกระทบต่อความโปร่งใสของฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (Figure 20) โดยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีค่าโปร่งใสเท่ากับ 2.41 ± 0.08 และ 3.70 ± 0.08 สำหรับวันที่ 0 และวันที่ 40 ของการเก็บฟิล์มตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพอลิเมอร์มีการรวมตัวหรือการจัดเรียงตัวของสายพอลิเมอร์มีความหนาแน่นมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บฟิล์ม ทำให้แสงส่องผ่านแผ่นฟิล์มได้น้อยลง (Tongnuanchan *et al.*, 2011) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดค่าการต้านแรงดึงขาดและค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์ม (Table 22) โดยผลการทดลองที่ได้เป็นไปในแนวทางเดียวกับผลการทดลองของ Artham และคณะ (2009) ที่ศึกษาความคงตัวของฟิล์มโพรตีนที่เติมและไม่เติมน้ำมันหรือโคโคซาน พบว่าฟิล์มมีความโปร่งใสลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น โดยเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Leerahawong และคณะ (2012) พบว่าฟิล์มจากเนื้อปลาหมึกที่เติมพลาสติกไซเซอร์ชนิดต่างๆ (กลีเซอรอล ซอร์บิทอล ฟรุคโตส และกลูโคส) มีค่าการส่องผ่านแสงและความโปร่งใสของฟิล์มลดลงตามระยะเวลาการเก็บ โดยเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วัน

Table 23. Light transmittance (%) of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) films during 40 days of storage at 25 °C and 50%RH.

Storage time (days)	Light transmission (%) at different wavelength (nm)							
	200	280	350	400	500	600	700	800
0	0	0.375	29.17	41.62	54.17	63.40	68.05	74.30
5	0	0.325	26.55	41.52	55.85	63.30	68.37	71.90
10	0	0.42	28.12	41.30	61.95	66.10	68.90	73.77
15	0	0.20	16.92	35.32	50.17	61.25	66.02	75.62
20	0	0.25	22.95	41.55	58.00	65.90	70.90	75.97
25	0	0.32	24.45	43.52	58.50	65.82	70.90	75.97
30	0	0.25	19.70	36.20	51.42	60.47	64.60	68.62
35	0	0.22	15.40	31.07	47.45	56.30	62.32	66.67
40	0	0.32	17.30	34.42	51.27	59.07	64.05	68.05

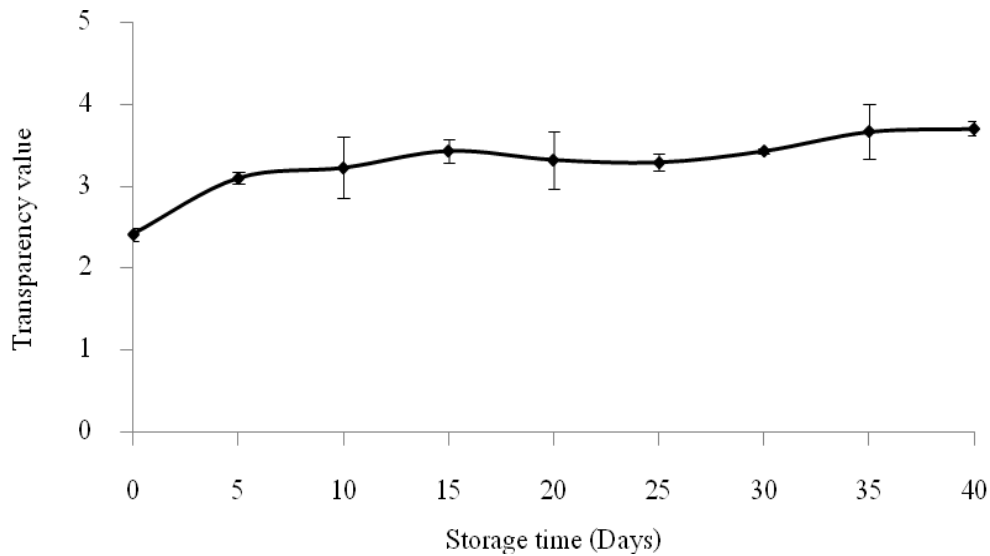


Figure 20. Changes in transparency value of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) during 40 days of storage at 25 °C and 50%RH.

7.2.5 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของฟิล์ม

จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ (*A. iwoffii* MA02 และ *Pseu. fragi* MA07) ของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอล เพื่อศึกษาความคงตัวของฟิล์ม โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 20 วัน ของการเก็บฟิล์ม เป็นเวลา 40 วัน พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้ง *A. iwoffii* MA02 ลดลงตามระยะเวลาการเก็บฟิล์มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 92.47 ± 2.64 และ 97.06 ± 1.87 เพอร์เซ็นต์ สำหรับการเก็บฟิล์มวันที่ 20 และวันที่ 40 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 ของการเก็บฟิล์ม ซึ่งมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 70.10 ± 0.25 เพอร์เซ็นต์ (Table 24) ในขณะที่ประสิทธิภาพการยับยั้ง *Pseu. fragi* MA07 ของฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเก็บฟิล์มแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยมีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 62.88 ± 0.33 , 68.53 ± 8.54 และ 80.60 ± 4.79 เพอร์เซ็นต์ สำหรับการเก็บฟิล์มวันที่ 0, 20 และ 40 ตามลำดับ (Table 25) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไทมอลเป็นสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสารดังกล่าวมีการระเหยเร็วมาก ทำให้ปริมาณที่เหลืออยู่น้อยไม่พอที่จะยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ได้ ซึ่งในงานวิจัยของ Tunc และ Duman (2011) ได้ศึกษาความคงตัวของฟิล์ม Methyl cellulose/carvacrol/montmorillonite nanocomposite พบว่าปริมาณสาร Carvacrol ในฟิล์มลดลงตามระยะเวลาการเก็บ โดยเก็บฟิล์มที่อุณหภูมิ 15, 25, 35 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

Table 24. Antimicrobial activity against *Acinetobacter iwoffii* MA02 of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) during 40 days of storage at 25 °C and 50%RH.

Storage time (days)	Relative survival (%) of <i>Acinetobacter iwoffii</i> MA02 [*]	
	0 h	6 h
0	100	70.10±0.25 ^{a**}
20	100	92.47±2.64 ^b
40	100	97.06±1.87 ^b

*Values are given as mean ±SD from triplicate determinations.

**Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

Table 25. Antimicrobial activity against *Pseudomonas fragi* MA07 of EPS/CS film incorporated with thymol (2.5 mg/ml) during 40 days of storage at 25 °C and 50%RH.

Storage time (days)	Relative survival (%) of <i>Pseudomonas fragi</i> MA07 [*]	
	0 h	6 h
0	100	62.88±0.33 ^{a**}
20	100	68.53±8.54 ^a
40	100	80.60±4.79 ^a

*Values are given as mean ±SD from triplicate determinations.

**Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05).

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ (EPS) จากเชื้อ *Weissella confusa* NH02 สามารถนำมาเตรียมฟิล์มเป็นแผ่นฟิล์มได้ด้วยเทคนิคการเทหล่อจากสารละลาย ฟิล์มที่มีความเข้มข้น EPS และ พลาสติกไซเซออร์ที่เหมาะสม โดยฟิล์ม EPS ที่มีสมบัติเตรียมได้จาก สารละลาย EPS ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับพลาสติกไซเซออร์ที่เหมาะสม คือ กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ EPS โดยฟิล์มที่ได้มีลักษณะใส โปร่งแสง มีความยืดหยุ่น และแข็งแรง สามารถลอกออกจากแผ่นซิลิโคนได้ง่าย ซึ่งมีสมบัติทางกายภาพและทางกล คือ ความหนา 0.063 มิลลิเมตร ค่าต้านทานแรงดึงขาด 7.38 MPa ค่าการยืดตัวเมื่อขาด 30.82 เปอร์เซ็นต์ ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ 4.34×10^{-10} g/msPa ค่าความโปร่งใส 1.82 และค่าการละลายน้ำของฟิล์ม 41.28 เปอร์เซ็นต์

ฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS กับ CS ที่อัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก สามารถลดความสามารถในการละลายน้ำของฟิล์มได้ดีที่สุด โดยมีค่าการละลายของฟิล์มเท่ากับ 14.95 เปอร์เซ็นต์ มีสมบัติทางกลและทางกายภาพ คือ ค่าต้านทานแรงดึงขาด 14.24 MPa ค่าการยืดตัวเมื่อขาด 51.05 เปอร์เซ็นต์ ค่าการซึมผ่านของไอน้ำ 2.78×10^{-10} g/m s Pa และค่าความโปร่งใส 1.50

แยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสียได้ 8 ไอโซเลต พบลักษณะของเชื้อต่างกันคือ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่งสั้น (Short rod) 7 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างกลม (Cocci) 1 ไอโซเลต ได้เลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนี และรูปร่างที่แตกต่างกันมา 2 ไอโซเลต (P1-2 และ P1-7) เพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์โดยวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต P1-2 และ P1-7 มีลำดับเบสเหมือนกับ *Acinetobacter iwoffii* และ *Pseudomonas fragi* ตามลำดับ

ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเน่าเสีย พบว่าไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. iwoffii* MA02 แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseu. fragi* MA07 ได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไทมอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseu. fragi* MA07 และ *A. iwoffii* MA02 ได้ ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2.5 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การเติมไทมอลในฟิล์มพอลิเมอร์ผสมระหว่าง EPS กับ CS ส่งผลให้ฟิล์มมีความหนาและมีสีเหลืองเพิ่มขึ้น แต่ความโปร่งใสและการส่องผ่านของแสงลดลง โดยฟิล์มที่ได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เนื้อหมูแช่เย็นเกิดการเน่าเสีย

สารเคลือบ EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อนำไปประยุกต์ใช้กับเนื้อหมูแช่เย็น พบว่าสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็นได้เพิ่มขึ้นจาก 2 วัน เป็น 9 วัน ในขณะที่ฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อหมูแช่เย็นได้เพิ่มขึ้นจาก 2 วัน เป็น 11 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อหมูที่ไม่เคลือบและห่อหุ้มด้วยฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอล

จากการศึกษาความคงตัวของสารเคลือบและฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 40 วัน พบว่าระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียของสารเคลือบ แต่ระยะเวลาในการเก็บฟิล์มส่งผลต่อสมบัติทางกลและทางกายภาพของฟิล์ม โดยพบว่าค่าต้านทานแรงดึงขาดเพิ่มขึ้น ขณะที่ค่าการยืดตัวเมื่อขาดของฟิล์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และส่งผลต่อค่าสี โดยฟิล์มมีสีเข้มและมีสีเหลืองเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อของฟิล์มลดลงหลังการเก็บฟิล์มเป็นเวลา 40 วัน

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

1. ศึกษาวิธีการขึ้นรูปฟิล์ม ชนิดและความเข้มข้นของพลาสติกไซเซอรอื่นๆ เพื่อให้ได้ฟิล์มที่มีสมบัติที่ดี และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายยิ่งขึ้น
2. ศึกษาการดัดแปลง EPS โดยวิธีการต่างๆ เพื่อให้ฟิล์ม EPS มีความคงตัวต่อความชื้นและน้ำมันมากขึ้น
3. ศึกษาสารต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์
4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของเนื้อหุ่มอื่นๆ เช่น การเกิด Lipid oxidation ซึ่งส่งผลให้การวิจารณ์ผลชัดเจนมากขึ้น
5. ฟิล์ม EPS/CS ที่เติมไทมอลมีกลิ่นและมีโอกาสรบกวนรสชาติของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเมื่อต้องการนำไปใช้งานจริงอาจทำการทดสอบทางประสาทสัมผัส เนื่องจากกลิ่นของไทมอลอาจมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- บุษกร อุดรภิชชาติ. 2547. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยทักษิณ. กรุงเทพฯ.
- ปรีชา วิบูลเศรษฐ์. 2540. การเน่าเสียของอาหาร. ใน วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. หน้า 74-91. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2547. มาตรฐานเนื้อสุกร เลขที่ 6000-2547. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2553. มาตรฐานถุงพลาสติกสำหรับบรรจุอาหาร เลขที่ 1027-2553. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรม.
- รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2546. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 1. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. บริษัท แอททีฟ ฟรีนธ์ จำกัด.
- วราวัฒน์ วงศ์ศุภชาติ. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากอาหารหมักพื้นบ้านและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2530. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. ใน จุลินทรีย์วิทยาทางอาหาร. หน้า 1-16. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศิวาพร ศิวเวชช. 2546. วัตถุประสงค์อาหาร เล่มที่ 1. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ. นครปฐม.
- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุรียรัตน์ เงินดวง. 2545. การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Adams, M. 2003. Nisin in multifactorial food preservation. In Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. (Roller, S., ed.). p. 11-26. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cambridge.

- Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T. and Agustini, T.W. 2012. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. *Food Hydrocolloid*. 28 : 189-199.
- Alves, V.D., Ferreira, A.R., Costa, N., Freitas, F., Reis, M.A.M. and Coelho, I.M. 2011. Characterization of biodegradable films from the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas leovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydr. Polym.* 83 : 1582-1590.
- Andrade-Mahecha, M.M., Tapia-Blacidob, D.R. and Menegalli, F.C. 2012. Development and optimization of biodegradable films based on achira flour. *Carbohydr. Polym.* 88 : 449-458.
- Anker, M., Stading, M. and Hermansson, A.M. 2001. Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. *J. Agric. Food Chem.* 49 : 989-995.
- Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G. and Penna, T.C.V. 2009. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends. Food. Sci. Tech.* 20 : 146-154.
- Argira, H., Urashima, E., Leo, M., Morizono, N., Kimura, T. and Takahashi, S. 1992. Extracellular polysaccharide from encapsulated *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* OR901 isolated from commercial yogurt. *J. Food Sci.* 57 : 624-628.
- Artharn, A., Prodpran, T. and Benjakul, S. 2009. Round scads protein-based film: storage stability and its effectiveness for shelf-life extension of dried fish powder. *LWT-Food. Sci. Technol.* 42 : 1238-1244.
- Arvanitoyannis, I.S., Nakayama, A. and Aiba, S. 1998. Chitosan and gelatin based edible film: state diagrams, mechanical and permeation properties. *Carbohydr. Polym.* 37 : 371-382.
- ASTM. 1980. Annual Book of American Standard Testing Method. Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials E 96. Philadelphia, PA.
- ASTM. 2006. Annual Book of ASTM Standards. Standard Test Method for Transparency of Plastic Sheeting ASTM D 1746-03.
- Banker, G.S. 1966. Film coating theory and practice. *J. Pharm. Sci.* 55 : 81-89.
- Bender, J., Eaton, S.R., Ekanemesang, U.M. and Phillips, P. 1994. Characterization of metal-binding ioflocculants produced by the Cyanobacterial of mixed microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 2311-2315.

- Bengtsson, M., Koch, K. and Gatenholm, P. 2003. Surface octanoylation of high-amylose potato starch film. *Carbohydr. Polym.* 54 : 1-11.
- Bertan, L.C., Palmu, P.S.T., Siani, A.C. and Grosso, C.R.F. 2005. Effect of fatty acid and 'Brazilian elemi' on composite films base on gelatin. *Food Hydrocolloid.* 19 : 73-82.
- Bertuzzi, M.A., Castro Vidaurre, E.F., Armada, M. and Gottifredi, J.C. 2007. Water vapor permeability of edible starch based films *J. Food Eng.* 80 : 972-978.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94 : 223-253.
- Cagri, A., Uatunol, Z. and Ryser, E.T. 2004. Antimicrobial edible films and coatings. *J. Food Prot.* 67 : 833-848.
- Cha, D.S., Choi, J.H., Chinnan, M.S. and Park, H.J. 2002. Antimicrobial films based on Na-alginate and K-carrageenan. *LWT-Food. Sci. Technol.* 35 : 715-719.
- Cha, D.S., Cooksey, K., Chinnan, M.S. and Park, H.J. 2003. Release of nisin from various heat press and cast films. *LWT-Food. Sci. Technol.* 36 : 209-213.
- Cheng, L.H., Karim, A. and Seow, C.C. 2008. Characterisation of composite films made of konjac glucomannan (KGM), carboxymethyl cellulose (CMC) and lipid. *Food Chem.* 107 : 411-418.
- Chinma, C.E., Ariahu, C.C. and Abu, J.O. 2012. Development and characterization of cassava starch and soy protein concentrate based edible films. *Int. J. Food Sci. Tech.* 47 : 383-389.
- Chiu, P.E. and Lai, L.S. 2010. Antimicrobial activities of tapioca starch/decolorized hsian-tsau leaf gum coatings containing green tea extracts in fruit-based salads, romaine hearts and pork slices. *Int. J. of Food Microbiol.* 139 : 23-30.
- Coates, K.J., Beattie, J.C., Morgan, I.R. and Widders, P.R. 1995. The contribution of carcass contamination and the boning process to microbial spoilage of aerobically stored pork. *Food Microbiol.* 12 : 49-54.
- Colla, E., Sobral, P.J. and Menegalli, F.C. 2006. *Amaranthus cruentus* flour edible films: influence of stearic acid addition, plasticizer concentration and emulsion stirring speed on water vapor permeability and mechanical properties. *J. Agric. Food Chem.* 54 : 6645-6653.

- Coma, V., Sebti, I., Pardon, P., Deschamps, A. and Pichavant, F.H. 2001. Antimicrobial edible packaging based on cellulosic ethers, fatty acids, and nisin incorporation to inhibit *Listeria innocua* and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Prot.* 64 : 470-475.
- Corrales, M., Han, J.H. and Tauscher, B. 2009. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch film. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44 : 425-433.
- Cunningham, P., Ogale, A.A., Dawson, P.L. and Acton, J.C. 2000. Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *J. Food Sci.* 65 : 668-71.
- Cvetnic, Z. and Vladimir-Knevi, S. 2004. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm.* 54 : 243-250.
- Dainty, R.H. and Mackey, B.M. 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bact.* 73 : 103-114.
- Damodaran, S. 1996. Amino acids, Peptides and Protein. *In Food Chemistry.* (Fennema, O.R., ed.). p. 321-429. Marcel Dekker. New York.
- Davidson, P.M. 1997. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. *In Food Microbiology Fundamentals and Frontiers* (Doyle, M.P., Beucha, L.R. and Montville, T.J., eds.) p. 520-556. ASM Press. Washington. D.C.
- Davidson, P.M. and Zivanovic, S. 2003. Food Preservation Techniques. *In The Use of Natural Antimicrobials.* (Zeuthen, P. and Bogh-Sorensen, L., eds.). p. 5-22. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. Cambridge.
- Dawson, P.L., Hirtb, D.E., Rieckc, J.R., Actona, J.C. and Sotthibandhud, A. 2003 Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method. *Food Res. Int.* 36 : 959-968.
- Delgado, B., Fernandez, P.S., Palop, A. and Periago, P.M. 2004. Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distributions. *Food Microbiol.* 21 : 327-334.
- Del Nobile, M.A., Conte, A., Incoronato, A.L. and Panza, O. 2008. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. *J.Food Eng.* 89 : 57-63.

- Devlieghere, F., Vermeulen, A. and Debevere, J. 2004. Chitosan: antimicrobial activity interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetable. *Int. J. Food Microbiol.* 21 : 703-714.
- De Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharide from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23 : 153-177.
- Dias, A.B., Muller, C.M.O., Larotonda, F.D.S. and Laurindo, J.B. 2010. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *J. Cereal Sci.* 51 : 213-219.
- Durtschi, J.D., Stevenson J., Hymas, W., Voelkerding, K.V. 2007. Evaluation of quantification methods for real-time PCR minor groove binding hybridization probe assays. *Anal. Biochem.* 361 : 55-64.
- Dutta, P.K., Tripathi, S., Mehrotra, G.K. and Dutta, J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem.* 114 : 1173-1182.
- Ehivet, F.E., Min, B., Park, M.K. and Oh, J.H. 2011. Characterization and antimicrobial activity of sweet potato starch-based edible film containing *Origanum (Thymus capitatus)* oil. *J. Food Sci.* 76 : 178-184.
- Elizondo, N.J., Sobral, J.A. and Menegalli, F. 2008. Development of film based on blends of *Amaranthus cruentus* flour and poly (vinyl alcohol). *Carbohydr. Polym.* 75 : 592-598.
- Emiroglu, Z.K., Yemis, G.P., Coskun, B.K. and Candogan, K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Sci.* 86 : 283-288.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, P., Ferranti, P. and Villani, F. 2009. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential *In vitro* and in beef. *Appl. Environ. Microb.* 75 : 1990-2001.
- Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Nasi, P. and Villani, F. 2006. Changes in the spoilage related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 : 4663-4671.
- Ettayebi, K., Yamani, J.E. and Rossi-Hassani, B.D. 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 183 : 191-195.

- Evenson, M.L., Hinds, M.W. and Bernstein, R.S. 1988. Enterotoxin production by a typical Staphylococci Enterotoxin A from large outbreak of Staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7 : 311-316.
- Fabra, M., Talens, P. and Chiralt, A. 2008 Microstructure and optical properties of sodium caseinatev films contain oleic acid-beewax mixtures. *Food Hydrocolloid.* 23 : 676-683.
- Freitas, F.D., Alves, V., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R. and Reis, M. 2009. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresour. Technol.* 100 : 859-865.
- Galdeano, M.C., Mali, S. and Grossmann, M.V.E., Yamashita, F. and Garcia, M. A. 2009. Effects of plasticizers on the properties of oat starch films. *Mater. Sci. Eng.* 29 : 532-538.
- Garcia-Garcia R, Lopez-Malo A, Palou E. 2011. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol and eugenol against *Listeria innocua*. *J. Food Sci.* 76 : 95-100.
- Garciagaribay, M. and Marshall, V.M.E. 1991. Polymer production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* *J. Appl. Bacteriol.* 70 : 325-328.
- Garcia, M.A., Martino, M.N. and Zaritzky, N.E. 1998. Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria*×*Ananassa*) quality and stability. *J. Agric. Food Chem.* 46 : 3758-3767.
- Gennadios, A., Handa, A., Froning, G.W., Weller, C.L. and Hanna, M.A. 1998. Physical properties of egg white-dialdehyde starch film. *J. Agric. Food Chem.* 46 : 1297-1302.
- Geraldine, R.M., Soares, N.D.F.F., Botrel, D.A. and Goncalves, L.D.A. 2008. Characterization and effect of edible coating on minimally process garlic quality. *Carbohydr. Polym.* 72 : 403-409.
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H. and Entezami, A.A. 2010. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 : 697-702.
- Ghasemloua, M., Khodaiyana, F. and Oromiehieb, A. 2011. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefiran. *Carbohydr. Polym.* 84 : 47-483.
- Giatrakou, V., Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N. 2010. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. *Food Microbiol.* 27 : 132-136.

- Gniewosz, M. and Synowiec, A. 2011. Antibacterial activity of pullulan films containing thymol. *Flavour. Frag. J.* 26 : 389-395.
- Godbillot, L., Dole, P., Joly, C., Roge, B. and Mathlouthi, M. 2006. Analysis of water binding in starch plasticized films. *Food Chem.* 96 : 380-386.
- Gontard, N., Guibert, S. and Cuq, J.L. 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.* 58 : 190-195.
- Gounga, M.E., Xu, S.Y. and Wang, Z. 2007. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. *J. Food Eng.* 83 : 521-530.
- Guibert, S. 1986. Technology and Application of Edible film. *In Food Packaging and Preservation Theory and Practice.* (Mathlouthi, M., ed.). p. 371-394. Elsevier Applied Science Publisher. London.
- Guibert, S., Gontard, N. and Gorris, L.G.M. 1996. Prolongation of the shelf life of perishable food product using biodegradable film and coating. *Lebensm-wissu-Technol.* 29 : 10-17.
- Guillen, M.C.G., Mateos, M.P., Estaca, J.G., Caballero, E.L. and Montero, P. 2009. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable film. *Trends. Food Sci. Technol.* 20 : 3-16.
- Gutierrez-Larraínzar, M., Rua, J., Caro, I., Castro, C., Arriaga, D., Garcia-Armesto, M.R. and Valle, P. 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria *Food Control.* 26 : 555-563.
- Halander, I.M. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *Int. J. Food Microbiol.* 60 : 153-161.
- Han, J.H. and Floros, J.D. 1997. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. *J. Plast. Film Sheet.* 13 : 287-298.
- Han, J.H. 2003. Antimicrobial Food Packaging, *In Novel Food Packaging Technique.* (Ahvenaine, R., ed.). p. 50-70. Woodhead Publishing. UK.
- Han, J.H. 2005. Antimicrobial Packaging Systems. *In Innovations in Food Packaging.* (Han, J.H. ed.). p. 80-107. Elsevier Academic Press. USA.

- Holley, R.A. and Patel, D. 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22 : 272-292.
- Hong, Y.H., Lim, G.O. and Song, K.B. 2009. Physical properties of *Gelidium corneum*-gelatin blend films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. *J. Food Sci.* 74 : 6-10.
- Hoque, M.S., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2011. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloid.* 25 : 1085-1097.
- Hosseini, M.H., Razavi, S.H., Mousavi S.M.A., Yasaghi S.A.S. and Hasansaraei, A.G. 2008. Improving antibacterial activity of edible films based on chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *J. Appl. Sci.* 8 : 2895-2900.
- Imran, M., El-Fahmy, S., Revol-Junelles, A.M. and Desobry, S. 2010. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydr. Polym.* 81 : 219-225.
- Iroegbu, C.U. and Nkere, C.K. 2005. Evaluation of the antibacterial properties of *Picralima nitida* stem bark extracts. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 1 : 182-189.
- ISO Standard. 1993. *Plastics-Film and Sheeting Determination of Thickness by Mechanical Scanning.* ISO 4593:1993 (E) International Standard : 1-2.
- Iwata, K., Ishizaki, S., Handa, A. and Tanaka, M. 2000. Preparation and characterization of edible films from fish water-soluble proteins. *Fish Sci.* 66 : 372-378.
- Jiang, Y., Gao, F., Xu, X.L., Ye, K.P. and Zhou, G.H. 2011. Changes in the composition of the bacterial flora on tray-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE and Real-time PCR. *J. Food Sci.* 76 : 27-33.
- Jin, T. and Zhang, H. 2009 Biodegradable polylactic acid polymer with nisin for use in antimicrobial food packaging. *J. Food Sci.* 73 : 127-134.
- Jin, T., Liu, L.S., Zhang, H. and Hicks, K. 2009. Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. of FoodSci. and Tech.* 44 : 322-329.

- Juven, B.J., Kanner, F., Schved, F. and Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J. Appl. Bacteriol.* 76 : 626-631.
- Kanatt, S.R., Rao, M.S., Chawla, S.P. and Sharma, A. 2012. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloid.* 29 : 290-297.
- Kim, Y., An, D., Park, H., Park, J. and Lee, D.S. 2002. Properties of nisin incorporated polymer coatings as antimicrobial packaging materials. *Packag. Technol. Sci.* 15 : 247-254.
- Ko, S. Janes, M.E. and Hettiarachchy, N.S. 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Sci.* 66 : 1006-1011.
- Kroll, J. and Rawel, H.M. 2001. Reactions of plant phenols with myoglobin: influence of chemical structure of phenolic compounds. *J. Food Sci.* 66 : 48-58.
- Kuorwel, K.K., Cran, M.J., Sonneveld, K., Miltz, J. and Bigger, S.W. 2011. Antimicrobial activity of natural agents coated on starch-based films against *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* 76 : 531-537.
- Larena, A. and Villar, M.A. 2001. Optical properties of CaCO₃ filled poly (ethylene-co-vinyl acetate) films. *Opt. Mater.* 17 : 437-442.
- Laukova, A. 2000. *In vitro* treatment of different isolates from cattle drug and pig slurry by nisin. *Acta Vet. Brno.* 69: 147-151.
- Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. 2001. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnol. Adv.* 19 : 597-625.
- Lebert, I., Begot, C. and Lebert, A. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* in a meat medium as affected by pH (5.8-7.0), water activity (0.97-1.00) and temperature (7-25 °C). *Int. J. Food Microbiol.* 39. 53-60.
- Lee, C.H. 2004. A coating for use as an antimicrobial and antioxidative packaging material incorporating nisin and α -tocopherol. *J. Food Eng.* 62 : 323-329.
- Lee, D.S. 2005. Packaging Containing Natural Antimicrobial or Antioxidative Agents. *In Innovations in Food Packaging.* (Han, J.H., ed.). p. 108-122. Elsevier Academic Press. USA.

- Lee, I.Y., Seo, W.T., Kim, G.J., Kim, M.K., Ahn, S.G. and Kwon, G.S. 1997. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 16 : 71-75.
- Leerahawong, A., Tanaka, M., Okazaki, E. and Osako K. 2012. Stability of the physical properties of plasticized edible films from squid (*Todarodes pacificus*) mantle muscle during storage. *J. Food Sci.* 77 : 159-165.
- Li, B., Kennedy, J.F., Peng, J.L., Yie, X. and Xie, B.J. 2006. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydr. Polym.* 65 : 488-494.
- Lim, G.O., Jang, S.A. and Song, K.B. 2010. Physical and antimicrobial properties of *Gelidium corneum*/nano-clay composite film containing grape fruit seed extract or thymol. *J. Food Eng.* 98 : 415-420.
- Li, M.Y., Zhou, G.H., Xu, X.L., Li, C.B. and Zhu, W.Y. 2006. Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food Microbiol.* 23 : 607-611.
- Liu, F., Yang, R.Q. and Li, Y.F. 2006. Correlations between growth parameters of spoilage microorganisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2, 4 and 10 °C. *Food Microbiol.* 23 : 578-583.
- Lopez-Carballo, G., Hernandez-Munoz, P., Gavara, R. and Ocio, M.J. 2008. Photoactivated chlorophyllin-base gelatin film and coating to prevent microbial contamination of food product. *Int. J. Food Microbiol.* 126 : 65-70.
- Lopez-Mallo, A., Alzamora, S.M. and Palou, E. 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 99 : 119-128.
- Manca de Nadra, M.C. and Strasser de Saad, A.M. 1995. Polysaccharide production by *Pediococcus pentosaceus* from wine. *Int. J. Food Microbiol.* 27 : 101-106.
- Marino, M., Bersani, C. and Comi, G. 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Prot.* 62 : 1017-1023.
- Mastromatteoa, M., Barbuzzib, G., Conteb, A. and Del Nobile, M.A. 2009. Controlled release of thymol from zein based film. *Innov. Food Sci. Emerg.* 10 : 222-227.

- Matsukawa, S. and Watanabe, T. 2007. Gelation mechanism and network structure of mixed solution of low and high-acyl gellan studied by dynamic viscoelasticity, CD and NMR measurements. *Food Hydrocolloid*. 21 : 1355-1361.
- Matta, M.D., Sarmento¹, S.B.S., Oliveira, L.M. and Zocchi, S.S. 2011. Mechanical properties of pea starch films associated with xanthan gum and glycerol. *Starch-Starke*. 63 : 274-282.
- Mauriello, G., Luca, E.D., Storia, A.L., Villani, F. and Ercolini, D. 2005. Antimicrobial activity of a nisin activated plastic film for food packaging. *Lett. Appl. Microbiol.* 41 : 464-469.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. and Jewell, K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92 : 15-33.
- Micard, V., Belamri, R., Morel, M.H. and Guilbert, S. 2000. Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *J. Agric. Food Chem.* 48 : 2948-2953.
- Moreira, M.R., Ponce, A.G., Valle, C.E. and Roura, S.I. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensm. Wiss. Technol.* 38 : 565-570.
- Nakatsu, C.H. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71 : 562-571.
- Nguyen, V.T., Gidley, M.J. and Dykes, G.A. 2008. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. *Food Microbiol.* 25 : 471-478.
- Nobile, M.A.D., Conte, A., Cannarsi, M. and Sinigaglia, M. 2009. Strategies for prolonging the shelf life of minced beef patties. *J. Food Safety.* 29 : 14-25.
- Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Roccaro, A.S. and Alonzo, V. 2004. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol. Lett.* 230 : 191-195.
- Ogale, A.A., Cunningham, P., Dawson, P.L. and Acton, J.C. 2000. Viscoelastic, thermal and microstructural characterization of soy protein isolate films. *J. Food Sci.* 65 : 672-9.

- Ojagha, S.M., Rezaeia, M., Razaeia, S.H. and Hosseini, S.M.H. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil. *Food Chem.* 122 : 161-166.
- Olsson, C., Ahrne, S., Pettersson, B. and Molin, G. 2003. The bacterial flora of fresh and chill-stored pork: analysis by cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *Int. J. Food Microbiol.* 83 : 245-252.
- Ouwehand, A. and Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. *In Lactic Acid Bacteria* (Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A., eds.). p. 375-395. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Padgett, T., Han, I.Y. and Dawson, P.L. 1998. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packagings. *J. Food Prot.* 61 : 1330-1335.
- Park, H.J., Weller, C.L., Vergano, P.J. and Testin, R.F. 1993. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. *J. Food Sci.* 58 : 1361-1364.
- Park, S.Y. and Chin, K.B. 2010. Effects of onion on physicochemical properties, lipid oxidation and microbial growth of fresh pork patties. *Int. J. Food Sci. Tech.* 45 : 1153-1160.
- Park, S.Y. and Chin, K.B. 2010. Evaluation of pre-heating and extraction solvents in antioxidant and antimicrobial activities of garlic, and their application in fresh pork patties. *Int. J. Food Sci. Tech.* 45 : 365-373.
- Parsek, M.R. and Tolker-Nielsen, T. 2008. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 11 : 560-566.
- Peirmaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M.A. and Abraham, A.G. 2011. Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food. Hydrocolloid.* 25 : 1261-1269.
- Peirmaria, J., Pinotti, A., Garcia, M.A. and Abraham, A.G. 2009. Film based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: development and characterization. *Food Hydrocolloid.* 23 : 684-690.
- Pelissari, F.M., Grossman, M.V.E., Yamashita, F. and Pinaea, E.A.G. 2009. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. *J. Agric. Food Chem.* 57 : 7499-7504.

- Pelissari, F.M., Yamashita, F., Garcia, M.A., Martino, M.N., Zaritzky, N.E. and Grossmann M.V.E. 2012. Constrained mixture design applied to the development of cassava starch-chitosan blown films J. Food Eng. 108 : 262-267.
- Pennacchia, C., Ercolini, D. and Villani, F. 2011. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. Food Microbiol. 28 : 84-93.
- Phisalaphong, M. and Jatupaiboon, N. 2008. Biosynthesis and characterization of bacteria cellulose-chitosan film. Carbohydr. Polym. 74 : 482-488.
- Pintado, C.M.B.S., Ferreira, M.A.S.S. and Sousa, I. 2010. Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. Food Control. 21 : 240-246.
- Pommet, M., Redl, A., Guilbert, S. and Morel, M.H. 2005. Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials. J. Cereal Sci. 42 : 81-91.
- Portes, E., Gardrat, C., Castellan A. and Coma, V. 2009. Environmentally friendly films based on chitosan and tetrahydrocurcuminoid derivatives exhibiting antibacterial and antioxidative properties. Carbohydr. Polym. 76 : 578-584.
- Pranoto, Y., Rakshit, S.K. and Salokhe, V.M. 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. LWT-Food Sci. Technol. 38 : 859-865.
- Rachtanapun, P., Luangkamin, S., Tanprasert, K. and Suriyatema, R. 2012. Carboxymethyl cellulose film from durian rind. LWT-Food Sci. Technol. 48 : 52-58.
- Ramos, M., Jimenez, A., Peltzerr, M. and Garrigos, M.C. 2012. Characterization and antimicrobial activity studies of polypropylene films with carvacrol and thymol for active packaging. J. Food Eng. 109 : 513-519.
- Rao, M.S., Kanatt, S.R., Chawla, S.P. and Sharma, A. 2010. Chitosan and guar gum composite films: Preparation, physical, mechanical and antimicrobial properties. Carbohydr. Polym. 82 : 1243-1247.
- Rattaya, S., Benjakul, S. and Prodpran, T. 2009. Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. J. Food Eng. 95 : 151-157.

- Rhim, J.W., Gennadios, A., Handa, A., Wwller, C.L. and Hanna, M.A. 2000. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. *J. Agr. Food Chem.* 48 : 4937-4941.
- Rojas-Grau, M.A., Avena-Bustillos, R.J., Olsen, C., Friedmen, M., Henika, P.R., Martin-Belloso, O., Pan, Z. and McHugh, T.H. 2007. Effect of plant essential oil and oil compound on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible film. *J. Food Eng.* 83 : 634-641.
- Rooney, M.L. 2005. Introduction to Active Food Packaging Technologies. *In Innovations in Food Packaging.* (Han, J.H., ed.). p. 63-79. Elsevier Academic Press. USA.
- Rotta, J., Ozorio, R.A., Kehrwald, A.M.G., Barra, M.O., Amboni, R.D.M.C. and Barreto, P.L.M. 2009. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Mater. Sci. Eng. A Struct. Mater.* 29 : 619-623.
- Ryu, S.Y., Rhim, J.W., Roh, H.J. and Kim, S.S. 2002. Preparation and physical properties of zien-coated high-amylose corn starch film. *Lebensm. Wiss. Technol.* 35 : 680-686.
- Sakala, R.M. Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y., Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C. and Ogawa, M. 2002. Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. *Int. J. Food Microbiol.* 74 : 87-99.
- Sanla-Ead, N., Jangchud, A., Chonhenchob, V. and Suppakul, P. 2012. Antimicrobial activity of cinnamaldehyde and eugenol and their activity after incorporation into cellulose based packaging. *Packg. Technol. Sci.* 25 : 7-17.
- Seyed, M.O., Masoud, R., Seyed, H.R. and Seyed, M.H. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem.* 122 : 161-166.
- Shaw, N.B., Monahan, F.J., Riordan, E.D. and Sullivan, M. 2002 Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films. *J. Food Eng.* 51 : 299-304.
- Shellhammer, T.H. and Krochta, J.M. 1997. Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type amount. *J. Food Sci.* 62 : 390-394.

- Shiku, Y., Hamaguchi, P.Y., and Tanaka, M. 2003. Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. *Fisheries Science*. 69 : 1026-1032.
- Siripatrawan, U. and Harte, B.R. 2010. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloid*. 24 : 770-775.
- Smith, J.L., Buchanan, R.L. and Palumbo, S.A. 1983. Effect of food environment on *staphylococcus* enterotoxin synthesis. *J. Food Protect*. 46 : 545-555.
- Smith, S.A. 1986. Polyethylene, lowdensity. *In The Wiley encyclopedia of packaging technology*. (Bakker, M., ed.). p. 514-523. John Wiley & Sons. New York. USA.
- Sothornvit, R. and Krochta, JM. 2000. Plasticizer effect on oxygen permeability of beta-lactoglobulin films. *J Agric Food Chem*. 48 : 6298-6302.
- Sothornvit, R. and Krochta, J.M. 2005. Plasticizers in Edible Films and Coatings. *In Innovations in Food Packaging*. (Han, J.H., ed.). p. 403-433. Elsevier Academic Press. San Diego.USA.
- Sothornvit, R. and Songtip, S. 2012. Properties of compression-molded banana-based sheets compared with banana flour. *Acta Hort*. 928 : 243-250.
- Sothornvit, R., Olsen, C.W., Mchugh, T.H. and Krochta, J.M. 2003. Formation conditions, water-vapor permeability, and solubility of compression-molded whey protein films. *J. Food Sci*. 68 : 1985-1989.
- Sorrentino, A., Gorrasi, G. and Vittoria, V. 2007. Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. *Trends Food Sci. Technol*. 18 : 84-95.
- Srinivasa, Ramesh, M.N. and Tharanathan, R.N. 2007. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films *Food Hydrocolloid* 21 : 1113-1122.
- Sutherland, I.W. 1995. Biosynthesis and composition of gram-negative bacteria extracellular and cell wall polysaccharide. *Annu. Rev. Microbiol*. 39 : 243-270.
- Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol*. 16 : 41-46.

- Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, M.C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. Res. Microbiol. 154 : 705-712.
- Tapia-Blacido, D., Mauri, A.N., Menegalli, F., Sobral, P.J. and Ahon, M.C. 2007. Contribution of the protein and lipid fractions to the physical, thermal and structural properties of amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. J. Food Sci. 72 : 293-300.
- Theivendran, S., Hettiarachchy, N.S. and Johnson, M.G. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin combined with grape seed extract or green tea extract in soy protein film coated on turkey frankfurters. J. Food Sci. 71 : 39-44.
- Theivendran, S., Hettiarachchy, N.S. and Johnson, M.G. 2008. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. Food Res. Int. 41 : 781-785.
- Thoroski, J., Blank, G. and Biliaderis, C.G. 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus subtilis*. J. Food Prot. 52 : 399-403.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T. and Songtipya, P. 2011. Properties and stability of protein-based films from red tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein isolate incorporated with antioxidant during storage (Online). Available <http://www.springerlink.com/content/v08h525202588j6t/> (2 May 2011)
- Tong, Q., Xiao, Q. and Lim, L.T. 2008. Preparation and properties of pullulan-alginate-carboxymethylcellulose blend films. Food Res. Int. 41 : 1007-1014.
- Trinetta, V., Cutter, C.N. and Floros, J.D. 2011. Effects of ingredient composition on optical and mechanical properties of pullulan film for food-packaging applications. LWT-Food Sci. Technol 44 : 2296-2301.
- Trivedi, S., Reynolds, A.E. and Chen, J. 2008. Effectiveness of commercial household steam cleaning system in reducing the population of *Listeria monocytogenes* and spoilage bacteria on incubated pork skin surfaces. Lebensm. Wiss. Technol. 41 : 295-302.
- Tunc, S. and Duman, O. 2011. Preparation of active antimicrobial methyl cellulose/carvacrol/ montmorillonite nanocomposite films and investigation of carvacrol release LWT-Food Sci. Technol. 44 : 465-472.

- Turhan, K.N., Sancak, Z.O.E., Ayana, B. and Erdog du, F. 2007. Optimization of glycerol effect on the mechanical properties and water vapor permeability of whey protein-methylcellulose films. *J. Food Process. Eng.* 30 : 485-500.
- Van der Meulen, R., Grosu-Tudor, S., Mozzi, F., Vaningelgem, F., Zamfir, M., Font de Valdez, G. and De Vuyst, L. 2007. Screening of lactic acid bacteria isolate from dairy and cereal product for exopolysaccharide production and gene involed. *Int. J. Food Microbiol.* 118 : 250-258.
- Vasconez, M.B., Flores, S.K., Campos, C.A., Alvarado J. and Gerschenson, L.N. 2009. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Res. Int.* 42 : 762-769.
- Wang, X., Sun, X., Liu, H., Li, M. and Ma, Z. 2011. Barrier and mechanical properties of carrot puree films. *Food Bioprod. Process.* 89 : 149-156.
- Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. and Song, S. 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *Int. J. Biol. Macromol.* 43 : 283-288.
- Wendakoon, C.N. and Sakaguchi, M. 1995. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J. Food Prot.* 58 : 280-283.
- Wenqiang, G., Dhufen, L., Ruixiang, Y., Shaokun, T. and Can, Q. 2007. Comparison of essential oil of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chem.* 101 : 1558-1564.
- Whitster, R.L. 1998. Introduction of industrial Gums, *In Industrial Gums.* (Whistler, R.L. and Bemiller, J.N., eds.). p. 1-19. Academic Press. San Diego.
- Wu, W. Tian, H. and Xiang, A. 2010. Influence of polyol plasticizers on the properties of polyvinyl alcohol films fabricated by melt processing. *J. Polym. Environ.* 20 : 63-69.
- Xiao, C., Gao, S., Wang, H. and Zhang, L. 2000. Blend films from chitosan and konjac glucomannan solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* 76 : 509-515.

- Xu, Y.X., Kim, K.M., Hanna, M.A. and Nag, D. 2005. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization Ind. Crop. Prod. 21 : 185-192.
- Yamazaki, K., Yamamoto, T., Kawai, Y. and Inoue, N. 2004. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. Food Microbiol. 21 : 283-289.
- Yang, L. and Paulson, A.T. 2000. Mechanical and water vapor barrier properties of edible gellan films. Food Res. Int. 33 : 563-70.
- Zhang, Y. and Han, J.H. 2006. Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. J. Food Sci. 71 : 253-261.
- Zhong, Y. and Li, Y. 2011. Effects of surfactants on the functional and structural properties of kudzu (*Pueraria lobata*) starch/ascorbic acid films. Carbohydr. Polym. 85 : 622-628.
- Zinoviadou, K.G., Koutsoumanis, K.P. and Biliaderis, C.G, 2009. Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. Meat Sci. 82 : 338-345.
- Zivanovic, S., Chi, S. and Draughon, A.F. 2005. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. J. Food Sci. 70 : 45-51.

ภาคผนวก**บทความวิจัยที่นำเสนอที่ประชุมวิชาการ (Proceeding)**

Matira Avapak, Thummanoon Prodpran and Suppasil Maneerat. 2011. Development and characterization of Film Based on Exopolysaccharide from *Weissella confusa* NH02. The 2011 Nation Conference of Higher Education Research Network. The 2th Thaksin University Annual Conference and 2011 International Conference on Alternative Energy in Developing Countries and Emerging Economies “Humanity; Community; The Path of Wisdom, Songkhla, Thailand, May 25-28, 2011. pp. 212.

Development and characterization of film band on exopolysaccharide from

Weissella confusa NH02

การพัฒนาและศึกษาคุณลักษณะของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จาก *Weissella confusa* NH02

มทิรา อวะภาค¹, ธรรมณูญ โปรดปราน² และศุภศิลา มณีรัตน์^{3*}

Matira Avapak¹ Thummanoon Prodpran² and Suppasil Maneerat^{3*}

บทคัดย่อ

ปัจจุบันฟิล์มย่อยสลายได้ในธรรมชาติที่ผลิตจากเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์ได้รับความนิยมมากขึ้น งานวิจัยนี้ศึกษาความสามารถในการผลิตฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก *Weissella confusa* NH02 และผลของพลาสติกไซเซอร์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยความเข้มข้นของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ตั้งแต่ 1.5 ถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถขึ้นรูปฟิล์มได้ และได้เลือกความเข้มข้นเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์เท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ผลิตฟิล์มเนื่องจากลอกออกจากแผ่นซีลิกอนได้ง่ายที่สุด ฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่เติมพลาสติกไซเซอร์จะมีลักษณะเปราะและแข็ง ซึ่งจะให้ค่าด้านทานแรงดึงขาดสูงและค่ายืดตัวของฟิล์มต่ำ ผลการศึกษาพบว่า กลีเซอรอลความเข้มข้นเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ของเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ให้ลักษณะของฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ดีที่สุด

คำสำคัญ: ฟิล์มเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ พลาสติกไซเซอร์

Abstract

In recently years the biodegradable film from exopolysaccharide (EPS) derived from microorganism become interested. In the present work, the ability of EPS from lactic acid bacteria, *Weissella confusa* NH02, to form film and the effect of plasticizer addition at different concentration on film properties was evaluated. EPS was able to form films at concentration ranging from 1.5 to 3.5%. The concentration 3 % was selected because the films were easily removed from the plate. Films without plasticizer were brittle and rigid since they showed high and low elongation at break. Glycerol was found to be the best plasticizer. The optimal glycerol concentration for film forming was 25% of EPS.

Keyword: Exopolysaccharide film, Plasticizer

¹ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

² ผศ.ดร., ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

ผศ.ดร., ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90112

* Corresponding author: e-mail: suppasil.m@psu.ac.th, Tel. 074-286379, Fax 074-558866

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are generally recognized as safe (GRAS) and polysaccharides isolated from them offer an alternative source of microbial polysaccharides for use in food formulations (Laws *et al.*, 2001). Piermaria *et al.* (2009) demonstrated the ability to form film of an exopolysaccharide (EPS) isolated from LAB. Polysaccharide-based films are relative stiff, and therefore, plasticizers are needed to facilitate handling. Water, oligosaccharides, polyols and lipids are different types of plasticizer widely used in hydrocolloid-based films (Kim *et al.*, 2002; Sothornvit and Krochta, 2005).

In recent years, the use of protective coatings and suitable packaging by the food industry has become a topic of great interest because of their potentiality for increasing the shelf life of many food products. Nowadays, the largest part of materials used in packaging industries is produced from non-renewable material with the negative environmental consequence. A big effort to extend the shelf life and enhance food quality while reducing packaging waste has encouraged the exploration of new biobased packaging materials, such as edible and biodegradable films from renewable resources (Garcia *et al.*, 1998; Sorrentino *et al.*, 2007).

EPS-producing *Wissella confusa* NH02 was isolated from Nham, Thai fermented pork sausage (Wongsuphachat *et al.*, 2010). EPS produced by *W. confusa* NH02 contained only glucose and had a molecular mass of 1.13×10^6 Da and exhibited high viscosity. Accordingly, the EPS from *W. confusa* NH02 has possibility to be a raw material for film forming. Taking into account EPS characteristics and the necessity of food industry for the development of multipurpose films, the aim of the present work was to evaluate the ability of EPS from *W. confusa* NH02 to form film and the effect of plasticizer on film properties.

Experimental methods

1. Production of EPSs from *W. confusa* NH 02

Pure culture of *W. confusa* NH 02 was taken from glycerol 30% stored at -20 °C and grown in 4 mL of fresh MRS for 18-24 hrs at 37°C. The culture was transferred to 10 mL of fresh MRS and incubated for 18-24 hrs at 37°C. Then, 1 ml of the culture was transferred to 100 ml of fresh MRS and incubated for 18-24 h at 37°C. After incubation, the centrifugation was applied to obtain cell free supernatant. The supernatant was mixed with an equal volume of chilled ethanol and stored at 4°C for 24 hrs. EPSs were collected by centrifugation ($9,000 \times g$ for 15 min at 4°C). The collected EPSs were dried for 2 days at 60 °C (Wongsuphachat *et al.*, 2010).

2. Preparation of the film-forming solution

EPS solutions concentration of 1.5, 2, 2.5, 3 and 3.5% were prepared under continuous agitation to select the suitable EPSs concentration. The effect of plasticizer addition was studied on the selected concentration of EPSs solution. Glycerol, sorbitol and polyethylene glycol were added as plasticizer; concentrations tested were 20, 25, 30, 35 and 40 % of EPSs.

3. Film casting and drying

Films without and with different concentrations of plasticizer were obtained by casting of 6 ml film forming solutions into silicone plate (25 cm²). Films were dried at 25°C and 50% relative humidity (RH) in an incubator along 2 days. The obtained films were removed from the silicone plate and stored at 25°C and 50%RH in an incubator.

4. Physicochemical characterization of films

Thickness of films was determined using a micrometer to the nearest 0.001 mm at 5 random positions around the film, and average values were used in calculations.

Film transparency was determined following the procedure described by Zhang and Han (2006). Film sample was cut into a rectangle and placed on the internal side of a spectrophotometer cell. The absorbance at 600 nm (A_{600}) was recorded for each sample using spectrophotometer (Biochrom Libra S21, UK). Film transparency was calculated by the equation of Han and Floros (1997) as the ratio between A_{600} and film thickness and expressed as (A_{600}/mm).

In order to determine the solubility of films in water, a method modified from Gennadios *et al.* (1998) was used. Films were cut into 20 mm × 20 mm pieces and films were weighed to the nearest 0.0001 g for the determination of the initial dry weights of films. Films were individually placed into 10 mL of distilled water. Traces of sodium azide (0.1% w/v) also were added to inhibit microbial growth. The tubes was placed in a shaking at room temperature for 24 h. Residual film in water were separated by centrifugation and drying them in a hot air oven (105 °C for 24 h). The weight of solubilized dry matter was calculated by subtracting the weight of unsolubilized dry matter from the initial weight of dry matter.

5. Measurement of tensile strength and elongation

Films were equilibrated at 50%RH for 48 h at 25 °C before being tested. The tensile strength of films were measured from strips of 30 mm × 20 mm films. These strips were placed into the film extension grips of the texture analyzer (LLOYD, Canada). They were stretched 20 mm apart at a speed of 2 mm/s by the texture analyzer. The parameters determined were: tensile strength (MPa) and elongation at break. Ten film specimens of each formulation were used in the analysis.

6. Measurement of water vapor permeability

Water vapor permeability (WVP) was determined gravimetrically according to the standard method ASTM E96-00 (ASTM, 1980). All measurements were replicated four times. The films were fixed on top of test cells containing a desiccant (silica gel). Test cells then were placed in a relative humidity chamber with controlled temperature and relative humidity (25°C and 55% RH). After steady-state conditions were reached, the weight of test cells was measured every 1 h, eight weight measurements were made. Changes in the weight of the cell were recorded to the nearest 0.0001 g and plotted as a function of time. The slope of each line was calculated by linear regression ($r^2 > 0.99$) and the water vapor transmission rate (WVTR) was calculated from the slope of the straight line (g/s) divided by the cell area (m²). After the permeation tests, film thickness was measured and WVP (g m Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻¹) was calculated as $WVP = [WVTR/S(R1 - R2)] d$, where S is the saturation vapor pressure of water (Pa) at the test temperature (25 °C), R1, the RH in the desiccator, R2, the RH in the permeation cell and d is the film thickness (m).

Results and Discussion

1. EPS concentration for film-forming solution.

EPS concentration for film-forming solution was selected considering the characteristics of the obtained film such as solubility, plate removal easiness and flexibility. The thickness of the films increased with EPS concentration used as expected from 0.031 ± 0.003 mm for 1.5%EPS to 0.063 ± 0.003 mm for 3.5 %EPS ($p<0.05$) (data not shown). Films were still difficult to handle, except those obtained from 1.5%, probably on account of their low thickness (0.031 ± 0.003 mm). Films formulated with 3% were easily removed from the cast plate. Thus, considering the previously described characteristics the suitable EPS concentration for film-forming solution was 3%.

2. Physicochemical characterization of films

The effect of plasticizer types and concentrations on the properties of EPS film were analyzed. The thickness of the films is shown in Table 1. It ranged from 0.058 to 0.070 mm, indicating that film thickness depended on EPS film's nature and composition. The optimal thickness of 0.064 ± 0.005 mm was observed and plasticizers content did not affect significantly this parameter.

Film transparency is a critical property that conditioned film applications. EPS film transparency was $1.82\pm 0.23 A_{600}/\text{mm}$; plasticizer addition did not modify this property except EPS film with 35 and 40% glycerol (Table 2). The obtained results indicated that the obtained transparency values were within the range of those of some commonly used synthetic films such as low density polyethylene ($3.05 A_{600}/\text{mm}$) and oriented polypropylene ($1.67 A_{600}/\text{mm}$) (Shiku *et al.*, 2003).

EPS film solubility in water increased significantly ($p<0.05$) with increasing glycerol and sorbitol concentrations (Table. 2). Glycerol and sorbitol have hydroxyl group and it can be attributed to increase hydrophilic of EPS film and enhance polymer chain mobility due to the plasticization effect of glycerol which increased the diffusivity of water molecules in the film matrix (Tong *et al.*, 2008).

3. Mechanical properties

Films without plasticizer were brittle and rigid since they showed high tensile strength values and low elongation at break value (data not shown). Plasticizers interfere with polymeric chain association facilitating their slipping and thus enhancing film flexibility. Most plasticizers contain hydroxyl groups which will form hydrogen bonds with biopolymers, and increase the flexibility of the film matrix. Thus, plasticizers decreases the rigidity of the network, increasing the movement ability of polymer chains. (Piermaria *et al.*, 2009).

It may be noted that higher tensile strength as well as percentage elongation will be preferable for food packaging films. Considering the above fact, the EPS film with 25% glycerol with tensile strength 7.38 ± 0.37 MPa and percentage elongation $30.82\pm 6.31\%$ (Table 1) was chosen for prepare film-forming solution.

4. Water vapor permeability (WVP) properties

The mean water vapor permeability (WVP) values for EPS films are presented in Table 2. The WVP values were found to increase with an increase plasticizer concentration from 20% to 40%. The addition of glycerol showed the greater of this property than sorbitol. Meanwhile, polyethylene glycol (PEG) was used as plasticizer showed the brittle and rigid film that could not remove from plate (data not shown). Glycerol is a hydrophilic molecule of low molecular mass that could easily fit into the EPS chains by establishing hydrogen bonds with reactive groups of polymers. Glycerol incorporated to the film matrix decreased the attractive forces between polymer chains, increased free volume and segmental motions; hence, water molecules diffused more easily, resulting in the higher WVP (Dias *et al.*, 2010). Plasticizers should only be used at the minimum amount required to obtain the advantage of enhancing the film properties (Sothornvit *et al.*, 2005). Accordingly, for EPS film formulations, the optimum glycerol concentration was 25% of EPS.

Table 1. Effect of plasticizer type on thickness, tensile strength and elongation at break of exopolysaccharides film from *Weissella confusa* NH02.

Plasticizer type	Plasticizer concentration (%)	Thickness (mm)*	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
Glycerol	20	0.068±0.004 ^{def**}	11.18±1.06 ^c	27.65±4.27 ^d
	25	0.064±0.005 ^{bcd}	7.38±0.37 ^b	30.82±6.31 ^{de}
	30	0.068±0.004 ^{def}	6.82±0.63 ^b	34.46±3.00 ^c
	35	0.070±0.006 ^f	5.21±0.15 ^{ab}	45.53±4.68 ^f
	40	0.064±0.002 ^{bcd}	3.50±0.03 ^a	47.97±2.42 ^f
Sorbital	20	0.068±0.005 ^{ef}	25.56±4.71 ^c	2.37±0.79 ^a
	25	0.065±0.003 ^{cde}	28.50±2.81 ^f	2.95±0.22 ^a
	30	0.063±0.003 ^{bc}	27.43±1.13 ^{ef}	3.31±0.19 ^a
	35	0.058±0.004 ^a	19.30±2.22 ^d	15.57±2.86 ^b
	40	0.060±0.003 ^{ab}	12.04±1.72 ^c	22.20±7.82 ^c

*Values are give as mean ±SD from triplicate determinations.

**Different letters in the same column indicate significant difference (p<0.05)

Table 2. Effect of plasticizer type on solubility, transparency value and water vapor permeability (WVP) of exopolysaccharides film from *Weissella confusa* NH02.

Plasticizer type	Plasticizer Concentration (%)	Solubility*(%)	WVP ($\times 10^{-7}$ g m/Pa h m ²)	Transparency value
Glycerol	20	40.49 \pm 4.95 ^{a**}	1.70 \pm 0.17 ^b	1.75 \pm 0.10 ^{cd}
	25	41.28 \pm 0.55 ^{ab}	2.20 \pm 0.04 ^c	1.82 \pm 0.23 ^d
	30	42.34 \pm 1.42 ^{ba}	2.47 \pm 0.03 ^c	1.74 \pm 0.11 ^{cd}
	35	45.09 \pm 0.75 ^{bc}	4.19 \pm 0.08 ^d	2.40 \pm 0.45 ^c
	40	51.52 \pm 0.52 ^c	4.55 \pm 0.28 ^c	2.50 \pm 0.23 ^c
Sorbital	20	44.54 \pm 1.12 ^{bc}	0.12 \pm 0.003 ^a	1.44 \pm 0.05 ^{abc}
	25	44.49 \pm 0.05 ^{bc}	0.14 \pm 0.007 ^a	1.45 \pm 0.12 ^{abc}
	30	47.06 \pm 2.39 ^{cd}	0.16 \pm 0.079 ^a	1.20 \pm 0.08 ^a
	35	47.11 \pm 3.00 ^{cd}	0.18 \pm 0.030 ^a	1.34 \pm 0.25 ^{ab}
	40	50.08 \pm 0.96 ^{de}	0.19 \pm 0.037 ^a	1.61 \pm 0.17 ^{bcd}

*Values are give as mean \pm SD from triplicate determinations.

**Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$)

Conclusion

This is the first report demonstrates the ability to form films of an EPS from *W. confusa* NH02 isolated from Thai traditional fermented foods. It can form film at concentration ranging from 1.5 to 3.5%. The EPS concentration at 3% and the addition of 25% glycerol allowed to obtain a film with an extraordinary flexibility. These characteristics of plasticized EPS films enhance their potential uses, especially for food industry.

Acknowledgements

This work was financially supported by Prince of Songkla University through Contract No. AGR530308S and Graduate School, Prince of Songkla University.

References

- ASTM. 1980. Annual Book of American Standard Testing Method. Standard Test Method for Water Vapor Transmission of Materials E 96. Philadelphia, PA.
- Dias, A.B., Mullera, C.M.O., Larotondaa, F.D.S. and Laurindo, J.B. (2010). Biodegradable films based on rice starch and rice flour. **J. Cereal. Sci.**, 213-219.
- Garcia, M.A., Martino, M.N. and Zaritzky, N.E. (1998). Plasticized starch-based coatings to improve strawberry (*Fragaria* \times *Ananassa*) quality and stability. **J. Agric. Food Chem.**, 3758-3767.

- Gennadios, A., Handa, A., Froning, G.W., Weller, C.L. and Hanna, M.A. (1998). Physical properties of egg white-dialdehyde starch film. **J. Agric. Food Chem.**, 1297-1302.
- Han, J.H. and Floros, J.D. (1997). Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity. **J. Plast. Film Sheet.**, 287-298.
- Kim, Y., An, D., Park, H., Park, J. and Lee, D.S. (2002). Properties of nisin incorporated polymer coatings as antimicrobial packaging materials. **Packag. Technol. Sci.**, 247-254.
- Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. (2001). Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnol. Adv.**, 597-625.
- Piermaria, J., Pinotti, A., Garcia, M.A. and Abraham, A.G. (2008). Film based on kefiran, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: development and characterization. **Food Hydrocoll.**, 684-690.
- Shiku, Y., Hamaguchi, P. Y. and Tanaka, M. (2003). Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins. **Fish Science.**, 1026-1032.
- Sorrentino, A., Gorrasi, G. and Vittoria, V. (2007). Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. **Trends Food Sci. Technol.**, 84-95.
- Sothornvit, R. and Krochta, J.M. (2005). Plasticizers in Edible Films and Coatings. *In* Innovations in Food Packaging. (Han, J.H., ed.). p. 403-433. Elsevier Academic Press. San Diego, USA.
- Tong, Q., Xiao, Q. and Lim, L.T. (2008). Preparation and properties of pullulan–alginate–carboxymethylcellulose blend films. **Food Res. Int.**, 1007-1014.
- Wongsuphachat, W., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. (2010). Optimization of exopolysaccharides production by *Weissella confusa* NH 02 isolated from Thai fermented sausages. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, 27-35.
- Zhang, Y. and Han, J. H. (2006). Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. **J. Food. Sci.**, 253-261.