



วิทยานิพนธ์

การสกัดเครื่องเทศของไทยด้วยตัวทำละลายร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง
และประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ในการยับยั้ง
จุลินทรีย์ในอาหาร

Ultrasound-Assisted Solvent Extraction in Thai Spices and Efficacy of
Spice Extracts with EDTA to Inhibit Microorganisms in Food

นายเอกรินทร์ ภัทรชนวดี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การสกัดเครื่องเทศของไทยด้วยตัวทำละลายร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงและประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร

Ultrasound-Assisted Solvent Extraction in Thai Spices and Efficacy of Spice Extracts with EDTA to Inhibit Microorganisms in Food

นามผู้วิจัย นายเอกรินทร์ ภัทรชนวนดี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(อาจารย์ยวีรภา มหากาญจนกุล, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์จิตศิริ ราชชนะพันธุ์, ป.ร.ค.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญย์ สัจจอนันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉรหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสกัดเครื่องเทศของไทยด้วยตัวทำละลายร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงและประสิทธิภาพของ
สารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร

Ultrasound-Assisted Solvent Extraction in Thai Spices and Efficacy of Spice Extracts with EDTA
to Inhibit Microorganisms in Food

โดย

นายเอกรินทร์ ภัทรธนาดี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

พ.ศ. 2550

เอกรินทร์ ภัทรธนวดี 2550: การสกัดเครื่องเทศของไทยด้วยตัวทำละลายร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูง และประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร ปรินญา วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการอาหาร ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์วราภา มหากาญจนกุล, Ph.D.
124 หน้า

การศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดเครื่องเทศได้แก่ กระชาย จิง ข่า และขมิ้นชัน ที่สกัดด้วยเอทานอล 50% (v/v) ร่วมกับวิธีเขย่าเปรียบเทียบกับวิธีใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร โดยทดสอบด้วยวิธี agar dilution พบว่าสารสกัดที่ได้จากวิธีทั้งสองให้ค่า MIC (minimum inhibitory concentration) ในการยับยั้ง จุลินทรีย์ใกล้เคียงกันและการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจะใช้เวลาสกัดสารเร็วกว่า ดังนั้นวิธีสกัดเครื่องเทศ ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจึงมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ดีกว่าวิธีเขย่า สารสกัดกระชายสามารถยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกได้แก่ *Bacillus cereus* 1 สายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* 1 สายพันธุ์และ *Listeria monocytogenes* 5 สายพันธุ์ ให้ค่า MIC 0.3-0.5% (v/v) และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7 1 สายพันธุ์และ *Salmonella* Typhimurium 5 สายพันธุ์ให้ค่า MIC 9-10% (v/v) ขณะที่สารสกัดกระชายและขิงสามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* 2 สายพันธุ์และ *Lactobacillus cellobiosus* 4 สายพันธุ์ ให้ค่า MIC ในช่วง $\geq 10\%$ (v/v) และยับยั้งรา *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus* และ *Fusarium oxysporum* ให้ค่า MIC ในช่วง $\geq 10\%$ (v/v) สำหรับสารสกัดข่าและขมิ้นชันให้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง จุลินทรีย์ที่ทดสอบต่ำ การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี microbroth dilution ให้ค่า MIC ไม่แตกต่างจากวิธี agar dilution จึงนำมาศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ในอาหาร เลี้ยงเชื้อ พบว่ากระชายและขิงสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA ให้ผลเสริมฤทธิ์ในการทำลาย แบคทีเรียแกรมบวกและยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมลบโดยให้ค่า fractional bactericidal concentration และ fractional inhibitory concentration ต่ำกว่า 1 การศึกษาในอาหารใช้ซูบไก่เป็นตัวแทนอาหารสร้างการปนเปื้อน *L. monocytogenes* สายพันธุ์ผสมและ *S. Typhimurium* เก็บรักษาที่ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่า กระชายที่ สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้น 5% (v/v) ทำลาย *L. monocytogenes* ใน 24 ชั่วโมง และเมื่อใช้ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 1000 ppm สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ภายใน 3 ชั่วโมง แต่ในกรณี *S. Typhimurium* ต้องเพิ่มความเข้มข้นสูงถึง 10% (v/v) ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 1000 ppm จึงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ชนิดนี้เป็นเวลา 36 ชั่วโมง การใช้สารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ได้แสดงประสิทธิภาพในการทำลายและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคนึ่งมีศักยภาพใช้ในอาหารเพื่อเพิ่มความปลอดภัยของอาหารและยืดอายุการเก็บรักษา

Ekkarin Pattaratanawadee 2007: Ultrasound-Assisted Solvent Extraction in Thai Spices and Efficacy of Spice Extracts with EDTA to Inhibit Microorganisms in Food. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Mrs. Warapa Mahakarnchanakul, Ph.D. 124 pages.

The antimicrobial efficacy of Thai spice extracts including fingerroot, ginger, galangal and turmeric against microorganisms were determined. The spices were immersed in 50% (v/v) ethanol then extracted either shaking or ultrasound-assisted (US) methods. The agar dilution assay was used to compare the efficacy of those extracts. Results showed that the US method was better than the shaking method, spice extracts from both methods showed similar MICs (minimum inhibitory concentrations). However, the US method consumed much less time and showed potential for application in spice extraction. US-fingerroot extract had inhibitory effect against gram positive bacteria including *Bacillus cereus* 1 strain, *Staphylococcus aureus* 1 strain and *Listeria monocytogenes* 5 strains with MICs of 0.3-0.5% (v/v), and gram negative bacteria including *Escherichia coli* O157:H7 1 strain and *Salmonella* Typhimurium 5 strains with MICs of 9-10% (v/v). US-fingerroot and US-ginger extract inhibited lactic acid bacteria (MICs \geq 10%, v/v) namely *Lactobacillus plantarum* 2 strains and *L. cellobiosus* 4 strains and fungi namely *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus* and *Fusarium oxysporum* (MICs \geq 10%, v/v). Whereas, both US-galangal and US-turmeric extracts had lower antimicrobial activity than the others. The microbroth dilution showed similar MICs to the agar dilution assay and was used to determine the efficiency of spice extracts combined with EDTA. The combination of EDTA and either US-fingerroot or US-ginger extracts showed synergism effect on inactivation of gram positive bacteria and on inhibition of gram negative bacteria, which gave fractional bactericidal concentration and fractional inhibitory concentration on value lower than one. In chicken broth, 5% (v/v) US-fingerroot extract eliminated mixed culture of *L. monocytogenes* within 24 hours, whereas 5% (v/v) US-fingerroot extract combined with 1000 ppm EDTA showed bactericidal effect to mixed culture of *L. monocytogenes* within 3 hours. However, 10% (v/v) US-fingerroot extract combined with 1000 ppm EDTA inhibited mixed culture of *S. Typhimurium* throughout the experimental period for 36 hours at 37°C. As the combination of fingerroot extract and EDTA showed potential for inhibiting those foodborne pathogens, thus this extract could apply in food system to enhance safety and extend shelf-life of food.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.วราภา มหากาญจนกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ ดร.จิตศิริ ราชตะนะพันธ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก เป็นอย่างสูง ที่ได้ช่วยเหลือให้คำแนะนำในงานวิจัยของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.เพ็ญแข วันไชยชนวงศ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ ดร.พัชรภรณ์ ศิวยพราหมณ์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิต ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุดสาย ศรีวานิช อาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ให้ความอนุเคราะห์แบคทีเรียกรดแลคติก ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ผศ.ดร.วัลย์รัตน์ จันทรปานนท์ อาจารย์ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *E. coli* O157:H7 ขอขอบพระคุณ คุณสุวรรณา กลัดพันธ์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษ เชื้อรา ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในการทำวิจัยครั้งนี้และขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนวิจัยเรื่องนี้ ในโครงการอุดหนุนทุนวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2547

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เลี้ยงดูข้าพเจ้า และให้โอกาสแก่สิ่งๆ ในชีวิตรวมถึงการให้โอกาสทางการศึกษา จนข้าพเจ้าสำเร็จในวันนี้ รวมทั้ง พี่ เพื่อน และน้องในห้องปฏิบัติการ 2414 และ 2111 สำหรับน้ำใจและกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

เอกรินทร์ ภัทรชนวดี

ธันวาคม 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	45
อุปกรณ์	45
วิธีการ	48
ผลและวิจารณ์	61
สรุปผลการทดลอง	96
ข้อเสนอแนะ	99
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	101
ภาคผนวก	109
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	110
ภาคผนวก ข ตารางแสดงข้อมูล	115
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	124

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สมบัติแบคทีเรีย <i>Staphylococcus</i> spp. ชนิดต่างๆ	18
2	สมบัติทางชีวเคมีของ <i>Listeria</i> spp. สายพันธุ์ต่างๆ	21
3	อาการของผู้ป่วยรับเชื้อ <i>E. coli</i> ชนิดต่างๆเข้าสู่ร่างกาย	24
4	สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินของ <i>A. flavus</i>	30
5	สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินของ <i>A. parasiticus</i>	32
6	ปริมาณการใช้ anhydrous calcium disodium EDTA ในอาหาร	38
7	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดหรือ MIC (% , v/v) ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อ แบคทีเรียก่อโรค ทดสอบด้วยวิธี agar dilution	62
8	ค่า MIC (% , v/v) ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อแบคทีเรียกรดแลคติก ทดสอบ ด้วยวิธี agar dilution	64
9	ค่า MIC (% , v/v) ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อเชื้อรา ทดสอบด้วยวิธี agar dilution	65
10	ค่า MIC (% , v/v) ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก ทดสอบด้วยวิธี agar และ microbroth dilution	70
11	ค่า MIC และ MBC ของ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค	72
12	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรีย ก่อโรค	76
13	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขิงร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดฆ่าร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	80
15	ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขมิ้นชันร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	82
16	ประสิทธิภาพสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค	84
17	ประสิทธิภาพสารสกัดขิงร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค	85
18	ประสิทธิภาพสารสกัดฆ่าร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค	86
19	ประสิทธิภาพสารสกัดขมิ้นชันร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค	87
ตารางผนวกที่		
ข1	ค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก ทดสอบด้วยวิธี microbroth	116
ข2	ค่า Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC _p) และค่า Fractional Bactericidal Concentration Index (FBC _p) ของสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค	117
ข3	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>L. monocytogenes</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	119
ข4	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>L. monocytogenes</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	119
ข5	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>L. monocytogenes</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	120
ข6	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>L. monocytogenes</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดขิงที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	120

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข7	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>S. Typhimurium</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	121
ข8	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>S. Typhimurium</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	121
ข9	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>S. Typhimurium</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	122
ข10	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>S. Typhimurium</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดขิงที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	122
ข11	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>L. monocytogenes</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ร่วมกับ EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	123
ข12	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>S. Typhimurium</i> ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ร่วมกับ EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	123

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างเคมีของสารให้ความเผ็ดร้อนในขิง	8
2	โครงสร้างสารเคมีบางชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน	11
3	การหาค่าบริเวณยับยั้ง โดยวิธี paper disk diffusion	34
4	การหาค่า MIC โดยวิธี broth dilution	36
5	การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar dilution	51
6	การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศต่อการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar dilution	52
7	ไมโครไทเทอร์เพลท	54
8	เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสำหรับไมโครไทเทอร์เพลท	54
9	การหาค่า MBC ด้วยเทคนิค drop test	56
10	กลไกการทำงานของ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (A) EDTA ก่อนจับกับ Ca^{+2} และ Mg^{+2} (B) EDTA จับกับ Ca^{+2} และ Mg^{+2} ทำให้ส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเสียหาย	74
11	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>L. monocytogenes</i> ในซุสไปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายหรือสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S), (A) และ (C), และด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U), (B) และ (D), ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	91
12	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>S. Typhimurium</i> ในซุสไปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายหรือสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S), (A) และ (C), และด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U), (B) และ (D), ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	92
13	การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย <i>L. monocytogenes</i> (A) และ <i>S. Typhimurium</i> (B) ในซุสไปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ร่วมกับ EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	94

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

cm	=	centimeter
g	=	gram
kHz	=	kilohertz
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
MHz	=	megahertz
nm	=	nanometer
ppm	=	part per million
rpm	=	round per minute
µg	=	microgram
µl	=	microliter
µm	=	micrometer
° C	=	degree celcius
CFU/ml	=	colony forming unit per milliliter
mg/ml	=	milligram per milliliter
µg/ml	=	microgram per milliliter
mW ml ⁻¹	=	milliwatt per milliliter
W/cm ²	=	watt per square centimeter
v/v	=	volume per volume
w/v	=	weight per volume

การสกัดเครื่องเทศของไทยด้วยตัวทำละลายร่วมกับคลื่นเสียงความถี่สูงและประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร

Ultrasound-Assisted Solvent Extraction in Thai Spices and Efficacy of Spice Extracts with EDTA to Inhibit Microorganisms in Food

คำนำ

เครื่องเทศเป็นพืชที่ถูกนำมาใช้ในการปรุงอาหารของคนไทยอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งเครื่องเทศตระกูลเหง้าได้แก่ กระชาย จิง ข่า และขมิ้นชัน พืชกลุ่มนี้ที่สำคัญคือมีสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Thongson *et al.*, 2004, 2005; Oonmetta-aree *et al.*, 2006) จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำสารยับยั้งจุลินทรีย์จากพืชซึ่งเป็นวัตถุดิบธรรมชาติมาทดแทนวัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ เนื่องจากมีแนวโน้มที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น แต่การที่จะนำสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในเครื่องเทศมาใช้ในอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพต้องมีวิธีสกัดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้สารสำคัญนั้น ทั้งยังต้องคำนึงถึงสมบัติของตัวทำละลายที่จะนำมาใช้เป็นสารสกัดและชนิดของสารสำคัญที่ต้องการ วิธีสกัดแบบดั้งเดิมที่นิยมกระทำคือการสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีที่สะดวก ง่าย และค่าใช้จ่ายไม่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีสกัดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ แต่โดยปกติการสกัดด้วยตัวทำละลายจะใช้วิธีแช่ หรือเขย่าระหว่างแช่ในตัวทำละลาย ใช้เวลานานมาก และอาจทำให้สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ต้องการนั้นเสียบสมบัติที่ต้องการ จึงมีการพัฒนาเพื่อช่วยให้การสกัดสารสำคัญที่ต้องการนั้นเร็วขึ้น เช่น การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับตัวทำละลายโดยใช้คลื่นเสียงที่มีความถี่ 20 kHz หรือมากกว่า (Piyasena *et al.*, 2003; D'Amico *et al.*, 2006; Baumann *et al.*, 2005) คาดว่าทำให้สารสำคัญที่ต้องการที่อยู่ในเซลล์พืชออกมาได้ดีกว่า การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยให้การสกัดสารยับยั้งจากเครื่องเทศมีประสิทธิภาพดีขึ้น (Vinatoru, 2001; Hemwimol *et al.*, 2006; Jacques *et al.*, 2007)

แม้ว่าสารสกัดจากเครื่องเทศตระกูลเหง้านี้มีประโยชน์หลายประการทั้งด้านอาหารและเภสัชกรรม แต่ข้อด้อยของเครื่องเทศตระกูลนี้คือมีกลิ่นฉุนและรสเผ็ดร้อน (นิจศิริ, 2534) ดังนั้นถ้าใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากเครื่องเทศในปริมาณที่มากเกินไปอาจมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามใช้สารเคมีชนิดอื่นร่วมกับสารสกัดจากเครื่องเทศเพื่อลดปริมาณการใช้สารสกัดจากเครื่องเทศ และสารเคมีนั้นจะต้องมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์และอนุญาตใช้ใน

อาหารได้ เช่น Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นต้น (Payne *et al.*, 1994; Boland *et al.*, 2003, 2004; Branen and Davidson, 2004; Davidson *et al.*, 2005)

ในงานวิจัยเรื่องนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดจากเครื่องเทศตระกูลเหง้า ได้แก่ กระชาย จิง ข่า และขมิ้นชัน ระหว่างวิธีการสกัดแบบแช่ซึ่งเป็นวิธีสกัดแบบดั้งเดิม หรือร่วมกับการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในการสกัดร่วมกับตัวทำละลายในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ชนิดทำให้อาหารเน่าเสีย และศึกษาผลของ EDTA ร่วมกับสารสกัดจากเครื่องเทศต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวแทนอาหาร ได้แก่ ชุปไก่ เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค คาดว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เครื่องเทศ เป็นทางเลือกหนึ่งแก่ผู้ผลิตอาหารในการเลือกใช้สารยับยั้งจากธรรมชาติแทนวัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมีในอาหาร

วัตถุประสงค์

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศของไทย ได้แก่ กระชาย ขิง ข่า และขมิ้นชัน ที่สกัดด้วยวิธีเขย่าในตัวทำละลาย เปรียบเทียบกับวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย
2. ศึกษาผลของ EDTA ร่วมกับสารสกัดจากกระชาย ขิง ข่า และขมิ้นชัน ต่อการยับยั้งและการทำลายจุลินทรีย์ชนิดก่อโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อและตัวแทนอาหารคือ ชูปไก่

การตรวจเอกสาร

ความหมายของเครื่องเทศ

ความหมายของคำว่าเครื่องเทศ (spice) แตกต่างกันในแต่ละประเทศหรือแต่ละพื้นที่ บางพื้นที่นิยามความหมาย “เครื่องเทศ” อ้างอิงตามสถานที่ปลูก หรือสภาพการนำมาใช้งาน เช่น อยู่ในสภาพสดหรือแห้ง อย่างไรก็ตามการนิยามความหมายของเครื่องเทศเหล่านี้ในแง่ของหน้าที่ และองค์ประกอบอาจไม่ถูกต้องและชัดเจนนัก โดยทั่วไปเครื่องเทศหมายถึงส่วนต่างๆ ของพืชที่ทำแห้งเช่น ราก ใบ เปลือก ดอก ผลและเมล็ด นำมาใช้ในอาหารเพื่อให้เกิดกลิ่นรส (flavor) กระตุ้นความเผ็ดร้อน บางชนิดอาจมีรสขม เครื่องเทศมักจะมีแหล่งกำเนิดบริเวณเส้นศูนย์สูตรของโลก หรือใต้เส้นศูนย์สูตร ส่วนคำว่า “สมุนไพร” หมายถึงพืชที่นำมาใช้ประโยชน์ทางยา เป็นพืชที่ไม่มีแก่นไม้ เมื่อสิ้นฤดูฤดูกาลเพาะปลูกจะให้เมล็ดแล้วตายไป (Hirasa and Takemasa, 1998)

ความหมายของน้ำมันหอมระเหยกับโอลีโอเรซิน

น้ำมันหอมระเหย (volatile oils หรือ essential oils) หมายถึงน้ำมันที่ได้จากการนำพืชที่ถูกบดไปกลั่นด้วยไอน้ำ ผลได้ (yield) ของน้ำมันหอมระเหยจากการกลั่นจะไม่แน่นอน โดยมีปริมาณตั้งแต่ร้อยละ 0.5% ถึงมากกว่า 16% ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ขณะที่โอลีโอเรซิน (oleoresins) คือสารสกัดที่ได้จากการนำพืชไปสกัดด้วยตัวทำละลาย เช่น อะซิโตนหรือเฮกเซน โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดกลิ่นรสจากนั้นระเหยตัวทำละลาย สารที่เหลือจากการระเหยนั้นเรียกว่าโอลีโอเรซิน โอลีโอเรซินที่ได้จะมีลักษณะเหนียวข้น และหนืดไม่สะดวกที่จะนำไปใช้ บางกรณีต้องเติมน้ำมันลงไปเพื่อให้โอลีโอเรซินกระจายตัวได้ดีก่อนจะนำไปใช้ นอกจากนี้ชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกันจะมีผลต่อองค์ประกอบของโอลีโอเรซินและกลิ่นรสจากพืชเหล่านั้น (Tainter and Grenis, 2001)

เครื่องเทศในตระกูลเหง้า

กระชาย

กระชาย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Boesenbergia pandurata* Roxb. และชื่อภาษาอังกฤษว่า fingerroot กระชายมีแหล่งกำเนิดที่เกาะชวาและเกาะสุมาตรา ปัจจุบันมีการเพาะปลูกมากในประเทศอินเดีย ศรีลังกา ทางตอนใต้ของประเทศจีน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย (de Guzman and Siemonsma, 1999) Chomchalow *et al.* (2003) และ Pruthi (1976) ได้รวบรวมลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกระชายดังนี้

ลำต้น กระชายเป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กสูงประมาณ 2 เมตรเศษ มีลำต้นใต้ดินที่เรียกว่า เหง้า (rhizome) แต่ละเหง้ามีสีน้ำตาลแกมเทาจนถึงสีน้ำตาลแกมสีส้ม เหง้าใต้ดินนี้แตกออกเป็นกระจุกจำนวนมาก มีลักษณะอวบน้ำ ตรงกลางเหง้ามีลักษณะพองมากกว่าหัวท้าย เนื้อในมีสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว

ใบ เป็นใบเดี่ยว มีขนาดใหญ่ มีความยาวมากกว่าความกว้างประมาณสองเท่า ใบมีรูปไข่ ปลายใบแหลม ใบออกสลับกันแต่อยู่ในระนาบเดียวกัน ใบมีสีเขียวอ่อน ท้องใบมีสีแดง เนื้อใบละเอียด กาบใบมีสีแดงหรือสีส้มปนสีเขียวอ่อน

ดอก ออกเป็นช่อที่ส่วนยอด ออกแทรกอยู่ระหว่างกาบใบ ช่อดอกมีใบประดับเรียงทแยงกัน ดอกบานทีละดอก โดยดอกที่อยู่ทางปลายช่อจะบานก่อน ดอกมีสีขาวหรือสีชมพูอ่อน หรือสีม่วงแดง ดอกมีลักษณะเป็นถุง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกจะเชื่อมติดกัน เกสรตัวผู้มี 5-6 อัน แต่จะมีเพียงอันเดียวเท่านั้นที่ไม่เป็นหมัน

ผล เป็นแบบผลแห้ง เมื่อแก่แล้วไม่แตก ระบบราก เป็นรากฝอย

พันธุ์กระชายในประเทศไทยมีอยู่ 3 พันธุ์ ได้แก่ กระชายเหลือง กระชายดำ และกระชายแดง แต่ที่สายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้ในการทำอาหารคือ กระชายเหลือง

สารออกฤทธิ์สำคัญในกระชาย

เหง้าและรากของกระชายมีสารจำพวกโมโนเทอร์พีนอยด์ (monoterpenoid) ได้แก่ geranial และ neral ฟลาโวนและฟลาโวนอน (flavones, flavanones) ได้แก่ pinostrobin, alpinetin และ pinocembrin และชาลโคน (chalcone) ได้แก่ cardamonin น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าและรากกระชายจะมีองค์ประกอบหลักคือ 1,8-cineole ประมาณ 18-41% รองลงมาเป็น camphor ประมาณ 13% และ *d*-borneol ประมาณ 9.2% นอกจากนั้นเป็น *d*-pinene, zingiberene, curcumin และ zedoarine รวมกันประมาณ 5% การศึกษาในหลอดทดลองของสาร methyl cinnamate และ zingiberone ที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยพบว่าสามารถละลายแคลเซียมในไต และสาร cardamonin สามารถยับยั้งเซลล์เนื้องอกได้ (de Guzman and Siemonsma, 1999) อนุพันธ์ของ cyclohexenyl chalcone ได้แก่ (-)-hydroxypanduratin A และ (-)-pandutain A สามารถยับยั้งแผลอักเสบได้ (Tuchinda *et al.*, 2002)

จิง

จิงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Zingiber officinale* Roscoe. และชื่อภาษาอังกฤษว่า ginger จิงเป็นพืชพื้นเมืองของทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย จีน ไทย เป็นต้น ชาวจีนรู้จักจิงเมื่อประมาณ 400 ปีก่อนคริสตศักราช ชาวกรีกและชาวโรมันก็รู้จักเช่นกัน ชาวสเปนเป็นผู้นำจิงไปปลูกในประเทศจาไมก้าและหมู่เกาะอินเดียตะวันตก ปัจจุบันมีการปลูกจิงกันอย่างแพร่หลายในแถบประเทศที่มีอุณหภูมิร้อนชื้น (de Guzman and Siemonsma, 1999) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของจิงที่ Chomchalow *et al.* (2003) และ Pruthi (1976) ได้รวบรวมไว้มีดังนี้

ลำต้น มีลำต้นใต้ดินเรียกว่าเหง้าหรือแง่ง (rhizome) เจริญขึ้นเป็นกอ ลำต้นแท้มีลักษณะเป็นข้อๆ แข็ง มีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน มีเยื่อและเกล็ดเล็กๆ ห่อหุ้ม จะแตกขนานไปกับพื้นดิน ลักษณะการแตกแขนงเป็นแบบนี้มีมือคือ แ่งอันแรกจะเจริญและแตกแง่งย่อยๆ ต่อกันไป เหง้าหรือลำต้นใต้ดินนี้สามารถดำรงชีวิตข้ามฤดูหรือหลายฤดู ซึ่งต่างจากลำต้นเหนือดินที่มีอายุได้เพียงฤดูเดียวหรือประมาณ 8-12 เดือน ลำต้นส่วนเหนือดินเป็นลำต้นเทียม (clump) ส่วนนี้ประกอบด้วยกาบใบซ้อนทับกันหลายๆ ชั้น เจริญจากตาที่ปรากฏอยู่บนแง่งของจิง ลำต้นมีความสูงประมาณ 50-100 เซนติเมตร

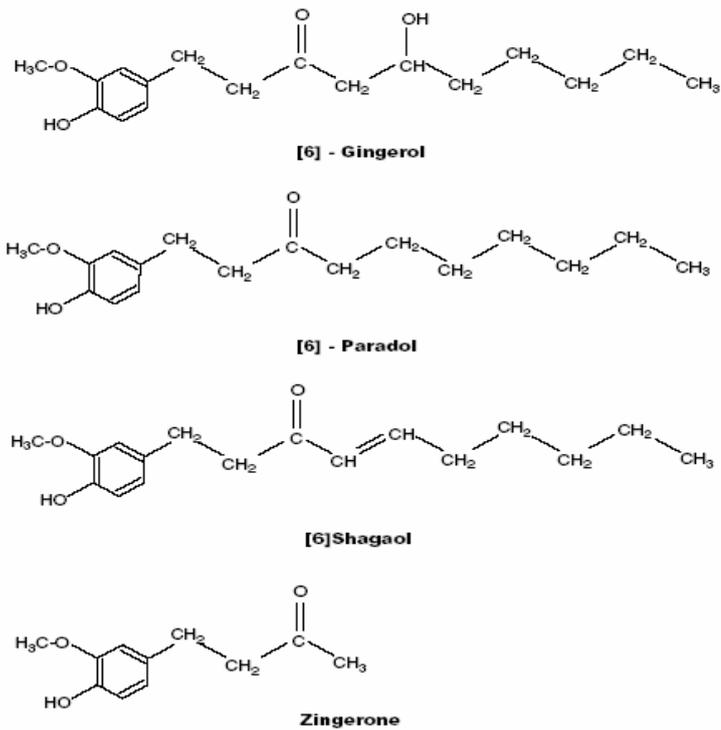
ใบ เป็นใบเดี่ยว รูปหอกแกมรี ขาวประมาณ 15-17 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 1.8-3 เซนติเมตร ใบออกเรียงสลับกันเป็นสองแถว หลังใบห่อหุ้มเป็นรูปร่างน้ำ ปลายใบสอบเรียวแหลม โคนใบสอบแคบและจะเป็นกาบหุ้มลำต้นเทียม

ดอก มีสีขาว ออกเป็นช่อ (inflorescence) รูปเห็ดหรือรูปกระบองโบราณยาวประมาณ 5-7 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 15-25 เซนติเมตร ดอกเกิดจากยอดที่ไม่มีใบหรือเกิดแยกกับลำต้น ลักษณะดอกเป็นคุ่มมีเกสรเล็กๆ ดอกจะแซมออกมาตามเกสรนั้น ปกติจึงเป็นพืชที่ไม่ค่อยออกดอกหรือติดเมล็ด

ผล มีลักษณะกลม แข็ง โด มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร

สารออกฤทธิ์สำคัญในขิง

ขิงประกอบด้วยสารเคมี 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกเป็นน้ำมันหอมระเหยมีอยู่ 1-2% ประกอบด้วยสารจำพวกเซสควิเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอน (sesquiterpene hydrocarbon) เป็นองค์ประกอบหลักมี zingiberene 35%, curcumene 18% และ farnesene 10% ส่วนที่เหลือเป็นสารพวกโมโนเทอร์พีนอยด์ไฮโดรคาร์บอน (monoterpenoid hydrocarbons) ได้แก่ 1,8-cineole, linalool, borneol, neral และ geraniol จากการศึกษารหัสทางประสาทสัมผัสในปี 1975 พบว่า β -sesquiphellandrene และ *ar*-curcumene จะให้กลิ่นขิง (Tainter and Grenis, 2001) ส่วนสารกลุ่มที่สองเป็นสารที่ให้รสเผ็ดร้อน มีสารเกี่ยวข้อง 4 ชนิด ได้แก่ gingerol, shogaol, paradol และ zingerone ในสารสกัดขิงสดพบสาร gingerol แต่ไม่พบ shogaol และ zingerone ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดที่กล่าวมานี้จะถูกพบในระยะเก็บรักษา หรือขณะได้รับความร้อนทั้ง shogaol และ zingerone ให้กลิ่นฉุนและรสเผ็ดแต่ให้กลิ่นและรสอ่อนกว่า gingerol (Shukla and Singh, 2006) ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างเคมีของสารให้รสเผ็ดร้อนในขิง



ภาพที่ 1 โครงสร้างเคมีของสารให้ความเผ็ดร้อนในขิง

ที่มา: Shukla and Singh (2006)

ข่า

ข่ามีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Alpinia galanga* Linn. และชื่อภาษาอังกฤษว่า galangal แหล่งกำเนิดของข่าไม่ปรากฏหลักฐานแน่นอนว่าที่ใด แต่มีรายงานการใช้ในแถบเกาะสุมาตราและทางภาคใต้ของจีน ในปัจจุบันมีการปลูกทุกประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย บังคลาเทศ จีน และสุรินัม (de Guzman and Siemonsma, 1999) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ Chomchalow *et al.* (2003) และ Pruthi (1976) ได้รวบรวมมีดังนี้

ลำต้น เป็นพืชล้มลุกมีอายุหลายปี มีเหง้าใต้ดินเลื้อยขนานกับผิวดิน มักจะแตกแขนงเป็นง่าม

ใบ เป็นใบเดี่ยว ใบยาว ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ ก้านใบแผ่เป็นกาบหุ้มซ้อนกันดูคล้ายลำต้น

ดอก ออกเป็นช่อที่ยอด ก้านช่อดอกมีขน ดอกย่อยคล้ายดอกกล้วยไม้

ผล มีลักษณะกลมหรือค่อนข้างรี มีกลีบเลี้ยงติดอยู่ ผลแก่มีสีส้ม

สารออกฤทธิ์ที่สำคัญในข่า

สารสกัดข่าที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าองค์ประกอบหลักเป็นน้ำมันหอมระเหยที่เป็น D,L-1'-acetoxychavicol acetate ซึ่งเป็นสารองค์ประกอบหลักที่ให้กลิ่น 76.49% มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียและพวกเชื้อราที่เป็นสาเหตุเกิดการติดเชื้อที่ผิวหนังของมนุษย์ (dermatophyte) (Janssen and Scheffer, 1985) สารชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแผลมีหนอง ยับยั้งการสร้างของเนื้องอก (Murakami *et al.*, 2000) ส่วนองค์ประกอบรองมาตามลำดับประกอบด้วย *p*-coumaryl diacetate (7.96%), palmitic acid (3.19%), acetoxyeugenol acetate (3.06%), 9-octadecenoic acid (2.28%), eugenol, β -bisabolene, β -farnesene และ sesquiphellandrene (Oonmetta-aree *et al.*, 2006)

ขมิ้นชัน

ขมิ้นชันมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn. และชื่อภาษาอังกฤษว่า turmeric เป็นพืชเก่าแก่ที่รู้จักกันนาน มีถิ่นกำเนิดในเอเชียอาคเนย์ ปลูกกันมากในอินเดีย ศรีลังกา จีน เวียดนาม ใต้ ไต้หวัน นอกจากนี้ยังมีการปลูกที่ประเทศเปรู ไฮติ และจาไมกา (Farrell, 1990) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่ Chomchalow *et al.* (2003) และ Pruthi (1976) ได้รวบรวมมีดังนี้

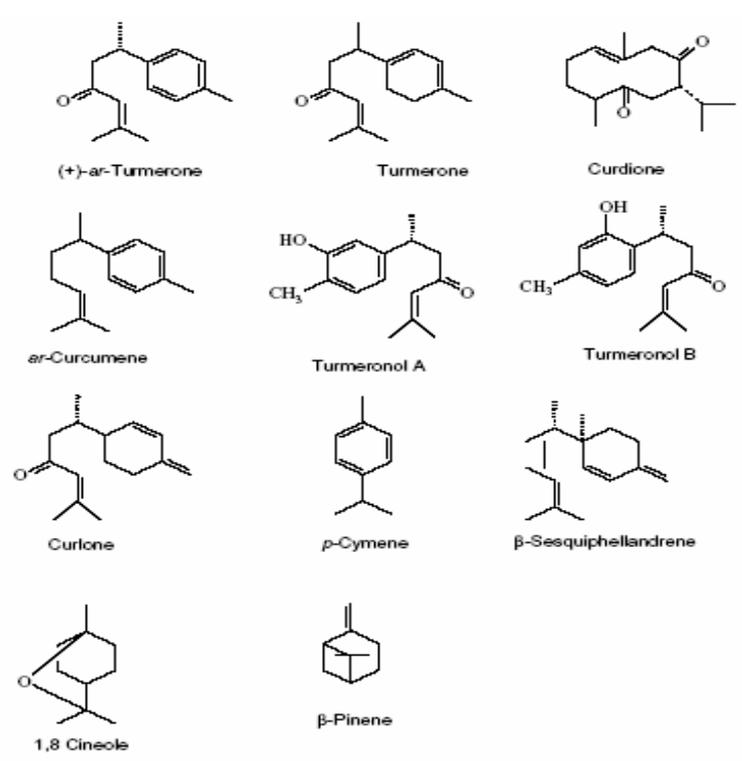
ลำต้น มีลำต้นใต้ดินที่เรียกว่า เหง้า (rhizome) ซึ่งประกอบด้วยแ่งที่มีลักษณะต่าง ๆ กันคือ แ่งแม่ (mother rhizome) หรือแ่งหลักมีลักษณะกลม เป็นที่แตกของแขนงที่สองและที่สามต่อไป (secondary and tertiary branches) แขนงที่แตกออกมานี้ถ้ามีลักษณะกลมจะเรียกว่า หัว หรือ corm และถ้ามีลักษณะยาวคล้ายนิ้วมือเรียกว่า นิ้ว (finger) เป็นที่เกิดของรากฝอย บริเวณแ่งของหัวและนิ้วจะมีตาอยู่ทั่วไป มีสีค่อนข้างอ่อน ปลายแหลม ซึ่งต่อไปจะเจริญเป็นลำต้นและใบ ส่วนลำต้นที่ปรากฏให้เห็นเหนือพื้นดินเป็นลำต้นเทียม สูงประมาณ 50-70 เซนติเมตร ประกอบด้วยกาบใบซ้อนทับกันเป็นชั้นๆ จากโคนถึงปลาย

ใบ เป็นใบเดี่ยว แผ่นใบมีลักษณะยาวรี ปลายแหลม ยาวประมาณ 30-45 เซนติเมตรและกว้างประมาณ 10-20 เซนติเมตร มีเส้นกลางใบเห็นได้ชัดเจนทางด้านล่างของใบ ใบเรียงแบบสลับ และอยู่กันเป็นกลุ่ม เมื่อโตเต็มที่จะมีใบประมาณ 6-10 ใบ

ดอก เกิดเป็นช่อ ช่อดอกจะเกิดบนลำต้นที่มีใบหรือโผล่ขึ้นมาจากใจกลางของกลุ่มใบ ช่อดอกมีรูปร่างแบบทรงกระบอกยาวประมาณ 10-18 เซนติเมตรและกว้างประมาณ 5 เซนติเมตรแต่ปกติแล้วดอกขมิ้นชันจะเป็นหมันเช่นเดียวกับขิงดังนั้นจึงมักไม่ติดผลและเมล็ด

สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของขมิ้นชัน

Jayaphakasha *et al.* (2005) ได้ทำการรวบรวมงานวิจัยในอดีตที่ทำการศึกษาสารสำคัญในขมิ้นชัน พบว่าเมื่อนำขมิ้นชันกลั่นด้วยไอน้ำ ผลได้ (yield) ของขมิ้นชันจากการกลั่นจะให้น้ำมันหอมระเหยประมาณ 5% ซึ่งมีกลิ่นเฉพาะตัว มีสีเหลืองปนส้ม ในน้ำมันหอมระเหยมีเซสควิเทอร์พินลิโทน ส่วนใหญ่เป็น turmerone อยู่ 60% นอกจากนี้ยังมี กรดอิสระ, borneol, cineol, phellandrene, curcumin และ zingerone การที่ขมิ้นชันมีลักษณะสีเหลืองหรือแดงเพราะว่ามีสารเคอคูมิน (curcumin) มีสมบัติเป็นผลึก ละลายได้ในแอลกอฮอล์ สารละลายมีสีเหลือง เมื่อถูกกับกรดบอริกจะได้สีแดง ปัจจุบันได้มีผู้นำไปใช้ประโยชน์โดยประยุกต์เป็นกระดาษขมิ้นตรวจสอบสารบอแรกซ์ในอาหาร (นิจศิริ, 2534) ตัวอย่างโครงสร้างสารเคมีบางชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหยของขมิ้นชันมีดังนี้ (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 โครงสร้างสารเคมีบางชนิดที่พบในน้ำมันหอมระเหยขมิ้นชัน

ที่มา: Jayaphakasha *et al.* (2005)

วิธีการสกัดเครื่องเทศ

เป็นที่ทราบกันดีว่าเครื่องเทศเป็นพืชที่มีสารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ (Leuschner and Zamparini, 2002; Thongson *et al.*, 2005; Owen and Palombo, 2007; Boyraz and Ozcan, 2006) แต่การที่จะนำสารเคมีเหล่านี้มาใช้จะต้องทำการสกัดสารสำคัญนั้นออกมาจากตัวพืช ไม่ว่าจะเป็นส่วนใบ ดอก เมล็ด เปลือก ไม่ว่าในลักษณะพืชสดหรือพืชแห้ง ซึ่งสารที่สกัดมาได้ เรียกว่า สารสกัด (extracts) สำหรับวิธีที่จะสกัดสารเคมีที่อยู่ในตัวพืช Vinatori (2001) ได้รวบรวม และเสนอหลายวิธีได้แก่

การกลั่น

การกลั่น หมายถึงการนำเครื่องเทศผสมกับน้ำแล้วให้ความร้อนโดยตรงแก่น้ำ หรือให้ความร้อนในรูปไอน้ำก็ได้ ความร้อนที่ให้แก่ น้ำทำให้น้ำระเหยกลายเป็นไอพร้อมกับนำสารเคมีที่มีจุดเดือดต่ำออกจากตัวเครื่องเทศ เมื่อไอน้ำลอยปะทะกับเครื่องควบแน่น (condensor) ไอน้ำนั้นจะกลั่นตัวเป็นหยดน้ำ เมื่อกลั่นนานขึ้นจะได้หยดน้ำในปริมาณมากจากนั้นทำการแยกน้ำและสารเคมีที่ต้องการนั้นออกจากกัน ซึ่งผลได้จากการแยกน้ำออกส่วนใหญ่จะเป็นสารจำพวกน้ำมันหอมระเหยชนิดหยาบ (crude essential oil)

วิธีการกลั่นสามารถแบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่ การกลั่นให้ได้น้ำมันหอมระเหยโดยตรง (direct essential oil distillation) การกลั่นด้วยไอน้ำ (water steam distillation) และการกลั่นด้วยไอน้ำและน้ำ (water and steam distillation) การสกัดสารด้วยวิธีการกลั่นส่วนใหญ่ผลได้จะเป็นน้ำมันหอมระเหย แต่ก็มีเทคนิคการสกัดวิธีอื่นที่ได้น้ำมันหอมระเหยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นการให้ของเหลวไปชะสารเคมีที่อยู่ในเนื้อเยื่อพืชเพื่อที่จะนำสารสำคัญที่ต้องการนั้นออกมา ดังนั้นชนิดของตัวทำละลายจึงมีผลต่อสารสกัด ถึงแม้ว่าพืชที่ทำการสกัดนั้นจะเป็นพืชชนิดเดียวกันก็ตาม เช่น เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วน้อยจะชะสารพวกที่ไม่มีขั้ว หรือมีขั้วต่ำออกมาได้ดีกว่าเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีขั้วสูงกว่า

สำหรับการสกัดด้วยตัวทำละลายมี 5 วิธี ได้แก่ การสกัดแบบให้ของเหลวไหลผ่าน (percolation) การสกัดแบบแช่อยู่ (maceration with solvent) การสกัดด้วยน้ำร้อน (boiling with water หรือ infusion) การสกัดด้วยไขมันเย็น (extraction with cold fat หรือ enfleurage) และการสกัดด้วยไขมันร้อน (extraction with hot fat)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการสกัดสารด้วยตัวทำละลายร่วมกับวิธีการต่างๆ เพื่อให้ได้สารสำคัญออกมาจากตัวพืชมากขึ้นและมีคุณภาพดี หรือช่วยลดเวลาให้การสกัดให้เร็ว เช่น การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับการสกัดด้วยตัวทำละลาย

การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราซาวด์ในการสกัดเครื่องเทศ

อัลตราซาวด์ (ultrasound) หมายถึงคลื่นเสียงที่มีความถี่ 20 kHz หรือมากกว่า คลื่นเสียงนี้สามารถเดินทางผ่านแก๊ส ของเหลว และของแข็ง (Piyasena *et al.*, 2003; D'Amico *et al.*, 2006) อัลตราซาวด์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ขึ้นกับความถี่และพลังงานเสียง (acoustic energy) ที่เกิดขึ้นประเภทแรกเรียกว่า diagnostic ultrasound เป็นคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงแต่ให้พลังงานต่ำ ความถี่ที่ใช้ในช่วง 5-10 MHz และให้พลังงานเสียงอยู่ในระดับ $100 \text{ mW/cm}^2 - 1 \text{ W/cm}^2$ ประเภทสองเป็นคลื่นเสียงที่มีความถี่ต่ำแต่ให้พลังงานสูงเรียกว่า power ultrasound ความถี่ที่ใช้ในช่วง 20-100 kHz และให้พลังงานเสียงอยู่ในระดับ $10-1000 \text{ W/cm}^2$ ลักษณะเครื่องผลิตอัลตราซาวด์ชนิดดังกล่าวนี้เป็นแบบโพรบ (probe) (Baumann *et al.*, 2005) ในงานวิจัยนี้ต่อไปจะใช้คำว่า “คลื่นเสียงความถี่สูง” แทน “อัลตราซาวด์” ในความหมายเดียวกัน

เนื่องจากการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงอาศัยพลังงานเสียงเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งพลังงานเสียงที่ใช้จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของตัวกลาง การหาพลังงานเสียงจากการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในระบบของเหลวแสดงอยู่ในรูปของความหนาแน่นของปริมาตร (volumetric density; mW ml^{-1}) ซึ่งตรวจวัดได้ด้วยวิธีแคลอริเมตริก (Manas *et al.*, 2000) โดยมีปัจจัยของความร้อนจำเพาะของสารมวลของสาร และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเกี่ยวข้องกับค่าพลังงานที่ใช้

การนำไปใช้ประโยชน์

การประยุกต์ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงในอุตสาหกรรมอาหารได้ดำเนินการวิจัยและพัฒนาต่อเนื่องเป็นเวลาหลายปี โดย Mason *et al.* (1996) ได้รวบรวมผลของคลื่นเสียงความถี่สูงที่มีต่อการสกัดพืชและเซลล์สิ่งมีชีวิตดังนี้

(1) กระตุ้นกิจกรรมของเซลล์สิ่งมีชีวิต

การประยุกต์ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อเพิ่มผลผลิตในผลิตภัณฑ์อาหารได้แก่ การใช้ power ultrasound กระตุ้นอัตราการเจริญของเซลล์สาหร่ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพบว่า เซลล์สาหร่ายให้โปรตีนเพิ่มสูงขึ้นเป็น 3 เท่าเมื่อเทียบกับการไม่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูง นอกจากนี้คลื่นเสียงความถี่สูงถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ตในอุตสาหกรรมอาหารพบว่า ลดระยะเวลาในการผลิตได้ถึง 40% คลื่นเสียงความถี่สูงยังช่วยลดเวลาในการฟักไข่ของปลาออก (loach) ได้ถึง

60 ถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งกลุ่มนักวิจัยนี้ได้แนะนำให้ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงความถี่ 1 MHz นาน 35 นาที จำนวน 3 ครั้งต่อวัน (Mason *et al.*, 1996)

(2) ยับยั้งจุลินทรีย์

การแปรรูปด้วยความร้อนแบบดั้งเดิม ได้แก่ พาสเจอร์ไรเซชัน (pasteurization) หรือ ยูเอชที (Ultra High Temperature หรือ UHT) ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร แต่ความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกลิ่นรสและสูญเสียคุณค่าทางสารอาหารที่มีในอาหารนั้น ดังนั้นจึงมีการพัฒนาใช้คลื่นเสียงความถี่สูงแทนการให้ความร้อนแบบดั้งเดิม คาดว่าฟองอากาศในของเหลวที่เกิดจากคลื่นเสียงความถี่สูงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความดันของเซลล์ มีผลทำให้เกิดความร้อน จึงช่วยทำลายเซลล์แบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดเช่น *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, และ *Bacillus subtilis* เป็นต้น (Piyasena *et al.*, 2006)

(3) ปฏิกริยาที่มีเอนไซม์ในระบบ

ในงานด้านชีวเคมี โดยปกติมีการใช้ประโยชน์จากคลื่นเสียงลักษณะ power ultrasound เพื่อทำให้ผนังเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแตก ทำให้ปล่อยสารต่างๆที่อยู่ภายในเซลล์ออกมา ซึ่งการใช้คลื่นเสียงในลักษณะเดียวกันนี้ยังทำให้เกิดผลดีต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ Mason *et al.* (1996) ได้รวบรวมประโยชน์ของการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่มีผลต่อเอนไซม์ พบว่าคลื่นเสียงความถี่สูง 20 kHz สามารถเพิ่มอัตราการรวมกันของเคซีน (casein) ซึ่งเป็นซับสเตรตกับเอนไซม์แอลฟาแคย์โมทริปซิน (α - chymotrypsin) เป็น 2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ใช้คลื่นเสียงความถี่สูง หรือการศึกษาการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ในผักและผลไม้ที่ยังไม่ผ่านความร้อน เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลและกลิ่นรสที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ พบว่าเมื่อใช้คลื่นเสียงความถี่สูง 20 kHz เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแก่สารละลายเอนไซม์และซับสเตรต สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ 90%

(4) การสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรและเครื่องเทศ

ในอดีตเทคนิคที่นิยมใช้การสกัดพืชสมุนไพรคือการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิมเป็นการนำตัวทำละลายเดิมลงในภาชนะที่มีสมุนไพร หรือเครื่องเทศที่ต้องการสกัดจากนั้นให้ความร้อนหรือทำการกวน ใช้เวลานานในการสกัด ปัจจุบันมีการเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดโดยใช้ power ultrasound ช่วยสกัดสารอินทรีย์ที่อยู่ภายในเนื้อเยื่อลำต้นของพืชหรือเมล็ดทำให้ได้ผลผลิตออกมาได้มากกว่า ผลเชิงกลของคลื่นเสียงความถี่สูงคือช่วยให้ตัวทำละลายซึมผ่านเข้าไปในเซลล์พืชได้ดี และทำให้เกิดการถ่ายเทของสารที่ต้องการสกัดออกจากเซลล์พืชได้เร็ว พบว่าให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้น จึงทำให้มีทำให้มีการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเป็นตัวช่วยในการสกัดอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น

ในปี 2001 Wu *et al.* ทำการเปรียบเทียบวิธีสกัดสารซาโปนิน (saponin) จากโสมด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดโสมเข้าไปมา (reflux) ในสารละลายที่เดือด โดยได้ใช้คลื่นเสียงความถี่สูงใน 2 รูปแบบ รูปแบบแรกเป็นการใช้โพรบจุ่มลงในสารละลายเพื่อปล่อยคลื่นเสียงโดยตรง รูปแบบที่สองเป็นการปล่อยคลื่นเสียงให้ผ่านภาชนะรูปร่าง (bath) พบว่าการสกัดซาโปนินจากโสมด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทั้ง 2 วิธี ใช้เวลาในการสกัดเร็วเป็น 3 เท่าและให้สารสกัดที่ต้องการใกล้เคียงกับการสกัดด้วยวิธีเข้าไปมาในสารละลายที่เดือด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสกัดโสมด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงระหว่างรูปแบบใช้โพรบกับรูปแบบใช้อ่าง พบว่า การสกัดโสมสายพันธุ์อเมริกันในตัวทำละลายเมทานอลด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงแบบใช้โพรบให้ผลได้เท่ากับ 4.58% (w/v) ซึ่งสูงกว่าการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงแบบใช้อ่างที่ให้ผลได้เท่ากับ 4 % (w/v) ในระยะเวลาสกัด 2 ชั่วโมง แต่เมื่อใช้คลื่นเสียงความถี่สูงสกัดโสมสายพันธุ์เกาหลีพบว่า ผลได้จากการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทั้ง 2 วิธีไม่ต่างกันมาก การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงแบบใช้โพรบให้ผลได้ 3.22% (w/v) และแบบใช้อ่างให้ผลได้ 3.20% (w/v) ในระยะเวลาเท่ากันคือ 2 ชั่วโมง Wu และคณะ ยังแนะนำเพิ่มอีกว่า การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงร่วมสกัดสารในตัวทำละลายยังสามารถทำได้ที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งเหมาะสำหรับสารสกัดที่มีสมบัติไม่ทนความร้อน

Thongson *et al.* (2004) ศึกษาเปรียบเทียบวิธีสกัดแบบเขย่าและใช้สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงกับเครื่องเทศไทยได้แก่ ขิง กระจ่าง และขมิ้นชัน ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิดได้แก่ เฮกเซน ไอโซโพรพานอล และสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับไอโซโพรพานอลในอัตราส่วน 3:7 พบว่าการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงที่ 20 kHz (มีพลังงานเสียงที่ใช้เท่ากับ 6.8 W/cm^2) ช่วยลดเวลาใน

การสกัดเครื่องเทศเหล่านั้นเหลือเพียง 5 นาที ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Salmonella* spp. โกลด์เดียวกับสารสกัดที่ได้จากการสกัดแบบเขย่าที่ใช้เวลาสกัด 24 ชั่วโมง ที่ 25°C

นอกจากนี้ยังมีการใช้ประโยชน์จากคลื่นเสียงความถี่สูงโดย Li *et al.* (2004) ได้นำคลื่นเสียงความถี่สูงมาช่วยสกัดน้ำมันจากถั่วเหลือง เปรียบเทียบระหว่างสารละลายเฮกเซน ไอโซโพรพานอล และสารละลายผสมระหว่างเฮกเซนกับ ไอโซโพรพานอลในอัตราส่วน 3:2 เป็นตัวทำละลาย โดยใช้ความถี่ 20 kHz เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (พลังงานเสียงที่ใช้อยู่ในช่วง 16.4-47.6 W/cm²) พบว่าการใช้พลังงานเสียงที่สูงช่วยการสกัดถั่วเหลืองในสารละลายเฮกเซนสกัดน้ำมันได้ปริมาณมาก และใช้เวลาสกัดสั้นกว่าการสกัดด้วยวิธีแช่ในตัวทำละลาย ล่าสุด Velickovic *et al.* (2006) พบว่าการสกัดสมุนไพรได้แก่ การ์เดนเซส (garden sage) และกลูทินัสเซส (glutinous sage) ด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (40 kHz) โดยใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทานอล 70% (v/v) และน้ำเป็นตัวทำละลายพบว่า ปริมาณสารที่สกัดได้จากเครื่องเทศเพิ่มขึ้นเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย รองลงมาได้แก่เอทานอล และปิโตรเลียมอีเทอร์ ตามลำดับ ระยะเวลาที่สกัดสารแล้วให้ความเข้มข้นสูงสุดใช้เวลาเพียง 20 นาที

จากงานวิจัยที่กล่าวมาพบว่า คลื่นเสียงความถี่สูงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ด้านต่างๆ ในการสกัดสาร โดยเฉพาะการลดเวลาในการสกัดพบว่าคลื่นเสียงความถี่สูงช่วยลดเวลาในการสกัดให้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม (Wu *et al.*, 2001; Thongson *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Velickovic *et al.*, 2006) นอกจากนี้วิธีนี้ยังเหมาะสำหรับการสกัดสารที่มีสมบัติไวต่อความร้อน (Wu *et al.*, 2001) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการนำคลื่นเสียงความถี่สูงมาใช้ในการช่วยสกัดสารจากเครื่องเทศและสมุนไพร

จุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

จุลินทรีย์ก่อโรค: ความสำคัญและแหล่งที่พบการปนเปื้อน

Bacillus cereus

ลักษณะทั่วไป

Bacillus cereus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนขนาดใหญ่ สร้างสปอร์ภายในเซลล์ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว (peritrichous flagella) เซลล์มีขนาดความกว้าง 1.0-1.2 μm ความยาว 3.0-5.0 μm อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อเจริญอยู่ในช่วง 10-12 °C และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ในช่วง 48-50°C เชื้อชนิดนี้เจริญในอาหารอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 30-40°C และสามารถเจริญที่ pH 4.9-9.3 สปอร์ของแบคทีเรียมีคุณสมบัติทนความร้อนปานกลาง (Labbe' and Garcia, 2001)

อาการของโรค

การเกิดโรคจากอาหารเป็นพาหะสาเหตุจาก *B. cereus* เกิดจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนในอาหาร สารพิษจาก *B. cereus* มี 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นสารพิษที่ทำให้มีอาการโรคอุจจาระร่วง (diarrhoeal toxin) สารพิษนี้ถูกสร้างขึ้นในเซลล์ช่วง late exponential ของการเจริญ หลังจากรับเชื้อหรือเซลล์ที่มีอยู่ในอาหารทำให้เกิดอาการของโรค (infection) ภายใน 8-24 ชั่วโมง ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วง เป็นตะคริวบริเวณท้อง คลื่นไส้และอาเจียนเล็กน้อย สารพิษไม่รุนแรงและอาการจะหายภายใน 24 ชั่วโมง สารพิษชนิดที่สองจะทำให้อาการอาเจียน (emetic toxin) เซลล์จะสร้างในช่วง late exponential จนถึง stationary และหลังสารพิษออกนอกเซลล์ อาการอาเจียนเกิดขึ้นรวดเร็วภายใน 1-6 ชั่วโมง หลังจากรับสารพิษทำให้เกิดอาการของโรค (intoxication) สารพิษชนิดนี้ไม่รุนแรงและร่างกายสามารถปรับเข้าสู่สภาวะปกติภายใน 12-24 ชั่วโมง (ICMSF, 1996; Labbe' and Garcia, 2001; Banerjee and Sarkar, 2004)

แหล่งที่พบการปนเปื้อน

B. cereus พบได้ตามสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป สามารถแยกเชื้อจากฝุ่น ดิน วัชพืช ผัก ขนหรือหนังสือ เครื่องเทศ เนื้อสัตว์ อาหารที่พบว่าเป็นพาหะหรือเกิดอุบัติเหตุการเกิดโรคจากเชื้อชนิดนี้ได้แก่ ข้าวผัดไก่ มักกะโรนี เนยแข็ง หัวหอม ถั่วอก ซุปไก่ กุ้งทอด แดงกวา กะหล่ำปลี สลัดผัก มันฝรั่ง เป็นต้น (<http://www.cdc.gov/mmwrR/preview/mmwrhtml/00000754.htm>)

Staphylococcus aureus

ลักษณะทั่วไป

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 μm เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเซลล์ติดกันเป็นกลุ่มคล้ายรวงองุ่น แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์อะเลสและโคแอกกูเลส สร้างรงควัตถุทำให้โคโลนีมีสีเหลือง แบคทีเรียชนิดนี้สร้างฮีโมไลซิน (hemolysin) ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกได้ (hemolysis) นอกจากนี้ยังสร้างเอนไซม์ thermonuclease และสามารถเฟอร์เมนต้น้ำตาลแมนนิทอลในสภาพไม่มีออกซิเจนได้ สมบัติของ *Staphylococcus aureus* และสปีชีส์ใกล้เคียงแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติแบคทีเรีย *Staphylococcus* spp. ชนิดต่างๆ

คุณสมบัติ	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>
Coagulase	+	-	W	+
Heat-stable nuclease	+	-	+	+
Yellow pigment	+	-	-	-
Hemolysis	+	V	-	+
Mannitol fermentation anaerobically	+	-	-	-

หมายเหตุ: (+) เกิดปฏิกิริยา, (-) ไม่เกิดปฏิกิริยา, (V) ปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงได้, (W) เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย

ที่มา: Yousef and Carlstrom (2003)

ปัญหาที่พบในอาหารคือ *S. aureus* สามารถมีชีวิตอยู่รอดในสภาพที่แห้งเป็นเวลานาน สามารถเจริญในอาหารและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า a_w ต่ำเท่ากับ 0.86 จึงเป็นปัญหาสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารที่ผ่านความร้อนแล้วปนเปื้อน *S. aureus* ภายหลัง ประกอบกับการผลิตอาหารชนิดนั้นมักเกลือในส่วนผสมทำให้ช่วยลด a_w จึงจำกัดการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดแข่งขัน ในขณะที่ *S. aureus* เจริญได้ในภาวนั้น เซลล์ที่ปนเปื้อนจึงเจริญเพิ่มจำนวนและผลิต enterotoxin ที่มีชื่อว่า staphylococcal enterotoxin โรคระบบทางเดินอาหารที่เกิดจาก *S. aureus* เป็นสาเหตุ เรียกว่า staphylococcal gastroenteritis

อาการของโรค

โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารจาก *S. aureus* ส่วนใหญ่เกิดจากสุขลักษณะของผู้สัมผัสอาหารไม่ดีพอ และมีการใช้ภาชนะร่วมกันระหว่างอาหารดิบและอาหารที่สุกแล้ว หรือในกระบวนการผลิตอาหารทำให้มีการปนเปื้อนข้ามของเชื้อไปยังอาหารชนิดต่างๆ โรคจากอาหารเป็นพาหะจากแบคทีเรียชนิดนี้เกิดจากเซลล์ *S. aureus* เจริญเพิ่มจำนวนไม่ต่ำกว่า 6 log CFU/g เซลล์จะสร้างสารพิษและขับออกมานอกเซลล์ สารพิษทำให้เกิดอาการของโรคได้ (intoxication) มีรายงานว่า การบริโภคอาหารที่มีพิษดังกล่าวน้อยกว่า 1 μg อาจเกิดอาการของโรคได้ ผู้รับสารพิษจะเกิดอาการอย่างรวดเร็วภายใน 0.5-6 ชั่วโมง ผู้ป่วยมีอาการอาเจียน ปวดท้อง คลื่นไส้ และถ่ายอุจจาระ แต่ผู้ป่วยไม่มีไข้ อาการของโรคจะทุเลาภายใน 2-3 ชั่วโมง พบผู้เสียชีวิตจากเชื่อนี้บ่อยมากแต่ควรระมัดระวังในเด็กและผู้สูงอายุซึ่งจะอ่อนแอต่อเชื้อโรคนี้นี้ (Yousef and Carlstrom, 2003)

แหล่งที่พบการปนเปื้อน

สารพิษจาก *S. aureus* มักพบในอาหารเช่น ผลิตภัณฑ์ขนมปังที่มีครีม ผลิตภัณฑ์นม สลัด และผลิตภัณฑ์เนื้อ *S. aureus* อาจพบได้ในลำคอหรือจมูกของคน ดังนั้นหากควบคุมกระบวนการผลิตอาหารไม่เหมาะสมอาจนำไปสู่การปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ โรคนี้อันตรายและควบคุมการเกิดโรคได้โดยเข้มงวดสุขลักษณะที่ดีของคนงานผลิตอาหารและการป้องกันการปนเปื้อนข้าม การพบปริมาณ *S. aureus* สูงในอาหาร ($>10^5$ CFU/ml หรือ CFU/g) จะทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพผู้บริโภค แม้ว่าเซลล์ในปริมาณต่ำอาจไม่ได้อันตรายจากสารพิษของเชื่อนี้ อย่างไรก็ตามถ้าอาหารถูกเก็บในสภาวะที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของ *S. aureus* สารพิษอาจถูกผลิตขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาและทำให้อาหารไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยปกติปริมาณ *S. aureus* ที่พบในอาหารมีปริมาณต่ำเนื่องจากถูกกระบวนการแปรรูปทำลาย แต่หากเปิดโอกาสให้เซลล์เจริญเพิ่มจำนวน

และสร้างสารพิษปนเปื้อนในอาหาร สภาวะของกระบวนการแปรรูปส่วนใหญ่ไม่สามารถทำลายสารพิษได้ เช่น การให้ความร้อนแก่อาหารที่อุณหภูมิ 100°C นาน 30 นาทีหรือความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์น้ำนม 71.6°C นาน 15 นาทีไม่ทำลายสารพิษ แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ *S. aureus* ในอาหารนิยมหาจำนวนเชื้อมากกว่าการตรวจหาปริมาณสารพิษจาก *S. aureus* บางครั้งจึงพบว่าอาหารที่เป็นพาหะของโรคตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ เนื่องจากเซลล์ถูกทำลายในระหว่างการให้ความร้อนหรือระหว่างการหมัก ในอาหารบางชนิดจึงควรตรวจสอบสารพิษจาก *S. aureus* เช่น ไข่กรอกหมักบางชนิด เป็นต้น (Yousef and Carlstrom, 2003)

***Listeria* spp.**

ลักษณะทั่วไป

จีโนม *Listeria* ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ แต่มีเพียง *Listeria monocytogenes* เพียงชนิดเดียวที่ก่อให้เกิดโรคในคน แบคทีเรียชนิดนี้แกรมบวก รูปท่อนสั้น กว้าง 0.4-0.5 μm ยาว 0.5-2.0 μm ไม่สร้างสปอร์ *Listeria* spp. ทุกชนิดสามารถสร้างเอนไซม์อะคะเลสแต่ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส *L. monocytogenes* สามารถเฟอร์เมนตน้ำตาลแรมโนส (rhamnose) แล้วสร้างกรดและยังมีสมบัติในการย่อยเม็ดเลือดแดง ดังแสดงในตารางที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีสมบัติพิเศษแตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นคือ เมื่อเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 20-25°C แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา แต่ถ้าเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เชื้อกลับเคลื่อนที่ช้าหรือไม่เคลื่อนที่เลย โคลินิของ *L. monocytogenes* เเพาะเลี้ยงใน nutrient agar ให้ลักษณะโคโลนิขนาด 0.2-0.8 mm เรียบแบน ขุ่น เซลล์สามารถเจริญได้ดีที่มีอากาศหรือมีอากาศเพียงเล็กน้อยได้

ตารางที่ 2 สมบัติทางชีวเคมีของ *Listeria* spp. สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	การหมักและการสร้างกรด			β - Hemolysis
	Xylose	Rhamnose	Mannitol	
<i>L. monocytogenes</i>	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	+
<i>L. welshimeri</i>	+	V	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	+
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-

หมายเหตุ: (+) เกิดปฏิกิริยา, (-) ไม่เกิดปฏิกิริยา, (V) ปฏิกิริยาเปลี่ยนแปลงได้
ที่มา: Yousef and Carlstrom (2003)

อาการของโรค

การบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน *L. monocytogenes* อาจทำให้เกิดติดเชื้อและทำให้เกิดโรค listeriosis โดยทั่วไปเชื่อว่า ปริมาณเชื้อ $> 10^2$ โคโลนี ทำให้เกิดการติดเชื้อ กลุ่มผู้บริโภคที่เสี่ยงต่อโรค listeriosis ได้แก่ เด็กที่มีอายุต่ำกว่า 4 ปี ผู้สูงอายุ คนที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอและสตรีมีครรภ์ โรคนี้เป็นสาเหตุให้เกิดการแท้งลูกหรือคลอดก่อนกำหนด อาการอีกประการหนึ่งของโรค listeriosis ที่เด่นชัดในผู้ป่วยที่ภูมิคุ้มกันอ่อนแอคือพบ *L. monocytogenes* ในกระแสเลือดทำให้มีไข้มึน คัดแล้นไส้ และอ่อนเพลีย กรณีที่มีการติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia) อาจทำให้เกิดการอักเสบของเยื่อหุ้มสมองหรือเยื่อหุ้มไขสันหลัง (meningitis) พบอัตราการเสียชีวิตประมาณ 20-30% ปัจจุบัน *L. monocytogenes* ยังเกี่ยวข้องกับโรคที่ไม่ติดเชื้อที่เรียกว่า febrile gastroenteritis อาการทั่วไปของโรคคล้ายคลึงกับโรคทางเดินอาหารทั่วไปนี้คือมีไข้และอุจจาระร่วง (Yousef and Carlstrom, 2003)

แหล่งที่พบการปนเปื้อนและการระบาด

L. monocytogenes พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม พบในอาหารดิบ เช่น นม ฝักสด เนื้อ และอาหารทะเล สำหรับอาหารพร้อมบริโภคที่ตรวจพบเชื้อชนิดนี้และเคยเป็นสาเหตุของการเกิดโรคได้แก่ เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก (Yousef and Carlstrom, 2003)

Escherichia coli

ลักษณะทั่วไป

Escherichia coli เป็นจีโนมหนึ่งในตระกูล *Enterobacteriaceae* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นท่อนสั้น เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลา สามารถเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถใช้ทริปโทเฟนให้อินโดล ไม่ใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเฟอร์เมนต์กลูโคสเพื่อผลิตกรดและแก๊ส เมตาบอลิซึมของกลูโคสสามารถให้ไพรูเวท ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก (Yousef and Carlstrom, 2003)

เมื่อเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mac Conkey agar จะแสดงความแตกต่างของสมบัติชีวเคมีของแบคทีเรียคือโคโลนิที่มีสีแดงชมพูเนื่องจากสมบัติการหมักแลคโทส แต่ถ้าเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Eosin methylene blue agar (EMB) และ Endo agar โคโลนิที่มีสีน้ำตาลดำ โลหะ สมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญคือการทดสอบ IMViC ได้ผล ++ -- คือสามารถใช้ทริปโทเฟนให้อินโดล ให้ผลบวกกับเมทิลเรดแต่ไม่สร้างอะซิติก เมทิล คาบินอล (acetyl methyl carbinol) และไม่ใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน *E. coli* สายพันธุ์ที่เป็นเชื้อก่อโรคแบ่งได้ 4 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasive (EIEC) และ enterohemorrhagic (EHEC) (ICMSF, 1996)

Enteropathogenic (EPEC)

EPEC เป็นสาเหตุให้เกิดโรคแผลบริเวณลำไส้ ซึ่งอาจคล้ายแผลที่เกิดจาก *E. coli* O157:H7 (EHEC) แผลที่บริเวณลำไส้เกี่ยวข้องกับการทำลายเยื่อบุลำไส้หรือไมโครวิลไล สมบัติในการยึดเกาะลำไส้มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องเรียกว่า EPEC adherence factor (EAF) ซึ่งถูกสร้างจากพลาสมิดโปรตีน EAF ยังพบใน *E. coli* ชนิดอื่นด้วย ดังนั้นโปรตีนดังกล่าวจึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงปัจจัยก่อโรค หรือที่เรียกว่า virulence factor

Enterotoxigenic (ETEC)

ETEC เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในเด็กในประเทศกำลังพัฒนาและนักท่องเที่ยวที่กลับจากประเทศกำลังพัฒนา ETEC จะยึดเกาะบริเวณลำไส้เล็กโดยใช้ ฟิมเบรีย (fimbriae) ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยก่อโรคที่ช่วยในการเกาะติดผนังลำไส้ ETEC สร้าง enterotoxin 2 ชนิด ได้แก่ สารพิษชนิดที่ไม่ทนร้อน (heat-labile toxin) และสารพิษชนิดทนร้อน (heat-stable toxin)

Enteroinvasive (EIEC)

EIEC ทำให้เกิดโรคมีอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อ *Shigella E. coli* ประเภทนี้จะมีลักษณะแตกต่างจาก *E. coli* ชนิดอื่นคือ ไม่เฟอร์เมนต์หรือเฟอร์เมนต์น้ำตาลแลคโทสช้า อาจเจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศและไม่เคลื่อนที่ EIEC จะรุกรานมีวโคซา (mucosa) และเซลล์เยื่อบุลำไส้ ชนิดอีพิทีเรียล (epithelial) แล้วเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เป็นสาเหตุของการเกิดหนองหรือฝีในระบบทางเดินอาหารความสามารถในการรุกรานขึ้นอยู่กับพลาสมิดที่จะผลิตโพลีเปปไทด์และหลั่งออกมาสู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก

Enterohemorrhagic (EHEC)

พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1982 *E. coli* ที่พบในครั้งนั้นคือสายพันธุ์ *E. coli* O157:H7 ทำให้เกิดอาการท้องร่วง แต่แตกต่างจากโรคบิดที่เกิดจาก *Shigella* และ EIEC กล่าวคือ ทำให้เกิดเลือดออกที่ลำไส้ (hemorrhagic colitis) และโรคแทรกซ้อนที่สำคัญคือ hemolytic uremic syndrome (HUS) ซึ่งจะทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (hemolytic anemia) ต่อมาเกล็ดเลือดลดลง (thrombocytopenia) และไตทำงานล้มเหลว (acute renal failure) ผู้ป่วยต้องรับการฟอกไตหรือเปลี่ยนไต หากรุนแรงทำให้เสียชีวิตได้ในที่สุด

อาการของโรค

อาการรุนแรงของโรคที่แสดงในแต่ละบุคคลขึ้นอยู่กับชนิดของ *E. coli* ที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายซึ่งได้สรุปและแสดงในตารางที่ 3 ดังนี้

ตารางที่ 3 อาการของผู้ป่วยรับเชื้อ *E. coli* ชนิดต่างๆเข้าสู่ร่างกาย

ชนิดของ <i>E. coli</i>	ระยะฟักตัว	ระยะเวลาป่วย	อาการ
Enteropathogenic (EPEC)	17-72 ชั่วโมง (เฉลี่ย 36 ชั่วโมง)	6 ชั่วโมง-3 วัน (เฉลี่ย 24 ชั่วโมง)	อุจจาระร่วงเป็นน้ำเหลว คลื่นไส้ ปวดท้อง อาเจียน ปวดหัว มีไข้ ร่างกายมีอุณหภูมิต่ำ
Enterotoxigenic (ETEC)	8-44 ชั่วโมง (เฉลี่ย 26 ชั่วโมง)	3-19 วัน	อุจจาระร่วงเหมือนน้ำซาวข้าว ร่างกายขาดน้ำ มีไข้ต่ำ เป็นตะคริวที่ท้อง คลื่นไส้ อาการของโรคคล้ายอหิวาตกโรค
Enteroinvasive (EIEC)	8-24 ชั่วโมง (เฉลี่ย 11 ชั่วโมง)	หลายวันถึงหลายสัปดาห์	อุจจาระร่วงบ่อยครั้ง อุณหภูมิร่างกายต่ำลง มีไข้ ปวดหัว ปวดเมื่อยตามกล้ามเนื้อ และเป็นตะคริวที่ท้อง
Enterohemorrhagic (EHEC)	3-9 วัน (เฉลี่ย 4 วัน)	2-9 วัน	อาการ hemorrhagic colitis: ถ่ายอุจจาระออกมาเป็นเลือด ปวดท้องอย่างรุนแรง อาเจียน ไม่มีไข้ อาการ hemolytic uremic syndrome (HUS): อุจจาระออกมาเป็นเลือด ไตวายเฉียบพลัน เป็นลมหมดสติและเสียชีวิต อาการ thrombotic thrombocytopenic purpura: ลักษณะคล้าย HUS แต่มีไข้และการควบคุมการทำงานของสมอง ส่วนกลางผิดปกติ

ที่มา: ดัดแปลงจาก ICMSF (1996)

แหล่งที่พบการปนเปื้อนและการระบาด

E. coli O157:H7 ตรวจพบในพวกเนื้อวัว อาหารสดและผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เช่น นมดิบ นมพาสเจอร์ไรซ์ เนยแข็ง น้ำผลไม้ที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ ผักสดเช่น ผักกาดหอม เป็นต้น การระบาดของโรคที่เกิด *E. coli* O157:H7 พบบ่อยในช่วงฤดูร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสามารถอยู่ในอาหารที่เป็นกรดสูงเช่น สามารถแยก *E. coli* O157:H7 จากมายองเนสและน้ำแอปเปิ้ล ซึ่งอาหารทั้ง 2 ชนิดที่มี pH ประมาณ 3.6 แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้นเกลือ 4.5% (Yousef and Carlstrom, 2003)

***Salmonella* spp.**

ลักษณะทั่วไป

Salmonella spp. เป็นจีโนสหนึ่งในตระกูล *Enterobacteriaceae* เช่นเดียวกับ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อนสั้น เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว (peritrichous flagella) แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังสามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคสผลิตกรดและแก๊ส แต่ไม่สามารถหมักแลคโทสหรือซูโครส ไม่สามารถไฮโดรไลซ์ยูเรีย สร้างแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ สามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งของคาร์บอนให้พลังงาน เชื้อ *Salmonella* spp. สามารถแบ่งได้ประมาณ 2400 ซีโรวา โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดของแอนติเจนหรือเชื้อทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้ 1. โชมาทิก (โอ) แอนติเจนจะอยู่ร่วมกับลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) บริเวณพื้นผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก โอแอนติเจนสามารถทนความร้อน ทนแอลกอฮอล์และกรดเจือจาง 2. แฟลกเจลลา (เอช) แอนติเจนจะอยู่ร่วมกับแฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ แอนติเจนชนิดนี้ไม่ทนความร้อน 3. แคปซูลา (เค) แอนติเจนถูกสร้างจาก *Salmonella* spp. ที่สร้างแคปซูลห่อหุ้มเซลล์ เป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ไม่ทนความร้อน (Yousef and Carlstrom, 2003)

อาการของโรค

ผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อ *Salmonella* spp. จะแสดงอาการของโรคแตกต่างกัน จำแนกออกได้เป็น 3 ลักษณะ (ICMSF, 1996)

1. อาการของโรกระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ภาวะเพาะและลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) โดยทั่วไปเกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. หลายชนิดโรไทป์ แต่ที่พบบ่อยเกิดจาก *S. Typhimurium* และ *S. Enteritidis* ที่มีเชื้อสายพันธุ์ทำให้เกิดโรคไข้ไทฟอยด์ ช่วงระยะเวลาฟักตัวของโรคอยู่ระหว่าง 5 ชั่วโมง ถึง 5 วัน แต่ปกติจะเริ่มแสดงอาการประมาณ 12-36 ชั่วโมงหลังจากได้รับเชื้อ ในกรณีที่ได้รับเชื้อเป็นจำนวนมาก อาการจะปรากฏเร็วขึ้นกว่าปกติ อาการของผู้ป่วยได้แก่ ท้องเดิน คลื่นไส้ ปวดท้อง ไข้สูงปานกลาง หนาวสั่น อาการอุจจาระร่วงจะรุนแรงต่างกัน บางรายอุจจาระร่วงเป็นน้ำ และเกิดอาการขาดน้ำ ผู้ป่วยอาจมีอาการอาเจียน อ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ปวดศีรษะ กระสับกระส่าย โดยทั่วไปอาการดังกล่าวจะปรากฏอยู่นาน 2-5 วัน หากนำสิ่งขับถ่ายของผู้ป่วยไปตรวจวิเคราะห์ ในช่วงนี้มักจะพบเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นจำนวนมาก เมื่อเวลาผ่านไปจำนวนเชื้อจะลดลง แต่ผู้ป่วยบางรายมีโอกาสพบเชื้อ *Salmonella* spp. ที่ไม่ใช่ชนิดไทฟอยด์หลังจากหายจากอาการของโรคนี้ไปแล้วอีก 3 เดือน

2. อาการไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ (enteric fever) ไข้ไทฟอยด์เกิดเนื่องจากเชื้อสายพันธุ์ *S. Typhi* ส่วนไข้พาราไทฟอยด์เกิดจากเชื้อ *S. Paratyphi*, *S. Paratyphi B* (ชื่อเดิม *S. Schottmuelleri*) และ *S. Paratyphi C* (ชื่อเดิม *S. Hirschfeldii*) ระยะเวลาฟักตัวของเชื้อไข้ไทฟอยด์อยู่ระหว่าง 7-28 วัน (ขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ได้รับ) เฉลี่ยประมาณ 14 วัน ผู้ป่วยมีอาการไม่สบาย ปวดศีรษะ ไข้สูงมากและทรงตัวอยู่หลายวัน ปวดท้องและปวดเมื่อยตามร่างกาย อ่อนเพลีย อุจจาระมีลักษณะเหลว นอกจากนี้ยังมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ไอ มีเหงื่อออกตามร่างกาย ร่างกายมีอุณหภูมิต่ำ และเบื่ออาหาร มีจุดแดงตามลำตัว แผ่นหลังและหน้าอก หัวใจเต้นช้าและอ่อน ท้องบวม น้ำ ม้ามโต บางครั้งมีเลือดออกจากช่องท้องหรือจมูก ผู้ป่วยอาจหมดสติ อาการทุเลาช้า (ประมาณ 1-8 สัปดาห์) และบางครั้งผู้ป่วยอาจเป็นพาหะของโรคไปอีกหลายเดือนหรือเป็นปี ในกรณีนี้มักพบเชื้อในอุจจาระ

3. อาการติดเชื้อในกระแสเลือด (bacteremia หรือ septicemia) เกิดจากเชื้อ *Salmonella* spp. แพร่กระจายจากตำแหน่งที่ติดเชื้อในลำไส้เข้าไปสู่กระแสเลือด และอาจกระจายเข้าไปอยู่ตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย ผู้ป่วยอาจมีไข้สูง ปวดหลัง ปวดท้อง และเจ็บหน้าอก ร่างกายมีอุณหภูมิต่ำ เหงื่อออกตามลำตัว ไม่สบายตัว เบื่ออาหาร น้ำหนักลด อาการที่เกิดขึ้นอาจเป็นแบบเฉียบพลัน มีอาการอย่างรวดเร็วหรือเป็นเรื้อรัง สายพันธุ์ของ *Salmonella* spp. ที่เป็นสาเหตุได้แก่ *S. Typhi*, *S. Choleraesuis* และ *S. Dublin* นอกจากนี้ยังอาจเกิดอาการของโรคแทรกซ้อน ได้แก่ ไข้ตั้งอักเสบ ข้ออักเสบ เชื้อบุโพรงหัวใจอักเสบ เชื้อบุช่องท้องอักเสบ เชื้อหุ้มปอดอักเสบ และอาจติดเชื้อในช่องทางเดินปัสสาวะ

แหล่งที่พบการปนเปื้อน

เชื้อ *Salmonella* spp. จะอาศัยอยู่บริเวณลำไส้ของสัตว์พบทั้งในสัตว์เลือดอุ่น และ สัตว์เลี้ยงลูกในน้ำ เชื้อชนิดนี้พบรายงานการระบาดของโรคจากผลิตภัณฑ์สัตว์ปีกเป็นพาหะบ่อยครั้ง เช่น จากเนื้อไก่ ไก่ไข่ เนื้อไก่กึ่งวง เป็นต้น นอกจากนั้นได้แก่ น้ำ นม สลัดผัก และแคนตาลูป โรคนี้ส่วนหนึ่งเกิดการปนเปื้อนมูลสัตว์ที่มีเชื้อและจากสุขลักษณะของคนไม่ดีพอ ดังนั้นในกระบวนการผลิตอาหาร คนงานผลิตอาหารควรมีสุขอนามัยส่วนบุคคลที่ดี และต้องมีกระบวนการผลิตอาหารที่สามารถประกันได้ว่าปลอดภัยและได้คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ เนื่องจากเชื้อ *Salmonella* spp. สามารถปนเปื้อนตั้งแต่วัตถุดิบในระหว่างกระบวนการเก็บเกี่ยว ระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร หรือแม้แต่ในระหว่างการบริการอาหาร (Yousef and Carlstrom, 2003)

ในหลายปีที่ผ่านมาพบการอุบัติการณ์ของเชื้อ *S. Typhimurium* DT104 ในประเทศแถบยุโรปและอเมริกาเหนือ ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวจะมีความสามารถด้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่สำคัญ 7 ชนิด ได้แก่ ampicillin, chloramphenicol, sulfonamides, streptomycin, tetracycline, trimethoprim และ ciprofloxacin มีหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดอุบัติการณ์ของเชื้อคือยาชนิดขึ้นได้แก่ การเดินทางของนักท่องเที่ยวต่างชาติ การเคลื่อนย้ายอาหารระหว่างประเทศรวมทั้งวัตถุดิบปรุงแต่งอาหารและอาหารสัตว์ และการนำเข้าของสัตว์ที่มีการติดเชื้อจาก *S. Typhimurium* DT104 ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เชื้อมีการแพร่มาสู่คนและระบบห่วงโซ่อาหาร (Labbe' and Garcia, 2001)

จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย: ความสำคัญและแหล่งที่พบ

แบคทีเรียกรดแลคติก

ลักษณะทั่วไป

เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างเอนไซม์อะซิเตสเลส ขาดไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีออกซิเจน ทนกรด มีรูปร่างกลมหรือท่อน และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลังจากการเฟอร์เมนเตชันคาร์โบไฮเดรต (Axelsson, 1993)

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดอยู่ในตระกูล *Lactobacillaceae* ระหว่างการเจริญส่วนใหญ่ ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศ (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน จึงได้พลังงานจากกระบวนการเฟอร์เมนเตชันน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและแลคโทส ด้วยเหตุนี้จึงมีความต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ในการเจริญเพิ่มจำนวน ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกคือความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดเช่น ผักดอง แหนม เนยแข็ง แบคทีเรียกรดแลคติก โดยเฉพาะจีส *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* แยกได้จากหลักการทำอาหารหมักตามธรรมชาติ แบคทีเรียกรดแลคติกจึงถูกแยกมาเป็นกล้าเชื้อและมีบทบาทในการหมักอาหารและเครื่องดื่มหหลายชนิดผลิตในระดับอุตสาหกรรมเช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักและผลไม้ดอง ใส้กรอก และผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ ดังได้กล่าวมาแล้วว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความต้องการอาหารที่สมบูรณ์ ความต้องการสารอาหารจึงค่อนข้างสลับซับซ้อนเช่น ต้องการกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิดเช่น ไบโอดีดิน ไรโบฟลาวิน แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส ซึ่งความต้องการสารอาหารต่างๆเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ (นภา, 2535)

เชื้อรา

Aspergillus spp.

ลักษณะทั่วไป

Aspergillus spp. เป็นเชื้อราที่พบในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง ร้อนและชื้น อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อพวกนี้พบทั่วไปในประเทศแถบเมืองร้อน เมตาบอลิซึมของเชื้อราจีสน์ี่มีความหลากหลาย เชื้อราเหล่านี้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเพื่อผลิต กรดอินทรีย์ เอนไซม์ และผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เชื้อราหลายชนิดในจีสน์ี่เช่น *A. flavus* และ *A. niger* ไม่มีระยะการสืบพันธุ์แบบมีเพศ ดังนั้นสปอร์ที่ไม่มีเพศ (asexual spores) หรือไมโททิกสปอร์ (mitotic spores) เรียกว่าคอนิเดีย (conidia) ส่วนสปอร์ที่มีเพศ (sexual spores) หรือไมโอทิกสปอร์ (meiotic spores) เรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospores) และเนื่องด้วยความแตกต่างกันของเชื้อราจีสน์ี่อยู่ที่ยุ่ระยะการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (sexual stage) นักวิทยาศาสตร์จึงนำเกณฑ์นี้มาแบ่งเชื้อราออกเป็นคลาส (class) ต่างๆ โดยเชื้อราที่มีระยะสืบพันธุ์แบบมีเพศ ถูกจัดอยู่ในคลาส Ascomycetes แต่ถ้าเชื้อราที่มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศจะถูกจัดอยู่ในคลาส Deuteromycetes เชื้อราที่น่าสนใจในจีสน์ี่ที่ก่อโรคและมีความสำคัญด้านความปลอดภัยของอาหาร ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus* เนื่องจากเชื้อรา 2 ชนิดนี้จะผลิตสารพิษที่มีชื่อว่าอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งสารพิษดังกล่าวพบว่าทำให้ผู้บริโภครโดยเฉพะผู้ติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี หากบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินเป็นประจำจะเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งตับเพิ่มขึ้น (Labbe' and Garcia, 2001)

Aspergillus flavus

ลักษณะทั่วไป

A. flavus จัดอยู่ในคลาส Deuteromycetes เมื่อเพาะเชื้อราบนอาหาร Czapek yeast extract agar (CYA) ให้โคโลนิมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 60-70 mm แต่เมื่อเลี้ยงบนอาหาร Malt extract agar (MEA) โคโลนิมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-70 mm สภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราประกอบด้วยอุณหภูมิ 33°C ค่า a_w เท่ากับ 0.98 และ pH เท่ากับ 5-8 สภาวะเหมาะสมต่อการสร้างสารพิษได้แก่ ช่วงอุณหภูมิ 16-31°C และค่า a_w ในช่วง 0.95-0.99 ตารางที่ 4 แสดงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ ดังนี้

ตารางที่ 4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินของ *A. flavus*

	ค่าต่ำสุด	ค่าเหมาะสม	ค่าสูงสุด
ปัจจัยการเจริญ			
อุณหภูมิ (°C)	10-12	33	43
a _w	0.8	0.98	>0.99
pH	2	5-8	>11
การสร้างอะฟลาทอกซิน			
อุณหภูมิ (°C)	13	16-31	31-37
a _w	0.82	0.95-0.99	>0.99

ที่มา: ICMSF (1996)

แหล่งที่พบและความสำคัญในอาหาร

พืชผลทางการเกษตรสำคัญที่มักพบการเจริญและสารพิษของ *A. flavus* ได้แก่ ถั่วลิสง ข้าวโพด เม็ดฝ้าย ธัญชาติ เครื่องเทศ นัท และเมล็ดพืชน้ำมัน สาเหตุที่เชื้อราชนิดนี้ชอบเจริญเมล็ดพืชเหล่านี้ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด จากการศึกษาเบื้องต้นสันนิษฐานว่าการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราในแถบพื้นที่ร้อนชื้นเกิดจากปัจจัยการทำแห้งของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรไม่เหมาะสมก่อนจะเก็บรักษา นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากสภาวะการเก็บรักษาพืชผลการเกษตรเหล่านี้ไม่เหมาะสม (ICMSF, 1996)

Aspergillus niger

ลักษณะทั่วไป

A. niger จัดอยู่ในคลาส Deuteromycetes โคลินีมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวหรือสีเหลือง สปอร์มีสีดำ ขนาด 4-5 μm เมื่อเพาะเชื้อราบนอาหาร CYA จะมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 mm หรือมากกว่า แต่ถ้าเพาะบนอาหาร MEA เชื้อราจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 30-60 mm *A. niger* เป็นเชื้อราทนร้อน (thermotolerant fungi) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6-47°C และเจริญได้ดีที่สุดที่

อุณหภูมิ 35-37°C มีรายงานว่า สปอร์ของ *A. niger* สามารถงอกที่ a_w ต่ำเท่ากับ 0.77 และอุณหภูมิ 35°C นอกจากนี้เชื้อรายังสามารถเจริญที่ pH เท่ากับ 2 ที่ค่า a_w สูง > 0.77 (Pitt and Hocking, 1997)

แหล่งที่พบและความสำคัญด้านอาหาร

A. niger เป็นเชื้อราถูกนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glycoamylase) และบีต้า-กาแล็กโทซิเดรส (β -galactosidase) เป็นต้น อีกทั้งยังถูกนำมาใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารอย่างกว้างขวางเพราะว่าถูกจัดเป็น Generally recognized as safe (GRAS) ซึ่งปลอดภัยหากใช้ในปริมาณและวิธีการที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าพบเชื้อราชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษชนิดออกซาลาทอกซินเอ (ochratoxin A) พบจำนวน 2 ไอโซเลท จาก 18 ไอโซเลท (Pitt and Hocking, 1997) *A. niger* ยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสียหลังการเก็บเกี่ยวในผลไม้สดหลายชนิดเช่น ส้ม มะม่วง องุ่น แอปเปิ้ล รวมถึงผักบางชนิดได้แก่ มะเขือเทศ หัวหอมและกระเทียม เป็นต้น (อรุณี, 2533)

Aspergillus parasiticus

ลักษณะทั่วไป

A. parasiticus มีลักษณะทางสรีระคล้ายคลึงกับ *A. flavus* มาก ดังนั้นการศึกษาเชื้อรา *A. flavus* จึงสามารถอธิบายและประยุกต์ใช้ได้กับ *A. parasiticus* เมื่อเพาะเชื้อราชนิดนี้บนอาหาร CYA ให้โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-70 mm ซึ่งให้ผลใกล้เคียงเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50-65 mm สภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราประกอบด้วย อุณหภูมิอยู่ที่ 32°C ค่า a_w เท่ากับ 0.99 และ pH เท่ากับ 5-8 เชื้อราชนิดนี้มีความสามารถผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยสภาวะเหมาะสมต่อการสร้างสารพิษได้แก่สภาวะอุณหภูมิที่ 25°C ค่า a_w เท่ากับ 0.95 และ pH เท่ากับ 6 ดังสรุปและแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินของ *A. parasiticus*

	ค่าต่ำสุด	ค่าเหมาะสม	ค่าสูงสุด
ปัจจัยการเจริญ			
อุณหภูมิ (°C)	12	32	42
a _w	0.80-0.83	0.99	>0.99
pH	2	5-8	>11
การสร้างอะฟลาทอกซิน			
อุณหภูมิ (°C)	12	25	40
a _w	0.86-0.87	0.95	>0.99
pH	2	6	>8

ที่มา: ICMSF (1996)

แหล่งที่พบและความสำคัญด้านอาหาร

คล้ายคลึงกับ *A. flavus*

Fusarium oxysporum

ลักษณะทั่วไป

Fusarium sp. จัดอยู่ในคลาส Deuteromycete เส้นใยมีลักษณะเป็นปุยฝ้าย มีสีขาวชมพู แดง ม่วงถึงน้ำตาล เชื้อราชนิดนี้มีสปอร์ 2 ชนิด ได้แก่ แมโครโคนิเดีย (macroconidia) ซึ่งประกอบด้วยสปอร์หลายสปอร์ รูปร่างโค้งเล็กน้อยคล้ายไต และไมโครโคนิเดีย (microconidia) ประกอบด้วยสปอร์ 1-2 สปอร์ มีลักษณะสั้นและกลม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเชื้อรา *F. oxysporum* อยู่ที่ 25-30°C อุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ที่ 5 และ 37°C ตามลำดับ pH ที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ที่ 2.2-9.0 แต่จะเจริญได้ดีที่สุดอยู่ที่ 7.7 *F. oxysporum* สร้างสารพิษหลายชนิดที่รู้จักกัน ได้แก่ moniliformin, zearalenone และ wortmannin นอกจากนี้ยังพบสารพิษชนิดอื่นอีก เช่น nivalenol, fusarenone X และ sambutoxin (Pitt and Hocking, 1997)

แหล่งที่พบและความสำคัญด้านอาหาร

F. oxysporum เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในพืชหลายชนิด เช่น กลั้ว มะเขือเทศ พืชจำพวกซิตรัส (citrus) เช่น ส้มและมะนาว แตง นอกจากนี้มีรายงานว่า เชื้อชนิดนี้มีความสามารถในการเจริญในที่มืดออกซิเจนต่ำเพราะ พบการเน่าเสียของน้ำผลไม้ที่ผ่านกระบวนการผลิตแบบยูเอชที และยังพบในเนยแข็ง มันฝรั่งและกระเทียม (Pitt and Hocking, 1997)

การทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเครื่องเทศชนิดแห้ง

ปัจจุบันมีสารหลายชนิดที่มีสมบัติต้านจุลินทรีย์และสามารถนำมาใช้ในอาหารได้ แต่การทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ บางครั้งยากที่จะนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับโดยปกติวิธีทดสอบประสิทธิภาพสารต้านจุลินทรีย์ นิยมอ้างอิงค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibitory concentration หรือ MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่การที่จะได้ค่า MIC นี้ได้จากเทคนิคหลายวิธีด้วยกัน ด้วยเหตุนี้ข้อมูลการเปรียบเทียบศักยภาพสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารหลายๆ ชนิดจึงคลาดเคลื่อนได้เพราะวิธีวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม Davidson และ Parish (1989) ได้เสนอแนะวิธีทดสอบประสิทธิภาพความสามารถในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ในอาหารเพื่อให้เกิดรูปแบบและมาตรฐานเดียวกัน ดังมีรายละเอียดดังนี้

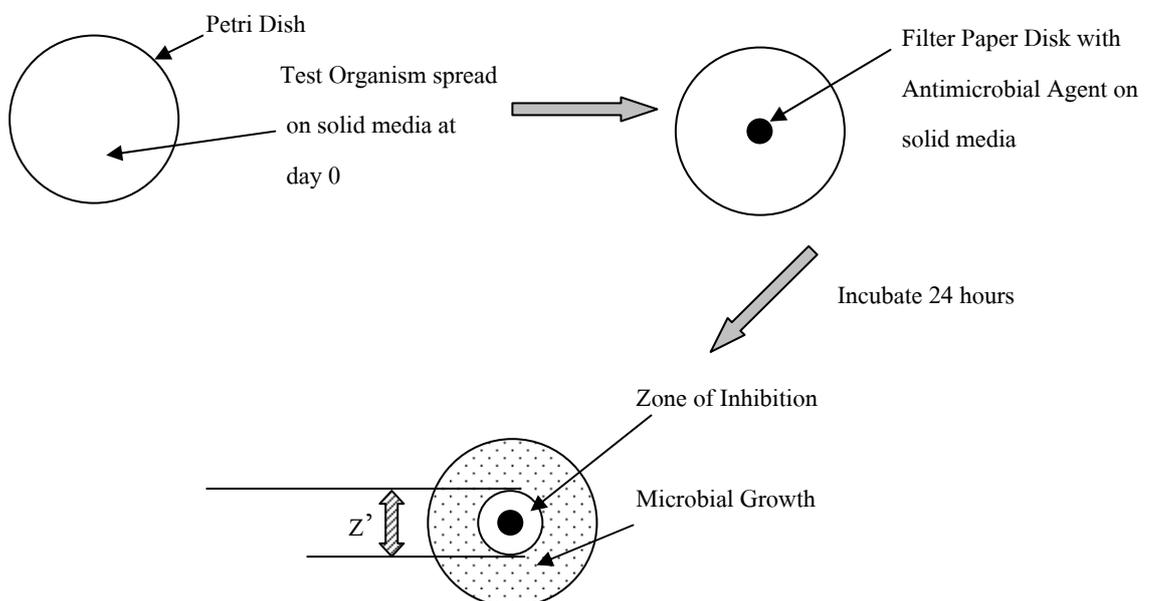
การทดสอบในหลอดทดลองหรือ “*in vitro*” ประกอบด้วย (1) วิธี endpoint เป็นวิธีที่จุลินทรีย์ทดสอบอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์เช่น สารสกัดจากเครื่องเทศ ทิ้งให้สัมผัสในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ผลการทดลองแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบในระยะเวลาที่กำหนด (2) วิธี descriptive เป็นการสุ่มตัวอย่างจุลินทรีย์ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ในช่วงเวลาต่างๆ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลาการเจริญนั้นๆ

วิธี endpoint

เป็นวิธีที่นิยมโดยทั่วไปวิธีนี้แยกได้ 2 วิธี ได้แก่

1. วิธี agar diffusion

เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบกันอย่างแพร่หลาย โดยให้สารที่คาดว่าจะมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ซึมเข้าไปในเนื้อวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แล้วตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งอยู่บนผิววุ้นหรืออยู่ในเนื้อวุ้น สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบอาจอยู่ในรูปของแผ่นกระดาษกรองรูปกลมหรือดิสก์ (disk) เนื่องจากจุดจับของเหลวได้ดี รูปกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm ชุบสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ หากไม่ใช่ดิสก์จะใช้วิธีเจาะเป็นหลุมในวุ้นโดยตรง หยดสารที่ต้องการทดสอบนั้นลงไป สารยับยั้งจุลินทรีย์จะค่อยๆ ซึมเข้าไปในวุ้นแผ่เป็นรัศมีโดยรอบ ปริมาณสารลดลงเป็นสัดส่วนกับระยะทางจากจุดเริ่มต้น จุลินทรีย์ทดสอบถูกยับยั้งการเจริญได้ด้วยปริมาณของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เติมในดิสก์หรือในหลุม บริเวณใดไม่มีจุลินทรีย์เจริญบริเวณนั้นเกิดเป็นวงใสรอบดิสก์ที่เรียกว่า บริเวณยับยั้ง (zone of inhibition, Z') แสดงว่า สารที่คาดว่าจะยับยั้งจุลินทรีย์นั้นมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้จริง วงใสรอบดิสก์ขยายมากหรือน้อยก็สามารถเปรียบเทียบในแง่ปริมาณของสาร หรือในแง่ของประสิทธิภาพการยับยั้งที่ต่างกัน ได้ ดังแสดงภาพที่ 3



ภาพที่ 3 การหาค่าบริเวณยับยั้งโดยวิธี paper disk diffusion

ที่มา: ดัดแปลงจาก Davidson *et al.* (2005)

ข้อจำกัดของวิธี agar diffusion คือเป็นการทดสอบแบบกึ่งคุณภาพ แม้ว่าจะหาค่า MIC ได้แต่ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากวิธีที่สองที่จะกล่าวถึงต่อไป คือวิธี dilution เหมาะสมในการทดสอบแบบปริมาณมากกว่า วิธี dilution ยังแก้ปัญหาจุลินทรีย์ที่เจริญช้าหรือจุลินทรีย์ชนิดไม่ต้องการออกซิเจน ในขณะที่วิธี agar diffusion มีข้อจำกัดคือสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ หากมีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) สูง จะแพร่ผ่านวุ้นไม่ดี สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบจึงควรมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) หากสารมีสมบัติชอบน้ำการทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งจุลินทรีย์อาจเกิดความผิดพลาดได้

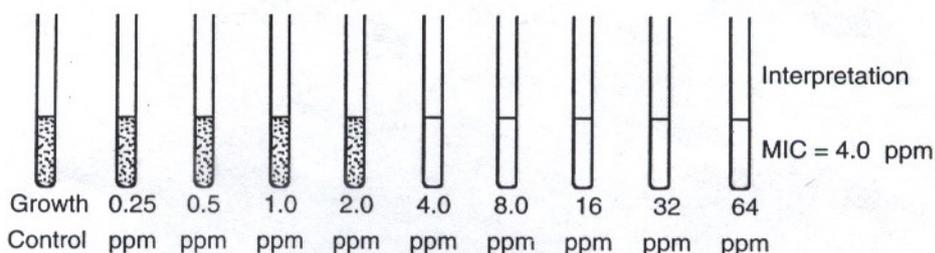
2. วิธี dilution

วิธีนี้สามารถทดสอบได้ทั้งในระบบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และระบบอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเรียกว่าวิธี agar และ broth dilution ตามลำดับ โดยทั่วไปเป็นการทดสอบแบบปริมาณวิเคราะห์เพื่อให้ทราบปริมาณสารที่จุลินทรีย์ถูกยับยั้ง โดยวิธี dilution สามารถทดสอบกับจุลินทรีย์ที่มีการเจริญแบบต้องการออกซิเจน ไม่ต้องการออกซิเจน และต้องการออกซิเจนน้อยในการเจริญได้ (microaerophilic) ดังนั้นจึงเหมาะสมในการตรวจประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ เนื่องจากยืดหยุ่นต่อปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

วิธี agar dilution เริ่มจากการนำสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่างๆผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่หลอมเหลว แล้วเทบนจานเพาะเชื้อร่อนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่กำหนดความเข้มข้นเซลล์เป็น $7 \log \text{CFU/ml}$ ปริมาตร $1 \mu\text{l}$ หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง จำนวนเชื้อเริ่มต้นบนจานเพาะเชื้อกำหนดให้มีปริมาณ $4 \log \text{CFU/ml}$ จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปเพาะเชื้อ ทิ้งให้เจริญตามเวลาที่กำหนด ตรวจหาค่า MIC เป็นลำดับต่อไป ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถเห็น โคโลนีของจุลินทรีย์ทดสอบ ทำให้ทราบได้ว่าเมื่อมีการกลายพันธุ์หรือมีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น ลักษณะ โคโลนีที่ปรากฏก็จะแตกต่างกันไปและสามารถทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีขุ่นได้

วิธี broth dilution ทดสอบโดยนำสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นต่างๆผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เติมจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการทดสอบที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเป็น $5.7 \log \text{CFU/ml}$ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารยับยั้งที่ต้องการทดสอบนั้นๆ แล้วนำไปเพาะเชื้อในระยะเวลาที่กำหนดเช่น 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจหาค่า MIC ด้วยการวัดปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต แสดงด้วยค่าการดูดกลืนคลื่นแสง โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ข้อดีของ broth dilution คือสามารถหาค่า minimum bactericidal concentration (MBC) หรือ minimum lethal concentration (MLC) ได้ นอกจากนั้น โดยวิธี broth dilution สามารถทดลองสารยับยั้งที่ต้องการทดสอบระดับปริมาณน้อยๆ ได้ เช่น 50-100 μl ในไมโครไทเทอร์เพลท ทำให้ประหยัดสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ได้ผลการทดสอบเร็วและสะดวก แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือไม่สามารถทราบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นกับจุลินทรีย์ทดสอบได้ และไม่สามารถใช้ทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีขุ่น นอกจากนั้นอาจมีความผิดพลาดได้เนื่องจากการใช้สารในปริมาณที่น้อย หากการเจือจางคลาดเคลื่อนทำให้ผลการทดสอบผิดพลาดได้



ภาพที่ 4 การหาค่า MIC โดยวิธี broth dilution

ที่มา: คัดแปลงจาก Davidson *et al.* (2005)

วิธี descriptive

เป็นอีกวิธีที่นิยมมี 2 วิธีย่อย คือ

1. time-kill curve

ได้แก่การศึกษาประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เติมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ สุ่มตัวอย่างที่ชั่วโมงต่าง ๆ กันตรวจหาจำนวนจุลินทรีย์โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ตรวจสอบจำนวนหรือ โคโลนีที่ปรากฏ ทำให้ทราบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนของจุลินทรีย์ที่เวลาต่าง ๆ กัน ทำให้ทราบว่าสารยับยั้งที่ต้องการทดสอบเช่น สารสกัดเครื่องเทศชนิดนั้นๆ ทำลาย หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ หรือยั้งระยะ log phase ของจุลินทรีย์

ให้นานออกไปเท่าใดจากกราฟจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตและเวลา แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือจะต้องใช้แรงงานมากและมีค่าใช้จ่ายสูง

2. วัดความขุ่น (turbidimetric)

ได้แก่การศึกษาประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เพาะเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ วัดความขุ่นของเชื้อที่ชั่วโมงต่างๆกันด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ข้อเสียวิธีนี้คือขึ้นกับความไวต่อการวัดของเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทั่วไปเครื่องมือนี้สามารถวัดความขุ่นหรือการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วง 6-7 log CFU/ml แต่ถ้ามีการเจริญของจุลินทรีย์ต่ำกว่า 5 log CFU/ml จะไม่สามารถวัดความขุ่นหรือการเจริญได้ ทำให้แปลผลผิดพลาดว่าเชื้อตาย ซึ่งให้ผลคลาดเคลื่อนได้

สารเคมีเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): คุณสมบัติและการประยุกต์ใช้ในอาหาร

EDTA เป็นสารกลุ่ม chelating agent เป็นโมเลกุลของสารอินทรีย์ที่สร้างโครงสร้างซับซ้อนกับโลหะประจุบวกเช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} และ Fe^{3+} เป็นต้น EDTA ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาสีของอาหารให้คงเดิม ยับยั้งการซีดจางของสีอาหาร ปกติในอาหารจะมีเหล็กและทองแดงซึ่งเป็นโลหะอยู่ในปริมาณน้อยแต่โลหะเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชัน (prooxidant) โดยเฉพาะในอาหารที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ อนุมูลโลหะดังกล่าวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน และเป็นสาเหตุทำให้ผักผลไม้ และอาหารอื่นๆมีสีซีดจางลงดังนั้นการเติม EDTA ลงไปในอาหารสาร EDTA จะสร้างโครงสร้างซับซ้อนกับเหล็กและทองแดงจึงยับยั้งการเกิดออกซิเดชันที่ทำให้อาหารมีสีซีดจาง ต่อมาพบว่า EDTA ยังมีสมบัติยับยั้งและทำลายเซลล์ของแบคทีเรีย (Davidson *et al.*, 2005) ด้วยเหตุนี้จึงคาดว่าเป็นสารเคมีที่ใช้เสริมฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

การประยุกต์ใช้ในอาหาร

จากที่กล่าวมาแล้วว่า EDTA ถูกนำมาใช้ในด้านอาหารวัตถุประสงค์หลักเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ป้องกันการเปลี่ยนแปลงสีของอาหาร ส่วนผลพลอยได้ก็คือช่วยป้องกันการเน่าเสียของอาหารจากจุลินทรีย์ เนื่องจากอาหารแต่ละชนิดมีองค์ประกอบของอาหารที่ไม่เหมือนกันดังนั้นการที่จะนำ EDTA มาใช้ในอาหารจึงต้องมีกำหนดและควบคุมโดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาหรือ USFDA อนุญาตให้เติม EDTA ในอาหารหลายชนิดเช่น น้ำสลัด มายองเนส เนื้อปูกระป๋อง และเครื่องดื่มนมแอลกอฮอล์หมัก เป็นต้น ความเข้มข้นที่สามารถใช้ในอาหาร (คำนวณในรูป anhydrous calcium disodium EDTA) อยู่ในช่วง 25-800 ppm ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณการใช้ anhydrous calcium disodium EDTA ในอาหาร

ชนิดอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ให้ได้ (ppm)
เครื่องดื่มนมอัลท์หมัก	25
เครื่องดื่มนมแอลกอฮอล์หมัก	25
ผลิตภัณฑ์ประเภทซอสข้น เช่น ซอสมะเขือเทศ ซอสพริก	75
สารสกัดเครื่องเทศ (ของเหลว)	60
ผลิตภัณฑ์ประเภทมายองเนสและน้ำสลัด	75
ผลิตภัณฑ์ทาบนแซนวิช (sandwich spread)	100
เครื่องดื่มที่ไม่ได้ทำจากผักหรือผลไม้ เครื่องดื่มเกลือแร่	100
เห็ดบรรจุกระป๋อง	200
กุ้งบรรจุกระป๋อง	250
ถั่วเมล็ดแห้ง	800

ที่มา: คัดแปลงจาก <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF172.html>

ก่อนหน้านี้นี้การเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารโดยทั่วไปนิยมเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์นั้นๆเพียงชนิดเดียว ในปัจจุบันมีการพยายามใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ร่วมกันหลายชนิดเติมลงในอาหาร ในทางทฤษฎีการใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ร่วมกันคาดว่าจะเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ดีกว่า โดยคาดว่าจะไปมีผลต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีอยู่ตามธรรมชาติในอาหารหรือมีผลต่อระบบเมตาบอลิซึมต่างๆในเซลล์จุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการปรากฏว่าสารยับยั้งชนิดนั้นให้ประสิทธิภาพดีในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่เมื่อประยุกต์ใช้ในอาหารกลับให้ผลไม่ค่อยดีนัก (Vigil *et al.*, 2005) ในส่วนของวิธีทดสอบประสิทธิภาพการใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์มากกว่าหรือ 2 ชนิดร่วมกันนั้นสามารถทดสอบด้วยวิธี agar diffusion, agar และ broth dilution และ time-kill curve ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

Vigil *et al.* (2005) ได้แนะนำรูปแบบประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์เมื่อใช้ร่วมกันมากกว่าหรือเท่ากับสองชนิด แบ่งได้ 3 แบบ ได้แก่ 1. Additivity หมายถึงสารยับยั้งจุลินทรีย์มากกว่าหรือเท่ากับสองชนิดให้ผลเท่ากับผลรวมของการใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยไม่มีการเสริมหรือลดประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียว 2. Antagonism หมายถึงประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับผลรวมของประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิด 3. Synergism หมายถึงประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น เมื่อนำสารยับยั้งจุลินทรีย์มาใช้ร่วมกัน เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์จากการรวมประสิทธิภาพการยับยั้งสารแต่ละชนิด

รูปแบบของสารยับยั้งจุลินทรีย์สองชนิดร่วมกันนั้นจะมีความสัมพันธ์แบบไหน ประเมินได้จากการค่า Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC_{index} or FIC_1) เช่น การใช้ EDTA ร่วมกับสารสกัดเครื่องเทศยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง โดยค่า FIC ของแต่ละชนิดและ FIC_1 สามารถคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$FIC_{EDTA} = \frac{MIC \text{ ของ EDTA ร่วมกับสารสกัดเครื่องเทศ}}{MIC \text{ ของ EDTA}}$$

$$FIC_{\text{สารสกัดเครื่องเทศ}} = \frac{MIC \text{ ของสารสกัดเครื่องเทศ ร่วมกับ EDTA}}{MIC \text{ ของสารสกัดเครื่องเทศ}}$$

$$FIC_1 = FIC_{EDTA} + FIC_{\text{สารสกัดเครื่องเทศ}}$$

โดยกำหนดไว้ดังนี้

$FIC_1 > 1-2$ รูปแบบการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารทั้งสองชนิดเป็นแบบ Antagonistic

$FIC_1 = 1$ รูปแบบการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารทั้งสองชนิดเป็นแบบ Additive

$FIC_1 < 1$ รูปแบบการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารทั้งสองชนิดเป็นแบบ Synergistic

ประสิทธิภาพของสารสกัดจากเครื่องเทศและ EDTA ต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ประสิทธิภาพสารสกัดจากเครื่องเทศต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

ดังได้กล่าวมาแล้วว่า เครื่องเทศเป็นพืชที่นำมาใช้ในการปรุงอาหารเพื่อให้อาหารมีกลิ่น ดึงดูดชวนรับประทาน มีรสชาติอร่อย มีรสจัดเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังพบว่า สารสำคัญที่อยู่ในเครื่องเทศมีประโยชน์ต่อร่างกายหลายประการเช่น ช่วยขับลม แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้อักเสบ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงมีสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันมีนักวิจัยหลายกลุ่มศึกษาประโยชน์ของสารเคมีชนิดสำคัญหรือสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในเครื่องเทศทั้งในรูปของสารสกัด น้ำมันหอมระเหย โอลีโอเรซิน ศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) และประยุกต์ใช้ในอาหาร เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้ อาหารเน่าเสีย อีกทั้งยังพยายามที่จะใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารที่มาจากธรรมชาติ ทดแทนการใช้วัตถุกันเสียซึ่งเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นมา ในที่นี้ได้รวบรวมงานวิจัยที่ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้ง จุลินทรีย์ดังนี้

ในปี ค.ศ. 1998 Akpomedaye and Ejechi ศึกษาผลของสารสกัดจากเครื่องเทศของประเทศ ในจีเรีย 2 ชนิด คือ *Zingiber officinale* และ *Xylopia aetiopica* ร่วมกับการใช้ความร้อนระดับต่ำ (100°C เป็นเวลา 2 นาที) ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*, *A. niger* และ *Rhizopus stolonifer* ใน น้ำส้มและน้ำสับปะรดพบว่า สารสกัด *Z. officinale* หรือ *X. aetiopica* ปริมาณ 3% สามารถชะลอ

การเจริญเชื้อราที่ทดสอบเหล่านั้นได้ และเมื่อมีการใช้สารสกัดทั้งสองชนิดร่วมกันชนิดละ 2% จะชะลอการเจริญของเชื้อราได้เพิ่มขึ้น คาดว่าพืชมีกลไกป้องกันตัวเองจากจุลินทรีย์โดยการสร้างโมเลกุลโปรตีนและพันธะเปปไทด์ที่มีสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ ผู้วิจัยขณะนี้ยังได้แยกโปรตีนจากจิงด้วยวิธีทางเคมีแล้วทดสอบสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์จำพวกเชื้อราพบว่า โปรตีนจากจิงที่แยกได้สามารถยับยั้งเชื้อรา *Physalospora piricola* ซึ่งเป็นสาเหตุการเน่าเสียของผลไม้ได้ดีที่สุด (Wang and Ng, 2005) ต่อมาในปี ค.ศ. 2002 Leuschner and Zamparini ได้ศึกษาการเจริญและการรอดชีวิตของ *E. coli* O157:H7 และ *S. Enteritidis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth ที่มีการเติมผงแห้งบดละเอียดของ กระเทียม จิง มัสตาด และกานพลู พบว่าผงแห้งบดละเอียดของกระเทียมและกานพลู 0.25-1% สามารถยับยั้งและทำลายแบคทีเรียทั้งสองชนิด ขณะที่ผงแห้งบดละเอียดของมัสตาดและจิงยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดได้ไม่คืบคั้น ส่วนประสิทธิภาพของกระเทียมผงบดแห้ง 1% ในมายองเนสต่อการยับยั้ง *S. Enteritidis* พบว่าสามารถลดจำนวน *S. Enteritidis* จากเชื้อเริ่มต้น 5 log CFU/g ลดลงเหลือ 3 log CFU/g ภายใน 3 วัน ในปีถัดมา Owen and Palombo (2007) ทำการสกัดพืชพื้นเมืองประเทศออสเตรเลีย 2 ชนิด ได้แก่ *Eremophila alternifolia* และ *E. duttonii* โดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดจาก *E. alternifolia* สามารถทำลาย *L. monocytogenes* ที่มีเซลล์เริ่มต้น 6 log CFU/ml ใน full cream milk และ skim milk ให้ค่า MBC (สารสกัด: ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ) เป็นสัดส่วน 1:10 และ 1:20 ตามลำดับ ขณะที่ *E. duttonii* สามารถทำลาย *L. monocytogenes* ที่มีเซลล์เริ่มต้น 6 log CFU/ml ใน Mueller-Hinton Broth ให้ค่า MBC (สารสกัด: ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ) เป็นสัดส่วน 1:1600

Rasooli and Abyaneh (2004) ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจาก ไทม์ (thyme) 2 ชนิด คือ *Thymus eriocalyx* และ *Thymus x-porlock* พบว่าสามารถทำลายเชื้อรา *A. parasiticus* ได้เป็นอย่างดี และสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินจากเชื้อราดังกล่าวได้ นอกจากนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคคือ *L. monocytogenes* ได้อีกด้วยโดยเฉพาะ *T. x-porlock* สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุดมีค่า MIC เท่ากับ 125 ppm คาดว่าน้ำมันหอมระเหยจากไทม์ 2 ชนิด มีกลไกทำลายผนังเซลล์และทำให้สารต่างๆในไซโทพลาสซึมผ่านออกนอกเซลล์ *L. monocytogenes* ต่อมานักวิจัยกลุ่มนี้พบว่า สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจาก *T. eriocalyx* และ *T. x-porlock* คือ Thymol, β -phellandrene และ cis-sabinene hydroxide (Rasooli et al., 2006)

ส่วน Mytle *et al.* (2006) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูต่อการยับยั้ง

L. monocytogenes 7 สายพันธุ์ในไส้กรอกที่เก็บรักษาอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 15°C เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่า ในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมน้ำมันหอมระเหยของกานพลู *L. monocytogenes* สามารถเจริญในไส้กรอกที่อุณหภูมิ 5 และ 15°C แต่เมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยกานพลู 2% ลงในไส้กรอก สามารถทำลายเซลล์ *L. monocytogenes* ที่สร้างการปนเปื้อนในอาหาร 2.7 log CFU/ml จึงเก็บที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 5°C เป็นเวลา 14 วัน และยับยั้งการเจริญของเซลล์ *L. monocytogenes* ที่อุณหภูมิการเก็บรักษา 15°C เป็นเวลา 7 วัน

Thongson *et al.* (2005) ศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยของเครื่องเทศไทยจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ ขิง กระชาย และขมิ้นชัน เพื่อยับยั้ง *L. monocytogenes* จำนวน 5 สายพันธุ์ และ *S. Typhimurium* DT104 จำนวน 4 สายพันธุ์พบว่า สารสกัดจากเครื่องเทศทั้ง 3 ชนิดที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *L. monocytogenes* ซึ่งให้ผลการทดลองเหมือนกับสารสกัดขิงและขมิ้นชันที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย แต่สารสกัดกระชายที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ความเข้มข้น 5-10% (v/v) สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ภายใน 24 ชั่วโมง ขณะที่น้ำมันหอมระเหยกระชาย ขิง และขมิ้นชันที่ผลิตในทางการค้ายับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ที่ความเข้มข้น ≤ 0.4 , ≤ 0.6 และ $\leq 10\%$ ตามลำดับ ในกรณีของ *Salmonella* spp. พบว่าสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากขิงและขมิ้นชันมีผลเล็กน้อยต่อการเจริญของ *Salmonella* spp. ยกเว้นน้ำมันหอมระเหยจากกระชาย $\leq 0.7\%$ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์เมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 0.2% ในน้ำแอปเปิ้ล สามารถลดจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml ของ *L. monocytogenes* Scott A และ *S. Typhimurium* DT104 ให้อยู่ในปริมาณที่ตรวจไม่พบภายใน 1-2 วัน

ในปี ค.ศ. 2006 Yano *et al.* ได้ศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดจากเครื่องเทศและสมุนไพร 18 ชนิดที่ปลูกในประเทศญี่ปุ่นพบว่า โหระพา กานพลู กระเทียม มะรุม สารระแห่น ออริกาโน โรสแมรี่ และไทม์สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* โดยกานพลูและสารระแห่นสามารถยับยั้งเชื้อชนิดนี้ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.125% และค่าสูงสุด Sandri *et al.* (2006) พบว่า น้ำมันหอมระเหยของ *Cunita galioides* ซึ่งเป็นเครื่องเทศพื้นเมืองประเทศบราซิลที่ความเข้มข้นในช่วง 0.04-2.50 mg/ml มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญ *Bacillus* sp., *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Aeromonass hydrophila*, *Enterococcus faecalis* และ Oonmetta-aree *et al.* (2006) ได้ศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดจากข่า ขิง ขมิ้นชันและกระชาย ต่อการยับยั้ง *S. aureus* 209P และ *E. coli* NIHJ JC-2 พบว่า สารสกัดข่ามีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด มีค่า MIC เท่ากับ 0.325 mg/ml และค่า MBC เท่ากับ 1.3

mg/ml เมื่อทดสอบด้วยวิธี broth dilution และจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ transmission electron microscopy (TEM) ทราบว่าสารสกัดจะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในและเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเซลล์ทำให้เกิดความเสียหายแก่ไซโทพลาสซึมทำให้ตกตะกอน นอกจากนี้ยังทำลายเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึม ทำให้สารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ไหลออกมาออกเซลล์ พบว่า D,L-1'-acetoxychavicol acetate เป็นสารมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของสารสกัดฆ่า

ประสิทธิภาพ EDTA ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์

ถึงแม้ว่าสารเคมีที่อยู่ในเครื่องเทศมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย แต่การที่จะนำสารเคมีที่อยู่ในเครื่องเทศมาใช้ในรูปแบบต่างๆ ในอาหารจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของอาหาร จากการทดลองพบว่าบางครั้งต้องใช้สารสกัดปริมาณมากจึงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่การเติมเครื่องเทศในปริมาณสูงจะทำให้อาหารมีกลิ่นฉุนรุนแรง และรสชาติเผ็ดร้อนมาก ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีการนำสารเคมีชนิดอื่นมารวมใช้กับสารสกัดจากเครื่องเทศ โดยที่สารเคมีนั้นต้องอนุญาตให้ใช้ได้ ในอาหาร และช่วยเสริมประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในขณะที่สารสกัดจากพืชยังคงมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ EDTA เป็นสารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่ได้มีการวิจัยว่ามีศักยภาพนำมาใช้ร่วมกับสารสกัดได้ในการยืดอายุการเก็บอาหาร จึงมีรายงานจากนักวิจัยที่ทำการศึกษาศาสตร์เคมีชนิดนี้ต่อสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งสรุปได้ดังนี้

ในปี ค.ศ. 1992 Sikes และ Whitfield เติม EDTA ร่วมกับ sucrose laurate และ butylated hydroxyanisole ในน้ำนมพร่องไขมัน (skim milk) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่เติมในน้ำนมที่เก็บไว้ที่ 20°C เป็นเวลา 20 วัน ในช่วงปีเดียวกัน Wang และ Shelef พบว่า เนื้อปลาสด (cod) ที่หั่นเป็นชิ้นแล้วเติมเชื้อ *L. monocytogenes* ในตัวปลา เมื่อนำไปจุ่มสารละลาย EDTA ที่ความเข้มข้น 15-25 mM สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ (Wang and Shelef, 1992)

ต่อมาปี ค.ศ. 1994 Payne *et al.* ได้ศึกษาผลของการใช้สารร่วมกันของ EDTA (0-25 mg/ml) หรือ apo-lactoferrin (Apo-Lf; 0-2.5 mg/ml) หรือร่วมกับไลโซไซม์ (0-200 µg/ml) ต่อความสามารถในการยับยั้ง *Pseudomonas fluorescens*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* ในน้ำนมพาสเจอร์ไรซ์ พบว่าทั้ง EDTA, Apo-Lf หรือไลโซไซม์ หรือการใช้ EDTA หรือ Apo-Lf ร่วมกับไลโซไซม์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญ *P. fluorescens* และ

S. Typhimurium ในขณะที่ EDTA มีสมบัติยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ได้ดีเมื่อทดลองใช้ EDTA ความเข้มข้น 2.5 mg/ml ร่วมกับไลโซไซม์ 100 µg/ml พบว่าสามารถทำลาย *L. monocytogenes* VPHI จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 7 log CFU/ml ลดลงเหลือประมาณ 2 log CFU/ml

ในปี ค.ศ. 2000 Gill and Holley ได้ศึกษาการใช้วัตถุเจือปนอาหารร่วมกัน 3 ชนิด ได้แก่ ไลโซไซม์ ไนซิน และ EDTA ในแฮมและโบโลญ่าที่บรรจุในถุงสุญญากาศเก็บที่อุณหภูมิ 8°C เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดก่อโรคพบว่า ไลโซไซม์ความเข้มข้น 500 mg/kg ต่อ ไนซินในสัดส่วน 1:3 และ EDTA ความเข้มข้น 500 mg/kg ที่เติมในตัวอย่างโบโลญ่าสามารถลดการเจริญ *L. monocytogenes* ในระหว่างการเก็บ 2 สัปดาห์ และช่วยลดการเจริญ *E. coli* O157:H7 ในแฮมเป็นเวลา 4 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถทำลายเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ *S. Typhimurium* ในแฮมมีปริมาณเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 เมื่อศึกษาผลของ EDTA ต่อการเจริญและรูปร่างของ *L. monocytogenes* Scott A ภายใต้สภาวะเครียดของอุณหภูมิ พบว่าที่อุณหภูมิ 28°C ความเข้มข้น EDTA 0.1 mM มีผลเล็กน้อยต่อการเจริญและรูปร่างของเชื้อ แต่ที่ความเข้มข้นของ EDTA เพิ่มขึ้นที่ 0.3 mM จะทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ (generation times) และระยะพักตัว (lag phase) เพิ่มขึ้น 6 เท่า นอกจากนี้แบคทีเรียยังสูญเสียความสามารถในการสร้างแฟลกเจลลาอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 แบคทีเรียก่อโรค

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* (ATCC 11778) และ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข *Listeria monocytogenes* สายพันธุ์ 101, 108, 310, Scott A และ V7 กับ *Salmonella* Typhimurium DT104 สายพันธุ์ 2380, 2486, 2576, 2582 อนุเคราะห์จากหน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเทนเนสซี ประเทศสหรัฐอเมริกา *Salmonella* Typhimurium (ATCC 13311) จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย *Escherichia coli* O157:H7 อนุเคราะห์จากภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 แบคทีเรียกรดแลคติก

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ PD 26 และ PD 110 และ *Lactobacillus cellobiosus* RE 33, PD 40, PD 55 และ PD 112 แยกได้จากนมเงินแป็งหมัก อนุเคราะห์จากภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 เชื้อรา

เชื้อแบคทีเรีย *Aspergillus flavus* (BCC 9167), *Aspergillus niger* (BCC 5772), *Aspergillus parasiticus* (BCC 5773) และ *Fusarium oxysporum* (BCC 5788) จากห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค, กรุงเทพฯ (BIOTECH Culture Collection; BCC)

2. เครื่องเทศ

เป็นเครื่องเทศตระกูลเหง้า กระจายพันธุ์กระจายเหลือียง (*Boesenbergia pandurata* Roxb.) จิงพันธุ์ขิงใหญ่หรือขิงหยวก (*Zingiber officinale* Roscoe.) ข่า (*Alpinia galanga* Linn.) และ ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เครื่องเทศทั้ง 4 ชนิดซื้อในรูปแบบสดจากตลาดสดสี่มุมเมือง รัชสิด ปทุมธานี

3. อาหารและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 3.1 Trypticase Soy Agar (TSA, ๒. Merck, Germany)
- 3.2 Trypticase Soy Agar ผสมกับ 0.6% (w/v) yeast extract (TSAYE, ๒. Merck, Germany)
- 3.3 De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar, ๒. Merck, Germany)
- 3.4 Malt Extract Agar (MEA, ๒. Merck, Germany)
- 3.5 Trypticase Soy Broth (TSB, ๒. Merck, Germany)
- 3.6 Trypticase Soy Broth ผสมกับ 0.6% (w/v) yeast extract (TSBYE, ๒. Merck, Germany)
- 3.7 De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS broth, ๒. Merck, Germany)
- 3.8 สารละลายเปปโตน 0.1% (w/v) (๒. Merck, Germany)
- 3.9 Chicken broth (๒. Campbell soup company, USA)

4. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 4.1 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator, Memmert model BE600, Germany)
- 4.2 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave, Tomy model ES-315, Japan)
- 4.3 เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Balance, Ohaus model GT 4100, USA)
- 4.4 เครื่องผสมสารในหลอดทดลอง (Vortex mixer, Vortex genie-2 model G-560E, USA)
- 4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Heraeus instrument, Denmark)
- 4.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert model SLM600, Germany)
- 4.7 ตู้อบแห้งลมร้อน (Hot air oven, Kan 1960 machines, Thailand)

- 4.8 ตู้ไมโครเวฟ (Microwave oven, Sharp model R-241, Japan)
- 4.9 เครื่องย่อยเซลล์จุลินทรีย์ (Soniprep, Sanyo, Japan)
- 4.10 เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator, Buchi, Switzerland)
- 4.11 ตู้ปลอดเชื้อแบบอากาศไหลเวียน (Laminar flow, Microflow, UK)
- 4.12 เครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ
(Shaker water bath, Heto CB60VS, Denmark)
- 4.13 เครื่องเขย่าสาร
(incubator, G24 enviromental incubator shaker New Brunswick, USA)
- 4.14 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์สำหรับไมโครไทเทอร์เพลท
(Microtiter plate spectrophotometer, Anthos Labtec Instruments, Austria)
- 4.15 ไมโครไทเทอร์เพลท (Microtiter plate, Nunc[™], Denmark)
- 4.16 ไมโครปิเปตขนาด 1-10 μ l (P10), ขนาด 20-100 μ l (P100) และ
ขนาด 200-1000 μ l (P1000) (Micropipette, Gilson, USA)
- 4.17 เครื่องปั่น (Blender, Warning, USA)
- 4.18 แท่งเหล็กเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm
(Cork borer, Japan)
- 4.19 นาฬิกาจับเวลา (Timer, Heatthrow Sciences, USA)
- 4.20 ชุดกรองและแผ่นกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตรตขนาด 0.45 μ m
(Syringe filter holder and cellulose acetate filter 0.45 μ m, Sartorius, Germany)
- 4.21 กระดาษกรองเบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 125 mm (Filter paper, Whatman, England)
- 4.22 ถังพลาสติกชนิดชิปทำจากวัสดุ polyethylene หรือ PE ขนาด 18 cm x 26 cm
- 4.23 เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ที่จำเป็น

5. สารเคมี

- 5.1 น้ำกลั่น
- 5.2 เอทานอล (Ethanol 99.8% (v/v), ป. Merck, Germany)
- 5.3 Ethylenedinitrilotetraacetic acid, disodium salt dehydrate (EDTA) ชื่อทางการค้า
Titriplex[®] III (ป. Merck, Germany)
- 5.4 สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodiumhypochlorite, ป. Sigma-Aldrich, USA)

วิธีการ

1. การเตรียมวัตถุดิบ

นำเครื่องเทศตระกูลเหง้าที่ต้องการศึกษาได้แก่ กระชาย จิง ข่า และขมิ้นชัน ตัดแต่งเอา ส่วนที่เน่าออก ล้างดินที่ติดเครื่องเทศเหล่านี้โดยการแช่ในน้ำประปาเป็นเวลา 10 นาที ล้างและ แปรงเบาๆ จากนั้นนำเครื่องเทศไปแช่ในสารละลายไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/ml}$ แช่เป็น เวลา 20 นาที สะเด็ดน้ำ หั่นเป็นชิ้นเล็กขนาดประมาณ 3 cm x 1 cm x 0.5 cm แล้วนำไปอบแห้งใน ตู้อบแห้งแบบลมร้อน ควบคุมอุณหภูมิที่ 50°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเครื่องเทศที่ผ่านการอบแห้ง เก็บในถุงซิปปริมาณ 200 g ต่อถุง ผนึกให้สนิทตามรอยซิปปและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -18°C ตลอดการ ทดลอง

2. การเตรียมสารสกัดหยาบจากเครื่องเทศ

2.1 สกัดด้วยวิธีเขย่าหรือ Conventional Extraction

นำเครื่องเทศที่ผ่านการเตรียมและทำแห้งจากข้อ 1 ซั่งตัวอย่าง 20 g ปั่นให้ละเอียดครั้ง ละ 10 g ด้วยเครื่องปั่น (blender) จากนั้นสุ่มซั่งเครื่องเทศ 10 กรัมใส่ใน erlenmeyer flask ขนาด 250 ml เติมเอทานอล 50% (v/v) ปริมาตร 100 ml จำนวน 2 flask จากนั้นนำเครื่องเทศที่บดแล้วไป สกัดด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 rpm ที่อุณหภูมิห้อง ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่าง ทั้งสองกรองเอากากหยาบออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำส่วนใสที่กรองได้เทรวมกันแล้วนำไป ระเหยด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45°C จนเหลือปริมาตร เล็กน้อย จากนั้นจึงใช้ฟาสเจอร์ปีเปตดูดสารละลายนั้น ปรับปริมาตรของสารสกัดด้วยเอทานอล 50% (v/v) ใน volumetric flask ขนาด 25 ml แล้วนำสารสกัด 25 ml เหยี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีแรง ศูนย์กลาง ที่ความเร็ว 1,258 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารสกัดส่วนใสกรองแบบปลอดเชื้อ ผ่านเมมเบรนขนาดรูกรอง 0.45 μm สารสกัดส่วนนี้ประมาณ 25 ml จะถูกบรรจุในขวด vial ขนาด 30 ml คือตัวอย่างสารสกัด 1 ซ้ำแล้วเก็บไว้ที่ -18°C ก่อนนำมาใช้ทดสอบต่อไป

2.2 สกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงหรือ Ultrasound Assisted Extraction

นำเครื่องเทศที่ผ่านการเตรียมและทำแห้งจากข้อ 1 ซึ่งตัวอย่าง 20 g ปั่นให้ละเอียดครั้งละ 10 g ด้วยเครื่องปั่น สุ่มซังเครื่องเทศ 10 กรัมใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 ml เติมน้ำเอทานอล 50% (v/v) ปริมาตร 100 ml ทำ 2 ตัวอย่าง จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปสกัดด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงที่กำเนิดความถี่ 23 kHz ความเข้ม 15 แอมพลิจูด (amplitude) เป็นเวลา 5 นาที โดยโพรบจุ่มลงไป 3 ส่วน 4 ของปริมาตรตัวอย่าง 100 ml สารละลายสกัดในบีกเกอร์นั้นจะถูกแช่ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็ง (4°C) เพื่อป้องกันความร้อนสะสมระหว่างการสกัด กรองเอากากเครื่องเทศออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำส่วนใสที่กรองได้จากตัวอย่างทั้งสองเทรวมกัน นำตัวอย่างไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 45°C จนตัวอย่างเหลือปริมาณเล็กน้อย ใช้ฟาสเจอร์ปีเปิดดูดสารละลายนั้นใส่ volumetric flask ขนาด 25 ml ปรับปริมาตรของสารสกัดด้วย เอทานอล 50% (v/v) เป็น 25 ml แล้วนำสารสกัดมาเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีแรงศูนย์กลางที่ความเร็ว 1,258 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารสกัดมากรองแบบปลอดเชื้อผ่านเมมเบรนขนาดรูกรอง 0.45 µm สารสกัดส่วนนี้ประมาณ 25 ml จะถูกบรรจุในขวด vial ขนาด 30 ml แล้วเก็บไว้ที่ -18°C ก่อนนำไปทดสอบต่อไป

3. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียชนิดทำให้อาหารเน่าเสียที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งสารสกัดเครื่องเทศประกอบด้วยแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus cereus* 1 สายพันธุ์, *Staphylococcus aureus* 1 สายพันธุ์และ *Listeria monocytogenes* 5 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ 101, 108, 310, Scott A และ V7) แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 จำนวน 4 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ 2380, 2486, 2576 และ 2582) และ *Salmonella* Typhimurium ชนิด wild type จำนวน 1 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ 13311) แบคทีเรียกรดแลคติกประกอบด้วย *Lactobacillus cellobiosus* 5 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ RE33, PD32, PD40, PD55 และ PD112) และ *L. plantarum* 2 สายพันธุ์ (ประกอบด้วยสายพันธุ์ PD26, และ PD110) รวมทั้งสิ้น 20 สายพันธุ์

อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยง *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) คือ 37°C ยกเว้น *B. cereus* เเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สำหรับ *L. monocytogenes* เเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth ที่

เติม 0.6% yeast extract (TSBYE) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วน *L. cellobiosus* กับ *L. plantarum* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

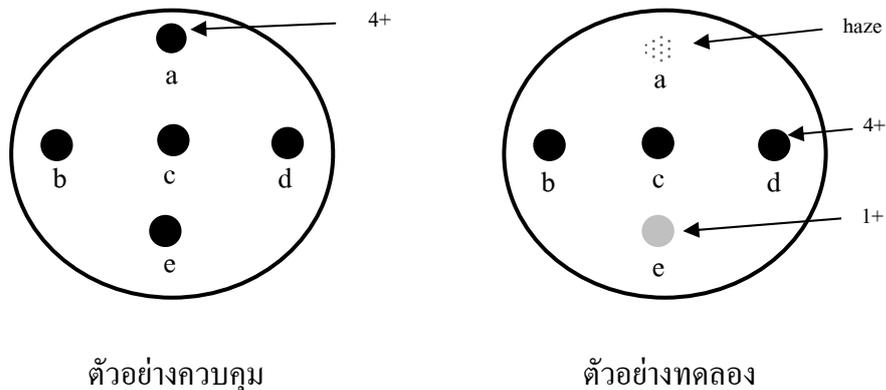
สายพันธุ์เชื้อราที่ทำการศึกษาร่วมประกอบด้วย *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus* และ *Fusarium oxysporum* ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 4 ชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar (MEA) ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 4 วัน

4. การหาความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibitory concentration; MIC) ด้วยวิธี agar dilution

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar dilution ดัดแปลงจากวิธีของ NCCLS (2002) เริ่มจากนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่หลอมเหลวและปรับอุณหภูมิประมาณ 50°C ปริมาตร 13 ml ผสมกับสารสกัดเครื่องเทศปริมาตร 2 ml ปรับระดับความเจือจางของสารสกัดตามต้องการเช่น ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-1 % (v/v) เป็นต้น ผสมให้เข้ากันแล้วทลงจานเพาะเชื้อ รอยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว นำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงและกำหนดอายุการเจริญเช่น 18 ชั่วโมง เจือจางเชื้อด้วยสารละลายที่เหมาะสม โดยปกติใช้สารละลายเปปโตน 0.1% ให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 7 log CFU/ml หยดเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ปริมาตร 1 µl ด้วยไมโครปิเปตให้เป็นวงกลม 5 ตำแหน่งๆ ละเชื้อ (spot inoculation) (ภาพที่ 5) ในหัวงกลมอยู่ในระยะห่างที่เท่ากันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ในการทดสอบนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด trypticase soy agar (TSA) ผสมกับสารสกัดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด trypticase soy agar ที่เติม 0.6% (w/v) yeast extract (TSAYE) ผสมกับสารสกัดใช้ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *L. monocytogenes* และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar ผสมสารสกัดใช้ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *L. cellobiosus* และ *L. plantarum*

หลังจากหยดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว จากนั้นรอเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ยกเว้น *B. cereus* เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหลังจากเพาะเชื้อ บันทึกการเจริญของแบคทีเรียจากความหนาแน่นของโคโลนี ให้คะแนนบวกลงหมายถึงเจริญได้น้อย (+) เริ่มจาก 1+, 2+, 3+ ถึงเจริญได้มากที่สุด 4+ เทียบกับตัวอย่างควบคุมคือเชื้อชนิดเดียวกันเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ไม่เติมสารสกัดภายในสถานะเดียวกัน (Thongson *et al.*, 2004; 2005) ในภาพที่ 5 โคโลนี b c และ d ในตัวอย่างทดลองคือโคโลนีของแบคทีเรียทดสอบกับสารสกัด มีความหนาแน่นของโคโลนีใกล้เคียงกับตัวอย่าง

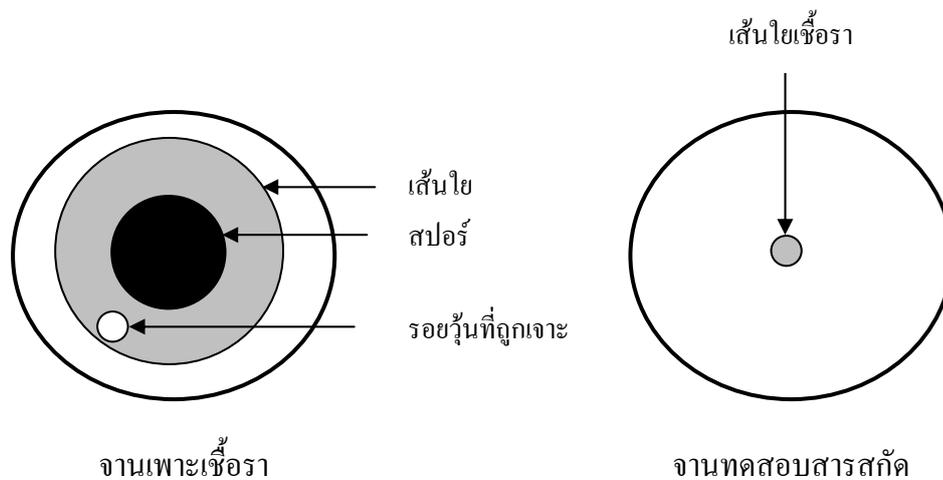
ควบคุม บันทึกลงผลเป็น 4+ คะแนนบวกลดลงเรื่อยๆเมื่อความหนาแน่นของโคโลนีลดลงดังเช่น ตัวอย่างทดลองโคโลนี e บันทึกลงผลเป็น 1+ เมื่อไม่พบการเจริญของแบคทีเรียหรือพบแบคทีเรียขึ้น เป็นจุดเล็กๆกระจายตัวกัน (haze) ให้คะแนนเป็นลบ (-) เช่น โคโลนี a ในตัวอย่างทดลอง



ภาพที่ 5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี agar dilution

สำหรับเชื้อรา เจาะเส้นใยของเชื้อราที่มีอายุ 4 วัน โดยปกคิบริเวณที่มีสปอร์จะมีสีเข้ม ให้ เจาะบริเวณเส้นใยเท่านั้นด้วยแท่งเหล็กเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเบอร์ 2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 mm ปลอดเชื้อ นำเส้นใยที่ถูกเจาะวางให้สัมผัสกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar (MEA) ที่ผสมสารสกัดเนื่องจากความเข้มข้นที่ต้องการเช่น ช่วงความเข้มข้น 5-10% (v/v) เป็นต้น วางเส้นใย เชื้อราที่ถูกเจาะตรงกลางจานเพาะจุลินทรีย์ 1 ตำแหน่งต่อจานเพาะจุลินทรีย์ (ภาพที่ 6) นำจานเพาะ เชื้อเหล่านั้นบรรจุในถุง PE เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C โดยเครื่องเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 7 วัน บันทึกการเจริญของเส้นใยรา บันทึกผลเป็น 4+, 3+, 2+, +1 และ - ตามลำดับ ทำนองเดียวกัน กับการตรวจสอบผลในกรณีแบคทีเรียข้างต้น สำหรับตัวอย่างควบคุมประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่ไม่เติมสารสกัดเครื่องเทศและเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

ในที่นี้ค่า MIC ของแบคทีเรียและเชื้อราคือค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่ผสมใน อาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียใน 48 ชั่วโมง (Wan *et al.*, 1998; Canillac and Mourey, 2001; Branen and Davidson, 2004) และเชื้อราภายใน 7 วัน ตามลำดับ ทำการทดลอง ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ



ภาพที่ 6 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศต่อการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี agar dilution

5. ทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศ EDTA และสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1 การหาค่า MIC ของ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* วิธี microbroth dilution

โดยวิธีนี้ใช้ทดสอบกับแบคทีเรีย 3 ชนิดคือ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* เริ่มจากนำไมโครไทเทอร์เพลท (ภาพที่ 7) ฆ่าเชื้อแล้ว (ขนาด 8.5 cm x 12.5 cm) มีจำนวนหลุม 96 หลุม แต่ละหลุมมีความจุ 300 μ l ทดสอบ 6 สภาวะ คือ

5.1.1 สภาวะที่ 1 เป็นสภาวะควบคุม ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียอายุ 18 ชั่วโมงมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเป็นสองเท่า (2 x สูตรความเข้มข้นอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ) ปริมาตร 150 μ l กับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 100 μ l

5.1.2 สภาวะทริทเมนต์ที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเครื่องเทศ ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเป็นสองเท่า ปริมาตร 150 μ l เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 μ l ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในปริมาตรทั้งหมดในแต่ละหลุมเช่น 0.1-1 และ 1-10% และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 μ l

5.1.3 สภาวะทริทเมนต์ที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของ EDTA ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า ปริมาตร 150 μ l และ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 μ l; ทดสอบในแบคทีเรียแกรมบวก) ปริมาตร 50 μ l และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 μ l

อนึ่งความเข้มข้นสูงสุดของ EDTA ที่ทดสอบคือ 2000 ppm ดังนั้นหากจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเจริญได้ในอาหารที่เติม EDTA ความเข้มข้น 2000 ppm แสดงว่าค่า MIC ต้องมีค่ามากกว่า 2000 ppm (หรือ > 2000 ppm)

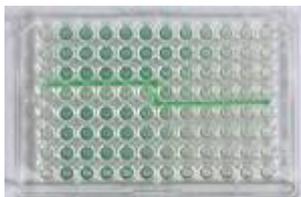
5.1.4 สภาวะทริทเมนต์ที่ 4 ศึกษาประสิทธิภาพร่วมระหว่าง EDTA และสารสกัดเครื่องเทศ ประกอบด้วยสารละลายแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเป็นสองเท่า ปริมาตร 150 μ l และ EDTA ที่ความเข้มข้นต่างๆ (จากข้อ 5.1.3) ปริมาตร 50 μ l และสารสกัดเครื่องเทศปริมาตร 50 μ l

5.1.5 สภาวะที่ 5 เป็นตัวอย่าง Blank (1) ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเป็นสองเท่า ปริมาตร 150 μ l กับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 100 μ l ไม่เติมเชื้อเพื่อขจัดค่ารบกวนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.1.6 สภาวะที่ 6 เป็นตัวอย่าง Blank (2) ประกอบด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นเป็นสองเท่า ปริมาตร 150 μ l น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 μ l และสารสกัดความเข้มข้นเดียวกับที่ทดลองในสภาวะทริทเมนต์ที่ 2 ปริมาตร 50 μ l แต่ไม่เติมเชื้อ เพื่อขจัดค่ารบกวนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อและสีของสารสกัด

หลังจากเตรียมการทดลองที่สภาวะต่างๆเรียบร้อยแล้ว นำไมโครไทเทอร์เพลทไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C สำหรับ *B. cereus* และ 37°C สำหรับ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไมโครไทเทอร์เพลทไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ vertical ความเร็ว 70 rpm เป็นเวลา 5 นาทีก่อนทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 630 nm (OD_{630nm}) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงสำหรับไมโครไทเทอร์เพลท (ภาพที่ 8) เพื่อหาค่า MIC ที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง), 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ สำหรับ minimum bactericidal concentration (MBC) หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำลายแบคทีเรียลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 99.9% หรือ 3 log CFU/ml นับจากเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml (Branen and Davidson,

2004) ทำได้โดยวิธี drop test เพื่อตรวจจำนวนเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ กำหนดว่าใน 1 หยดพบโคโลนีได้ไม่เกิน 13 โคโลนี ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดต่อไป



ภาพที่ 7 ไมโครไทเทอร์เพลท



ภาพที่ 8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงสำหรับไมโครไทเทอร์เพลท

สำหรับวิธีการหาค่า MIC จากการทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งด้วยวิธี microbroth dilution เป็นการนำค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm (OD_{630nm}) ของเชื้อแบคทีเรียชนิดหนึ่งจากสภาวะทริทเมนต์ที่เวลา 24 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับค่า OD_{630nm} เฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นที่ 0 ชั่วโมง ถ้าค่า OD_{630nm} ของแบคทีเรียชนิดนั้นในสภาวะทริทเมนต์ที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับหรือน้อยกว่าค่า OD_{630nm} เฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่ 0 ชั่วโมง ค่า OD_{630nm} นั้นเป็นค่า MIC กล่าวคือไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบ หรือสารสกัดนั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้นที่ทดสอบนั้นๆ จากการทดสอบพบว่าค่า OD_{630nm} เฉลี่ยที่ 0 ชั่วโมงของ *L. monocytogenes* เท่ากับหรือน้อยกว่า 0.01 ส่วนค่า OD_{630nm} เฉลี่ยที่ 0 ชั่วโมงของ *B. cereus* และ *S. aureus* เท่ากับหรือน้อยกว่า 0.02

วิธีการหาค่า OD_{630nm} ของเชื้อจากสภาวะทริทเมนต์ที่ 24 ชั่วโมง ทำโดยการนำค่า OD_{630nm} ของเชื้อจากสภาวะดังกล่าวหักออกด้วยปัจจัยที่רבวนค่า OD_{630nm} ของเชื้อ ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

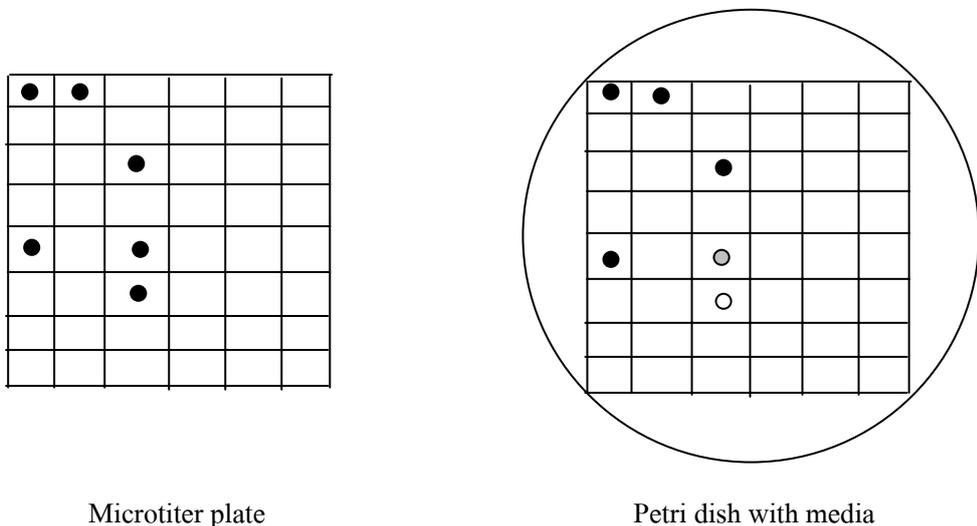
1. OD_{630nm} สภาวะควบคุม - OD_{630nm} สภาวะที่ 5 เป็นตัวอย่าง Blank (1) ค่าที่ได้คือค่าดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียทดสอบที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารสกัด แต่กำจัดค่ารบกวนการดูดกลืนคลื่นแสงของสื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว
2. OD_{630nm} สภาวะทริทเมนต์ที่ 2 - OD_{630nm} สภาวะที่ 6 เป็นตัวอย่าง Blank (2) ค่าที่ได้คือค่าดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียทดสอบที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดเครื่องเทศ แต่กำจัดค่ารบกวนการดูดกลืนคลื่นแสงของสื่ออาหารเลี้ยงเชื้อและสีของสารสกัดเครื่องเทศแล้ว
3. OD_{630nm} สภาวะทริทเมนต์ที่ 3 - OD_{630nm} สภาวะที่ 5 เป็นตัวอย่าง Blank (1) ค่าที่ได้คือค่าดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียทดสอบที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม EDTA แต่กำจัดค่ารบกวนการดูดกลืนคลื่นแสงของสื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว
4. OD_{630nm} สภาวะทริทเมนต์ที่ 4 - OD_{630nm} สภาวะที่ 6 เป็นตัวอย่าง Blank (2) ค่าที่ได้คือค่าดูดกลืนคลื่นแสงของแบคทีเรียทดสอบที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดเครื่องเทศและ EDTA แต่กำจัดค่ารบกวนการดูดกลืนคลื่นแสงของสื่ออาหารเลี้ยงเชื้อและสีของสารสกัดเครื่องเทศแล้ว

ขณะที่การหาค่า MIC ที่ 48 ชั่วโมงทำการคำนวณคล้ายกับการหาค่า MIC ที่ 24 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนจาก OD_{630nm} ของแบคทีเรียในสภาวะทริทเมนต์ที่ 24 ชั่วโมงเป็น 48 ชั่วโมง

5.2 การหาค่า MBC โดยวิธี drop test ร่วมกับ microbroth dilution

ค่า MBC ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี drop test ทำได้โดยนำไมโครปิเปตทวนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละหลุมให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน คูณเชื้อที่อยู่ในหลุมไมโครไทเทอร์เพลทในสภาวะ ทริทเมนต์แต่ละหลุมด้วยปริมาตร 1 μ l หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ติดารางบนฝาจานเพาะเชื้อด้านล่างเป็นช่องๆ ให้เท่ากับจำนวนหลุมในไมโครไทเทอร์เพลทที่จะตรวจสอบ (ภาพที่ 9) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบจะต้องเหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละชนิด รองนเชื้อแห้ง จากนั้นนำไป

เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C สำหรับ *L. monocytogenes* กับ *S. aureus* และที่อุณหภูมิ 30°C สำหรับ *B. cereus* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดนับโคโลนีของเชื้อในแต่ละช่องที่ได้เปิดหยดไว้ ภาพที่ 9 เป็นตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่ทดสอบด้วยเทคนิค drop test โดยวงกลมสีดำและสีเทาคือโคโลนีแบคทีเรียที่เจริญ สามารถต้านทานสารยับยั้งแบคทีเรีย ขณะที่วงกลมสีขาวคือไม่ปรากฏโคโลนีของแบคทีเรียแสดงถึงความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดร่วมกับ EDTA ที่ทำลายแบคทีเรีย กำหนดจำนวนเชื้อให้อยู่ในช่วง 0 ถึง 13 โคโลนี/หยด ให้เป็นสถานะ MBC หมายถึงความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำลายแบคทีเรียลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 99.9% หรือ 3 log CFU/ml นับจากเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml (Branen and Davidson, 2004)



ภาพที่ 9 การหาค่า MBC ด้วยเทคนิค drop test

5.3 การหาค่า FIC

เมื่อได้ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดเครื่องเทศกับ EDTA จากการทดลองข้อ 5.1 และ 5.2 สามารถหาค่า Fractional Inhibitory Concentration Index หรือ FIC_1 และ Fractional Bactericidal Concentration Index หรือ FBC_1 โดยการหาค่า FIC_1 สามารถคำนวณจาก

$$FIC_{EDTA} + FIC_{\text{สารสกัดเครื่องเทศ}} \quad \text{โดยที่}$$

$$FIC_{EDTA} = \frac{\text{MIC ของ EDTA ร่วมกับสารสกัดเครื่องเทศ}}{\text{MIC ของ EDTA}}$$

$$FIC_{\text{สารสกัดเครื่องเทศ}} = \frac{\text{MIC ของสารสกัดเครื่องเทศ ร่วมกับ EDTA}}{\text{MIC ของสารสกัดเครื่องเทศ}}$$

เมื่อรวมค่า $FIC_{EDTA} + FIC_{\text{สารสกัดเครื่องเทศ}}$ แล้วได้ค่าต่ำกว่าหนึ่ง สรุปว่า สารสองชนิดเมื่อรวมกันจะมีคุณสมบัติเป็นแบบ synergistic ถ้ารวมกันแล้วเท่ากับหนึ่งจะมีคุณสมบัติเป็นแบบ additive และถ้ารวมกันแล้วมากกว่าหนึ่งจะมีคุณสมบัติแบบ antagonistic

สำหรับการหาค่า FBC_1 สามารถคำนวณจาก $FBC_{EDTA} + FBC_{\text{สารสกัดเครื่องเทศ}}$ โดยที่ FBC_{EDTA} และ $FBC_{\text{สารสกัดเครื่องเทศ}}$ จะทำการคำนวณคล้ายกับ FIC_{EDTA} และ $FIC_{\text{สารสกัดเครื่องเทศ}}$ เพียงแต่นำค่า MBC มาคำนวณแทนค่า MIC และเมื่อได้ค่า FBC_1 แล้วทำการประเมินประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์ร่วมตามหลักเกณฑ์ที่ได้กล่าวมาข้างต้น

5.4 การหาค่า MIC ของ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* ด้วยวิธี agar dilution

ใช้ทดสอบกับ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* DT 104 อายุ 18 ชั่วโมง สาเหตุที่ใช้วิธี agar dilution สำหรับเชื้อทั้งสองชนิดนี้ เนื่องจากวิธี microbroth dilution ให้ OD_{630nm} ของเชื้อกลุ่มนี้เมื่อรวมกับค่า OD_{630nm} ของสารสกัดจะมีค่าเกินกว่า 1.00 (ค่า OD ที่ให้ผลการทดลองแม่นยำอยู่ระหว่าง 0.2-0.8) การหาประสิทธิภาพของสารยับยั้งร่วมจึงควรทดสอบด้วยวิธี agar dilution ดำเนินการทดลองคล้ายข้อ 4. เพียงแต่จะลดปริมาตรของตัวอย่างทดลองทั้งหมดเหลือเพียง 5 ml เนื่องจากปริมาณสารสกัดที่ทดสอบกับแบคทีเรียมีจำกัด

ปริมาตรที่ทำการทดลองทั้งหมด 5 ml ประกอบด้วยปริมาตรสารสกัดเท่ากับ 0.6 ml เตรียมให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 6-10% ของปริมาตรการทดลองทั้งหมด ปริมาตรสารละลาย EDTA เท่ากับ 2.2 ml เตรียมให้ได้ความเข้มข้นเป็น 250, 500, 1000, 1500, 2000 และ 3000 ppm ของปริมาตรการทดลองทั้งหมด (ทดสอบในแบคทีเรียแกรมลบ) และปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ความเข้มข้นเป็นสองเท่า เท่ากับ 2.2 ml

6. ประสิทธิภาพสารสกัดเครื่องเทศต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในซุปลั๊ก

6.1 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดต่อการเจริญ *L. monocytogenes* ในซุปลั๊ก

ปีเปตเชื้อ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ 101, ScottA และ V7 จากข้อ 3 สายพันธุ์ละ 3 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้เข้ากันให้ได้ความเข้มข้นเชื้อเริ่มต้นประมาณ $9 \log \text{CFU/ml}$ จากนั้นปีเปตเชื้อ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ผสม 1 ml ใส่ในสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 ml เจือจางเชื้อให้อยู่ในระดับ $5 \log \text{CFU/ml}$ ปีเปตเชื้อดังกล่าวมา 1 ml ผสมกับซุปลั๊ก 10 ml (ซุปลั๊กประกอบด้วยน้ำซุปลั๊ก 87.75% ไขมันไก่ 4.74% เกลือ 1.85% และโมโนโซเดียมกลูตาเมต 0.41% pH 5.65) ตามด้วยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเย่าหรือคลื่นเสียงความถี่สูง เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1%, 2.5% และ 5% ในปริมาตรซุปลั๊กทั้งหมด 10 ml ตามลำดับ

ตัวอย่างการเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดกระชายในซุปลั๊กมีดังนี้ สารสกัดความเข้มข้น 1% ประกอบด้วย ซุปลั๊กปริมาตร 8.90 ml เชื้อผสมปริมาตร 1.00 ml และสารสกัดปริมาตร 0.10 ml, สารสกัดความเข้มข้น 2.5% ประกอบด้วย ซุปลั๊กปริมาตร 8.75 ml เชื้อผสมปริมาตร 1.00 ml และสารสกัดปริมาตร 0.25 ml และสารสกัดความเข้มข้น 5% ประกอบด้วย ซุปลั๊กปริมาตร 8.50 ml เชื้อผสมปริมาตร 1.00 ml และสารสกัดปริมาตร 0.50 ml

ทำการสุ่มตัวอย่างตรวจการเจริญของแบคทีเรียที่ชั่วโมงเริ่มต้น (0), 3, 6, 9, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง โดยเจือจางความเข้มข้นเชื้อให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม จากนั้น spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวน *L. monocytogenes* และบันทึกผลการทดลอง สำหรับความเข้มข้นสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเย่าหรือใช้คลื่นเสียงความถี่สูงจะทดสอบกับเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ 2.5%, 5% และ 7.5% ในปริมาตรซุปลั๊กทั้งหมด 10 ml ตามลำดับ

6.2 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดต่อการเจริญ *S. Typhimurium* ในซุปลั๊ก

ดำเนินการทดสอบคล้ายคลึงกับข้อ 6.1 แต่ทดสอบด้วย *S. Typhimurium* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 2380, 2576 และ 13311 และสารสกัดกระชายหรือสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเย่าและคลื่น

เสี่ยงความถี่สูง ที่ความเข้มข้น 6%, 8% และ 10% ตรวจสอบการเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSA

7. ประสิทธิภาพของ EDTA ร่วมกับสารสกัดกระชายต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในซูปไก่

7.1 ทดสอบประสิทธิภาพของ EDTA ร่วมกับสารสกัดกระชายต่อยับยั้งการเจริญ

L. monocytogenes ในซูปไก่

ปิเปตเชื้อ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ 101, ScottA และ V7 จากข้อ 3 สายพันธุ์ละ 3 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้เข้ากันให้ได้เชื้อปริมาณตั้งต้น 9 log CFU/ml ปิเปตเชื้อ *L. monocytogenes* ที่ผสมกันมา 1 ml ใส่ในสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 ml เจือจางเชื้อให้อยู่ในระดับ 5 log CFU/ml ปิเปตเชื้อดังกล่าวมา 1 ml ผสมกับซูปไก่ตามด้วยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงปริมาณ 0.50 ml (ความเข้มข้น 5%) แล้วจึงเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 250 หรือ 1000 ppm ในปริมาตรทั้งหมด 10 ml

ตัวอย่างการเตรียมความเข้มข้นของสารสกัดกระชายร่วมกับความเข้มข้นของ EDTA ในซูปไก่ มีดังนี้ ตัวอย่างสารสกัดกระชายความเข้มข้น 5% ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 250 ppm ประกอบด้วย ซูปไก่ปริมาตร 8.25 ml เชื้อผสมปริมาตร 1 ml สารสกัดปริมาตร 0.50 ml และ EDTA ความเข้มข้น 10000 ppm ปริมาตร 0.25 ml ส่วนตัวอย่างสารสกัดกระชายความเข้มข้น 5% ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 1000 ppm ประกอบด้วย ซูปไก่ปริมาตร 7.50 ml เชื้อผสมปริมาตร 1 ml สารสกัดปริมาตร 0.50 ml และ EDTA ความเข้มข้น 10000 ppm ปริมาตร 1.00 ml

ทำการสุ่มตัวอย่าง ที่ชั่วโมงเริ่มต้น (0), 3, 6, 9, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง แล้วเจือจางความเข้มข้นเชื้อให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม จากนั้น spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวน *L. monocytogenes* และบันทึกผลการทดลอง

7.2 ทดสอบประสิทธิภาพของ EDTA ร่วมกับสารสกัดกระชายต่อการยับยั้งการเจริญ S. Typhimurium ในซูปไก่

ปีเปตเชื้อ *S. Typhimurium* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 2380, 2576 ซึ่งเป็น DT104 และ 13311 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ wild type จากข้อ 3 สายพันธุ์ละ 3 ml ใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ผสมเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้เข้ากันให้ได้เชื้อปริมาณตั้งต้น 9 log CFU/ml ปีเปตเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ผสมกัน มา 1 ml ใส่ในสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 ml เจือจางเชื้อให้อยู่ในระดับ 5 log CFU/ml ปีเปตเชื้อดังกล่าวมา 1 ml ผสมกับซูปไก่ ตามด้วยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียง ความถี่สูง ปริมาตร 1.00 ml (ความเข้มข้น 10%) แล้วจึงเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 250 หรือ 1000 ppm ในปริมาตรทั้งหมด 10 ml

ทำการสุ่มตัวอย่าง ที่ชั่วโมงเริ่มต้น(0), 3, 6, 9, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง แล้วเจือจางความเข้มข้นเชื้อให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม จากนั้น spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวน *S. Typhimurium* และบันทึกผลการทดลอง

8. สถานที่และระยะเวลาทำวิจัย

8.1 สถานที่ทำการทดลอง

8.1.1 ห้องวิจัย 2414 และ 2411 ตึกอุตสาหกรรมเกษตร 2 ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

8.1.2 ห้องปฏิบัติการกลางคณะอุตสาหกรรมเกษตร ตึกอุตสาหกรรมเกษตร 2

8.1.3 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์สารพิษเชื้อรา ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

8.2 ระยะเวลาที่ทำวิจัย

เริ่มตั้งแต่ธันวาคม 2547 สิ้นสุด พฤศจิกายน 2549

ผลและวิจารณ์

1. ประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

1.1 เปรียบเทียบวิธีการสกัด

สารสกัดเครื่องเทศจากพืชตระกูลเหง้าได้แก่ กระชาย จิง ข่า และขมิ้นชัน ที่สกัดด้วยเอทานอล 50% (v/v) เป็นตัวทำละลาย โดยวิธีเขย่าและวิธีคลื่นเสียงความถี่สูง สารสกัดที่เตรียมได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยแสดงด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญหรือ MIC ด้วยวิธี agar dilution จุลินทรีย์ที่ทดสอบแบ่งเป็น แบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกได้แก่ *B. cereus* 1 สายพันธุ์, *S. aureus* 1 สายพันธุ์ และ *L. monocytogenes* 5 สายพันธุ์ แบคทีเรียก่อโรคแกรมลบได้แก่ *E. coli* O157:H7 1 สายพันธุ์ *S. Typhimurium* DT104 4 สายพันธุ์ และ *S. Typhimurium* ชนิด wild type 1 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังทดสอบกับแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ได้แก่แบคทีเรียกรดแลคติก ประกอบด้วย *L. plantarum* จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *L. cellobiosus* จำนวน 4 สายพันธุ์ และสุดท้ายทดสอบกับเชื้อราที่มักพบในอาหาร บางชนิดสามารถสร้างสารพิษได้แก่ *A. flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus* และ *F. oxysporum* ทำการเจือจางความเข้มข้นของสารสกัดเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิด ให้เหมาะสมและผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้อยู่ระหว่าง 0.1-10% (v/v) บันทึกค่า MIC ที่ 48 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรียและ 7 วันสำหรับเชื้อรา

ผลการทดสอบประสิทธิภาพวิธีสกัดเครื่องเทศต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแสดงด้วยค่า MIC ในตารางที่ 7 พบว่า สารสกัดกระชายและจิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกได้แก่ *B. cereus* 1 สายพันธุ์, *S. aureus* 1 สายพันธุ์ และ *L. monocytogenes* 5 สายพันธุ์ จะให้ค่า MIC ใกล้เคียงกับค่า MIC ที่ได้จากสารสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ตัวอย่างเช่น สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มนี้ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.1-0.3% (v/v) ขณะที่สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.3-0.5% (v/v) ส่วนสารสกัดข่าและขมิ้นชันจากวิธีเขย่าและการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงให้ค่า MIC แตกต่างกัน โดยเฉพาะสารสกัดขมิ้นชันที่ได้จากการสกัดแบบเขย่าทดสอบกับ *L. monocytogenes* ให้ค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดขมิ้นชันที่ได้จากการสกัดแบบคลื่นเสียงความถี่สูงถึง 10 เท่า แต่สารสกัดข่าที่

สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มเดียวกันจะให้ค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดฆ่าที่สกัดด้วยวิธีเขย่าประมาณ 1-2 เท่า

ตารางที่ 7 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดหรือ MIC (% , v/v) ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค ทดสอบด้วยวิธี agar dilution

จุลินทรีย์ทดสอบ	ค่า MIC (% , v/v)							
	วิธีสกัดแบบเขย่า				วิธีสกัดแบบคลื่นเสียงความถี่สูง			
	กระชาย	ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน	กระชาย	ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน
<i>B. cereus</i>	0.1 ^a	0.4	6	1	0.3	0.7	0.9	4
<i>S. aureus</i>	0.3	2	7	3	0.5	3	3	6
<i>L. monocytogenes</i>								
101	0.2	1	6	0.4	0.3	3	3	10
108	0.2	1	5	0.9	0.3	3	3	10
310	0.2	2	4	0.8	0.3	3	3	10
Scott A	0.2	2	4	0.8	0.3	3	3	10
V7	0.2	2	5	0.8	0.3	3	3	10
<i>E. coli</i> O157:H7								
	9	8	9	8	10	9	>10	>10
<i>S. Typhimurium</i>								
2380	10	8	10	10	9	9	>10	>10
2486	8	8	10	8	9	9	>10	>10
2576	6	7	9	8	9	9	>10	>10
2582	7	8	10	8	9	9	>10	>10
13311	10	8	10	8	10	10	>10	>10

หมายเหตุ -^a คือ ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพวิธีสกัดเครื่องเทศต่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* DT104 4 สายพันธุ์และชนิด wild type 1 สายพันธุ์ พบว่าให้ผลไปแนวทางเดียวกันกับการทดสอบต่อแบคทีเรียแกรมบวก คือสารสกัดจากกระชายและขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ใกล้เคียงสารสกัดเครื่องเทศที่สกัดด้วยคลื่น

เสียงความถี่สูง ตัวอย่างเช่น สารสกัดขิงจากวิธีสกัดแบบเขย่าและวิธีสกัดแบบคลื่นเสียงความถี่สูง ทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มนี้ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 7-8% (v/v) และ 9-10% (v/v) ตามลำดับ

กลไกการสกัดเครื่องเทศด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิมจะประกอบด้วย กระบวนการ 2 ขั้นตอนได้แก่ ขั้นตอนแรก พืชเครื่องเทศจะดูดสารละลายเข้าไปในตัวเซลล์ทำให้เซลล์ พืชมีการบวม ขั้นตอนที่สอง จะเกิดการถ่ายเทสารต่างๆภายในเซลล์พืชที่ละลายได้ในตัวทำละลาย ด้วยกระบวนการแพร่และออสโมซิส ขณะที่การใช้คลื่นเสียงความถี่สูงจะเกิด cavitation ซึ่งจะทำให้ช่องว่างที่อยู่ในผนังเซลล์พืชมีการขยายขนาดใหญ่ คาดว่าทำให้ตัวทำละลายที่ใช้สกัดจะเข้าสู่ เซลล์พืชได้ง่าย เร็ว และส่งผลให้การเคลื่อนที่ของสารประกอบต่างๆ ในเซลล์พืชแพร่ออกมาได้เร็ว ขึ้น ดังนั้นการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจึงใช้เวลาสั้นกว่าการสกัดแบบเขย่า ด้วยเหตุนี้คาดว่า การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจึงให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าวิธีสกัดแบบเขย่า (Vinatoru, 2001; Velickovic *et al.*, 2006; Hemwimol *et al.*, 2006)

แต่ในกรณีของสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทดสอบกับแบคทีเรีย แกรมบวกกลับให้ค่า MIC สูงกว่าสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธีเขย่าถึง 10 เท่า คาดว่าเกิดจากการ สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจะทำให้เกิด cavitation สารมีฤทธิ์จากการสกัดขมิ้นชันอาจไวต่อ ออกซิเจนในฟองอากาศจากกระบวนการนี้ จึงลดประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในสารสกัด ขมิ้นชัน (Mason *et al.*, 1996)

โดยสรุปประสิทธิภาพของสารสกัดจากเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิดที่สกัดด้วยวิธีเขย่าแสดง โดยค่า MIC ทดสอบกับจุลินทรีย์ก่อโรค มีแนวโน้มให้ค่า MIC ต่ำกว่าสารสกัดเครื่องเทศที่สกัด ด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูง แต่อย่างไรก็ตามค่า MIC ของทั้งสองวิธีนี้มีค่าแตกต่างกันไม่มาก ประกอบกับการสกัดเครื่องเทศด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงใช้เวลาสกัดสารเร็วกว่าการสกัดด้วยวิธีเขย่า เนื่องจากการสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงใช้เวลาเพียง 5 นาที ขณะที่การสกัดด้วยวิธีเขย่าใช้ เวลานานถึง 24 ชั่วโมง ดังนั้นการสกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงจึงมีประสิทธิภาพดีกว่าการสกัด ด้วยวิธีเขย่าสอดคล้องกับการทดลองของ Thongsong *et al.* (2004) พบว่าการสกัดเครื่องเทศด้วยตัว ทำละลายโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีกว่าวิธีเขย่า โดย การสกัดขิงที่ใช้ไอโซโพรพานอลเป็นตัวทำละลาย สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง เพื่อยับยั้ง *L. monocytogenes* สายพันธุ์ Scott A พบว่าให้ค่า MIC เท่ากันคือ 4% (v/v) อย่างไรก็ตาม การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงมีข้อด้อยคือ เครื่องมือมีราคาสูงและระหว่างการสกัดคลื่นเสียง ความถี่สูงทำให้เกิดฟองอากาศจำนวนมากและเกิดความแตกต่างความดัน ต่อมาเมื่อความดันเปลี่ยนแปลง

จึงเกิดความร้อนสะสมขึ้น ความร้อนในตัวทำลายอาจส่งผลทำให้สารมีฤทธิ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง

เมื่อทดสอบความสามารถการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ *L. plantarum* 2 สายพันธุ์และ *L. cellobiosus* 4 สายพันธุ์ด้วยสารสกัดเครื่องเทศที่ใช้เอทานอล 50% (v/v) เป็นตัวทำละลายสกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง แสดงในตารางที่ 8 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้เมื่อทดสอบกับสารสกัดกระชาย จิงและขมิ้นชัน ที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและวิธีสกัดแบบคลื่นเสียงความถี่สูงมีแนวโน้มส่วนใหญ่ให้ค่า MIC ใกล้เคียงกัน แต่มีค่าค่อนข้างสูงอยู่ในช่วง 6 ถึงมากกว่า 10% (v/v)

ตารางที่ 8 ค่า MIC (% , v/v) ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อแบคทีเรียกรดแลคติก ทดสอบด้วยวิธี agar dilution

จุลินทรีย์ทดสอบ	ค่า MIC (% , v/v)							
	วิธีสกัดแบบเขย่า				วิธีสกัดแบบคลื่นเสียงความถี่สูง			
	กระชาย	จิง	ข่า	ขมิ้นชัน	กระชาย	จิง	ข่า	ขมิ้นชัน
<i>L. plantarum</i>								
PD26	10 ^a	>10	8	10	10	10	10	>10
PD110	10	10	>10	10	10	10	10	>10
<i>L. cellobiosus</i>								
RE33	10	6	>10	10	>10	10	10	>10
PD40	10	10	>10	10	10	10	10	>10
PD55	10	>10	>10	10	>10	>10	10	>10
PD112	10	10	>10	10	10	>10	10	>10

หมายเหตุ - ^a คือ ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

เช่นเดียวกันกับการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงต่อการยับยั้งเชื้อรา (ตารางที่ 9) พบว่าค่า MIC โดยทั่วไปของเชื้อราจะมีค่า MIC สูง ตั้งแต่ 8 ถึงมากกว่า 10% (v/v) กล่าวคือ แบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อราที่มีความ

ต้านทานต่อสารสกัดเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิดสูง ไม่ว่าจะเป็นสารสกัดจากการสกัดด้วยวิธีเขย่าหรือด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง

ตารางที่ 9 ค่า MIC (% , v/v) ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อเชื้อรา ทดสอบด้วยวิธี agar dilution

จุลินทรีย์ทดสอบ	ค่า MIC (% , v/v)							
	วิธีสกัดแบบเขย่า				วิธีสกัดแบบคลื่นเสียงความถี่สูง			
	กระชาย	ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน	กระชาย	ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน
<i>A. flavus</i>	>10 ^a	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
<i>A. niger</i>	8	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
<i>A. parasiticus</i>	10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
<i>F. oxysporum</i>	>10	9	>10	>10	10	10	9	>10

หมายเหตุ - ^a คือ ค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.2 เปรียบเทียบสารสกัดจากกระชาย ขิง ข่า และขมิ้นชัน

ตารางที่ 7 ที่กล่าวมาได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ กระชาย ขิง ข่า และขมิ้นชันต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ด้วยวิธีทดสอบ agar dilution พบว่า สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกประกอบด้วย *B. cereus* *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้ดีที่สุด ให้ค่า MIC ที่อยู่ในช่วง 0.1-0.5% (v/v) ขณะที่สารสกัดขิงมี ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์รองลงมา ค่า MIC ทดสอบกับแบคทีเรียกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 0.4-3% (v/v) สารสกัดจากข่าต้องให้ความเข้มข้นมากกว่า 3% (v/v) จึงสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดที่ใช้ ทดสอบดังกล่าวได้ ส่วนสารสกัดจากขมิ้นชันด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงให้ผลในการยับยั้ง แบคทีเรียกลุ่มนี้ที่ความเข้มข้นมากกว่า 4% (v/v) ซึ่งมีประสิทธิภาพยับยั้งจุลินทรีย์ต่ำสุด ในกรณี แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* DT104 และ *S. Typhimurium* พบว่า สารสกัดกระชายและสารสกัดขิงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบใกล้เคียงกัน โดยสารสกัดจากพืชทั้ง 2 ชนิด ไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีเขย่าหรือด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ให้ค่า MIC ทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มนี้อยู่ในช่วง 6-10% (v/v) ในขณะที่สารสกัดข่าและขมิ้นชันสกัด จากทั้ง 2 วิธีให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 8 ถึงมากกว่า 10% (v/v)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิดที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและสกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบว่า แบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกส่วนใหญ่มีแนวโน้มไวต่อสารสกัดทั้ง 4 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบ สารสกัดเครื่องเทศที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบได้แก่ กระชายและขิง รองลงมาได้แก่ ขมิ้นชันและข่า ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Thongsong *et al.* (2004) และ (2005) ที่รายงานว่าสารสกัดจากกระชายมีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียที่ดีที่สุด แต่ Oonmetta-aree *et al.* (2006) ให้ผลการทดลองที่ตรงข้ามกันโดยพบว่าสารสกัดข่าที่สกัดแบบแช่ขุ่ย (maceration) มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกดีที่สุดโดยเฉพาะ *S. aureus* 209P ให้ค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดข่าทดสอบด้วยวิธี broth dilution เท่ากับ 0.325 และ 1.3 mg/ml ตามลำดับ สาเหตุที่ Oonmetta-aree *et al.* ให้ผลการทดลองที่แตกต่างจากผลการทดลองนี้อาจเป็นเพราะวิธีการสกัด ความเข้มข้นของตัวทำละลาย และวิธีทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ต่างกัน

ในกรณีแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อราพบว่า สารสกัดกระชายและสารสกัดขิงสามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อราได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ข่าและขมิ้นชัน อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของสารสกัดจากเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 6 ถึงมากกว่า 10% (v/v) และเชื้อราต้องการคือ 8 ถึงมากกว่า 10% (v/v) จึงจะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ได้หมด

ค่า MIC แสดงถึงสมบัติการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยค่า MIC ของจุลินทรีย์ชนิดใดที่มีค่าสูง หมายความว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นมีความต้านทานต่อสารสกัดสูง ในทางตรงกันข้ามจุลินทรีย์ใดให้ค่า MIC ต่ำแสดงว่าจุลินทรีย์ชนิดนั้นไวต่อสารสกัด หรืออีกนัยหนึ่งคือสารสกัดชนิดนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี ในสารสกัดเครื่องเทศแต่ละชนิดจะประกอบด้วยสารเคมีชนิดต่างๆรวมกัน ได้แก่ ฟีนอลและอนุพันธ์ฟีนอล เอสเทอร์ของกรดอ่อน กรดไขมัน เทอร์พีน อัลคิล เป็นต้น มีรายงานว่าสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์โดยจะไปมีผลต่อตำแหน่งและกลไกภายในเซลล์แบคทีเรีย ทำให้ผนังเซลล์เสียรูปร่าง หรือทำให้เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมเกิดการฉีกขาดแล้วทำให้เกิดการรั่วของสารในไซโตพลาสซึม หรือทำให้เกิดตกตะกอนของสารในไซโตพลาสซึม หรือรบกวนการทำงานของ proton motive force หรือรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างพลังงานและสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ (Burt, 2004) จากผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Burt (2004) Thongsong *et al.* (2004, 2005) และ Oonmetta-aree *et al.* (2006) พบว่าโดยส่วนใหญ่สารสกัดเครื่องเทศจะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

ในการทดลองนี้พบว่า *L. monocytogenes* ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีค่า MIC ของสารสกัด กระจายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าหรือวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงเป็น 0.2 และ 0.3% (v/v) ตามลำดับ ซึ่งมีความ ต้านทานต่ำกว่าต่อสารสกัดกระจายที่ทดสอบกับ *S. Typhimurium* DT104 4 สายพันธุ์ให้ค่า MIC เท่ากับ 6-10% (v/v) การที่ความไวของแบคทีเรียต่างชนิดกันต่อการทดสอบสารสกัดชนิดเดียวกัน นี้ต่างกันมาก อธิบายได้ว่าการใช้เอทานอล 50% (v/v) ที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดเครื่องเทศ นั้นสามารถสกัดสารมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic) ออกมามาก ประกอบกับความแตกต่างขององค์ประกอบผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและลบ ทำให้สารมี ฤทธิ์ดังกล่าวจะถูกป้องกันโดยลิพอพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) ของเยื่อหุ้มเซลล์ ชั้นนอกโดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) สูง ดังนั้นเยื่อหุ้ม เซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบจึงสามารถสกัดกั้นโมเลกุลของสารสกัดเครื่องเทศที่มีสมบัติ ชอบน้ำไม่ให้ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้โดยง่าย ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียแกรมลบจึงต้านทานต่อสารสกัด เครื่องเทศในที่นี้ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งผนังเซลล์ไม่มี LPS (Cloete, 2003; Thongson *et al.*, 2005; Oonmetta-aree *et al.*, 2006) ซึ่งคาดว่ายอมให้สารมีฤทธิ์ที่มีสมบัติชอบน้ำผ่านเซลล์เข้า ไปได้จึงต้านทานต่อสารสกัดกระจายได้ต่ำ

จากการศึกษาสารสำคัญของเครื่องเทศกระจาย ขิง ข่า และขมิ้นชันที่มีผลยับยั้งการ เจริญของจุลินทรีย์ Thongson *et al.* (2005) รายงานว่า geraniol, 1,8-cineole และ methylcinnamate อาจเป็นสารสำคัญในสารสกัดกระจายที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* และ *S. Typhimurium* ส่วนสารออกฤทธิ์ในน้ำมันหอมระเหยจึงจะมีสารสำคัญ zingiberene, curcumene และ farnesene (Tainter and Grenis, 2001) สารที่ให้รสเผ็ดร้อนในขิงจะมี gingerol, shogaol, paradol และ zingerone (Shukla and Singh, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนจากขิง สามารถยับยั้งเชื้อรา *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum* และ *Mycosphaerella arachidicola* ได้อีกด้วย (Wang and Ng, 2005) ขณะที่สารสกัดข่าที่ใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายมี D, L-1'- acetoxychavicol acetate เป็นองค์ประกอบหลักที่สามารถยับยั้งจำพวกยีสต์และแบคทีเรียแกรมบวก โดยเฉพาะ *S. aureus* (Oonmetta-aree *et al.*, 2006) ส่วนขมิ้นชันจะพบสารสำคัญได้แก่ ar-turmerone, zingiberene, turmerone และ curlone เป็นองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหย นอกจากนี้ยังพบสารที่ไม่ใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นสารที่ให้สีและจะมีองค์ประกอบฟีนอลเป็น จำนวนมากได้แก่ curcumin, demethoxycurcumin และ bidehydroxycurcumin (Jayaprakasha *et al.*, 2005)

ส่วนการที่แบคทีเรียกรดแลคติกต้านทานต่อสารสกัดกระชาย จิง ข่า และขมิ้นชันสูง อาจมีกลไกบางอย่างต้านทานต่อสารสกัดซึ่ง Cloete (2003) ได้ตั้งสมมติฐานว่าจุลินทรีย์บางชนิด อาจสร้างสารบางอย่างออกมาเพื่อป้องกันสารยับยั้งเข้าไปในเซลล์ หรือพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรีย จะทำอันตรกิริยา (interaction) กับสารสกัดให้มีสภาพเป็นกลาง ทำให้สารสกัดมีคุณสมบัติ เปลี่ยนไป หรือหากสารสกัดเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ เอนไซม์ภายในเซลล์จะเปลี่ยนโครงสร้างเคมีของ สารสกัดทำให้ไม่สามารถทำลายเซลล์จุลินทรีย์ได้ หรือในบางกรณีเซลล์แบคทีเรียจะมีการปรับ พันธุกรรมให้มีความต้านทานต่อสารสกัดสูงขึ้นก็อาจเป็นไปได้

ในกรณีของเชื้อราที่สัมผัสสารสกัดจากเครื่องเทศ มีรายงานว่าสารสกัดนั้นจะทำลาย เยื่อหุ้มพลาสมา เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย สารต่างๆในไซโตพลาสซึมออกนอกเซลล์และเกิดการพับ ของเยื่อหุ้มนิวเคลียสทำให้เซลล์เชื้อราถูกทำลายในที่สุด (Rasooli *et al.*, 2006) แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบเคมีของสารสกัด ถ้าโครงสร้างสารสกัดมีหมู่ hydroxyl หรือ aldehyde จะมีแนวโน้มที่ จะแสดงคุณสมบัติทำลายจุลินทรีย์ เนื่องจากหมู่ hydroxyl จะสร้างพันธะกับบริเวณ active ของ เอนไซม์ของเชื้อรา ทำให้เอนไซม์ไม่ทำงานหรือหมู่ aldehyde จะทำปฏิกิริยากับ sulfhydryl ทำให้ ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (Hirasa *et al.*, 1998)

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศกระชาย จิง ข่า และขมิ้นชัน ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อรา พบว่าสารสกัดเครื่องเทศเหล่านี้ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคให้ค่า MIC ที่ต่ำกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อรามาก มีศักยภาพ ในการประยุกต์ใช้ในอาหารได้ ดังนั้นในการทดลองส่วนต่อไปจะศึกษาเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคซึ่ง แบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อความปลอดภัยในอาหารเป็นอย่างมาก ต่อไปเป็นการศึกษาวิธี ทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยเทคนิค microbroth dilution ซึ่งเทคนิคนี้ทำการทดลอง ใช้เวลาในการทดสอบเร็วกว่า ทำได้หลายตัวอย่างในคราวเดียวกัน แต่ละตัวอย่างสามารถทำได้ หลายความเข้มข้น และยังประหยัดสารสกัดที่ทำการทดสอบเนื่องจากใช้ในปริมาณน้อย

2. การทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเครื่องเทศโดยวิธี microbroth dilution

การทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี microbroth dilution จะทำการทดสอบ ในไมโครไทเทอร์เพลทที่มีหลุมทดลอง 96 หลุม แต่ละหลุมมีปริมาตร 300 μl ปริมาตรที่ทำการ ทดลองจริง 250 μl ประกอบด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 μl สารสกัดเครื่องเทศความ

เข้มข้น 0.1-10% (v/v) ปริมาตร 50 μ l และแบคทีเรียทดสอบอายุ 18 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 150 μ l เพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ทำการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ชั่วโมง 0, 24 และ 48 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์สำหรับไมโครโทเทอร์เพลทเพื่อหาค่า MIC ในขณะที่การทดสอบ ด้วยวิธี agar dilution แบบดั้งเดิมเป็นการหยดแบคทีเรียทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีการ ผสมสารสกัดเครื่องเทศความเข้มข้น 0.1-10% (v/v) นำไปเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C หาค่า MIC โดยการตรวจความหนาแน่นของโคโลนีที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 พบว่าค่า MIC จากวิธี microbroth dilution ส่วนใหญ่จะ ให้ใกล้เคียงกับวิธี agar dilution เช่น ค่า MIC ของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าทดสอบกับ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ด้วยวิธี microbroth dilution จะให้ค่า MIC เท่ากับ 0.1% (v/v) ขณะที่ MIC ของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าทดสอบแบบที่เรียกกลุ่มเดียวกันด้วย วิธี agar dilution จะให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.1-0.3% (v/v) หรือสารสกัดขิงที่สกัดด้วยคลื่นเสียง ความถี่สูงทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกด้วยวิธี microbroth dilution จะให้ค่า MIC ระหว่าง 0.8-3% (v/v) ซึ่งใกล้เคียงกับสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเดียวกันแต่ทดสอบด้วยวิธี agar dilution จะ ให้ค่า MIC ระหว่าง 0.7-3% (v/v) อย่างไรก็ตามพบว่า สารสกัดเครื่องเทศที่สกัดด้วยวิธีเดียวกันแต่ ทดสอบสารสกัดนั้นด้วยวิธี microbroth dilution บางข้อมูลจะให้ค่า MIC ที่สูงกว่าวิธีทดสอบ agar dilution เช่น สารสกัดข่าที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทดสอบกับแบคทีเรีย *B. cereus* ด้วยวิธี microbroth dilution จะให้ค่า MIC เท่ากับ 6% (v/v) ซึ่งสูงกว่าวิธีทดสอบ agar dilution ที่ให้ค่า MIC เท่ากับ 0.9% (v/v) หรือสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทดสอบกับ *S. aureus* ทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution จะให้ค่า MIC เท่ากับ 10% (v/v) สูงกว่าวิธีทดสอบ agar dilution ให้ค่า MIC เท่ากับ 6% (v/v)

ตารางที่ 10 ค่า MIC (% , v/v) ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกที่ทดสอบด้วยวิธี agar และ microbroth dilution

วิธีสกัด	จุลินทรีย์ทดสอบ	ค่า MIC (% , v/v)							
		Agar dilution				Microbroth dilution			
		กระชาย	ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน	กระชาย	ขิง	ข่า	ขมิ้นชัน
แบบเขย่า	<i>B. cereus</i>	0.1	0.4	6	1	0.1	0.6	3	0.4
	<i>S. aureus</i>	0.3	2	7	3	0.1	5	3	1
	<i>L. monocytogenes</i>								
	101	0.2	1	6	0.4	0.1	2	4	0.4
	108	0.2	1	5	0.9	0.1	1	4	0.4
	310	0.2	2	4	0.8	0.1	2	4	0.6
	Scott A	0.2	2	4	0.8	0.1	5	4	0.6
	V7	0.2	2	5	0.8	0.1	3	6	0.4
แบบคลื่นเสียงความถี่สูง	<i>B. cereus</i>	0.3	0.7	0.9	4	0.5	0.8	6	6
	<i>S. aureus</i>	0.5	3	3	6	4	3	2	10
	<i>L. monocytogenes</i>								
	101	0.3	3	3	10	0.4	2	4	8
	108	0.3	3	3	10	0.4	2	4	6
	310	0.3	3	3	10	0.4	3	4	10
	Scott A	0.3	3	3	10	0.4	3	8	>10
	V7	0.3	3	3	10	0.4	3	8	10

ดังได้กล่าวมาแล้วว่าวิธีทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้งสองวิธีคือวิธี agar dilution และ microbroth dilution เป็นวิธีทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อสารต้านจุลินทรีย์แบบปริมาณวิเคราะห์ เป็นวิธีทดสอบว่าแบคทีเรียจะสามารถต้านทานต่อสารออกฤทธิ์ในสารสกัดเครื่องเทศที่ความเข้มข้นน้อยสุดเท่าใดจึงยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แสดงด้วยค่า MIC จากการทดลองนี้พบว่า โดยส่วนใหญ่ค่า MIC ที่ทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution จะให้ค่าใกล้เคียงกับวิธี agar dilution หมายความว่าวิธีทดสอบสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 2 วิธีมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน แต่การทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution สามารถประหยัดสารสกัดเครื่องเทศที่ใช้ทดสอบ ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เนื่องจากใช้สารสกัดในปริมาณต่ำกว่าการทดสอบด้วยวิธี agar dilution นอกจากนี้สามารถทดสอบกับแบคทีเรียได้หลายชนิดในเวลาเดียวกัน ดังนั้นวิธี microbroth dilution จึงสะดวกและรวดเร็วมาก ทำให้วิธีนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าการทดสอบด้วยวิธี

agar dilution แต่อย่างไรก็ตามวิธี microbroth dilution มีข้อจำกัดคือไม่สามารถทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือสารสกัดเครื่องเทศที่มีสีเข้มมาก หรือในกรณีของน้ำมันหอมระเหย พบว่าโดยวิธี microbroth dilution อาจมีการแยกชั้นของน้ำมันและอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ผลการทดลองผิดพลาดได้ควรใช้วิธี agar dilution ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจะผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเข้ากันดีกว่า (Davidson *et al.*, 2005)

3. ประสิทธิภาพของ EDTA ร่วมกับสารสกัดจากเครื่องเทศต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์ในสารสกัดเครื่องเทศต่อแบคทีเรียก่อโรค จะต้องใช้ความเข้มข้นสูงในการยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียกลุ่มนี้ ในทางปฏิบัติจึงควรใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเครื่องเทศให้น้อยที่สุดเท่าที่จำเป็น หากนำสารสกัดไปใช้ในอาหารโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ ชีวอายุการเก็บอาหาร ปริมาณมากอาจส่งผลกระทบต่อการยอมรับของผู้บริโภคในด้านกลิ่นรส ของอาหาร ดังนั้นการหาสารเคมีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพเมื่อใช้ร่วมกับสารสกัดเครื่องเทศในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เป็นอีกวิธีที่ลดปริมาณการใช้สารสกัดเครื่องเทศให้ต่ำลง เช่น การเติมด้วยสาร Ethylenediaminetetraacetic acid หรือ EDTA

3.1 ประสิทธิภาพของ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพ EDTA ในแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมบวกได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution ที่ระดับความเข้มข้นของ EDTA 6 ระดับ คือ 125, 250, 500, 1000, 1500 และ 2000 ppm จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของ EDTA ต่อแบคทีเรียก่อโรคอยู่ในรูปของค่า MIC ด้วยการวัดค่า OD และหาค่า MBC ด้วยวิธี drop plate สำหรับแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมลบได้แก่ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* DT104 จะถูกทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจาก EDTA ด้วยวิธี agar dilution ความเข้มข้นของ EDTA ที่ทดสอบกับแบคทีเรียแกรมลบใช้ 7 ระดับ คือ 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 และ 3000 ppm

ผลการทดลองในส่วนนี้แสดงในตารางที่ 11 พบว่า แบคทีเรียแกรมบวกส่วนใหญ่ ได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ 101 108 และ V7 จะมีความต้านทานต่อ EDTA ต่ำ มี MIC เท่ากับ 500 ppm และค่า MBC ของเชื้อเหล่านี้อยู่ในช่วง 500-2000 ppm ในบรรดาแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมดพบว่า *L. monocytogenes* สายพันธุ์ 310 และ Scott A จะมีความต้านทานต่อ EDTA สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 1000 ppm สำหรับแบคทีเรียแกรมลบโดยภาพรวมมีแนวโน้มต้านทานต่อ EDTA สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยค่า MIC อยู่ในช่วง 3000 ppm ยกเว้น *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* DT104 สายพันธุ์ 2486 ที่มีค่า MIC เท่ากับ 2000 และ 1000 ตามลำดับ

ตารางที่ 11 ค่า MIC และ MBC ของ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค

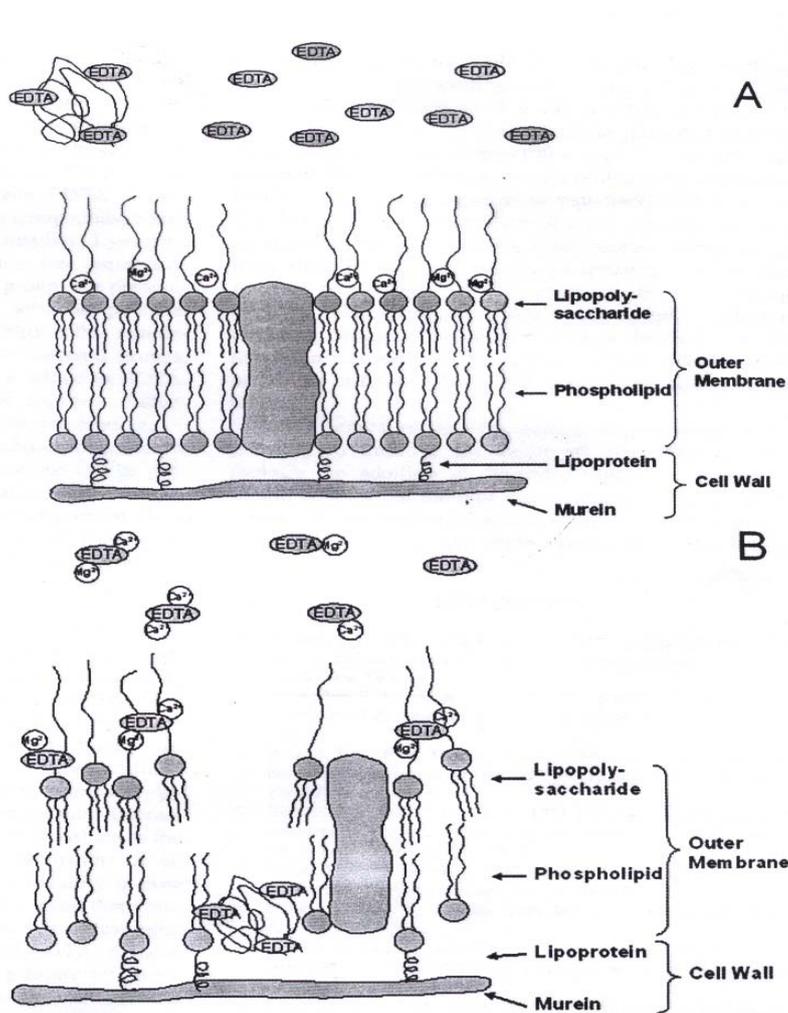
dilution assay	จุลินทรีย์ทดสอบ	ปริมาณ EDTA (ppm)	
		MIC	MBC
microbroth	<i>B. cereus</i>	500	500
	<i>S. aureus</i>	500	1000
	<i>L. monocytogenes</i>		
	101	500	2000
	108	500	2000
	301	1000	>2000
	Scott A	1000	2000
	V7	500	1500
agar	<i>E. coli</i> O157:H7	2000	ND
	<i>S. Typhimurium</i>		
	2380	3000	ND
	2486	1000	ND
	2576	3000	ND
	2582	3000	ND
	13311	3000	ND

หมายเหตุ

- ND หมายถึง not determine

Branen and Davidson (2004) ศึกษาปริมาณการใช้ EDTA เพื่อยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า EDTA สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *L. monocytogenes* Scott A และ 19115 ได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าคือมีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 250 ppm และมากกว่า 500 ppm ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ *E. coli* O157:H7, *E. coli* O104:H21, *S. Enteritidis* สายพันธุ์ 13076 และ *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ 13525 มีค่า MIC ต่ำกว่าเช่นกัน คืออยู่ในช่วง 1250-5000 ppm และมีค่า MBC สูงมากคือมากกว่า 10000 ppm ปัจจัยต่างๆ ได้แก่ วิธีการทดลองที่ต่างกัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้นการทดลอง ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ความแตกต่างของสายพันธุ์ จุลินทรีย์ที่ทดลอง ระยะเวลาที่เชื้อสัมผัส EDTA ความเข้มข้นของสารยับยั้ง จุลินทรีย์ที่ทดสอบ หรือระยะเวลาการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้ค่า MIC และ MBC ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน แตกต่างกันได้

สำหรับกลไกของ EDTA ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ Boland *et al.* (2004) ได้อธิบายว่า EDTA ไปจับกับโลหะประจุสองบวก ได้แก่ แคลเซียม (Ca^{2+}) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก โดยปกติแคลเซียมและแมกนีเซียมทำหน้าที่เชื่อมโครงสร้างกับประจุลบในการสร้างสะพานเกลือ (salt bridge) เพื่อที่จะไปรวมกับพอลิแซ็กคาไรด์ของเมมเบรนแบคทีเรียแกรมลบ ด้วยเหตุนี้แคลเซียมจึงเป็นส่วนสำคัญที่สร้างความเสถียรให้แก่ LPS ซึ่งอยู่ในส่วนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นการที่ EDTA จับกับแคลเซียมจึงไปรบกวนกระบวนการรักษาสมดุลของอเล็กตรอนระหว่างประจุบวกกับประจุลบส่งผลให้ชั้น LPS ไม่เสถียร โดยเฉพาะในแบคทีเรียแกรมลบ เช่นเดียวกันแมกนีเซียมจะรักษาความเสถียรของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกโดยจับกับโครงสร้างที่ซับซ้อนระหว่าง LPS กับโปรตีนอย่างแน่นหนา หากแมกนีเซียมถูกจับโดย EDTA จะทำให้โครงสร้างที่ซับซ้อนระหว่าง LPS กับโปรตีนมีอันตรกิริยา (interaction) กับของเหลวในสิ่งแวดล้อมต่ำลง และสุดท้ายจะทำให้ LPS กับโปรตีนส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเกิดการตกตะกอน (Boland *et al.*, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 10 สำหรับกลไกของ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า EDTA น่าจะไปมีผลต่อการทำลาย เปปติโดไกลแคน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถควบคุมของเหลวผ่านเข้าและออกเซลล์ได้ จะทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Okereke *et al.*, 1990)



ภาพที่ 10 กลไกการทำงานของ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (A) EDTA ก่อนจับกับ Ca^{+2} และ Mg^{+2} (B) EDTA จับกับ Ca^{+2} และ Mg^{+2} ทำให้ส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกเสียสภาพ

ที่มา: Boland *et al.* (2004)

เนื่องจาก EDTA มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Boland *et al.*, 2003; Zaika *et al.*, 2003) จากผลการทดลองในส่วนนี้ทำให้ทราบความสามารถในการต้านทานของแบคทีเรียชนิดก่อโรคที่นำมาทดสอบนี้ต่อ EDTA ดังนั้นในการทดลองต่อไปเป็นการศึกษาผลการใช้ EDTA ร่วมกับสารสกัดเครื่องเทศทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคเพื่อลดปริมาณสารสกัดที่ใช้ หรือเพื่อศึกษาว่ามีแนวโน้มของการแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์เป็นเช่นใด โดยคาดว่าหากให้ผลในทาง synergism จะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ ในอาหาร

3.2 ประสิทธิภาพของ EDTA ร่วมกับสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาประสิทธิภาพการใช้สารยับยั้งร่วมกันระหว่างสารสกัดเครื่องเทศกับ EDTA เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยค่า MIC และ MBC สำหรับแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E. coli* O157:H7 *S. Typhimurium* DT104 4 สายพันธุ์ และ *S. Typhimurium* ชนิด wild type 1 สายพันธุ์ ทุกสายพันธุ์ทดสอบด้วยวิธี agar dilution แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยค่า MIC

ตารางที่ 12 เป็นการศึกษาการใช้สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเย่าและด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA เพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบว่า แบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเย่าร่วมกับ EDTA จะให้ค่า MIC ร่วมกันเท่ากับ 0.1% + 0 ppm สำหรับการใส่สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* พบว่า จากผลงานทดลองที่ผ่านมาข้างต้นการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกจะใช้ความเข้มข้นร่วมกันต่ำลง ตัวอย่างเช่น *L. monocytogenes* สายพันธุ์ 101 ประสิทธิภาพการยับยั้งสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเพียงอย่างเดียวมีค่า MIC เท่ากับ 0.4% (v/v) และความเข้มข้นของ EDTA ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้มีค่า MIC เท่ากับ 500 ppm แต่เมื่อมีการใส่สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA ช่วยลดความเข้มข้นของสารสกัดกระชายและ EDTA ในการทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.1% + 125 ppm ขณะที่การใช้สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA เพื่อยับยั้ง *B. cereus* พบว่าสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงเพียงอย่างเดียวสามารถยับยั้ง *B. cereus* ที่ค่า MIC เท่ากับ 0.5% (v/v) ส่วนความเข้มข้นของ EDTA สามารถยับยั้ง *B. cereus* ที่ค่า MIC เท่ากับ 500 ppm แต่เมื่อมีการใส่สารยับยั้งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด แม้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดกระชายลดลงแต่ EDTA ยังคงความเข้มข้นที่ 500 ppm มีค่า MIC คือ 0.1% + 500 ppm แสดงว่าที่ความเข้มข้นของสารร่วมกันที่สามารถยับยั้ง *B. cereus* เป็นอิทธิพลมาจากความเข้มข้นของ EDTA มากกว่าสารสกัดกระชาย

ตารางที่ 12 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ทดสอบ	dilution assay	สารสกัดกระชาย (%) + EDTA (ppm)			
		สกัดด้วยการเขย่า		สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	
		MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. cereus</i>	microbroth	0.1+0	0.1+1000	0.1+500	0.4+125
<i>S. aureus</i>	microbroth	0.1+0	0.1+1000	1+250	1+500
<i>L. monocytogenes</i>	microbroth	0.1+0	0.1+500	0.1+125	0.1+1000
101					
108	microbroth	0.1+0	0.1+500	0.1+1000	0.1+1000
310	microbroth	0.1+0	0.1+500	0.1+1000	0.1+1500
Scott A	microbroth	0.1+0	0.1+500	0.1+1000	0.7+500
V7	microbroth	0.1+0	0.1+500	0.1+1000	0.1+1000
<i>E. coli</i> O157:H7	agar	2+1000	ND	2+1000 6+500	ND
<i>S. Typhimurium</i>	agar	4+1000	ND	2+1000 6+500	ND
2380					
2486	agar	2+1000 8+500	ND	6+500	ND
2576	agar	2+2000 4+1000	ND	2+1000 6+500	ND
2582	agar	2+2000 6+1000	ND	4+1000 6+500	ND
13311	agar	2+2000 6+1000	ND	6+500	ND

หมายเหตุ

- ND หมายถึง not determine

ประสิทธิภาพของสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* แสดงในตารางที่ 12 พบว่า เมื่อมีการใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกันทำให้ลดความเข้มข้นของสารสกัดกระชายและลดความเข้มข้นของ EDTA หรืออีกนัยหนึ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้เช่นกัน เช่น สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเย่าเพียงอย่างเดียวสามารถยับยั้ง *E. coli* O157:H7 ที่ค่า MIC เท่ากับ 9 และเชื้อชนิดนี้มีความต้านทานต่อ EDTA ให้ค่า MIC เท่ากับ 2000 ppm แต่เมื่อใช้สารทั้ง 2 ชนิด จะมีค่า MIC ร่วมกันเป็น 2% + 1000 ppm หรือสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* สายพันธุ์ 13311 ที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ส่วน EDTA สามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดนี้ที่ค่า MIC มากกว่า 2000 แต่เมื่อมีการใช้สารยับยั้งร่วมกันจะมีค่า MIC เป็น 6% + 500 ppm

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบว่า การใช้สารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ช่วยลดปริมาณการใช้สารสกัดกระชายเมื่อต้องการทำลายแบคทีเรียแกรมลบ และมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเมื่อสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA เมื่อต้องการทำลายแบคทีเรียแกรมบวก

ประสิทธิภาพการใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างสารสกัดขิงกับ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แสดงในตารางที่ 13 พบว่า ค่าความต้านทานของสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA ทดสอบกับแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ Scott A ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบว่าทำให้เกิดโรคระบาดในอาหาร ให้ค่า MIC สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกด้วยกัน ให้ค่า MIC เท่ากับ 2% + 500 ppm

ตารางที่ 13 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขิงร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ทดสอบ	dilution assay	สารสกัดขิง (%) + EDTA (ppm)			
		สกัดด้วยการเขย่า		สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	
		MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. cereus</i>	microbroth	0.4+125	0.4+125	0.6+125	0.6+125
<i>S. aureus</i>	microbroth	1+500	1+1000	0.6+500	0.6+500
<i>L. monocytogenes</i>	microbroth	2+125	0.1+1000	1+500	1+1000
101			2+500		
108	microbroth	1+125	1+1000	1+500	0.5+1000
					2+500
310	microbroth	0.1+500	1+1000	2+500	2+1000
Scott A	microbroth	2+500	0.5+1000	2+500	0.5+1000
			4+500		
V7	microbroth	2+250	0.5+1000	2+125	0.5+1000
					2+250
<i>E. coli</i> O157:H7	agar	2+1000	ND	2+1000	ND
		6+500		6+500	
<i>S. Typhimurium</i>	agar	2+2000	ND	2+1000	ND
2380					
2486	agar	2+500	ND	4+500	ND
2576	agar	2+2000	ND	2+1000	ND
		6+1000		6+500	
2582	agar	4+1000	ND	2+1000	ND
		6+500		6+500	
13311	agar	6+500	ND	6+2000	ND

หมายเหตุ

- ND หมายถึง not determine

สำหรับการศึกษาประสิทธิภาพสารยับยั้งร่วมกันระหว่างจึงร่วมกับ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แสดงในตารางที่ 13 พบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีแนวโน้มถูกยับยั้งและทำลายที่ความเข้มข้นของสารสกัดจึงและ EDTA สูงกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *S. Typhimurium* สายพันธุ์ 2576 มีความต้านทานต่อสารสกัดจึงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าร่วมกับ EDTA สูงมาก มีค่า MIC เท่ากับ 2% + 2000 ppm และ 6% + 1000 ppm เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *E. coli* O157:H7 มีความต้านทานต่อสารสกัดจึงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA ให้ค่า MIC เท่ากับ 2% + 1000 ppm และ 6% + 500 ppm

เป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้สารยับยั้งร่วมกันระหว่างสารสกัดจึงกับ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* พบว่า ใช้สารสกัดจึงในปริมาณที่ต่ำลงอาจเป็นอิทธิพลจาก EDTA เช่น จากการทดลองที่ผ่านมาสารสกัดจึงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* ด้วยค่า MIC เท่ากับ 5% (v/v) และเชื้อชนิดนี้ถูกยับยั้งด้วย EDTA ที่ค่า MIC เท่ากับ 500 ppm แต่ในที่นี้เมื่อมีการใช้สารยับยั้งร่วมกันจะมีค่า MIC เท่ากับ 1% + 500 ppm ในขณะที่การใช้สารยับยั้งร่วมกันระหว่างสารสกัดจึงกับ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ มีแนวโน้มที่จะใช้สารสกัดและ EDTA ลดต่ำลงเป็นผลจากความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารทั้งสอง เช่น *S. Typhimurium* สายพันธุ์ 13311 มีความต้านทานต่อสารสกัดจึงที่สกัดด้วยวิธีเขย่า มีค่า MIC เท่ากับ 8% (v/v) และเชื้อนี้ถูกยับยั้งด้วย EDTA ที่ค่า MIC มากกว่า 2000 ppm แต่เมื่อมีการใช้สารยับยั้งร่วมกัน จะใช้สารสกัดจึงร่วมกับ EDTA ลดลงค่า MIC เท่ากับ 6% + 500 ppm

สำหรับการใช้สารสกัดฆ่าที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA เพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แสดงในตารางที่ 14 ส่วนใหญ่แบคทีเรียแกรมบวกและลบต่างมีความต้านทานต่อสารสกัดฆ่าแม้ว่าจะใช้ EDTA ร่วมด้วย พบว่าต้องใช้ปริมาณสูงตั้งแต่ 500-1000 ppm โดยทั่วไป *L. monocytogenes* ต้านทานต่อการยับยั้งของสารทั้งสองมากกว่า *S. aureus* และ *B. cereus* ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามยังลดปริมาณการใช้สารสกัดฆ่าเพื่อยับยั้งแบคทีเรียได้อย่างมาก ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ 101 มีค่า MBC เมื่อทดสอบกับสารสกัดฆ่าที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงและ EDTA เป็น 10% (v/v) และ 2000 ppm ตามลำดับ แต่เมื่อมีการใช้สารยับยั้งร่วมกันจะให้ค่า MBC ต่ำลงเป็น 2% + 1500 ppm ในทำนองเดียวกันแบคทีเรียแกรมลบโดยส่วนใหญ่ปริมาณการใช้สารสกัดฆ่าและ EDTA เพื่อยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบมีค่า MIC สูงกว่าในกรณีของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น แบคทีเรีย *S. Typhimurium* DT104 สายพันธุ์ 2380 มีค่า MIC ของสารสกัดฆ่าที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและ EDTA สูงเท่ากับ 10% และ 3000 ppm ตามลำดับ แต่

เมื่อมีการใช้สารยับยั้งร่วมกันจะทำให้ค่า MIC ต่ำลง โดยจะให้ค่า MIC 2 ค่าคือ 2% + 2000 ppm และ 4% + 1000 ppm

ตารางที่ 14 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดข่าร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ทดสอบ	dilution assay	สารสกัดข่า (%) + EDTA (ppm)			
		สกัดด้วยการเขย่า		สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	
		MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. cereus</i>	microbroth	2+125	2+250	2+125	2+125
<i>S. aureus</i>	microbroth	1+1000 3+125	4+1000	1+1000	1+1000
<i>L. monocytogenes</i>	microbroth	2+125	1+1000	2+125	2+1500
101					
108	microbroth	4+500	1+1000	3+500	2+1500
310	microbroth	1+1000	1+1000	2+1000 4+125	2+1500
Scott A	microbroth	1+1000	1+1000	2+500	2+1000
V7	microbroth	1+1000	1+1000	2+1000 8+250	2+1500
<i>E. coli</i> O157:H7	agar	2+2000	ND	2+2000	ND
<i>S. Typhimurium</i>	agar	2+2000 4+1000	ND	2+2000	ND
2380					
2486	agar	8+500	ND	2+1000	ND
2576	agar	2+2000 6+1000	ND	10+500	ND
2582	agar	6+500	ND	2+2000 10+1000	ND
13311	agar	2+2000	ND	2+2000	ND

หมายเหตุ

- ND หมายถึง not determine

ตารางที่ 14 ที่ได้กล่าวมาแล้วแสดงประสิทธิภาพสารยับยั้งร่วมกันระหว่างสารสกัดชา กับ EDTA ต่อแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า ส่วนใหญ่ต้องเพิ่มความเข้มข้นของ EDTA ที่ยับยั้งการ เจริญของแบคทีเรียแกรมบวกเมื่อใช้ร่วมกับสารสกัดชาเช่น สารสกัดชาที่สกัดแบบเขย่าสามารถ ยับยั้ง *L. monocytogenes* สายพันธุ์ V7 ที่ค่า MIC เท่ากับ 6% (v/v) ส่วน EDTA สามารถยับยั้ง แบคทีเรียชนิดนี้มีที่ค่า MIC เท่ากับ 500 ppm แต่เมื่อใช้สารทั้ง 2 ร่วมกันให้ค่า MIC ร่วมกันเท่ากับ 1% + 1000 ppm สาเหตุที่ใช้ความเข้มข้นของ EDTA สูงขึ้น คาดว่า EDTA มีอันตรกิริยากับ โลหะ ประจุบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในสารสกัดทำให้ต้องใช้ความเข้มข้นของ EDTA สูงขึ้น ซึ่ง Branen and Davidson (2004) พบว่าการใช้ EDTA จะช่วยเสริมประสิทธิภาพของไนซินในการ ยับยั้ง *L. monocytogenes* ที่ความเข้มข้นต่ำโดยใช้ EDTA และ ไนซินมีค่าเท่ากับ 7.8 และ 15.6 μg ตามลำดับ ซึ่งลดค่า MIC ของไนซินเพียงอย่างเดียวได้ถึง 50% อย่างไรก็ตามต่อมาได้เพิ่มความ เข้มข้นของ EDTA พบว่าไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไนซินเพิ่มขึ้น เข้าใจว่า EDTA อาจจะมีอันตรกิริยากับ โลหะประจุบวกในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะยับยั้งกิจกรรมไนซิน

ผลการทดสอบประสิทธิภาพสารยับยั้งร่วมกันระหว่างสารสกัดขมิ้นชันกับ EDTA ต่อ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แสดงในตารางที่ 15 พบว่าโดยส่วนใหญ่แบคทีเรียแกรมบวกมีค่า MIC ของสารสกัดขมิ้นชันและ EDTA ต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เช่นเดียวกับในกรณีของสารสกัด กระชาย จิง และข่า อย่างไรก็ตามพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชันเมื่อสกัดด้วยวิธีเขย่าใน การยับยั้ง *L. monocytogenes* ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อใช้ร่วมกับ EDTA เช่น สารสกัดขมิ้นที่สกัด ด้วยวิธีเขย่าร่วมกับ EDTA สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* สายพันธุ์ 101 ให้ค่า MIC ต่ำเท่ากับ 0.2% + 250 ppm ค่า MBC เท่ากับ 0.2% + 1000 ppm และ 0.4% + 500 ppm แต่ในกรณีสารสกัด ขมิ้นชันที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA กลับพบว่าให้ค่า MIC และ MBC ที่สูง ต้องการสารสกัดขมิ้นชันตั้งแต่ 2-6% (v/v) และ EDTA ความเข้มข้น 250 + 1000 ppm ในบรรดา *L. monocytogenes* ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ Scott A มีความต้านทานสูงสุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 10% + 125 ppm และมีค่า MBC เท่ากับ 8% + 1500 ppm

ในกรณีของแบคทีเรียแกรมลบ พบว่า ประสิทธิภาพสารสกัดขมิ้นชันด้วยวิธีเขย่า ร่วมกับ EDTA ต่อการยับยั้ง *S. Typhimurium* DT104 แต่ละสายพันธุ์มีค่าแตกต่างกันไป แต่ส่วน ใหญ่ต้องการความเข้มข้นของสารสกัดขมิ้นชัน 2-8% (v/v) และ EDTA ความเข้มข้น 1000-2000 ppm สายพันธุ์ 2582 มีค่า MIC สูงที่สุดเท่ากับ 8% + 1000 ppm และ MIC เท่ากับ 8% + 2000 ppm เมื่อใช้สารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและวิธีคลื่นเสียงความถี่สูง ตามลำดับ

ตารางที่ 15 ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดขมิ้นชันร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ทดสอบ	dilution assay	สารสกัดขมิ้นชัน (%) + EDTA (ppm)			
		สกัดด้วยวิธีเยาะ		สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	
		MIC	MBC	MIC	MBC
<i>B. cereus</i>	microbroth	2+250	2+250	4+250	4+250
<i>S. aureus</i>	microbroth	0.2+250	0.4+500 0.8+125	3+500	1+1000
<i>L. monocytogenes</i>	microbroth	0.2+250	0.2+1000 0.4+500	6+500	6+1000
101					
108	microbroth	0.4+125 0.2+500	0.2+500	6+250	4+1000 6+500
310	microbroth	0.6+500	0.2+500 0.6+250	2+500	2+1000
Scott A	microbroth	0.2+500	0.2+500 0.4+250	10+125	8+1500
V7	microbroth	0.2+500	0.2+500	8+250	2+1000
<i>E. coli</i> O157:H7	agar	2+1000	ND	2+2000	ND
<i>S. Typhimurium</i>	agar	4+1000	ND	2+2000	ND
2380					
2486	agar	2+500	ND	2+1000	ND
2576	agar	2+1000	ND	4+2000	ND
2582	agar	8+1000	ND	8+2000	ND
13311	agar	2+2000	ND	8+2000	ND

หมายเหตุ

- ND หมายถึง not determine

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธีเขย่าเพียงอย่างเดียว สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* สายพันธุ์ 2380 ที่ค่า MIC เท่ากับ 10% (v/v) และ EDTA สามารถยับยั้งเชื้อนี้ที่ค่า MIC มากกว่า 2000 ppm แต่เมื่อนำสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธีเขย่าร่วมกับ EDTA จะมีค่า MIC ร่วมกันเท่ากับ 4% + 1000 ppm การใช้ความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ลดลง คาดว่ามาจากการเสริมฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ร่วมกับ EDTA

สรุปการศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งร่วมกันระหว่างสารสกัดเครื่องเทศกับ EDTA แสดงในค่า FIC_1 และ FBC_1 เพื่อประเมินว่าเมื่อมีการใช้สารร่วมกันแล้วจะให้ผลออกมาแบบใดใน 3 ลักษณะ ได้แก่ เพิ่มฤทธิ์หรือ additive (FIC_1 หรือ $FBC_1 = 1$) เสริมฤทธิ์หรือ synergistic (FIC_1 หรือ $FBC_1 < 1$) และหักล้างฤทธิ์หรือ antagonistic (FIC_1 หรือ $FBC_1 > 1$) แสดงค่า FIC_1 หรือ FBC_1 ในตารางผนวกที่ 2 พบว่าการใช้สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าร่วมกับ EDTA จะเสริมฤทธิ์กันในการทำลาย *L. monocytogenes* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ขณะที่สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA จะเสริมฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกและยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดี (ตารางที่ 16)

ส่วนสารสกัดขิงที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับการใช้ EDTA (ตารางที่ 17) พบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดจะเสริมฤทธิ์การทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* และช่วยเสริมฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับสารสกัดข่าที่สกัดด้วยวิธีเขย่าร่วมกับการใช้ EDTA (ตารางที่ 18) จะช่วยเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้ง *S. Typhimurium* 4 สายพันธุ์และสารสกัดข่าที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับการใช้ EDTA แนวโน้มส่วนใหญ่จะเสริมฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ส่วนสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธีเขย่าร่วมกับการใช้ EDTA (ตารางที่ 19) จะช่วยกันเสริมฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการใช้สารยับยั้งร่วมกันระหว่างสารสกัดเครื่องเทศกับ EDTA (ตารางที่ 16-19) พบว่า แนวโน้มส่วนใหญ่ของสารสกัดเครื่องเทศได้แก่ กระชาย ขิง และข่า ที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและคลื่นเสียงความถี่สูงจะให้ผลเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ กล่าวคือ สามารถลดปริมาณการเติมสารสกัดลงได้ในขณะเดียวกันต้องใช้ EDTA ร่วมด้วยจึงจะให้ประสิทธิภาพดีในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และสารสกัดเครื่องเทศเหล่านี้จะให้ผลหักล้างฤทธิ์กันเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก ขณะที่ขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธีเขย่าจะเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แต่จะหักล้างฤทธิ์เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวก กล่าวคือ สารสกัดมีฤทธิ์

ในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี โดยส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพดีในปริมาณที่ต่ำ (1-3%) ไม่มีความจำเป็นต้องเติม EDTA ช่วย

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ทดสอบ	สารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA			
	สกัดด้วยวิธีเยาะ		สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	
	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁
<i>B. cereus</i>	-	ant. (2.05)	ant. (1.20)	syn. (0.82)
<i>S. aureus</i>	-	ant. (1.10)	syn. (0.75)	syn. (0.70)
<i>L. monocytogenes</i>				
101	-	syn. (0.39)	syn. (0.50)	syn. (0.64)
108	-	syn. (0.39)	ant. (2.25)	syn. (0.75)
310	-	syn. (<0.39)	ant. (1.25)	syn. (0.85)
Scott A	-	syn. (0.39)	ant. (1.25)	syn. (0.95)
V7	-	syn. (0.47)	ant. (2.25)	syn. (0.77)
<i>E. coli</i> O157:H7	syn. (0.72)	ND	syn. (0.70)	ND
<i>S. Typhimurium</i>				
2380	syn. (0.73)	ND	syn. (0.55)	ND
2486	ant. (1.25)	ND	ant. (1.17)	ND
2576	add. (1.00)	ND	syn. (0.55)	ND
2582	syn. (0.96)	ND	syn. (0.77)	ND
13311	syn. (0.87)	ND	syn. (0.77)	ND

หมายเหตุ

- ant. หมายถึง antagonistic
- add. หมายถึง additive
- syn. หมายถึง synergistic
- ND หมายถึง not determine
- < หมายถึง น้อยกว่า

ตารางที่ 17 ประสิทธิภาพสารสกัดจิ้งร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ทดสอบ	สารสกัดจิ้งร่วมกับ EDTA			
	สกัดด้วยวิธีเขย่า		สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	
	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁
<i>B. cereus</i>	ant. (1.17)	syn. (0.45)	add. (1.00)	add. (1.00)
<i>S. aureus</i>	ant. (1.20)	ant. (1.20)	ant. (1.20)	syn. (0.65)
<i>L. monocytogenes</i>				
101	ant. (1.25)	syn. (0.75)	ant. (1.50)	syn. (0.75)
108	ant. (1.25)	add. (1.00)	ant. (1.50)	syn. (0.67)
310	syn. (0.55)	syn. (~0.70)	ant. (1.17)	syn. (<1.00)
Scott A	syn. (0.90)	syn. (0.60)	ant. (1.17)	syn. (0.63)
V7	ant. (1.17)	syn. (0.76)	syn. (0.92)	syn. (0.84)
<i>E. coli</i> O157:H7				
	syn. (0.75)	ND	syn. (0.72)	ND
<i>S. Typhimurium</i>				
2380	syn. (0.92)	ND	syn. (0.55)	ND
2486	syn. (0.75)	ND	syn. (0.94)	ND
2576	syn. (0.96)	ND	syn. (0.55)	ND
2582	syn. (0.83)	ND	syn. (0.55)	ND
13311	syn. (0.92)	ND	ant. (1.27)	ND

หมายเหตุ

- ant. หมายถึง antagonistic
- add. หมายถึง additive
- syn. หมายถึง synergistic
- ND หมายถึง not determine
- < หมายถึง น้อยกว่า

ตารางที่ 18 ประสิทธิภาพสารสกัดเข้าร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ทดสอบ	สารสกัดเข้าร่วมกับ EDTA			
	สกัดด้วยวิธีเขย่า		สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	
	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁
<i>B. cereus</i>	syn. (0.92)	add. (1.00)	syn. (0.58)	syn. (0.58)
<i>S. aureus</i>	ant. (2.33)	ant. (2.00)	ant. (2.50)	ant. (1.33)
<i>L. monocytogenes</i>				
101	syn. (0.75)	syn. (0.61)	syn. (0.75)	syn. (0.95)
108	ant. (2.00)	syn. (<0.67)	ant. (1.75)	syn. (0.95)
310	ant. (1.25)	syn. (<1.00)	ant. (1.50)	syn. (<0.95)
Scott A	ant. (1.25)	syn. (0.67)	syn. (0.75)	syn. (<0.70)
V7	ant. (2.17)	syn. (0.92)	ant. (2.25)	ant. (1.25)
<i>E. coli</i> O157:H7				
	ant. (1.22)	ND	ant. (<1.20)	ND
<i>S. Typhimurium</i>				
2380	syn. (0.87)	ND	syn. (<0.87)	ND
2486	ant. (1.30)	ND	ant. (<1.20)	ND
2576	syn. (0.89)	ND	ant. (<1.08)	ND
2582	syn. (0.77)	ND	syn. (<0.87)	ND
13311	syn. (0.87)	ND	syn. (<0.87)	ND

หมายเหตุ

- ant. หมายถึง antagonistic
- add. หมายถึง additive
- syn. หมายถึง synergistic
- ND หมายถึง not determine
- < หมายถึง น้อยกว่า

ตารางที่ 19 ประสิทธิภาพสารสกัดขมิ้นชันร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค

จุลินทรีย์ทดสอบ	สารสกัดขมิ้นชันร่วมกับ EDTA			
	สกัดด้วยวิธีเยาะ		สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง	
	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁
<i>B. cereus</i>	ant. (5.50)	ant. (5.50)	ant. (1.16)	ant. (1.16)
<i>S. aureus</i>	syn. (0.70)	syn. (0.90)	ant. (1.30)	ant. (1.10)
<i>L. monocytogenes</i>				
101	add. (1.00)	syn. (0.75)	ant. (1.75)	ant. (1.25)
108	ant. (1.25)	syn. (0.58)	ant. (1.50)	ant. (1.17)
310	ant. (1.50)	syn. (<0.50)	syn. (0.70)	syn. (<0.70)
Scott A	syn. (0.83)	syn. (0.45)	ant. (<1.13)	ant. (<1.55)
V7	ant. (1.50)	syn. (0.58)	ant. (1.30)	syn. (<0.87)
<i>E. coli</i> O157:H7	syn. (0.75)	ND	ant. (<1.20)	ND
<i>S. Typhimurium</i>				
2380	syn. (0.73)	ND	syn. (<0.87)	ND
2486	syn. (0.75)	ND	ant. (<1.20)	ND
2576	syn. (0.58)	ND	ant. (<1.07)	ND
2582	ant. (1.33)	ND	ant. (<1.47)	ND
13311	syn. (0.92)	ND	ant. (<1.47)	ND

หมายเหตุ

- ant. หมายถึง antagonistic
- add. หมายถึง additive
- syn. หมายถึง synergistic
- ND หมายถึง not determine
- < หมายถึง น้อยกว่า

4. ประสิทธิภาพสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับ EDTA ในการยับยั้งแบคทีเรียในซूपไก่

4.1 ประสิทธิภาพของสารสกัดกระชายและขิงที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคในซूपไก่

ทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียในซूपไก่ด้วยสารสกัดกระชายและสารสกัดขิงต่อเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวน 3 สายพันธุ์ผสมกัน ประกอบด้วย 101, Scott A และ V7 จำนวนเซลล์เริ่มต้น *L. monocytogenes* 4 log CFU/ml ตรวจจำนวนเชื้อที่เจริญและอยู่รอดภายใน 36 ชั่วโมงพบว่า สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ภาพที่ 11A และ 11B) ที่ความเข้มข้น 1 และ 2.5% (v/v) ไม่สามารถทำลายแบคทีเรีย แต่สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าความเข้มข้น 2.5% (v/v) จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (bacteriostatic) ให้อยู่ในระดับปริมาณเชื้อ 4 log CFU/ml จากชั่วโมงเริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้นปริมาณเชื้อจึงเจริญเพิ่มจำนวนในระดับ 6 log และ 7 log CFU/ml ภายใน 24 และ 36 ชั่วโมงตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้น 5% (v/v) ของสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง มีประสิทธิภาพทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้ ในช่วงแรกพบการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* จากจำนวนเชื้อเริ่มต้น 4 log CFU/ml และถูกทำลายลดลงเหลือประมาณ 2 log CFU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 จนถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้นเชื้อจะถูกทำลายหมดภายใน 24 ชั่วโมง

สำหรับสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ภาพที่ 11C และ 11D) พบว่าความเข้มข้น 2.5 และ 5% (v/v) ไม่สามารถทำลายเชื้อ แต่สารสกัดขิงความเข้มข้น 5% (v/v) ที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ให้อยู่ในระดับประมาณ 4 log CFU/ml ในช่วง 12-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนเชื้อจะเพิ่มปริมาณขึ้นอยู่ในระดับประมาณ 5 log CFU/ml ที่เวลา 36 ชั่วโมง ความเข้มข้นของสารสกัดขิง 7.5% (v/v) สามารถทำลายแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ได้ พบว่าสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าความเข้มข้น 7.5% (v/v) จะยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ผสมจากจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml ให้อยู่ในระดับประมาณ 2 log CFU/ml ภายใน 3 ชั่วโมงและคงจำนวนเช่นนั้นเป็นเวลา 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนเชื้อลดลงต่ำสุดเหลือ 0.54 log CFU/ml ที่ชั่วโมง 36 ขณะที่สารสกัดขิงที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้น 7.5% (v/v) สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ผสมจากจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml ให้อยู่ในระดับประมาณ 3 log CFU/ml ที่ 3 ชั่วโมงและคงจำนวนเป็นเวลา 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อถูกทำลายหมดในชั่วโมงที่ 36

จากภาพที่ 12 เป็นการศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดกระชายและสารสกัดขิงต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* จำนวน 3 สายพันธุ์ผสมกันประกอบด้วย สายพันธุ์ 2380, 2576 และ 13311 พบว่า สารสกัดกระชายที่ความเข้มข้น 6, 8 และ 10% (v/v) ไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ภาพที่ 12A และ 12B) ไม่สามารถทำลายเชื้อได้ โดยสารสกัดกระชายสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้นสูงสุดในการทดลองนี้คือ 10% (v/v) สามารถลดจำนวนเชื้อเริ่มต้นจากประมาณ 4 log CFU/ml เหลือ 2.1 log CFU/ml ที่ 6 ชั่วโมง แต่เซลล์สามารถฟื้นตัวจากสารฆ่าเชื้อได้จึงเจริญเพิ่มขึ้น จนเมื่อครบ 36 ชั่วโมงมีจำนวนเชื้อ 7.8 log CFU/ml ขณะที่สารสกัดกระชาย 10% (v/v) ที่สกัดด้วยวิธีเขย่าชะลอการเจริญของแบคทีเรียได้เพียง 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นพบว่าไม่สามารถลดจำนวนหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อเริ่มต้นได้ และจำนวนเชื้อเพิ่มปริมาณสูงสุดที่ 12 ชั่วโมงมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 8.3 log CFU/ml สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดขิงด้วย *S. Typhimurium* ผสม (ภาพที่ 12C และ 12D) ให้ผลในทำนองเดียวกัน พบว่า *S. Typhimurium* มีความต้านทานต่อสารสกัดขิงสูงไม่ว่าจะทดสอบด้วยสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดขิงความเข้มข้น 6, 8 และ 10% (v/v) ไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียสายพันธุ์ผสมชนิดนี้ได้ เพียงแต่ที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ของสารสกัดขิงที่สกัดจากทั้ง 2 วิธี จะยั้งระยะ lag ของเชื้อมานถึง 3 ชั่วโมงและใช้เวลา 21 ชั่วโมงจึงจะเข้าสู่ระยะ stationary เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ใช้เวลาเพียง 6 ชั่วโมงเท่านั้นหลังจากระยะ lag ไปยังระยะ stationary

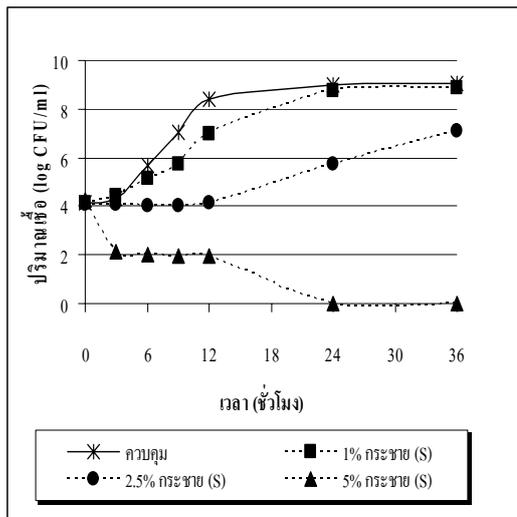
จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดกระชายที่ความเข้มข้น 5% (v/v) ที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง สามารถทำลาย *L. monocytogenes* ผสม 3 สายพันธุ์ ได้ที่ 24 ชั่วโมง ขณะที่สารสกัดขิงที่ความเข้มข้น 7.5% (v/v) ที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง สามารถทำลายแบคทีเรียนี้ที่ 36 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้พบว่าสารสกัดกระชายและสารสกัดขิงมีประสิทธิภาพยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดีในซูปไก่เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Thongson *et al.* (2005) โดยนักวิจัยกลุ่มนี้ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดกระชายที่ใช้เอทานอล 50% (v/v) เป็นตัวทำละลายที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE ศึกษาการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* จำนวน 2 สายพันธุ์ได้แก่สายพันธุ์ 108 และ Scott A พบว่า ความเข้มข้น 5% (v/v) ของสารสกัดกระชายเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว TSAYE ลดจำนวนแบคทีเรียนี้ได้เล็กน้อย ต้องเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10% (v/v) จึงจะสามารถทำลายเชื้อทั้งหมดภายในเวลา 9 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดขิงความเข้มข้นสูงถึง 10% (v/v) จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อให้อยู่ในระดับ 4-5 log CFU/ml เป็นเวลา 12 ชั่วโมงและไม่สามารถทำลายเชื้อให้หมดได้ ที่แตกต่างกันเป็นเพราะอิทธิพลของอาหารต่างชนิดกันมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ต่างกัน TSAYE เป็น

อาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมสมบูรณ์ เซลล์จึงฟื้นคืนตัวได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับซูปไก่อ่ จึงอาจเป็นเหตุผลว่าไม่สามารถทำลายเซลล์ได้หมดแม้จะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดสูงกว่า

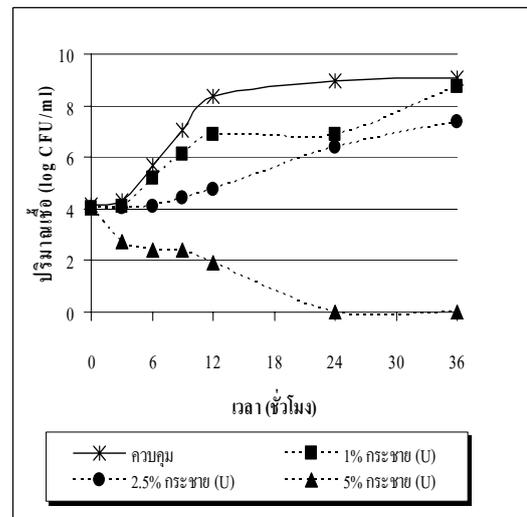
และเมื่อพิจารณาสารสกัดจึงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ความเข้มข้น 6, 8 และ 10% (v/v) พบว่าสารสกัดจึงไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายเชื้อสายพันธุ์ผสมของ *S. Typhimurium* ในซูปไก่อ่ได้ เพียงแต่จะยั้งระยะ lag และระยะ stationary ให้นานขึ้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ผสมชนิดนี้มีความต้านทานต่อสารสกัดจึงที่ความเข้มข้นสูง โดยสารออกฤทธิ์ในจึงอาจทำให้เซลล์ของ *S. Typhimurium* เกิดการบาดเจ็บและยั้งระยะ lag และ stationary นานขึ้น และเซลล์สามารถฟื้นตัวจากเซลล์บาดเจ็บเพิ่มจำนวนได้ในที่สุด

นอกเหนือจากปัจจัยของชนิดสารฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น ชนิดของอาหารที่ทดสอบ ชนิดแบคทีเรียจากการศึกษาในที่นี้ การศึกษาของ Thongson *et al.* (2005) ยังพบว่าชนิดของตัวทำลายมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปน้ำมันหอมระเหยจะมีประสิทธิภาพยับยั้งจุลินทรีย์ดีที่สุด สารสกัดเครื่องเทศที่ใช้เอทานอล 50% (v/v) ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์รองลงมา และสารสกัดเครื่องเทศที่ใช้น้ำเป็นตัวทำลายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่ำที่สุด น้ำมันหอมระเหย และสารสกัดกระชายที่ใช้เอทานอล 50% (v/v) เป็นตัวทำลายจึงมีศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเครื่องดื่ม แต่มีข้อจำกัดคือสารสกัดเครื่องเทศชนิดนี้มีกลิ่นรสที่รุนแรง ดังนั้นจะต้องมีการทดสอบทางประสาทสัมผัสของสารสกัดกระชายนี้ก่อนที่จะนำไปใช้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร

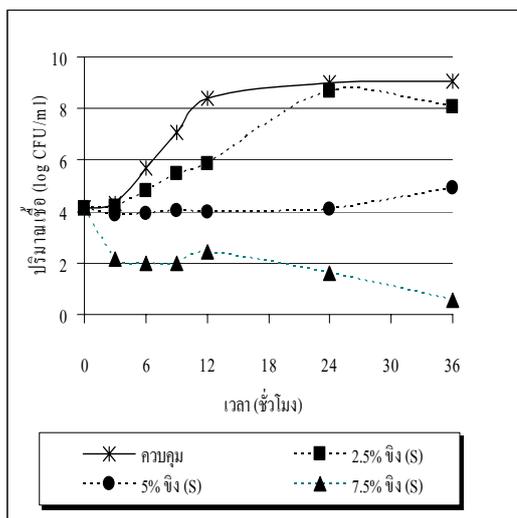
นอกจากจะมีการศึกษาการใช้สารยับยั้งจุลินทรีย์ในลักษณะของเหลว ยังมีการใช้อยู่ในรูปผงด้วย โดย Leuschner and Zamparini (2002) เติมกระเทียมผงบดแห้ง 1% ลงในมายองเนสเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. Enteritidis* ผลการทดลองพบว่าเชื้อเริ่มต้น 5 log CFU/g ลดลงเหลือ 3 log CFU/g ภายใน 3 วัน สาเหตุที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียต่ำ เนื่องจากสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในเครื่องเทศในรูปผงจะเคลื่อนที่แพร่ออกจากเครื่องเทศเมื่ออยู่ในอาหารเหลวได้ช้า ประกอบกับการกระจายตัวของอนุภาคเครื่องเทศที่ไม่สม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกับอาหารเหลว ส่งผลให้สารยับยั้งจุลินทรีย์จะสัมผัสกับเซลล์จุลินทรีย์ได้ไม่ทั่วถึงจึงทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่ำ



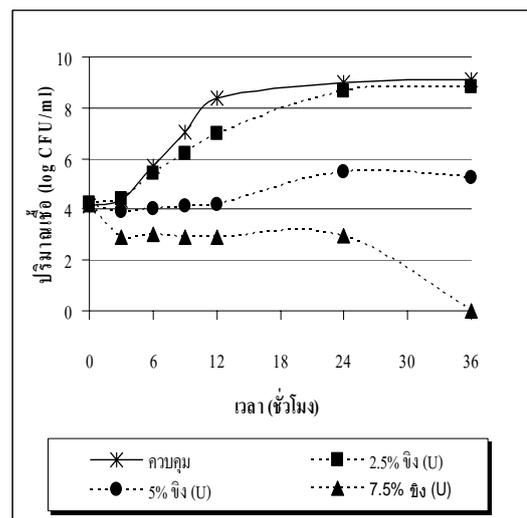
(A)



(B)

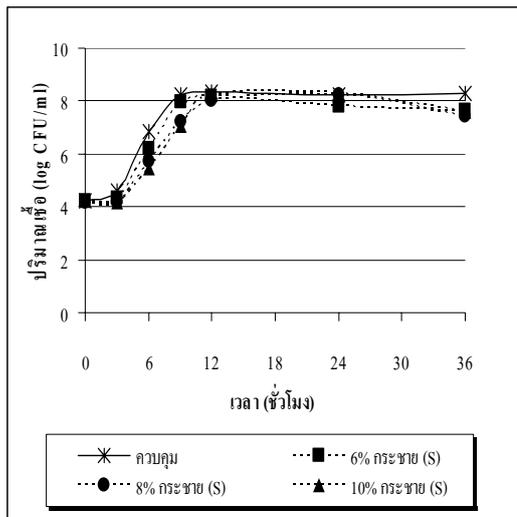


(C)

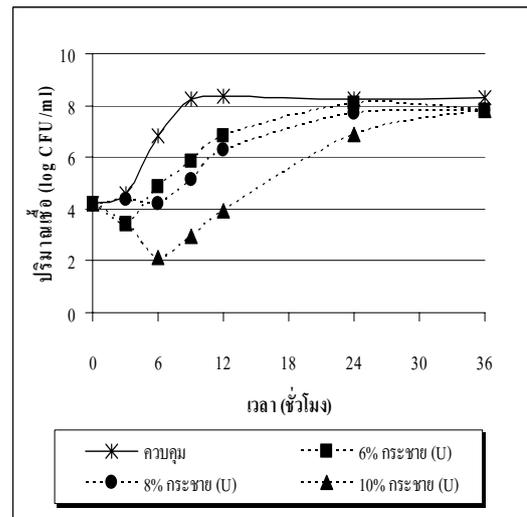


(D)

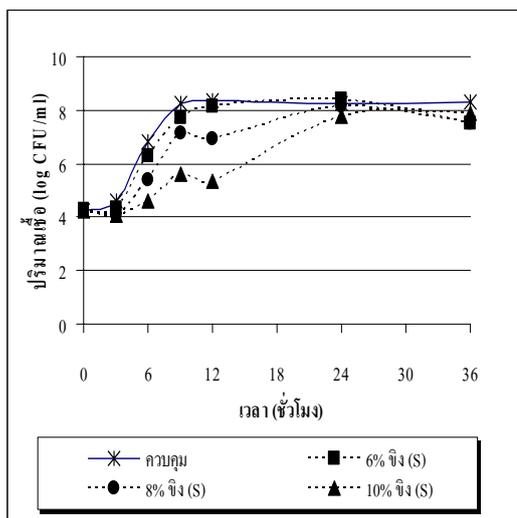
ภาพที่ 11 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายหรือสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีแช่ (S), (A) และ (C), และด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U), (B) และ (D), ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง



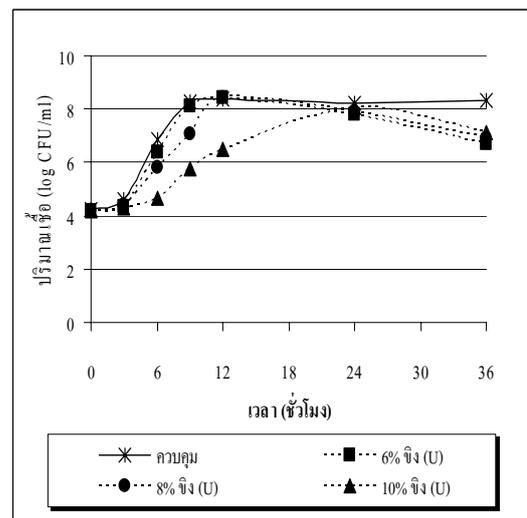
(A)



(B)



(C)



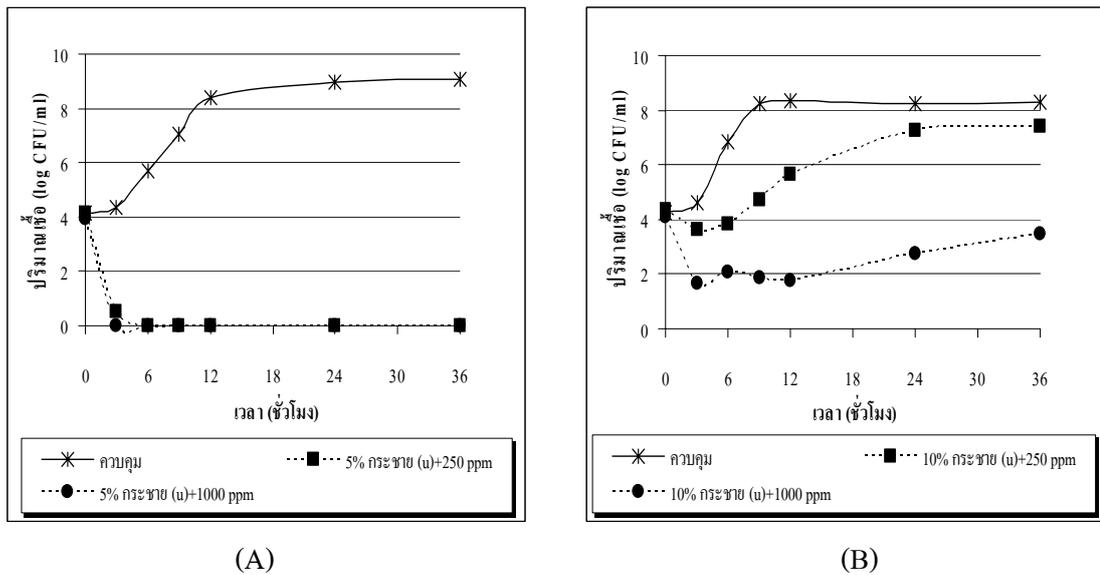
(D)

ภาพที่ 12 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ในซูปเปอร์ไค่ที่มีการเติมสารสกัด ทรายหรือสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเย่า (S), (A) และ (C), และด้วยคลื่นเสียงความถี่ สูง (U), (B) และ (D), ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากเครื่องเทศในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้งที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อและในซุปลั๊ก สรุปได้ว่าสารสกัดกระชายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงและวิธีสกัดแบบเขย่าที่ทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคในซุปลั๊ก สารสกัดจากทั้ง 2 วิธีมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน การเติม EDTA จึงมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และมีศักยภาพนำมาใช้ในอาหารคาดว่าช่วยลดความเข้มข้นของสารสกัดกระชายได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาการใช้สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงรวมกับการใช้ EDTA เพื่อยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *S. Typhimurium* ในซุปลั๊ก

4.2 ประสิทธิภาพของ EDTA ร่วมกับสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียในซุปลั๊ก

ได้เลือกสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงที่ความเข้มข้น 5% (v/v) เติมร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 250 และ 1000 ppm ในซุปลั๊ก (ภาพที่ 13A) เพื่อทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ผสม 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 101, Scott A และ V7 โดยมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml จากการทดลองพบว่า สารสกัดกระชาย 5% (v/v) ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 250 ppm สามารถลดจำนวนเชื้อเหล่านี้ลงได้ 3.7 log CFU/ml ภายใน 3 ชั่วโมง จากเดิมมีเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 4.2 log CFU/ml ลดลงเหลือ 0.5 log CFU/ml และเชื้อถูกทำลายหมดเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ขณะที่สารสกัดกระชาย 5% (v/v) ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 1000 ppm จะสามารถยับยั้งเชื้อดีกว่า กล่าวคือเชื้อถูกทำลายหมดภายใน 3 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อเจริญแม้ว่าเพาะเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบเชื้อ *S. Typhimurium* ผสม 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย 2380, 2576 และ 13311 ลงในซุปลั๊กที่มีการเติมสารสกัดกระชายความเข้มข้น 10% (v/v) ที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง ร่วมกับการเติม EDTA ความเข้มข้น 250 ppm (ภาพที่ 13B) พบว่า ชั่วโมงเริ่มต้นที่มีจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ผสมประมาณ 4 log CFU/ml จะลดลงเพียงเล็กน้อย เหลือประมาณ 3.6- 3.8 log CFU/ml เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเชื้อไม่ถูกยับยั้งกลับเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆ ประมาณ 7.2-7.4 log CFU/ml ที่ชั่วโมง 24 จนถึงชั่วโมง 36 ขณะที่สารสกัดกระชายสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้น 10% (v/v) ร่วมกับ EDTA 1000 ppm จะยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ผสมตลอดระยะเวลาการทดลอง 36 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* (A) และ *S. Typhimurium* (B) ในซูปเปอร์ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ร่วมกับ EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ก่อนหน้านี้ Payne *et al.* (1994) ได้ศึกษาการใช้สารเคมีร่วมกันระหว่าง EDTA กับ ไคโซไซม์เพื่อยับยั้งแบคทีเรียในน้ำนมยูเอชทีพบว่า การใช้ EDTA ความเข้มข้น 1500 ppm ร่วมกับ ไคโซไซม์ความเข้มข้น 150 ppm ไม่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ เพียงแต่ยั้งระยะ lag ของ *E. coli* O157:H7 ที่อุณหภูมิ 36°C ให้นานขึ้น โดยเมื่อเพาะเชื้อครบ 12 ชั่วโมงจะมีจำนวนเชื้อประมาณ 5 log CFU/ml อย่างไรก็ตามมีจำนวนเชื่อน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมประมาณ 3 log CFU/ml (ตัวอย่างควบคุมคือน้ำนมเต็ม *E. coli* O157:H7 แต่ไม่เติมสารเคมี) และหลังจากสร้างการปนเปื้อนแบคทีเรีย *L. monocytogenes* VPHI ในน้ำนมยูเอชทีเก็บที่อุณหภูมิ 36°C จำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 2 log CFU/ml เมื่อเพาะเชื้อครบ 12 ชั่วโมงพบมีจำนวนเชื้อ 6.88 log CFU/ml และเมื่อเติม EDTA ความเข้มข้น 2500 ppm ร่วมกับ ไคโซไซม์ความเข้มข้น 150 ppm ลงไปในน้ำนม แบคทีเรียจะถูกยับยั้งและจำนวนคงที่ 2 log CFU/ml เป็นเวลา 6 ชั่วโมงนับตั้งแต่เวลาที่ถ่ายเชื้อลงในน้ำนม พบว่าสารทั้ง 2 มีประสิทธิภาพร่วมกันในการยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ (bactericidal) โดยจำนวนเชื้อจะลดต่ำกว่า 1 log CFU/ml หลังจากครบ 12 ชั่วโมง

จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าสารสกัดกระชายความเข้มข้น 5% (v/v) ที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 250 ppm เสริมประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *L. monocytogenes* สายพันธุ์ผสมได้ดีที่สุด สามารถชะลอการเจริญของเซลล์ได้ 3 ชั่วโมง คาดว่าสารสกัดจะไปมีผลต่อตำแหน่งต่างๆ ภายในเซลล์ร่วมกับ EDTA ที่จะเข้าไปจับกับโลหะประจุบวก เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เป็นต้น ทำให้สารต่างๆ ภายในเซลล์ตกตะกอน กลไกต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรียสูญเสียการควบคุม ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Burt *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ EDTA ไม่มีผลต่อการทำลายเซลล์แบคทีเรียชนิดนี้อย่างเด่นชัดพบว่า EDTA ทั้งสองความเข้มข้นคือ 250 และ 1000 ppm จะทำให้เซลล์ตายในช่วงเวลาใกล้เคียงกัน และพบว่าที่สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง 10% เดิมร่วมกับ EDTA ทดสอบกับ *S. Typhimurium* สายพันธุ์ผสม ไม่ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นจาก 250 เป็น 1000 ppm ก็ไม่สามารถทำลายเซลล์ได้ อย่างไรก็ตามช่วยชะลอการเจริญของแบคทีเรียได้ 6 และ 12 ชั่วโมงเมื่อเติม EDTA ที่ความเข้มข้นดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้พบว่า *S. Typhimurium* มีความต้านทานต่อสารยับยั้งที่ทดสอบนี้ ซึ่งความเข้มข้นสูงถึง 10% (v/v) นี้มีผลต่อกลิ่นรสของอาหาร หากนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารต้องเป็นอาหารที่มีการเติมเครื่องเทศค่อนข้างมาก เช่น ชุปเนื้อ ชุปปลา หรือขนมจีนน้ำยา และกลิ่นรสต้องสัมพันธ์กับการยอมรับของอาหาร

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศตระกูลเหง้า ได้แก่ กระชาย จิง ข่า และขมิ้นชัน สกัดด้วยตัวทำละลาย เปรียบเทียบระหว่างวิธีเขย่าและวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดเครื่องเทศ 2 วิธี คือ วิธี agar dilution และ microbroth dilution ด้วยค่า MIC และ MBC ศึกษาประสิทธิภาพ EDTA ร่วมกับสารสกัดเครื่องเทศต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเลี้ยงเชื้อและในซूपไก่ สรุปได้ดังนี้

1. ประสิทธิภาพวิธีสกัดเครื่องเทศจากกระชาย จิง ข่า และขมิ้นชัน ทดสอบด้วยวิธี agar dilution พบว่าสารสกัดเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิดที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีการสกัดแบบเขย่า ค่า MIC ของเครื่องเทศจากวิธีสกัดทั้ง 2 ทดสอบกับจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียมีแนวโน้มในการทำงานเหมือนกัน สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงทดสอบกับ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ให้ค่า MIC อยู่ในช่วง 0.1-0.3% (v/v) และ 0.3-0.5% (v/v) ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบเวลาที่ใช้ในการสกัด การสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงใช้เวลาสกัดเพียง 5 นาที ซึ่งเร็วกว่าการสกัดด้วยวิธีเขย่าที่ใช้เวลานานถึง 24 ชั่วโมง จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นวิธีสกัดเครื่องเทศต่อไป

2. สำหรับประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศทั้ง 4 ชนิดต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อรา พบว่า สารสกัดกระชายและสารสกัดจิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่สารสกัดขมิ้นชันและสารสกัดข่า โดยสารสกัดกระชายสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก และแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบ ให้ค่า MIC เป็น 0.1-0.5% (v/v) และ 6-10% (v/v) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อราให้ค่า MIC สูงมากคือ 10 ถึงมากกว่า 10% (v/v) และ 8 ถึงมากกว่า 10% (v/v) ตามลำดับ แสดงความต้านทานของจุลินทรีย์ต่อสารสกัดกระชายและสารสกัดจิงสูง ด้วยความเข้มข้นสูงจึงมีข้อจำกัดที่จะนำมาประยุกต์ใช้

3. ประสิทธิภาพของ EDTA ต่อการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution พบว่า โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมบวกจะมีค่า MIC ของ EDTA อยู่ระหว่าง 500-1000 ppm ขณะที่แบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *E. coli* O157:H7 และ *S. Typhimurium* DT104 และ *S. Typhimurium* ชนิด wild type ส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อ EDTA สูงโดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 1000-3000 ppm

4. ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ร่วมกันระหว่างสารสกัดเครื่องเทศกับ EDTA เมื่อทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคนิคมแกรมบวกประกอบด้วย *B. cereus* 1 สายพันธุ์, *S. aureus* 1 สายพันธุ์ และ *L. monocytogenes* จำนวน 5 สายพันธุ์ ทดสอบด้วยวิธี microbroth dilution และแบคทีเรียก่อโรคนิคมแกรมลบประกอบด้วย *E. coli* O157:H7 จำนวน 1 สายพันธุ์และ *S. Typhimurium* DT104 จำนวน 4 สายพันธุ์ และ wild type จำนวน 1 สายพันธุ์ทดสอบด้วยวิธี agar dilution พบว่า กระจายที่สกัดด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA แนวโน้มส่วนใหญ่จะเสริมฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียแกรมบวกและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ จึงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA จะหักล้างฤทธิ์กันในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่จะเสริมฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนข่าที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA จะหักล้างฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ขณะที่ข่าสกัดด้วยวิธีเขย่าจะเสริมฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. Typhimurium* ได้ดี และขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยวิธีคลื่นเสียงความถี่สูงร่วมกับ EDTA แนวโน้มส่วนใหญ่หักล้างฤทธิ์กันในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เฉพาะขมิ้นชันที่สกัดด้วยวิธีเขย่าจะเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

5. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคในซุปลั๊กพบว่า สารสกัดกระจายที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้น 5% (v/v) สามารถทำลาย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ผสมประกอบด้วย สายพันธุ์ 101, ScottA และ V7 ที่มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 4 log CFU/ml ภายใน 24 ชั่วโมง ขณะที่สารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้น 7.5% (v/v) สามารถทำลายเชื้อชนิดนี้หมดที่เวลา 36 ชั่วโมง แต่สารสกัดกระจายและสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่าและสกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้น 6, 8 และ 10% (v/v) ไม่สามารถทำลาย *S. Typhimurium* สายพันธุ์ผสมประกอบด้วย สายพันธุ์ 2380, 2576 และ 13311 แต่ที่ 10% (v/v) ชะลอระยะ lag ของแบคทีเรียชนิดนี้ได้ 3 ชั่วโมง

สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้น 5% (v/v) ร่วมกับ EDTA ความเข้มข้น 250 ppm และ 1000 ppm สามารถทำลาย *L. monocytogenes* สายพันธุ์ผสม ภายใน 6 และ 3 ชั่วโมง แต่ในกรณี *S. Typhimurium* แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดกระชาย ที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงความเข้มข้น 10% (v/v) ร่วมกับการใช้ EDTA ความเข้มข้น 1000 ppm พบว่าไม่สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดนี้ได้หมด แต่สามารถยับยั้งการเจริญตลอดระยะเวลา การทดลอง 36 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. ขั้นตอนการเตรียมเครื่องเทศ ควรที่จะล้างเศษดินที่ติดมากับเครื่องเทศออกด้วยน้ำสะอาด ก่อนทำการแช่สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์เนื่องจากเศษดินจะลดประสิทธิภาพของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ในการฆ่าเชื้อโรคที่ติดมากับเครื่องเทศ และขั้นตอนการอบแห้งควรระวังอุณหภูมิในการอบอย่าให้เครื่องเทศเกิดการไหม้เกรียม เพราะอาจมีผลทำให้สารยับยั้งจุลินทรีย์ในเครื่องเทศลดลง
2. การนำสารสกัดเครื่องเทศมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ควรรีบนำมาทดสอบหลังจากทำการสกัดแล้วภายใน 1-2 วัน โดยเก็บรักษาในอุณหภูมิแช่แข็ง (-18°C) หากเก็บสารสกัดเครื่องเทศไว้นานอาจทำให้ประสิทธิภาพของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในเครื่องเทศลดลง
3. การหาค่า MIC ด้วยวิธี agar dilution ในขั้นตอนการผสมสารสกัดเครื่องเทศร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่หลอมเหลว ควรที่จะควบคุมอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้มีอุณหภูมิสูงเกินไปเพราะอาจจะรบกวนประสิทธิภาพสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่อยู่ในเครื่องเทศ โดยอุณหภูมิที่ควบคุมความร้อนของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ที่ 50°C ก่อนที่จะนำมาผสมกับสารสกัดเครื่องเทศ และควรให้สารสกัดเครื่องเทศและอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกัน มีฟองอากาศน้อยที่สุดเพื่อควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อที่มีต่อจุลินทรีย์
4. การหาค่า MIC ด้วยวิธี microbroth dilution โดยใช้ไมโครไทเทอร์เพลท ควรที่จะทำการเขย่าไมโครไทเทอร์เพลทขณะเพาะเชื้อสม่ำเสมอใน 24 และ 48 ชั่วโมง และเขย่าอีกครั้งก่อนทำการวัดค่า OD ป้องกันการตกตะกอนของเซลล์ซึ่งจะมีผลต่อการวัดค่า OD
5. ยืนยันความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์หรือหาค่า MBC ควรเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค spread plate (100 µl จากไมโครไทเทอร์เพลท) แทนวิธี drop test ข้อจำกัดของวิธี drop test คือเมื่อโคโลนีเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้ออาจเกิดการเกาะกลุ่มกัน หรือโคโลนีมีขนาดใหญ่ หรือโคโลนีมีลักษณะแผ่ จะทำให้นับจำนวนโคโลนีลำบาก
6. ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี agar และ microbroth dilution ควรยืนยันจำนวนเชื้อเริ่มต้นทุกครั้ง โดยวิธีการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือวัดค่า OD

7. สารสกัดกระชายและสารสกัดขิงมีศักยภาพที่จะเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่สามารถเติมลงในอาหาร โดยเฉพาะการใช้สารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA เพื่อลดปริมาณสารสกัดเครื่องเทศซึ่งจะรบกวนกลิ่นและรส งานวิจัยที่ควรศึกษาต่อไปคือ ศึกษาอายุการเก็บรักษาอาหารเหลวที่มีการเติมสารสกัดกระชายร่วมกับ EDTA ตัวอย่างอาหารที่น่าศึกษาเช่น น้ำซूप น้ำยาสำหรับขนมจีน หรือเครื่องแกง นอกจากนี้อาจประยุกต์ใช้ในฟิล์มบิโพลีเมอร์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้นานขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- นภา โล่ห์ทอง. 2535. **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต**. ฟีนีพิบลิชซิง, กรุงเทพฯ.
- นิจศิริ เรืองรังษี. 2534. **เครื่องเทศ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- อรุณี พวงมี. 2533. **การควบคุมโรคผลเน่าของมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ระยะก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, เกษตรศาสตร์.
- Akpomedaye, D.E. and B.O. Ejechi. 1998. The hurdle effect of mild heat and two tropical spice extracts on the growth of three of fungi in fruit juices. **Food Research International**. 31 (5): 339-341.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : Classification and physiology pp. 1-72. *In* S. Salminen and A. Wright, eds. **Lactic acid bacteria : Microbiology and Functional Espects**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Baumann, A.R., S.E. Martin and H. Feng. 2005. Power ultrasound treatment of *Listeria monocytogenes* in apple cider. **J. Food Prot.** 11: 2333-2340. *Cited* H.Y. Hui. 2005. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. CRC Press, Boca Raton.
- Banerjee, M. and P.K. Sarkar. 2004. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. **Food Control**. 15: 491-496.
- Boyraz, N. and M. Ozcan. 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. **Int. J. Food Microbiol.** 107 (3): 238-242.

- Branen, J.K. and P.M. Davidson. 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **Int. J. Food Microbiol.** (90): 63-74.
- Boland, J.S., P.M. Davidson and J. Weiss. 2003. Enhanced inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by lysozyme and chelators. **J. Food Prot.** 66 (10): 1783-1789.
- Boland, J.S., P.M. Davidson, B. Bruce and J. Weiss. 2004. Cations reduce antimicrobial efficacy of lysozyme-chelator combinations. **J. Food Prot.** 67 (2): 285-294.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. **Food Microbiology.** 94: 223-253.
- Canillac, N. and A. Mourey. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 18: 261-268.
- Chomchalow, N., J. Bansiddhi and C. MacBaine. 2003. **Amazing Thai Spices.** Bangkok. pp 5-11.
- Cloete, T.E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. **International Biodeterioration & Biodegradation.** 51: 277-282.
- D' Amico, D.J., T.M. Silk, J. Wu and M. Guo. 2006. Inactivation of microorganisms in milk and apple cider treated with ultrasound. **J. Food Prot.** 69 (3): 556-563.
- Davidson, P.M., J.N. Sofos and A.L. Branen. 2005. **Antimicrobials in Foods.** 3rd ed. CRC Press Taylor and Francis Group, New York.

- de Guzman, C.C. and J.S. Siemonsma. 1999. **Plant Resources of South-East Asia No 13. Spices.** Backhuys, Leiden.
- Doyle, M.P., L. R. Beuchat and T. J. Montville. 2001. **Food Microbiology : Fundamental and Frontiers.** 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Farrell, K.T. 1990. **Spices, Condiments, and Seasonings.** 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Gill, A.O. and R.A. Holly. 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. **Food Research International.** 33 (2): 83-90.
- Hemwimol, S., P. Pavasant and A. Shotipruk. 2006. Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from root of *Morinda citrifolia*. **Ultrasonics Sonochemistry.** 13 (6): 543-548.
- Hirasa, K. and M. Takemasa. 1998. **Spice Science and Technology.** Marcel Dekker, Inc., New York.
- ICMSF. 1996. **Micro-organisms in Foods: Vol.5 Microbiological Specifications of Food Pathogens.** 1st ed. Blackie Academic and Professional, London, UK.
- Jacques, R.A., L.D.S. Freitas, V.F. Perez, C. Dariva, A.P.D. Oliveira, J.V.D. Oliveira and E.B. Caramao. 2007. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry.** 14 (1): 6-12.
- Jayaprakasha, G.K., L. Jagan, M. Rao and K.K. Sakariah. 2005. Chemistry and biological activities of *Curcuma longa*. **Trends in Food Science and Technology.** 16: 533-548.
- Labbe', R.G. and S. Garcia. 2001. **Guide to Foodborne Pathogens.** 1st ed. John Wiley and Sons, Inc., Canada.

- Leuschner, R.G.K. and J. Zamparini. 2002. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**. 13: 399-404.
- Li, H., L. Pordesimo and J. Weiss. 2004. High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. **Food Research International**. (37): 731-738.
- Manas, P., R. Pagan and J. Raso. 2000. Predicting lethal effect of ultrasonic waves under pressure treatments on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 by power measurement. **J. Food Sci.** (65): 663-667.
- Mason, T.J., L. Paniwnyk and J.P. Lorimer. 1996. The uses of ultrasound in food technology. **Ultrasonics Sonochemistry**. 8: S253-S260.
- Mytle, N., G.L. Anderson, M.P. Doyle and M.A. Smith. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. **Food Control**. 17 (2): 102-107.
- Okereke, A., R.B. Beelman, S. Doores and R. Walsh. 1990. Elucidation of the mechanisms of the acid blanch and EDTA process inhibition of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores **J. Food Sci.** 55: 1137-1142
- Oonmetta-aree, J., T. Suzuki, P. Gasaluck and G. Eumkeb. 2006. Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. **LWT-Food Science and Technology**. 2006 (39): 1214-1220.
- Owen, R.J. and E.A. Palombo. 2007. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. **Food Control**. (18): 387-390.

- Payne, K.D., S.P. Oliver and P.M. Davidson. 1994. Comparison of EDTA and apo-lactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **J. Food Prot.** 67 (2): 285-294.
- Pitt, J.I. and A.D. Hocking. 1997. **Fungi and Food Spoilage.** 2nd ed. Blackie Academic and Professional, Cambridge.
- Piyasena, P., E. Mohareb and R.C. McKeller. 2003. Inactivation of microbes using ultrasound: A review. **Int. J. Food Microbiol.** 87: 207-216.
- Pruthi, J.S. 1976. **Spices and Condiments.** National Book Trust, New Delhi, pp 76-93.
- Rasooli, I. and M.R. Abyaneh. 2004. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control.** 15 (6): 479-483.
- Rasooli, I., M.B. Rezaei and A. Allameh. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control.** 17 (5): 359-364.
- Sandri, I.G., J. Zacaria, F. Fracaro, A.P.L. Delamare and S. Echeverrigaray. 2006. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. **Food Chemistry.** (*in press*)
- Shryock, T.R., M. Apley, R.N. Jones, D.H. Lein, C. Thornsberry, R.D. Walker, J.L. Watts, D.G. White and C.C. Wu. 2002. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animal: Approved Standard.** 2nd ed. Pennsylvania, USA.

- Shukla, Y. and M. Singh. 2006. Cancer preventive properties of ginger: A brief review. **Food and Chemical Toxicology**. (*in press*)
- Sikes, A. and S. Whitfield. 1992. Antimicrobial activity of sucrose laurate, EDTA, and BHA alone and in combination, pp. 237-250. *In* M.L. Herz and T.A. Sklarsky, eds. **Proceedings of the Fourth Natick Science Symposium 4. ed.** Office of the Technical Director, U.S. Army Natick Research, Development and Engineering Center, Natick, Mass.
- Tainter, D.R. and A.T. Grenis. 2001. **Spices and Seasonings: A Food Technology Handbook**. 2 nd ed. John Wiley and Sons, Inc, Canada.
- Terranova, W. and P.A. Blake. 1998. **Bacillus cereus-Maine**. CDC: MMWR. Available Source: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000754.htm>, February 28, 2006.
- Thongson, C., P.M. Davidson, W. Mahakarnchanakul and J. Weiss. 2004. Antimicrobial activity of ultrasound-assisted solvent-extracted spices. **Lett. Appl. Microbiol.** 39: 401-406.
- Thongson, C., P.M. Davidson, W. Mahakarnchanakul and P. Vibulsresth. 2005. Antimicrobial effect of Thai spices against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104. **J. Food Prot.** 67 (10): 2054-2058.
- Tuchinda, P., V. Reutrakul, P. Claeson, U. Pongprayoon, T. Sematong, T. Santisuk and W.C. Taylor. 2002. Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. **Phytochemistry.** 59 (2): 169-173.
- U.S. Government Printing Office. 2002. **Food Preservatives; Disodium EDTA**. Food and Drug. Available Source: <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/FCF172.html>, December 15, 2006.

- Velickovic, D.T., D.M. Milenovic, M.S. Ristic and V.B. Veljkovic. 2006. Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage. **Ultrasonics Sonochemistry**. 13 (2): 150-156.
- Vigil, A.L.M., E. Palou, M.E. Parish and P.M. Davidson. 2005. Methods for activity assay and evaluation of results, pp. 659-677. In P.M. Davidson, J.N. Sofos and A.L. Branen, eds. **Antimicrobials in Foods**. CRC press Taylor and Francis Group, New York.
- Vinatoru, M. 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrasonics Sonochemistry**. 8: 303-313.
- Vuddhakul, V., P. Bhoopong, F. Hayeebilan and S. Subhadhirasakul. 2007. Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Microbiology**. 24: 413-418.
- Wan, J., A. Wilcock and M.J. Coventry. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **J. Appl. Microbiol.** 84: 152-158.
- Wang, C. and L.A. Shelef. 1992. Behavior of *Listeria monocytogenes* and the spoilage microflora in fresh cod fish treated with lysozyme and EDTA. **Food Microbiol.** 9: 207-213.
- Wang, H. and T.B. Ng. 2005. An antifungal protein from ginger rhizomes. **BBRC**. 336 (1): 100-104.
- Wu, J., L. Lin and F. Chau. 2001. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics Sonochemistry**. 8: 347-352.
- Yano, Y., M. Satomi and H. Oikawa. 2006. Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. **Int. J. Food Microbiol.** 111: 6-11.

Yousef, A.E. and C. Carlstrom. 2003. **Food Microbiology: A Laboratory Manual**. 1st ed. John Wiley and Sons, Inc., Canada.

Zaika, L.L. and J.S. Fanelli. 2003. Growth kinetics and cell morphology of *Listeria monocytogenes* Scott A as affected by temperature, NaCl, and EDTA. **J. Food Prot.** 66 (7): 1208-1215.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase Soy Agar (TSA, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	15.0	กรัม
Peptone from soymeal	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar-agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

2. Trypticase Soy Agar + Yeast extract (TSAYE, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	15.0	กรัม
Peptone from soymeal	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar-agar	15.0	กรัม
Yeast extract	6.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

3. Malt Extract Agar (MEA, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Malt extract	30.0	กรัม
Peptone from soymeal	3.0	กรัม
Agar-agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนเพื่อละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

4. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
D (+) Glucose	20.0	กรัม
<i>di</i> -Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Tween [®] 80	1.0	กรัม
<i>di</i> -Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Maganese sulfate	0.04	กรัม
Agar-agar	14.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118°C นาน 15 นาที

5. Trypticase Soy Broth (TSB, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	17.0	กรัม
Peptone from soymeal	3.0	กรัม
D (+) Glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
<i>di</i> -Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

6. Trypticase Soy Broth + Yeast extract (TSAYE, Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	15.0	กรัม
Peptone from soymeal	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Yeast extract	6.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยต้มให้เดือดในอ่างน้ำร้อนหรือตั้งบนเปลวไฟโดยตรง นึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

7. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from casein	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
D (+) Glucose	20.0	กรัม
<i>di</i> -Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Tween [®] 80	1.0	กรัม
<i>di</i> -Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม

Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Maganese sulfate	0.04	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร นึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 118°C นาน 15 นาที

8. Diluent (Merck Laboratories, Darmstadt, Germany)

Peptone from meat	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ละลายสารในน้ำกลั่นให้เข้ากัน เทใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 ml แล้วนำไปนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข
ตารางแสดงข้อมูล

ตารางแสดงข้อมูล

ตารางผนวกที่ ข1 ค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดเครื่องเทศที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก ทดสอบด้วยวิธี microbroth

dilution assay	จุลินทรีย์ทดสอบ	วิธีสกัด															
		แบบเขย่า								แบบคลื่นเสียงความถี่สูง							
		กระชาย		ขิง		ข่า		ขมิ้นชัน		กระชาย		ขิง		ข่า		ขมิ้นชัน	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
microbroth	<i>B. cereus</i>	0.1%	2%	0.6%	2%	3%	4%	0.4%	0.4%	0.5%	0.7%	0.8%	0.8%	6%	6%	6%	6%
	<i>S. aureus</i>	0.1%	1%	5%	5%	3%	4%	1%	1%	4%	5%	3%	4%	2%	3%	10%	10%
	<i>L. monocytogenes</i>																
	101	0.1%	0.7%	2%	4%	4%	9%	0.4%	0.8%	0.4%	0.7%	2%	4%	4%	10%	8%	8%
	108	0.1%	0.7%	1%	2%	4%	6%	0.4%	0.6%	0.4%	0.4%	2%	3%	4%	10%	6%	6%
	301	0.1%	0.7%	2%	5%	4%	2%	0.6%	0.8%	0.4%	1%	3%	4%	4%	10%	10%	10%
	Scott A	0.1%	0.7%	5%	5%	4%	6%	0.6%	1%	0.4%	1%	3%	4%	8%	>10%	>10%	>10%
	V7	0.1%	0.7%	3%	5%	6%	4%	0.4%	0.8%	0.4%	1%	3%	3%	8%	8%	10%	>10%

ตารางผนวกที่ ข2 ค่า Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC₁) และค่า Fractional Bactericidal Concentration Index (FBC₁) ของสารสกัดเครื่องเทศ ร่วมกับ EDTA ที่มีผลต่อแบคทีเรียก่อโรค

dilution assay	จุลินทรีย์ทดสอบ	วิธีสกัด															
		สกัดด้วยวิธีเขย่า								สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง							
		กระชาย		ขิง		ข่า		ขมิ้นชัน		กระชาย		ขิง		ข่า		ขมิ้นชัน	
FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁		
microbroth	<i>B. cereus</i>	-	2.05	1.17	0.45	0.92	1.00	5.5	5.5	1.20	0.82	1.00	1.00	0.58	0.58	1.17	1.17
	<i>S. aureus</i>	-	1.10	1.20	1.20	2.33	2.00	0.70	0.90	0.75	0.70	1.20	0.65	2.50	1.33	1.30	1.10
	<i>L. monocytogenes</i>																
	101	-	0.39	1.25	0.53	0.75	0.61	1.00	0.75	0.50	0.64	1.50	0.75	0.75	0.95	1.75	1.25
	108	-	0.39	1.25	1.00	2.00	0.67	1.25	0.58	2.25	0.75	1.50	0.67	1.75	0.95	1.50	1.17
	301	-	<0.39	0.55	<0.70	1.25	<1.00	1.50	<0.50	1.25	0.85	1.17	<1.00	1.50	<0.95	0.70	<0.70
	Scott A	-	0.39	0.90	0.60	1.25	0.67	0.83	0.45	1.25	0.95	1.17	0.63	0.75	<0.70	<1.13	<1.55
	V7	-	0.47	1.17	0.77	2.17	0.92	1.50	0.58	2.25	0.77	0.92	0.84	2.25	1.25	1.30	<0.87

ตารางผนวกที่ ข2 (ต่อ)

dilution assay	จุดินทรีย์ทดสอบ	วิธีสกัด															
		สกัดด้วยวิธีเขย่า								สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง							
		กระชาย		ขิง		ข่า		ขมิ้นชัน		กระชาย		ขิง		ข่า		ขมิ้นชัน	
		FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁	FIC ₁	FBC ₁
agar	<i>E. coli</i> O157:H7	0.72	ND	0.75	ND	1.22	ND	0.75	ND	0.70	ND	0.72	ND	<1.20	ND	<1.20	ND
	<i>S. Typhimurium</i>																
	2380	0.73	ND	0.92	ND	0.87	ND	0.73	ND	0.55	ND	0.55	ND	<0.87	ND	<0.87	ND
	2486	1.25	ND	0.75	ND	1.30	ND	0.75	ND	1.17	ND	0.94	ND	<1.20	ND	<1.20	ND
	2576	1.00	ND	0.96	ND	0.89	ND	0.58	ND	0.55	ND	0.55	ND	<1.08	ND	<1.07	ND
	2582	0.96	ND	0.83	ND	0.77	ND	1.33	ND	0.77	ND	0.55	ND	<0.87	ND	<1.47	ND
	13311	0.87	ND	0.92	ND	0.87	ND	0.92	ND	0.77	ND	1.27	ND	<0.87	ND	<1.47	ND

หมายเหตุ

- ND หมายถึง not determine; < หมายถึง น้อยกว่า

ตารางผนวกที่ ข3 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)			
	ตัวอย่างควบคุม	1% กระชาย (S)	2.5% กระชาย (S)	5% กระชาย (S)
0	4.15±0.01	4.13±0.19	4.07±0.30	4.25±0.01
3	4.33±0.14	4.42±0.38	4.10±0.35	2.15±0.01
6	5.69±0.34	5.14±0.68	4.04±0.43	2.01±0.01
9	7.06±0.01	5.72±0.00	4.03±0.47	1.98±0.00
12	8.38±0.11	7.01±0.69	4.16±0.31	1.96±0.01
24	8.98±0.03	8.75±0.18	5.72±0.26	0
36	9.08±0.03	8.87±0.06	7.12±0.26	0

ตารางผนวกที่ ข4 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)			
	ตัวอย่างควบคุม	1% กระชาย (U)	2.5% กระชาย (U)	5% กระชาย (U)
0	4.15±0.01	4.04±0.00	4.04±0.00	4.04±0.00
3	4.33±0.14	4.11±0.00	4.04±0.03	2.72±0.02
6	5.69±0.34	5.17±0.68	4.11±0.00	2.40±0.28
9	7.06±0.01	6.12±0.09	4.41±0.04	2.41±0.15
12	8.38±0.11	6.91±0.01	4.75±0.21	1.93±0.11
24	8.98±0.03	6.90±0.14	6.41±0.01	0
36	9.08±0.03	8.76±0.08	7.36±0.03	0

ตารางผนวกที่ ข5 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในซุสไปไก่ที่มีการเติมสารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)			
	ตัวอย่างควบคุม	2.5% ขิง (S)	5% ขิง (S)	7.5% ขิง (S)
0	4.15±0.01	4.15±0.05	4.15±0.05	4.15±0.05
3	4.33±0.14	4.19±0.11	3.86±0.06	2.15±0.01
6	5.69±0.34	4.78±0.64	3.91±0.25	2.01±0.12
9	7.06±0.01	5.47±0.67	4.05±0.44	1.98±0.02
12	8.38±0.11	5.87±0.51	3.98±0.54	2.42±0.26
24	8.98±0.03	8.68±0.06	4.09±0.13	1.59±0.01
36	9.08±0.03	8.06±0.65	4.90±0.01	0.54±0.76

ตารางผนวกที่ ข6 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในซุสไปไก่ที่มีการเติมสารสกัดขิงที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)			
	ตัวอย่างควบคุม	2.5% ขิง (U)	5% ขิง (U)	7.5% ขิง (U)
0	4.15±0.01	4.23±0.00	4.18±0.00	4.20±0.00
3	4.33±0.14	4.43±0.24	3.93±0.22	2.91±0.01
6	5.69±0.34	5.42±0.54	4.02±0.40	3.03±0.04
9	7.06±0.01	6.21±0.52	4.15±0.74	2.90±0.28
12	8.38±0.11	7.00±0.01	4.17±0.78	2.88±0.04
24	8.98±0.03	8.68±0.12	5.45±0.00	2.98±0.06
36	9.08±0.03	8.80±0.00	5.26±0.00	0

ตารางผนวกที่ ข7 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ในซุปลั๊กที่มีการเติม สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยวิธีเขย่า (S) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)			
	ตัวอย่างควบคุม	6% กระชาย (S)	8% กระชาย (S)	10% กระชาย (S)
0	4.23±0.04	4.20±0.00	4.18±0.00	4.23±0.00
3	4.60±0.31	4.32±0.03	4.17±0.13	4.18±0.17
6	6.85±0.00	6.22±0.06	5.71±0.00	5.45±0.08
9	8.26±0.00	7.97±0.30	7.20±0.57	7.08±0.00
12	8.36±0.00	8.19±0.06	8.02±0.42	8.26±0.00
24	8.23±0.16	7.83±0.49	8.22±0.25	8.30±0.00
36	8.31±0.07	7.63±0.08	7.45±0.35	7.60±0.16

ตารางผนวกที่ ข8 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ในซุปลั๊กที่มีการเติม สารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)			
	ตัวอย่างควบคุม	6% กระชาย (U)	8% กระชาย (U)	10% กระชาย (U)
0	4.23±0.04	4.20±0.03	4.18±0.03	4.23±0.04
3	4.60±0.31	3.46±0.03	4.39±0.26	3.45±0.90
6	6.85±0.00	4.87±0.51	4.23±0.03	2.12±0.59
9	8.26±0.00	5.85±0.01	5.14±0.62	2.96±0.64
12	8.36±0.00	6.81±0.01	6.30±0.28	3.95±0.91
24	8.23±0.16	8.08±0.11	7.73±0.60	6.90±0.02
36	8.31±0.07	7.84±0.09	7.83±0.02	7.84±0.11

ตารางผนวกที่ ข9 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ในซุปลั๊กที่มีการเติม สารสกัดขิงที่สกัดด้วยวิธีเยาะ (S) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)			
	ตัวอย่างควบคุม	6% ขิง (S)	8% ขิง (S)	10% ขิง (S)
0	4.23±0.04	4.26±0.00	4.23±0.00	4.23±0.00
3	4.60±0.31	4.34±0.11	4.08±0.22	4.09±0.33
6	6.85±0.00	6.31±0.01	5.42±0.02	4.58±0.01
9	8.26±0.00	7.73±0.54	7.12±0.64	5.60±0.78
12	8.36±0.00	8.14±0.45	6.93±0.00	5.36±0.00
24	8.23±0.16	8.41±0.06	8.15±0.21	7.78±0.08
36	8.31±0.07	7.52±0.57	7.50±0.13	7.87±0.30

ตารางผนวกที่ ข10 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ในซุปลั๊กที่มีการเติม สารสกัดขิงที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)			
	ตัวอย่างควบคุม	6% ขิง (U)	8% ขิง (U)	10% ขิง (U)
0	4.23±0.04	4.20±0.00	4.21±0.04	4.18±0.04
3	4.60±0.31	4.34±0.06	4.41±0.04	4.29±0.08
6	6.85±0.00	6.39±0.01	5.82±0.15	4.65±0.49
9	8.26±0.00	8.12±0.16	7.08±0.03	5.75±0.69
12	8.36±0.00	8.45±0.18	8.43±0.04	6.49±0.01
24	8.23±0.16	7.79±0.55	7.93±0.16	8.08±0.69
36	8.31±0.07	6.71±0.67	6.90±0.51	7.12±0.66

ตารางผนวกที่ ข11 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ร่วมกับ EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ตัวอย่างควบคุม	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)	
		5% กระชาย (U) + EDTA 250 ppm	5% กระชาย (U) + EDTA 1000 ppm
0	4.15±0.01	4.15±0.01	3.96±0.43
3	4.33±0.14	0.50±0.71	0
6	5.69±0.34	0	0
9	7.06±0.01	0	0
12	8.38±0.11	0	0
24	8.98±0.03	0	0
36	9.08±0.03	0	0

ตารางผนวกที่ ข12 การเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* ในซูปไก่ที่มีการเติมสารสกัดกระชายที่สกัดด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (U) ร่วมกับ EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ตัวอย่างควบคุม	ปริมาณเชื้อ (log CFU/ml)	
		10% กระชาย (U) + EDTA 250 ppm	10% กระชาย (U) + EDTA 1000 ppm
0	4.23±0.04	4.35±0.21	4.09±0.24
3	4.60±0.31	3.64±0.57	1.68±0.45
6	6.85±0.00	3.84±0.79	2.05±0.15
9	8.26±0.00	4.74±0.76	1.84±0.02
12	8.36±0.00	5.66±1.69	1.74±0.13
24	8.23±0.16	7.26±0.79	2.74±0.08
36	8.31±0.07	7.39±0.49	3.47±0.23

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายเอกรินทร์ ภัทรธนาดี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	29 ตุลาคม พ.ศ. 2521
สถานที่เกิด	จ. ชลบุรี
ประวัติการศึกษา	มัธยมต้น โรงเรียนประชาราษฎร์อุปถัมภ์ มัธยมปลาย โรงเรียนสามเสนวิทยาลัย ปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ประวัติการทำงาน	นักวิจัยโครงการพัฒนาเครื่องแกงเผ็ดแดงสำเร็จรูปเพื่อ สุขภาพด้วยโคโคซาน มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2544- 2546
ผลงานวิจัย	เสนอผลงานทางวิชาการ ภาคโปสเตอร์ เรื่อง ประสิทธิภาพสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเครื่องเทศต่อ จุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 และผลงานทางวิชาการ เรื่อง Antimicrobial Activity of Spice Extracts against Pathogenic and Spoilage Microorganisms ใน KASETSART JOURNAL volume 40, number 5: 159-165
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	โครงการอุดหนุนทุนวิจัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2547

