

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางต่อการนับจำนวนเชื้อรา ที่ปนเปื้อนในเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ

Comparison of the efficiency of diluents on the enumeration of molds contaminated in spices and spice products

5

สุพรรณณี เทพอรุณรัตน์^{1*}, สุลาวดี เขียวชม^{2*}
Supanee Theparoonrat^{1*}, Sulawadee Keawchom^{2*}

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนเชื้อราในเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศเป็นปัญหาสำคัญของการพัฒนาคุณภาพอาหารไทย เครื่องเทศมีสมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราทำให้การทดสอบเชื้อราได้ผลที่ไม่ถูกต้อง จึงได้พัฒนาวิธีทดสอบหาปริมาณเชื้อราในตัวอย่างเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ โดยการเปรียบเทียบสูตรสารละลายเจือจางสำหรับเชื้อราที่สามารถทำให้สมบัติยับยั้งการเจริญของเชื้อราของเครื่องเทศเป็นกลางได้ จำนวน 5 สูตร [F1 (Bacteriological peptone 1 g/L, Tween 80 30 mL/L, L-∞-Phosphatidylcholine : Lecithin 0.7 g/L), F2 (Bacteriological peptone 1 g/L, Tween 80 5 mL/L, L-∞-Phosphatidylcholine: Lecithin 7 g/L, Sodium thiosulfate 6 g/L, Sodium bisulfate 2.5 g/L), F3 (Fluid casein digest soya lecithin medium เติมน้ำ polysorbate 20 40 mL/L), F4 (L-Histidine 1 g/L, Tween 80 30 mL/L, L-∞-Phosphatidylcholine 3 g/L) and F5 (D/E Neutralizing broth (Himedia))] ที่มีต่อการเจริญของโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ dichloran rose-bengal chloramphenicol agar (DRBC) โดยใช้ตัวอย่างเครื่องเทศ 12 ตัวอย่าง คือ พริกแห้ง (2 ตัวอย่าง) พริกไทย (2 ตัวอย่าง) กานพลู (2 ตัวอย่าง) ขมิ้นชัน (1 ตัวอย่าง) โป๊ยกั๊ก (2 ตัวอย่าง) ลูกผักชี (1 ตัวอย่าง) และอบเชย (2 ตัวอย่าง) และผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ 5 ตัวอย่าง คือ พริกแกงเขียวหวาน พริกแกงมัสมั่น พริกแกงเผ็ด พริกแกงเหลือง และพริกแกงกะหรี่ รวม 17 ตัวอย่าง พบว่าสารละลายเจือจางสูตร F4 หรือ F5 สามารถลดผลกระทบจากสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศได้ดีที่สุด โดยให้ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อราสูงกว่าสารละลายเจือจาง 0.1% peptone (ตัวควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการใช้สารละลายเจือจางสูตร F4 หรือ F5 ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC agar เป็นวิธีทดสอบที่เหมาะสมในการตรวจนับเชื้อราในเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ

Abstract

Fungal contamination of spices and spice products was critical problem for quality assurance of Thai food. Antifungal activity of spices caused underestimation on mold contamination. This study was aimed to improve the efficiency of enumeration of mold in spices and spice products. A total of 17 samples including 12 spices: dried chilli (2), pepper (2), clove (2), turmeric (1), Chinese star (2), coriander seeds (1), and cinnamon (2), and 5 spice products (green curry paste, mussaman curry paste, red curry paste, southern yellow curry paste, and Indian-style curry paste) were subsequently examined on five diluents containing neutralizing agent : F1 (Bacteriological peptone 1 g/L, Tween 80 30 mL/L, L-∞-Phosphatidylcholine : Lecithin 0.7 g/L), F2 (Bacteriological peptone 1 g/L, Tween 80 5 mL/L, L-∞-Phosphatidylcholine: Lecithin 7 g/L, Sodium thiosulfate 6 g/L, Sodium bisulfate 2.5 g/L), F3 (Fluid casein digest soya lecithin medium with polysorbate 20 40 mL/L), F4 (L-Histidine 1 g/L, Tween 80 30 mL/L, L-∞-Phosphatidylcholine 3 g/L) and F5 (D/E Neutralizing broth (Himedia)) The sample were cultured on plating culture media dichloran rose-bengal chloramphenicol agar (DRBC). The most effective diluents which inhibited antifungal properties of spices were F4 or F5, demonstrated by the average number of mold colonies of these formulas gave significantly higher than 0.1% peptone (control). In conclusion, the usage of F4 or F5 formulas as diluent incorporated with DRBC agar is an effective method for enumeration of mold in spices and spice products.

คำสำคัญ: เครื่องเทศ เชื้อรา สารละลายเจือจาง สารทำให้เป็นกลาง สมบัติด้านการเจริญของเชื้อรา

Keywords: Spice, Spice products, Mold, Diluents, Neutralizing agent, Antifungal activity

¹ กรมวิทยาศาสตร์บริการ

² การประปานครหลวง

* E-mail address: sk.chom27@gmail.com

** Corresponding author E-mail address: supanee@dss.go.th

1. บทนำ (Introduction)

อาหารไทยมีส่วนผสมที่หลากหลาย ทั้งเครื่องสมุนไพรนานาชนิด เครื่องเทศ รวมถึงเครื่องปรุงรสต่างๆ มีการผลิตปริมาณมาก ทั้งระดับสินค้าชุมชน (OTOP) หรือระดับอุตสาหกรรม แต่ก็มีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกลุ่มเชื้อรา โดยมักพบการปนเปื้อนในวัตถุดิบจำพวกเครื่องเทศ อย่างไรก็ตามเครื่องเทศหลายชนิดในเครื่องแกงและอาหารไทยสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ [1, 2] แต่เชื้อรามีความทนทานสูง และมีสปอร์ ทำให้เชื้อเหล่านี้มีโอกาสรอดสูงกว่าแบคทีเรีย ซึ่งในเวลาต่อมาหากสภาพแวดล้อมเปลี่ยนไปในทางที่เอื้อต่อการเจริญของเชื้อรา หรือเครื่องเทศเก่าเก็บทำให้ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลดลง เชื้อราที่เหี่ยวหรือในอาหารก็จะเจริญ ทำให้อาหารเน่าเสีย และ/หรือสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ [3, 4, 5] ดังนั้นการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเครื่องเทศจึงมีความสำคัญมาก

ในปัจจุบันวิธีการทดสอบเชื้อราที่นิยมใช้กันทั่วไปอาจไม่เหมาะสม เพราะการทดสอบจะเป็นการเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ละลายออกจากเครื่องเทศและสมุนไพรในอาหารอาจไปละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ ทำให้การตรวจสอบหาปริมาณเชื้อราดังกล่าวได้น้อยกว่าความเป็นจริงหรืออาจตรวจไม่พบ ทั้งที่เชื้อราอาจยังมีเหลือรอดอยู่ แต่ไม่มีการเจริญให้เห็นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้การแปลผลการทดสอบผิดพลาด จากผลการทดสอบที่ได้ผู้ผลิตอาจประเมินว่ามีเชื้อราปริมาณน้อยหรือไม่มีในวัตถุดิบ จึงใช้กระบวนการแปรรูปอาหารที่ต่ำเกินไป (under-processing) ทำให้เชื้อยังมีเหลือรอดในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และอาจเจริญทำให้อาหารเน่าเสีย หรือสร้างสารพิษในเวลาต่อมาเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อที่รอดชีวิต มาตรฐาน USP<61> Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests [6] แนะนำให้มีการทำให้สมบัติด้านเชื้อจุลินทรีย์หมดไปก่อนนำไปทดสอบหาเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถกระทำได้โดย การเพิ่มปริมาณสารละลายเจือจางหรืออาหารเลี้ยงเชื้อ การเติมสาร neutralizing agents ในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสารละลายเจือจาง การกรอง และการใช้หลายวิธีข้างต้นร่วมกัน นอกจากนี้สารยับยั้งจุลินทรีย์ในเครื่องเทศบางชนิดยังเป็นสารกลุ่มที่ใช้ในเครื่องสำอาง หรือผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เช่น กลุ่ม phenolic compounds, aldehydes, alcohol, hydrocarbon, monoterpene เป็นต้น ซึ่งการทดสอบทางจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีการเติมสาร neutralizing agent เพื่อยับยั้งสมบัติการต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) เช่นเดียวกัน

กรมวิทยาศาสตร์บริการโดยกลุ่มคุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาหาร กองผลิตภัณฑ์อาหารและวัสดุสัมผัสอาหารจึงได้ศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการทดสอบเชื้อราในเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์ เพื่อนำไปปรับปรุงวิธีทดสอบให้มีความแม่นยำถูกต้องเพิ่มขึ้น สามารถลดผลกระทบจากสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ของเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ ช่วยในการพัฒนาสินค้าชุมชน (OTOP) กลุ่มเครื่องแกงและน้ำพริกสำเร็จรูป รวมถึงสินค้าอื่นๆที่มีการนำพืชสมุนไพรมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ผลการตรวจสอบคุณภาพสินค้าที่ได้ยังสามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเกี่ยวกับจุลชีววิทยาของอาหารในประเทศไทยที่จะนำไปใช้ในการกำหนดมาตรฐานด้านความปลอดภัยของอาหารเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ข้อมูลจากผลการวิจัยใช้ประกอบการพิจารณาปรับปรุงและให้ข้อคิดเห็นร่างมาตรฐานของประเทศและระหว่างประเทศ

2. วิธีการวิจัย (Experimental)

2.1 ตัวอย่าง

2.1.1 เครื่องเทศชนิดเดียวทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ พริกแห้ง (2 ตัวอย่าง) พริกไทย (2 ตัวอย่าง) กานพลู (2 ตัวอย่าง) ขมิ้นชัน (1 ตัวอย่าง) โป๊ยกั๊ก (2 ตัวอย่าง) ลูกผักชี (1 ตัวอย่าง) อบเชย (2 ตัวอย่าง) รวม 12 ตัวอย่าง จากตลาดในเขตกรุงเทพมหานคร จังหวัดสมุทรสาคร และจังหวัดนครปฐม

2.1.2 ผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ 5 ตัวอย่าง ได้แก่ พริกแกงเขียวหวาน พริกแกงมัสมั่น พริกแกงเผ็ด พริกแกงเหลือง จากตลาดยิ่งเจริญ กรุงเทพมหานคร และพริกแกงกระหรี่ ตลาดบางเขน กรุงเทพมหานคร

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี สารละลาย และวิธีเตรียม

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (Oxoid)

2.2.2 สารละลายเจือจาง 0.1% Peptone (Oxoid)

ละลาย Peptone Bacteriological 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดขนาด 1000 มิลลิลิตร ปริมาตร 470 มิลลิลิตร และขวดขนาด 150 มิลลิลิตร ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ค่า pH 7.1 ± 0.2

2.2.3 สารละลายเจือจาง สูตร 1 (F1)

ละลาย Bacteriological peptone (Oxoid) 1 กรัม Tween 80 for synthesis (Merck) 30 มิลลิลิตร และ L- α -Phosphatidylcholine (Sigma): Lecithin 0.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ค่า pH 7.2 ± 0.2

2.2.4 สารละลายเจือจาง สูตร 2 (F2)

ละลาย Bacteriological peptone (Oxoid) 1 กรัม Tween 80 for synthesis (Merck) 5 มิลลิลิตร L- α -Phosphatidylcholine (Sigma): Lecithin 7 กรัม Sodium thiosulfate 6 กรัม Sodium bisulfate 2.5 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ค่า pH 7.6 ± 0.2

2.2.5 สารละลายเจือจาง สูตร 3 (Fluid Casein Digest Soya Lecithin Medium, Himedia) (F3)

ละลาย Fluid Casein Digest Soya Lecithin Medium 25.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 960 มิลลิลิตร เติม Polysorbate 20 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ค่า pH 7.3 ± 0.2

2.2.6 สารละลายเจือจาง สูตร 4 (F4)

ละลาย L-Histidine (Sigma) 1 กรัม Tween 80 for synthesis (Merck) 30 มิลลิลิตร L- α -Phosphatidylcholine (Sigma) 3 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 970 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ค่า pH 7.2 ± 0.2

2.2.7 สารละลายเจือจาง สูตร 5 (Dey-Engley Neutralizing broth, Himedia) (F5)

ละลาย D/E Neutralizing broth (Himedia) 39.02 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ค่า pH 7.6 ± 0.2

2.3 การศึกษาสารละลายเชื้อจากที่มีสมบัติยับยั้งความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อราของเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ

2.3.1 การเตรียมตัวอย่างเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ

ทำตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องปั่นผสม (blender) ซั่งตัวอย่าง 50.0 ± 0.1 กรัม ใส่ในขวดที่บรรจุ 0.1% peptone water (ตัวควบคุม) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร และขวดที่บรรจุสารละลายเชื้อจากที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 5 สูตร คือ F1 F2 F3 F4 และ F5 ปริมาตร 450 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างให้กระจายทั่ว สารละลายตัวอย่างที่ได้ถือว่ามีความเจือจาง 10-1 (ตัวอย่างถูกเจือจาง 10 เท่า) เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเจือจางที่เหมาะสม โดยปิเปตตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10-1 จำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดที่มีสารละลายเชื้อจากชนิดต่างๆ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จะได้ระดับความเจือจาง 10-2 เขย่าให้ตัวอย่างกระจายทั่วกันทั้งขวด สารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางอื่นๆ ทำเช่นเดียวกัน

2.3.2 การศึกษาผลกระทบของสารละลายที่มีสาร neutralizing agents ชนิดต่างๆต่อการยับยั้งความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อราในเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ

ตัวอย่างสารละลายเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศที่ระดับความเจือจางต่างๆ (ข้อ 2.3.1) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาให้เพาะเชื้อโดยวิธี spread plate ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC agar) จำนวน 3 เพลท เพลทละ 0.3 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นเกลี่ยให้สารละลายตัวอย่างกระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แท่งแก้ววอร์ม ทั้งไว้จนกระทั่งสารละลายตัวอย่างซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ (ประมาณ 10 นาที) ในแต่ละระดับความเจือจางทำ 3 ซ้ำ นำเพลทที่ได้วางซ้อนกันไม่เกิน 3 เพลท ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C โดยไม่ต้องกลับเพลทนาน 5 วัน ถ้าไม่มีโคโลนีขึ้นบนเพลทให้นำไปบ่มต่ออีก 48 ± 2 ชั่วโมง จึงนำมานับจำนวน และคำนวณปริมาณเชื้อราที่พบในตัวอย่าง

2.3.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทดสอบเชื้อราของ neutralizing agents ในเชิงสถิติ

นำค่าจำนวนโคโลนีของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC agar ร่วมกับสารละลายเชื้อจากทั้ง 5 สูตร มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทดสอบเชื้อรากับสารละลายเชื้อจากที่เป็นตัวควบคุม โดยกำหนดให้ผลการทดสอบจะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อจำนวนโคโลนีเชื้อราที่มีปริมาณต่างกันมากกว่าหรือเท่ากับ $0.5 \log \text{CFU/g}$

3 ผลและวิจารณ์ (Results and Discussion)

3.1 การศึกษาสารละลายเชื้อจากที่มีสมบัติ neutralizing agents ในการยับยั้งความสามารถในการต้านการเจริญของเชื้อราของเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศผลการศึกษาการใช้สารละลายเชื้อจากที่เติมสาร neutralizing agents ที่แตกต่างกัน ทั้งหมด 6 สูตร คือ 0.1% peptone water (ตัวควบคุม) F1 F2 F3 F4 และ F5 เพื่อยับยั้งสมบัตินี้ในการเจริญของเชื้อรา (antifungal activity) ของเครื่องเทศ 7 ชนิด ได้แก่ อบเชย โป๊ยกั๊ก กานพลู ลูกผักชี ขมิ้นชัน พริก และพริกไทย ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าเครื่องเทศในกลุ่ม อบเชย กานพลู ขมิ้นชัน และพริกแห้ง สารละลายเชื้อจากสูตร F4 และ F5 สามารถยับยั้งสมบัตินี้ antifungal activity ของเครื่องเทศได้ เนื่องจากพบจำนวนโคโลนีเชื้อราสูงกว่าสารละลายเชื้อจากมาตรฐาน 0.1% peptone บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน โดยจะเห็นผลชัดเจนในตัวอย่างอบเชยทั้ง 2 แหล่ง (จังหวัดสมุทรสาครและนครปฐม) และพริกแห้งเม็ดเล็ก ตลาดอมรพันธ์ กรุงเทพมหานคร ที่ให้ค่าจำนวนโคโลนีเชื้อราที่นับได้แตกต่างจากสารละลายเชื้อจาก 0.1% peptone มากกว่า $0.5 \log \text{CFU/g}$ ซึ่งถือว่าแตกต่างกันทางสถิติ

เครื่องเทศในกลุ่ม โป๊ยกั๊ก ลูกผักชี พริกไทย พบว่าสารละลายเชื้อจากสูตร F3 F4 และ F5 ในการยับยั้งสมบัตินี้ antifungal activity ของพริกไทยได้ดีกว่าสูตรอื่น ในเครื่องเทศโป๊ยกั๊กพบว่าสารละลายเชื้อจากสูตร F1 F4 และ F5 ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อราที่นับได้แตกต่างจากสารละลายเชื้อจาก 0.1% peptone ถึง $0.5 \log \text{CFU/g}$ ซึ่งถือว่าแตกต่างกันทางสถิติ ในลูกผักชีสารละลายเชื้อจากสูตร F2 F3 และ F5 ยับยั้งสมบัตินี้ antifungal activity ของเครื่องเทศได้ดีกว่าสูตรอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายเชื้อจากสูตร F1 ให้ผลในการยับยั้งสมบัตินี้ antifungal activity ของเครื่องเทศได้เช่นกันในตัวอย่างกานพลูจากจังหวัดนครปฐม โป๊ยกั๊กจากจังหวัดสมุทรสาคร และพริกแห้งเม็ดใหญ่ แสดงว่าสามารถยับยั้งสมบัตินี้ antifungal activity ของเครื่องเทศได้เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเชื้อจากมาตรฐาน (0.1% peptone) แม้ว่าจะมีปริมาณสาร lecithin ต่ำกว่าสูตรอื่น ซึ่งมีปริมาณเพียง 0.7 กรัมต่อลิตร อาจเป็นเพราะมีปริมาณสาร polysorbate 80 ในสูตรสูงถึง 30 มิลลิลิตร จึงทำหน้าที่ทดแทนสาร lecithin ในการยับยั้งสมบัตินี้ antifungal activity ได้ จากผลการทดลองข้างต้นในตัวอย่างเครื่องเทศแต่ละชนิดจำนวนทั้งหมด 12 ตัวอย่าง พบว่าสารละลายเชื้อจากสูตร F4 และ F5 นั้น สามารถใช้เป็นสาร neutralizer ในการทดสอบเชื้อราในเครื่องเทศได้เกือบทุกชนิดที่ใช้ในการทดสอบ

ตัวอย่างเครื่องเทศที่มีส่วนประกอบหลักเป็นเครื่องเทศหลายชนิดและมีสาร antifungal activity หลายกลุ่มออกฤทธิ์ร่วมกัน จากการทดลองใช้ตัวอย่างเครื่องเทศทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ได้แก่ พริกแกงเขียวหวาน พริกแกงมัสมั่น พริกแกงเผ็ด พริกแกงเหลือง และพริกแกงกระหรี่ ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าในพริกแกงมัสมั่น พริกแกงเผ็ด พริกแกงเหลือง และพริกแกงกระหรี่ สามารถใช้สารละลายเชื้อจากสูตร F4 และ F5 ส่วนพริกแกงเขียวหวาน ใช้สารละลายเชื้อจากสูตร F1 F2 และ F5 เป็นสารยับยั้งสมบัตินี้ antifungal activity ของเครื่องเทศได้ เนื่องจากสามารถนับจำนวนโคโลนีเชื้อราได้สูงกว่าสารละลายเชื้อจาก 0.1 % peptone บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

เครื่องเทศที่นำมาทดสอบมีส่วนประกอบของสาร antifungal activity ที่แตกต่างกัน ซึ่งระดับความรุนแรงของการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก็แตกต่างกันตามชนิดของสารที่เป็นส่วนประกอบ เครื่องเทศในกลุ่ม อบเชย กานพลู ขมิ้นชัน และพริกแห้ง มีสาร antifungal activity กลุ่มหลัก คือ phenolic compounds และ aldehydes เครื่องเทศในกลุ่ม โป๊ยกั๊ก ลูกผักชี พริกไทย ประกอบด้วยสาร antifungal activity ในกลุ่ม hydrocarbon และ terpenes ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่ำกว่าสารในกลุ่ม phenolic compounds ซึ่งจากผลการทดลองสารละลายเชื้อจากสูตร F4 และ F5 สามารถยับยั้งสมบัตินี้ antifungal activity ของเครื่องเทศได้ดี เป็นผลมาจากสาร neutralizer ทั้ง 2 สูตรที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย lecithin polysorbate 80 และ L-histidine มีสมบัตินี้ยับยั้งความเป็น antimicrobial activity หรือ antifungal activity ของสารในกลุ่ม phenolic compounds และ aldehydes ส่วนผลิตภัณฑ์เครื่องเทศ สาร antifungal ส่วนใหญ่มาจากน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ในเครื่องเทศ เช่น พริกแห้งมีสาร capsaicin ข่ามีสาร D, L-10-acetoxycinnamic acid และ eugenol [7] ตะไคร้มีสาร monoterpenes compounds และ citral [8] กระเทียมมีสาร alliin ลูกผักชีมีสารกลุ่ม camphor cyclohexanol acetate (cis-2-tert.butyl-) limonene alpha-pinene [9] ยี่ห่วยมีสาร eugenol [10] พริกไทยมีสาร piperine [11] กานพลูมีสาร eugenol [12] อบเชยมีสาร cinnamic aldehyde และ eugenol ขมิ้นมีสาร curcuminoids [13] หัวหอมแดงมีสารหลักในกลุ่ม diallyl sulfide [14] และใบกระวานมีสาร cineole [15] ซึ่ง

สารเหล่านี้เป็นสารในกลุ่ม phenolic compounds aldehyde oxide และ hydrocarbon เป็นหลัก และสามารถลดสมบัติความเป็น antifungal activity ได้โดยการเติมสาร lecithin polysorbate 80 polysorbate 20 histidine และ sodium thiosulfate ในสารละลายเจือจางทั้ง 5 สูตร นอกจากนี้เครื่องเทศชนิดต่าง ๆ ที่เป็นส่วนผสมในเครื่องแกง ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยเฉพาะเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. ที่สร้างสาร aflatoxin (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*), *Alternaria alternata*, *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. verrucosum*, *P. expansum*), *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum*, *F. graminearum*, *F. culmorum* เป็นต้น) และเชื้อราที่ก่อโรคในพืช *Botrytis cinerea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Sclerotinia sclerotiorum* เป็นต้น [16]

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหรือวิธีมาตรฐานที่ใช้สารในกลุ่ม tween 80, sodium thiosulfate, lecithin, L-histidine หรือสารละลายเจือจางสูตร F5 (D/E Neutralizing Broth: Dey-Engley Neutralizing Broth) เป็นสาร neutralizing agents ในการทดสอบหาจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ที่มีสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด หรือ non-sterile products โดย Scott และคณะ [17] ได้ทดสอบความใช้ได้ของวิธีฟื้นฟูจุลินทรีย์จากสารฆ่าเชื้อ (Validation of microbial recovery from disinfectants) โดยใช้ diluting broth (AOAC), Dey-Engley Neutralizing Broth (DEB), Lethen (LET), NIH Thioglycollate Broth (NIH), Trypticase with Tween (TAT), and Trypticase Soy Broth with Polysorbate 80 and Lecithin (TPL) เป็นสาร neutralizing agents พบว่าสามารถฟื้นฟูเซลล์แบคทีเรียได้ถึงร้อยละ 75 และ Dey-Engley Neutralizing Broth เป็น neutralizing broth ที่ดีที่สุดสำหรับสารฆ่าเชื้อทุกประเภท วิธีมาตรฐาน ISO 21149: 2006 Cosmetics- Microbiology-Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria [18] หรือ ISO 16212: 2008 Cosmetics-Microbiology-Enumeration of yeast and mould [19] ใช้สาร neutralizers ในกลุ่ม lecithin, L-histidine, polysorbate 80, saponin glycine, L-cysteine และ D/E Neutralizing Broth เป็นสารละลายเจือจางและ rinsing liquid ในเทคนิค membrane filtration เพื่อลดความรุนแรงของสารฆ่าเชื้อในเครื่องสำอาง

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อราในเครื่องเทศ ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC agar ร่วมกับสารละลายเจือจางสูตร F1 F2 F3 F4 และ F5 เทียบกับสารละลายเจือจาง 0.1% peptone

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อรา (log CFU/g)					
	0.1% peptone	F1	F2	F3	F4	F5
อบเชย จังหวัดสมุทรสาคร	2.54	2.97	2.98	3.27	3.90	3.45
อบเชย จังหวัดนครปฐม	2.56	2.14	2.05	2.93	2.86	3.01
โปยัก จังหวัดสมุทรสาคร	1.43	1.48	1.10	0.33	1.63	1.49
โปยัก จังหวัดนครปฐม	2.63	2.64	0	2.82	3.06	2.99
กานพลู จังหวัดสมุทรสาคร	3.26	2.85	0	2.96	3.20	3.23
กานพลู จังหวัดนครปฐม	2.81	3.12	2.30	3.11	2.97	2.92
ลูกผักชี จังหวัดสมุทรสาคร	4.05	4.23	4.59	4.32	4.14	4.29
ขมิ้นชัน ตลาดอมรพันธ์ กรุงเทพมหานคร	3.66	3.38	3.25	3.56	3.65	3.68
พริกแห้งเม็ดเล็ก ตลาดอมรพันธ์ กรุงเทพมหานคร	4.51	4.50	3.83	5.54	5.97	5.87
พริกแห้งเม็ดใหญ่ ตลาดบางเขน กรุงเทพมหานคร	4.89	4.83	3.25	4.88	4.88	4.58
พริกไทยดำแบบเม็ด ตลาดอมรพันธ์ กรุงเทพมหานคร	2.15	2.08	2.33	2.27	2.75	2.44
พริกไทยขาวแบบบดละเอียด ตลาดบางเขน กรุงเทพมหานคร	3.28	3.25	3.00	3.38	3.42	3.40

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อราในพริกแกง ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC agar ร่วมกับสารละลายเจือจางสูตร F1 F2 F3 F4 และ F5 เทียบกับสารละลายเจือจาง 0.1% peptone

ตัวอย่าง	ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อรา (log CFU/g)					
	0.1% peptone	F1	F2	F3	F4	F5
พริกแกงเขียวหวาน ตลาดยิ่งเจริญ กรุงเทพมหานคร	1.66	1.66	1.78	0.97	1.03	1.89
พริกแกงมัสมั่น ตลาดยิ่งเจริญ กรุงเทพมหานคร	0.97	1.40	1.62	1.07	1.79	1.23
พริกแกงเผ็ด ตลาดยิ่งเจริญ กรุงเทพมหานคร	2.79	2.59	2.68	2.68	2.90	2.76
พริกแกงเหลือง ตลาดยิ่งเจริญ กรุงเทพมหานคร	2.70	2.66	2.76	2.72	2.73	2.77
พริกแกงกระหรี ตลาดบางเขน กรุงเทพมหานคร	1.26	0.67	0.77	1.30	1.56	1.40

การทดสอบเชื้อราในเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศนอกจากการเลือกใช้สารละลายเจือจางที่เหมาะสมแล้ว ก็ควรเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ออกฤทธิ์ส่งเสริมกันในการทดสอบเชื้อรา และยังต้องอาศัยลักษณะโคโลนีเป็นปัจจัยหนึ่งในการตัดสินใจเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม อาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีเชื้อราสูงที่สุดในตัวอย่างเครื่องเทศบางชนิด แต่โคโลนีเชื้อรามีขนาดเล็ก จนสังเกตเห็นได้ยาก ทำให้ยากต่อการนับจำนวนเชื้อรา และต้องอาศัยความชำนาญและความรอบคอบในการตรวจนับมากยิ่งขึ้นเพื่อลดความผิดพลาด นอกจากนี้ควรศึกษาเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศอื่นๆ อีก เพื่อให้ได้วิธีการทดสอบเชื้อราที่เหมาะสมกับเครื่องเทศและอาหารไทยชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ควรศึกษาจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้เครื่องเทศ เช่น แซลมอนเนลลา คลอสทริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์, สแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส และแบซิลลัส ซีเรียส เป็นต้น

4. สรุป (Conclusion)

การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางที่มี neutralizing agents ยับยั้งสมบัติ antifungal activity ของเครื่องเทศ ในการทดสอบเชื้อรา จำนวน 5 สูตร คือ F1 F2 F3 F4 และ F5 จากตัวอย่างเครื่องเทศ 7 ชนิด จำนวน 12 ตัวอย่าง คือ อบเชย (2) โป๊ยกั๊ก (2) กานพลู (2) ลูกผักชี (1) ขมิ้นชัน (1) พริกแห้ง (2) และพริกไทย (2) และเครื่องเทศที่ประกอบด้วยเครื่องเทศหลากหลายชนิด จำนวน 5 ตัวอย่าง คือ พริกแกงมัสมั่น พริกแกงเหลือง พริกแกงเผ็ด และพริกแกงกระหรี พบว่าการใช้สารละลายเจือจางสูตร F4 และ F5 ให้จำนวนโคโลนีเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อสูงที่สุด ดังนั้นสารละลายเจือจางสูตร F4 และ F5 มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นสารละลายเจือจางในการทดสอบเชื้อราในเครื่องเทศและผลิตภัณฑ์เครื่องเทศที่ใช้ในการทดสอบได้เกือบทุกชนิด เนื่องจากมีองค์ประกอบหลักเป็นสาร L-histidine polysorbate 80 (Tween 80) และ lecithin, sodium thioglycollate, sodium thiosulfate และ sodium bisulfite ซึ่งมีสมบัติยับยั้งความเป็น antifungal activity

5. กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ขอขอบคุณกรมวิทยาศาสตร์บริการที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยตลอดโครงการนี้ ขอขอบคุณผู้อำนวยการกองผลิตภัณฑ์อาหารและวัสดุสัมผัสอาหาร นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ของกลุ่มคุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาหารทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมและผลักดันให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

6. เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] เกรรินทร์ ภัทรณวดี จิตศิริ ทองสอน วรภา มหากาญจนกุล และ เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. ประสิทธิภาพสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเครื่องเทศต่อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย. *เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สาขา* *เศรษฐศาสตร์ สาขาบริหารธุรกิจ*. 2549, 297-307
- [2] Beuchat L.R. and D. A. Golden. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*. 1989, 43, 134-142.
- [3] ฐิตินันท์ บัวบาน. ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ในเครื่องเทศและการเหลือรอดของจุลินทรีย์ในระหว่างการแปรรูปน้ำพริกตาแดงและการเก็บรักษา. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยขอนแก่น 2552.
- [4] ดวงจันทร์ สุขประเสริฐ และ วนิดา ยุธยาดี. สารพิษอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในเครื่องเทศ. *วารสารสาขาวิชาอาหาร*. 2545, 4(2), 33-37.
- [5] อติพล ดิลกพิมพ์. *ราและอะฟลาทอกซินในน้ำพริกแกงและเครื่องเทศที่เป็นองค์ประกอบ*. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2546.
- [6] USP. *Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests* [online]. [viewed 11 February 2017]. Available from: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c61.pdf>
- [7] JAYASHREE T. and C. SUBRAMANYAM. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Letters Applied Microbiology*. 1999, 28, 179-183.
- [8] CRISTIANE B.S., S.S. GUTERRES, V. WEISHEIMER and E.S. ELFRIDES SCHAPOVAL. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008, 12(1), 63-66.
- [9] DARUGHE F., M. BARZEGAR and M. A. SAHARI. Antioxidant and antifungal activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil in cake. *International Food Research Journal*. 2012, 19(3), 1253-1260.

- [10] BHATT MEHUL K, M.B. SHANJAR, K. SALUJA AJAY, D. KISHOR AND A.D. CAPTAIN. Evaluation of anti-microbial activity of *Ocimum sanctum* methanolic extract. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*. 2012, 39-41.
- [11] SHIVA RANI S.K., N.I SAXENA AND UDAYSREE. Antimicrobial activity of black pepper (*Piper nigrum* L.) *Global Journal of Pharmacology*. 2013, 7(1), 87-90.
- [12] TAJKARIMI, M.M., S.A. IBRAHIM AND D.O. CLIVER. Review antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*. 2010, 21, 1199-1218.
- [13] APISARIYAKUL A., N. VANITTANAKOM AND D. BUDDHASUKH. Antifungal activity of tumeric oil extracted from *Curcuma longa* (*Zingiberaceae*). *Journal of Ethnopharmacol*. 1995, 49, 163-169.
- [14] RATTANACHAIKUNSOPON P. AND PHUMKHACHORN P. Shallot (*Allium ascalonicum* L.) oil: diallyl sulfide content and antimicrobial activity against food-borne pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 2009, 3, 747-750.
- [15] SEDEF N.E., N. KARAGOZLU, S. KARAKAYA AND S. SAHIN. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oils extracted from *Laurus nobilis* L. leaves by using solvent-free microwave and hydrodistillation. *Food and Nutrition Sciences*. 2014, 5, 97-106.
- [16] KOCIĆ-TANACKOV S. D. AND G. R. DIMIĆ. Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. 2013, 838-849.
- [17] SCOTT V.W.S., W.P. DAVID, R. STEPHEN AND K.B. DANIEL. Validation of microbial recovery from disinfectants. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2002, 56(5), 255-266.
- [18] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 21149: 2006. *Cosmetics - Microbiology of Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria*.
- [19] INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 16212: 2008. *Cosmetics – Microbiology - Enumeration of yeast and mould*.