สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์และการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ และการประยุกต์ใช้

ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SPICE ESSENTIAL OILS AND APPLICATION

พรพรรณ วิมุตติโกศล

PORNPAN WIMUTTIGOSOL

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 110391
วัน,เดือน,ปี 2 พ.ค. 2553

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMITL-2010-SC-M-020-028

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF SPICE ESSENTIAL OILS AND APPLICATION

PORNPAN WIMUTTIGOSOL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2010

KMITL-2010-SC-M-020-028

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2010

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ สมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์และการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ และการประยุกต์ใช้

Antimicrobial and Antioxidant Properties of Spice Essential oils and Application

นักศึกษา นางสาวพรพรรณ วิมุตติโกศล

รหัสประจำตัว 49068351

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.ดุษฎี	ธนะบริพัฒน์	
รศ.ดร.สุรีย์	นานาสมบัติ	
รศ.ดร.ประพันธ์	ปิ่นศิโรดม	
ผศ.ดร.ภาณุวัฒน์	สรรพกุล	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 เวลา 10.00 น.

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณ 1 คณะวิทยาศาสตร์ ห้อง 424

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 1 เดือน มิ.ย. พ.ศ. 53

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจล.

วันที่ส่งเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์

วันที่ 4 เดือน ส.ค. พ.ศ. 53

ลงชื่อ.....

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ทั้งนี้ห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิทยานิพนธ์เรื่อง	สมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์และการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศและการประยุกต์ใช้
ชื่อนักศึกษา	นางสาวพรพรรณ วิมุตติโกศล
รหัสนักศึกษา	49068351
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

ในการศึกษากิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ 16 ชนิดโดยน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ 8 ชนิดได้แก่ เทียนสัตตบุษย์ (*Pimpinella anisum*) เร่ว (*Amomum xanthioides*) อบเชย (*Cinnamomum zeylanicum*) เทียนตาตั๊กแตน (*Anethum graveolens*) จันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) ขมิ้นอ้อย (*Curcuma zedoaria*) พริกหอม (*Zanthoxylum limonella*) และกระทือ (*Zingiber zerumbet*) พบว่า น้ำมันอบเชยมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่สุด โดยแบคทีเรียที่มีความไวต่อน้ำมันอบเชยมากที่สุด คือ *Bacillus cereus* ซึ่งมีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันอบเชย น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันจันทน์เทศ และน้ำมันพริกหอมมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราได้ดี เชื้อราที่มีความไวต่อน้ำมันเหล่านี้ คือ *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus ochraceus* และ *Fusarium moniliforme* และเมื่อทดสอบหาค่า fractional inhibitory concentration index (FICI) ของน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ กับน้ำมันอบเชยและน้ำมันพริกหอมพบว่าค่า FICI มีค่าอยู่ระหว่าง 0.32-0.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลเสริมฤทธิ์กันเมื่อทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* และ *Salmonella* Rissen นอกจากนี้ยังได้ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศทั้ง 8 ชนิด พบว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศ และน้ำมันพริกหอมมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น เมื่อทดสอบด้วยวิธี DPPH พบว่าน้ำมันทั้งสามชนิดนี้มีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 0.29-5.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิธี β-carotene bleaching ได้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 61.46-68.52 วิธี FRAP สามารถเปลี่ยน Fe^{3+}-TPTZ ให้เป็น Fe^{2+}-TPTZ ได้ค่าความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.22-2.11 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม ในขณะที่น้ำมันอบเชยและน้ำมันพริกหอมมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี superoxide anion-scavenging activity ซึ่งมีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 84.30 และ 82.62 ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หอมระเหยทั้ง 3 ชนิดนี้ยังมีสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในปริมาณสูงโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 51.54-140.90 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัม

การศึกษาฤทธิ์ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารจำลองต่างชนิดกันได้แก่ starch agar, meat agar และ sausage agar ด้วยวิธี agar dilution พบว่าเชื้อ *Salmonella* Senftenberg, *Sal.* Rissen, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* มีความไวต่อน้ำมันอบเชยในอาหาร sausage agar (MIC เท่ากับ 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในอาหารชนิดอื่น ในขณะที่เชื้อ *Sal.* Senftenberg มีความต้านทานต่อน้ำมันอบเชยในอาหาร starch agar มากที่สุด (MIC 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และพบว่าเชื้อ *Sal.* Rissen มีความต้านทานต่อน้ำมันจันทน์เทศมากที่สุดในอาหาร sausage agar (MIC เท่ากับ 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ทดสอบ (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium*) พบว่ามีความต้านทานต่อน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศมากกว่าแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อน้ำมันจันทน์เทศในอาหาร sausage agar มากที่สุด แต่กลับมีความไวต่อน้ำมันอบเชยเมื่อทดสอบบนอาหารชนิดเดียวกัน และจากค่า MIC ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร sausage agar จึงนำมาศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยผสมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันเพื่อควบคุมการเจริญของ *Sal.* Rissen และ *S. aureus* และชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่มีการเติม *P. pentosaceus* (10^4 CFU/g) เป็นกล้าเชื้อ พบว่าน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็มมีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *S. aureus* ได้ 3.70 log CFU ต่อกรัมเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมักที่ 96 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (252 พีพีเอ็ม) ผสมกับน้ำมันจันทน์เทศ (1375 พีพีเอ็ม) มีประสิทธิภาพในการลดจำนวน *Sal.* Rissen ลงเหลือต่ำกว่า 1 log CFU ต่อกรัม และยังช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ เมื่อพิจารณาการยอมรับในทางประสาทสัมผัสพบว่าการใช้น้ำมันอบเชยร่วมกับน้ำมันจันทน์เทศเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคและยืดอายุการเก็บรักษาของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Antimicrobial and Antioxidant Properties of Spice Essential oils and Application
Student	Miss Pornpan Wimuttigosol
Student ID.	49068351
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2010
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Suree Nanasombat

Abstract

Eight essential oils of anise (*Pimpinella anisum*), bastard cardamom (*Amomum xanthioides*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), dill (*Anethum graveolens*), mace (*Myristica fragrans*), zedoary *(Curcuma zedoaria*), *Zanthoxylum limonella* and *Zingiber zerumbet* were determined for their antimicrobial activity against 16 microorganisms. Of all, cinnamon oil had the highest antibacterial activity. The most sensitive bacterium was *Bacillus cereus* with the minimum inhibitory concentration (MIC) of 0.5 mg/ml. Oils of anise, cinnamon, dill, mace and *Z. limonella* exhibited strong antifungal activity. The most susceptible fungal species to these oils were *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus ochraceus* and *Fusarium moniliforme*. The fractional inhibitory concentration index (FICI) of cinnamon oil mixed with mace oil, and cinnamon oil mixed with *Z. limonella* was in the range of 0.32-0.38 mg/ml, showing a synergistic effect against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella* Rissen. Antioxidant activity of these oils was studied. Compared to other oils, oils of cinnamon, mace and *Z. limonella* had stronger antioxidant activity with 0.29-5.66 mg/ml IC_{50} (by DPPH method), 61.46-68.52% antioxidant activity (by β-carotene bleaching method) and 0.22-2.11 mM/mg reducing capacity (by FRAP method), while oils of cinnamon and *Z. limonella* showed percentage of inhibition with 84.30% and 82.62% (by superoxide anion-scavenging activity), respectively. These oils also contained high amount of total phenolics (51.54-140.90 μg gallic acid/mg oil).

Antibacterial effect of cinnamon oil and mace oil on different food model media (starch agar, meat agar and sausage agar) against pathogenic bacteria and lactic acid bacteria was evaluated by agar dilution. *Salmonella* Senftenberg, *Sal. Rissen*, *S. aureus* and *L. monocytogenes*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

were more sensitive to cinnamon oil on sausage agar (MIC 0.063 mg/ml) than the others. *Sal.* Senftenberg was the most resistant bacteria to cinnamon oil with MIC value of 14 mg/ml on starch agar, while *Sal.* Rissen was the most resistant bacteria to mace oil on sausage agar (MIC 22 mg/ml). All lactic acid bacteria tested (*Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*) were more resistant to cinnamon and mace oils than pathogenic bacteria. Among all food model media, most of lactic acid bacteria had the highest resistance to mace oil, but showed sensitivity to cinnamon oil on sausage agar. Based on the MIC values of cinnamon and mace oils against pathogenic bacteria on sausage agar, effect of mixed essential oil at different concentrations on controlling growth of *Sal.* Rissen and *S. aureus* and retardation of lipid oxidation in fermented beef sausage was studied. *P. pentosaceus* (10^4 CFU/g) was used as starter culture. Cinnamon (1008 ppm) and mace (1375 ppm) oil combination effectively decreased *S. aureus* viable counts in beef sausage by 3.70 log CFU/g at the end of fermentation period (96 h). However, cinnamon oil at the concentration as low as 252 ppm mixed with mace oil (1375 ppm) was sufficient to cause decreasing number of viable *Sal.* Rissen to below detection level (<1 log CFU/g), and retardation of lipid oxidation. Considering sensory acceptability, this combination of cinnamon and mace oils can be used as effective strategy to control these pathogenic bacteria and extend shelf-life of fermented beef sausage.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ รศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และผศ.ดร.ภาณุวัฒน์ สรรพกุล กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะจนในที่สุดทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณอาจารย์ในสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ได้สั่งสอนอบรมให้ความรู้จนประสบความสำเร็จได้ในวันนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆน้องๆในห้องปฏิบัติการทุกคนที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร.ไพฑูรย์ รักเหลือ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยแนะนำและสนับสนุนในทุกเรื่องจนประสบความสำเร็จในวันนี้

พรพรรณ วิมุตติโกศล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญรูป.....XI

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....4

1.3 ขอบเขตการวิจัย.....4

1.4 ขั้นตอนของการศึกษา.....4

1.5 ประโยชน์ที่คาดหวังว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....5

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 สมุนไพรและเครื่องเทศ.....6

2.2 การจำแนกสมุนไพรและเครื่องเทศตามลักษณะการใช้ประโยชน์.....7

2.3 น้ำมันหอมระเหย.....13

2.4 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย.....21

2.5 อนุมูลอิสระ 28

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ.....29

2.7 วิธีวิเคราะห์สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....44

2.8 จุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก.....48

2.9 เครื่องเทศที่ใช้ในการทดลอง.....50

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ 57

3.2 วิธีการทดลอง.....59

3.2.1 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ.....59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *L. monocytogenes* 64

3.2.3 การศึกษาผลของส่วนผสมอาหารต่อฤทธิ์ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก 65

3.2.4 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยผสมในการต้านจุลินทรีย์และชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ 66

3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 70

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยในพืชสมุนไพร 71

4.2 ผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี Agar disc diffusion 71

4.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dilution 74

4.4 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย 77

4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด 79

4.6 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *L. monocytogenes* 83

4.7 ผลของส่วนผสมอาหารต่อฤทธิ์ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก 85

4.8 ผลของน้ำมันหอมระเหยผสมในการต้านจุลินทรีย์และชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ 88

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 97

บรรณานุกรม 99

ภาคผนวก ก 107

ภาคผนวก ข 110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ค..... 115
ภาคผนวก ง..... 124
ภาคผนวก จ.....130
ภาคผนวก ฉ..... 137
ภาคผนวก ช..... 144

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชนิดของเครื่องเทศที่ปลูกอยู่ทั่วโลก....8

2.2 ชนิดและตัวอย่างของสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน....15

2.3 ชนิดและตัวอย่างของสารกลุ่มเซสควิเทอร์พีน....17

2.4 ข้อดีและข้อเสียของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติเมื่อเปรียบเทียบกับ
สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์....35

2.5 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่พบในส่วนประกอบของอาหาร....36

3.1 เครื่องเทศที่นำมาใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย....57

4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในพืชแต่ละชนิด....71

4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ
โดยการทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion....73

4.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibition concentration)
ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ....75

4.4 ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI)
ของน้ำมันอบเชย จันทน์เทศ และพริกหอม....84

4.5 ผลการหาค่า minimum inhibitory concentration ของน้ำมันอบเชย
และน้ำมันจันทน์เทศในอาหาร 3 ชนิด....86

4.6 ค่าพีเอชในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ
ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส....92

4.7 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่าง
การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส....94

4.8 การประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ
เมื่อเก็บรักษาครบ 27 วัน....96

ก.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆกันเพื่อใช้ใน
การทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration....109

ข.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย $FeSO_4 \cdot 7H_2O$....113

ข.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก....113

ค.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 517
นาโนเมตร และร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical....116

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยที่เวลา 0 นาทีและ 105 นาที....119
ค.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตรของน้ำมันอบเชย
ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร....120
ง.1 ทรีทเมนต์ของการทำไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเพื่อหาปริมาณน้ำมันผสมที่เหมาะสม....125
ง.2 จำนวนจุลินทรีย์แบคทีเรียแลคติก *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Rissen
ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมที่ระดับต่างๆ....127
ง.3 ค่าพีเอชของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสม
ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ....128
จ.1 รูปแบบการผสมของน้ำมันหอมระเหย....131
จ.2 ความเข้มข้นของ stock solution และความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชย
และน้ำมันจันทน์เทศ....133
จ.3 การยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* โดยน้ำมันอบเชย
ร่วมกับน้ำมันจันทน์เทศ....134
จ.4 Stock solution ที่เตรียมได้จากค่า MIC และค่าความเข้มข้นสุดท้าย
ที่ใช้ในการทดสอบ....136
ฉ.1 จำนวนจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ครั้งที่1)....138
ฉ.2 จำนวนจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ครั้งที่ 2)....139
ฉ.3 จำนวนจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ครั้งที่ 3)....140
ฉ.4 จำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่างการหมัก
ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส....141
ฉ.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมัก
ที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส....142
ฉ.6 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อเก็บรักษา
ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน....143

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์บางชนิด....33
2.2 สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร....37
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของฟลาโวนอยด์และสารประกอบที่เกี่ยวข้อง....38
2.4 สารประกอบที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากเครื่องเทศ....40
2.5 สารประกอบบางชนิดของงาที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ....40
2.6 การเกิดสีโดยการทำปฏิกิริยาของ MDA และ TBA....45
4.1 ค่า Inhibition concentration 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ
ด้วยวิธีการวัดความสามารถในการขจัด 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical....80
4.2 ค่า Antioxidant activity (%) ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ
ด้วยวิธี β-carotene bleaching test....80
4.3 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศซึ่งวิเคราะห์ด้วย
วิธี Ferric reducing antioxidant power assay....81
4.4 ความสามารถในการยับยั้ง superoxide anion ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ
ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Superoxide anion-scavenging activity....81
4.5 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ....82
4.6 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ
ที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ
ระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส....89
4.7 จำนวน *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Rissen ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ
ที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ
ระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส....90
ค.1 กราฟการยับยั้ง DPPH radical กับน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ....117
ค.2 กราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate heptahydrate....121

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เครื่องเทศ (Spice) เป็นพืชเมืองร้อนที่มีสารที่ให้กลิ่นและมีรสชาติที่ร้อนแรงของ aromatic substance เมื่อกล่าวถึงเครื่องเทศมักหมายถึงส่วนต่างๆของพืชที่แห้ง เช่น ราก เมล็ด เปลือก เหง้า และดอกตูม โดยปกติมักนิยมนำมาปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร การนำเครื่องเทศมาปรุงแต่งรสชาติอาหารอาจนำมาใช้ได้ทั้งแบบบด แบบชิ้น หรืออาจใช้ในรูปของสารสกัด ซึ่งอาจอยู่ในรูปของโอลิโอเรซิน และน้ำมันหอมระเหย น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติเป็นของเหลว ไม่ค่อยมีสี มีโครงสร้างที่ซับซ้อน กลิ่นแรง มักพบอยู่ในส่วนต่างๆของพืช เช่น ดอก เมล็ด เปลือก ตา ใบ ผล ไม้หรือเปลือกไม้ น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศบางชนิดถูกนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารในอุตสาหกรรมอาหาร หรือแม้แต่ในอุตสาหกรรมน้ำหอมและอุตสาหกรรมยา และยังได้มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศบางชนิดมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ เช่น อบเชย เทียนสัตตบุษย์ เทียนตาตั๊กแตน จันทน์เทศ กานพลู ขมิ้นอ้อย และออริกาโน (Jirovetz และคณะ. 2003; Kosalec และคณะ. 2005; Singh และคณะ. 2005a; Wilson และคณะ. 2005; Gupta และคณะ. 2008; Rusenova และ Parvanov. 2009) นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Politeo และคณะ. 2006)

อนุมูลอิสระเป็นอะตอมหรือโมเลกุลเดมีที่เกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกาย เป็นสารที่มีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน (superoxide anion) อนุมูลไฮดรอกซี (hydroxyl radical) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารเหล่านี้มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยาสูง เนื่องจากเป็นสารที่มีอิเล็กตรอนไม่ครบคู่ดังนั้นสารนี้จึงต้องเข้าทำลายโมเลกุลอื่นที่อยู่ใกล้เคียงและดึงอิเล็กตรอนมาให้ตัวเองเพื่อให้เกิดความเสถียร การมีสารอนุมูลอิสระในร่างกายมากเกินไปจะเป็นอันตรายต่อโปรตีน ไขมัน สารพันธุกรรมและคาร์โบไฮเดรตทำให้เพิ่มอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคต่างได้หลายชนิด เช่น โรคความจำเสื่อม (Alzheimer's disease) อาการความจำบกพร่องเล็กน้อย (mild cognitive impairment) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (multiple sclerosis) โรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) โรคหัวใจล้มเหลว (cardiac failure) และโรคมะเร็ง (Ali และคณะ. 2008) ดังนั้นการบริโภคอาหารที่มีสารต้านอนุมูลอิสระเช่น ผัก ผลไม้ และเมล็ดถั่วต่างๆ จะสามารถปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายจากอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของโรคแก่ โรคเสื่อมต่างๆ และโรคมะเร็ง (Yanishlieva และคณะ. 1999)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่มีสมบัติในการยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่างๆที่เกิดจากอนุมูลอิสระ สารนี้มีบทบาทสำคัญทั้งในร่างกาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และในอาหาร ในอาหารที่มีไขมันสูงจะสามารถเกิดออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ซึ่งเป็นผลให้คุณค่าทางโภชนาการลดลงและเกิดกลิ่นรสผิดปกติ (Estévez และ Cava. 2006) ดังนั้นจึงได้นำสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT) และ Butylated hydroxyanisole (BHA) มาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาซึ่งได้มีการใช้สารนี้มาเป็นระยะเวลานานแล้ว แต่ในปัจจุบันพบว่าสารเหล่านี้อาจมีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค ถ้าหากใช้ในปริมาณมากเกินไป (Ali และคณะ. 2008) ดังนั้นจึงมีการนำสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติมาใช้ทดแทนเนื่องจากมีความปลอดภัย มีคุณค่าทางโภชนาการและช่วยในการรักษาโรคได้ ซึ่งได้มีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศหลายชนิดมีสารที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้เช่นกัน (Kulisic และคณะ. 2004; Singh และคณะ. 2005b; Politeo และคณะ. 2006)

ไส้กรอกหมักเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากเนื้อวัว หรือเนื้อหมู ไขมันสัตว์ ข้าวสุก เกลือ น้ำตาล ไนไตรท์ และส่วนผสมอื่นๆ เช่น กระเทียม หรือ พริกไทย โดยกระบวนการหมักอาจเกิดขึ้นตามธรรมชาติหรืออาจมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงไป ซึ่งในระหว่างกระบวนการหมักจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ กรดฟอร์มิก เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดแอซีทิล (diacetyl) เบนโซเอต (benzoate) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (Vuyst และ Vanamme. 1994; Holzapfel. 1998) แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีรายงานว่าตรวจพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักหลายชนิด (Boonmar และคณะ. 1997; Uyttendaele และคณะ. 1999) จุลินทรีย์ก่อโรคมักจะพบปนเปื้อนมากับเนื้อดิบที่ใช้เป็นวัตถุดิบ เช่น *Staphylococcus aureus* (Peel และคณะ. 1975), *Salmonella*, *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Campylobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Enterococcus*, *Moraxella*, *Psychrobacter* และอื่นๆ (Jay และคณะ. 2005) จุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้บางชนิดสามารถทนหรือปรับตัวให้ทนต่อสภาวะเครียดที่มีเกลือ กรด และสารยับยั้งชนิดต่างๆได้ดี เช่น *S. aureus* และ *Salmonella* (Jay และคณะ. 2005) โดยเฉพาะเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้างสารพิษในไส้กรอกหมักได้ โดยเชื้อจะสามารถสร้างสารพิษได้อย่างรวดเร็วและสารพิษที่สร้างขึ้นจะยังคงอยู่ในอาหารถึงแม้ว่าตัวเซลล์จะตายแล้วก็ตาม (Varnam และ Sutherland. 1995) นอกจากนี้ *Salmonella* ก็เป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่พบบ่อยในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและเป็นสาเหตุการเกิดโรคระบาด เช่น ในช่วงเดือนธันวาคมปี 1987 ถึงเดือนมกราคมปี 1988 ในประเทศอังกฤษ ได้พบการระบาดของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium DT 124 ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในไส้กรอกซาลามิของเยอรมันทำให้มีผู้ป่วยถึง 101 ราย (Cowden และคณะ. 1989) ในขณะที่ประเทศอิตาลีพบการระบาดเชื้อ *Sal.* Typhimurium PT 193 ในผลิตภัณฑ์เดียวกันซึ่งทำให้มีผู้ป่วย 83 ราย (Pontello และคณะ. 1998) นอกจากนี้ Boonmar และคณะ (1997) ยังได้ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ปนเปื้อนอยู่ในแหนมหมูถึงร้อยละ 81.25 ซึ่งเชื้อก่อโรคที่ปนเปื้อนเหล่านี้อาจถูกทำลายได้ด้วยความร้อนในการปรุงอาหาร แต่ถ้าผู้บริโภคนิยมรับประทานผลิตภัณฑ์เนื้อหมักแบบกึ่งสุกกึ่งดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์ก่อโรคที่ยังคงรอดชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ อาจจะเป็นสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องหาวิธีควบคุมแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ในไส้กรอกหมัก โดยอาจเติมสารต้านจุลินทรีย์ลงไปในผลิตภัณฑ์เพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้

น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศเป็นสารธรรมชาติที่ได้รับความสนใจมากในการนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารทดแทนสารเคมี มีน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดที่มีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ และได้มีรายงานว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักได้ ดังเช่นการรายงานของ Koutsoumanis และคณะ (1999) ได้รายงานว่าน้ำมันออริกาโนสามารถยับยั้งเชื้อ *Sal. enteritidis* ได้ในสลัดปลา น้ำมันมินต์ที่ระดับความเข้มข้น 5-20 ไมโครลิตรต่อกรัมสามารถยับยั้ง *Sal. enteritidis* ในโยเกิร์ตและสลัดแตงกวา (Tassou และคณะ. 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันกานพลู น้ำมันโรสแมรี่ (rosemary) น้ำมันออริกาโน (oregano) และน้ำมันเสจ (sage) สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *S. aureus* ในผลิตภัณฑ์เนื้อได้ (Shelef และคณะ. 1984; Pandit และ Shelef. 1994; Skandamis และ Nychas. 2001; Vrinda Menon และ Garg. 2001) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเพื่อช่วยควบคุมการเจริญของ *S. aureus* และ *Salmonella*

นอกจากปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรคแล้ว ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักยังเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีอายุการเก็บรักษาได้ไม่นาน เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันสัตว์เป็นส่วนประกอบซึ่งอาจเกิดปฏิกิริยาการหืนแบบออกซิเดทีฟ (oxidative rancidity) ในระหว่างการเก็บรักษาเกิดเป็นไฮโดรเปอร์ออกไซด์ และสารประกอบอื่นๆ เช่น แอลดีไฮด์ คีโตน กรดอินทรีย์ และแอลกอฮอล์ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรสชาติและกลิ่นหืนในผลิตภัณฑ์อาหาร (Allen และ Hamilton. 1994) การเติมสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) ลงไปในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหานี้ สารต้านออกซิเดชันสังเคราะห์ (synthetic antioxidant) บางชนิด เช่น BHT หรือ BHA เป็นสารกันหืนที่นิยมใช้เติมในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีไขมันสูง เมื่อบริโภคสารเหล่านี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานอาจเกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้นการใช้สารต้านออกซิเดชันจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อจึงนับว่าเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะทำให้ผู้บริโภครู้สึกปลอดภัย ซึ่งได้มีรายงานการนำน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศหลายชนิดมาใช้ได้อย่างประสบความสำเร็จในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น การใช้น้ำมันออริกาโน น้ำมันโรสแมรี่ น้ำมันไทม์ (thyme) น้ำมันขิง และน้ำมันเสจสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในผลิตภัณฑ์เนื้อได้ (Botsoglou และคณะ. 2002; Dzudie และคณะ. 2004; Estévez และ Cava. 2007; Liu และคณะ. 2009; Viuda-Martos และคณะ. 2009) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาและค้นคว้าสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ เพื่อที่จะคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพดีไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาทดแทนการใช้สารถนอมอาหารสังเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ

1.2.2 เพื่อศึกษาหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยผสมในการประยุกต์ใช้ในอาหาร

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยผสมในการต้านจุลินทรีย์และชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้นำเสนอถึงการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศชนิดต่างๆเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค และศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด และทำการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหารทดแทนการใช้สารเคมี

1.4 ขั้นตอนของการศึกษา

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้แบ่งเนื้อหาออกเป็น 5 บทด้วยกันคือ

บทที่ 1 กล่าวถึงความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย วัตถุประสงค์ ขอบเขตของการวิจัย ขั้นตอนการศึกษาและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

บทที่ 2 กล่าวถึงทฤษฎีพื้นฐานที่ใช้ในการวิจัย ซึ่งมีเนื้อหาเกี่ยวกับพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ น้ำมันหอมระเหย การกลั่นน้ำมันหอมระเหย องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย วิธีทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย ความหมายของอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

บทที่ 3 กล่าวถึงวิธีการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี Agar disc diffusion การหาค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดโดยวิธี Agar dilution method การศึกษาสมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย การศึกษาระดับหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยผสมในการประยุกต์ใช้ในอาหาร และการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยผสมในการต้านจุลินทรีย์และชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

บทที่ 4 กล่าวถึงผลที่ได้จากการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้มีประสิทธิภาพ สมบัติความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย ผลของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยผสมเพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารและผลของน้ำมันหอมระเหยผสมในการต้านจุลินทรีย์และชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

บทที่ 5 เป็นบทสรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1.5 ประโยชน์ที่คาดหวังว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้คาดหวังว่าจะนำน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระได้ดีจากการทดลองครั้งนี้ไปพัฒนาเป็นสารที่ช่วยในการถนอมอาหารหรือเป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อป้องกันหรือชะลอการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทดแทนการใช้สารเคมีเพื่อลดความเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคในระยะยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 สมุนไพรและเครื่องเทศ

สมุนไพรในพจนานุกรมฉบับราชบัณฑิตยสถาน พุทธศักราช 2542 ให้ความหมายของคำว่า สมุนไพร คือ ผลิตผลทางธรรมชาติที่ได้มาจากพืช สัตว์ และแร่ธาตุ หรืออาจผสมกับสารอื่นตามตำรายา เพื่อจะนำมาใช้ในการบำบัดโรค บำรุงร่ายกายหรือในอีกทางจะใช้เป็นยาพิษ ตัวอย่างเช่น กระเทียม เขากวางอ่อน น้ำผึ้ง กำมะถัน เป็นต้น ส่วนทางพระราชบัญญัติยา พุทธศักราช 2510 ได้ให้ความหมายของคำว่า สมุนไพร คือ ตัวยาที่ได้มาจากส่วนของพืช สัตว์และแร่ โดยที่ยังไม่ได้รับการผสม ปรุง หรือแปรสภาพฉะนั้น สมุนไพร (Medicine plant หรือ herb) จึงมีความหมายว่า สิ่งที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และมีคุณค่าสำหรับมนุษย์ในเรื่องของการรักษาโรคสุขภาพ อีกทั้งยังได้รวมไปถึงเรื่องความสวยความงามของร่างกายมนุษย์ (พิสุทธิพร. 2537)

เครื่องเทศ (Spice) เป็นพืชเมืองร้อนที่มีสารที่ให้กลิ่นและมีรสชาติที่ร้อนแรงของ aromatic substance โดยปกติแล้วมักใช้ในการปรุงอาหาร เครื่องเทศ คือ ส่วนต่างๆของพืชที่ถูกทำให้แห้งเช่น เมล็ด ผล ราก เหง้า เปลือก และดอกตูม โดยนำไปใส่ในอาหารในปริมาณไม่มากเพื่อเพิ่มรสชาติ โดยปกติมักจะนำเครื่องเทศไปทำให้แห้งและบดเป็นผง เครื่องเทศต่างจากสมุนไพร (Herb) ซึ่งเป็นส่วนของใบพืชสีเขียวโดยมักใช้แบบสดโดยหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ เช่น โหระพา และออริกาโน เป็นต้น (Parathasarathy และคณะ. 2008)

American Spice Trade Association (ASTA) ได้ให้คำจำกัดความของเครื่องเทศไว้ว่า เครื่องเทศเป็นผลิตภัณฑ์จากพืชที่ทำให้แห้งซึ่งจะนำไปใช้เพื่อการปรุงแต่งรสชาติอาหารเป็นหลัก รวมทั้งพืชเมืองร้อนที่มีสาร aromatics (Tropical aromatic) เช่น พริกไทย อบเชย กานพลู สมุนไพรจำพวกใบ (leafy herb) เช่น โหระพา (basil) ออริกาโน (oregano) เครื่องเทศประเภทเมล็ด เช่น งา (sesame) มัสตาร์ด (mustard) และจำพวกผัก เช่น หัวหอม กระเทียม นอกจากนี้เครื่องเทศหลายชนิดยังมีการใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆด้วย เช่น เป็นสารถนอมอาหาร ยา เครื่องสำอาง น้ำหอม ใช้ในพิธีกรรมทางศาสนา และใช้รับประทานเป็นผัก เป็นต้น (Parathasarathy และคณะ. 2008)

เครื่องเทศบางชนิดได้ถูกนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหาร บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นยา ช่วยให้เกิดความอยากอาหาร (appetizer) และช่วยย่อยอาหาร (digestive) เครื่องเทศบางชนิดมีคุณสมบัติต้านทานอนุมูลอิสระได้ ในขณะที่เครื่องเทศบางชนิดมีคุณสมบัติต้านและทำลายจุลินทรีย์ได้ดีอีกด้วย นอกจากนี้เครื่องเทศยังช่วยเพิ่มการหลั่งน้ำลายที่เต็มไปด้วยเอนไซม์ไทอะลิน (ptyalin) ซึ่งจะทำให้การย่อยสารอาหารประเภทแป้ง (starch) เกิดได้ดีขึ้นในกระเพาะอาหาร และยังสามารถกระตุ้นการทำงานสร้างความแข็งแรงและความต้านทานของส่วนที่เป็นเปลือกนอกของต่อมหมวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไต เครื่องเทศยังช่วยลดความดัน สามารถยับยั้งเลือดไม่ให้จับตัวเป็นก้อนและสามารถเร่งการละลายลิ่มเลือดในเส้นเลือดได้ (Parathasarathy และคณะ. 2008)

International Organization for Standardization (ISO) ได้กล่าวว่าเครื่องเทศที่ปลูกทั่วโลกมีประมาณ 109 ชนิด จัดอยู่ใน 31 วงศ์ (ตารางที่ 2.1) การจัดจำแนกเครื่องเทศสามารถทำได้หลายวิธี เช่น ส่วนของพืชที่นำไปใช้ (เช่น ราก เปลือก ใบ ดอก ผลและเมล็ด) ปริมาณที่ผลิตได้ สภาพอากาศ ระยะเวลาที่ปลูก และความสูงของพืช (Parathasarathy และคณะ. 2008)

2.2 การจำแนกสมุนไพรและเครื่องเทศตามลักษณะการใช้ประโยชน์

2.2.1 น้ำมันหอมระเหย (Essential oil) พืชสมุนไพรหลายชนิดสามารถนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยได้โดยวิธีการกลั่น ซึ่งจะได้น้ำมันหอมระเหยมีกลิ่นหอมแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชสมุนไพร น้ำมันหอมระเหยนี้มีสารสำคัญที่สกัดออกมาซึ่งจะใช้ประโยชน์ได้ตรงตามวัตถุประสงค์มากกว่า รวมทั้งการใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการนำพืชสมุนไพรมาใช้ในรูปอื่น ตัวอย่างของพืชสมุนไพรที่นำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย เช่น น้ำมันตะไคร้หอม ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสบู่ แชมพู น้ำหอมหรือใช้ทำสารไล่แมลง น้ำมันไพล ใช้ในผลิตภัณฑ์ครีมทาภายนอก ลดอาการอักเสบจากการฟกช้ำ น้ำมันกระวาน ใช้แต่งกลิ่นเหล้า เครื่องดื่มต่าง ๆ รวมทั้งใช้ในอุตสาหกรรมน้ำหอม น้ำมันพลู ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง หรือใช้เป็นเจลทาภายนอกแก้คัน

2.2.2 ยารับประทาน พืชสมุนไพรหลายชนิด สามารถนำมาใช้รับประทานเพื่อรักษาอาการของโรคได้ อาจใช้สมุนไพรชนิดเดียว หรือหลายชนิดรวมกันก็ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสาระสำคัญที่มีอยู่ในพืชสมุนไพรชนิดนั้นๆ ที่ออกฤทธิ์เพื่อการบำบัดรักษา เช่น บอระเพ็ด ฟ้าทะลายโจร ใช้แก้ไข้ กะเพรา ไพล ขิง แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ ขี้เหล็ก ไมยราพ ใช้ระงับประสาท คำฝอย กระเจี๊ยบแดง กระเทียม ลดไขมันในเส้นเลือด

2.2.3 ยาสำหรับใช้ภายนอก เป็นพืชสมุนไพรที่สามารถนำมาบำบัดโรคที่เกิดขึ้นตามผิวหนัง แผลที่เกิดขึ้นตามร่างกายรวมทั้งแผลในปาก อาจใช้สมุนไพรชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันก็ได้ ลักษณะของการนำมาใช้มีหลายลักษณะมีทั้งใช้สด บดเป็นผง ครีม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสารสำคัญที่มีอยู่ในพืชสมุนไพร และความสะดวกในการนำมาใช้ ตัวอย่างของพืชสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นยาสำหรับใช้ภายนอก เช่น บัวบก หว้า โทงเทง รักษาแผลในปาก ฝ้ง กานพลู ใช้ระงับกลิ่นปาก ผักบุ้งทะเล เสลดพังพอน เท้ายายม่อม ตำลึง แก้แพ้ บัวบก ยาสูบ ว่านหางจระเข้ รักษาแผลน้ำร้อนลวก ตำลึง พุดตาน ว่านมหากาฬ เสลดพังพอน แก้งูสวัด

2.2.4 ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องดื่ม พืชสมุนไพรหลายชนิดสามารถนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ผู้บริโภคจึงรู้สึกปลอดภัยในการนำมารับประทาน เช่น บุก ใช้ดูดจับไขมันจากเส้นเลือด ลดน้ำหนัก ส้มแขก เปลี่ยนไขมันเป็นพลังงาน ลดน้ำหนัก หญ้าหนวดแมว คำฝอย หญ้าหวาน ใช้ทำเป็นเครื่องดื่มบำรุงสุขภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเครื่องเทศที่ปลูกอยู่ทั่วโลก

	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ใช้
1.	*Acorus calamus*	Araceae	Sweet flag, myrtle flag, calamus, flag root	เหง้า
2.	*Aframomum angustifolium*	Zingiberaceae	Madagascar cardamom	ผล และเมล็ด
3.	*Aframomum hanburyi*	Zingiberaceae	Cameroon cardamom	ผล และเมล็ด
4.	*Aframomum koranima*	Zingiberaceae	Korarima cardamom	ผล และเมล็ด
5.	*Aframomum melegueta*	Zingiberaceae	Grain of paradise, Guinea grains	ผล และเมล็ด
6.	*Allium ascalonicum*	Liliaceae	Shallot	หัวใต้ดิน
7.	*Allium cepa*	Liliaceae	Onion	หัวใต้ดิน
8.	*Allium cepa var. aggregatum*	Liliaceae	Potato onion	หัวใต้ดิน
9.	*Allium tuberosum*	Liliaceae	Indian leek, Chinese chive	หัวใต้ดิน และใบ
10.	*Allium fistulosum*	Liliaceae	Stony leek, Welsh onion, Japanese bunching onion	หัวใต้ดิน และใบ
11.	*Allium porrum*	Liliaceae	Leek, winter leek	หัวใต้ดิน และใบ
12.	*Allium sativum*	Liliaceae	Garlic	หัวใต้ดิน
13.	*Allium schoenoprasum*	Liliaceae	Chive	ใบ
14.	*Alpinia galangal*	Zingiberaceae	Greater galangal, Longwas, Siamese ginger	เหง้า
15.	*Alpinia officinarum*	Zingiberaceae	Lesser galangal	เหง้า
16.	*Amomum aromaticum*	Zingiberaceae	Bengal cardamom	ผล และเมล็ด
17.	*Amomum kepulaga*	Zingiberaceae	Round cardamom, Chester cardamom, Siamese cardamom, Indonesian cardmom	ผล และเมล็ด
18.	*Amomum krervanh*	Zingiberaceae	Cambodian cardamom	ผล และเมล็ด
19.	*Amomum subulatum*	Zingiberaceae	Greater Indian cardamom, large cardamom, Nepalese cardamom	ผล และเมล็ด
20.	*Amomum tsao-ko*	Zingiberaceae	Tsao-ko cardamom	ผล และเมล็ด
21.	*Anethum graveolens*	Apiaceae (Umbelliferae)	Dill	ผล ใบ และยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเครื่องเทศที่ปลูกอยู่ทั่วโลก (ต่อ)

	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ใช้
22.	*Anethum sowa*	Apiaceae (Umbelliferae)	Indian dill	ผล
23.	*Angelica archagelica*	Apiaceae (Umbelliferae)	Garden angelica	ผล และก้านใบ
24.	*Anthriscus cereifolium*	Apiaceae (Umbelliferae)	Chervil	ใบ
25.	*Apium graveolens*	Apiaceae (Umbelliferae)	Celery, garden celery	ผล ราก และใบ
26.	*Apium graveolens var. rapaceum*	Apiaceae (Umbelliferae)	Celeriac	ผล ราก และใบ
27.	*Armoracia rusticana*	Brassicaceae	Horse radish	ราก
28.	*Artemisia dracunculus*	Asteraeae (Compositae)	Tarragon, estragon	ใบ
29.	*Averrhoa bilimbi*	Averrhoaceae	Belimbing, bilimbi cucumber tree	ผล
30.	*Averrhoa carambola*	Averrhoaceae	Carambola, caramba	ผล
31.	*Brassica junceae*	Brassicaceae	Indian mustard	เมล็ด
32.	*Brassica nigra*	Brassicaceae	Black mustard	เมล็ด
33.	*Bunium persicum*	Apiaceae (Umbelliferae)	Black caraway	เมล็ด และหัวใต้ดิน
34.	*Capparis spinosa*	Capparidaceae	Caper, common caper, caper bush	ดอกตูม
35.	*Capsicum annuum*	Solanaceae	Capsicum, chillies, paprika	ผล
36.	*Capsicum frutescens*	Solanaceae	Chillies, bird's eye chilli	ผล
37.	*Carum bulbocastanum*	Apiaceae (Umbelliferae)	Black caraway	ผล และหัวใต้ดิน
38.	*Carum carvi*	Apiaceae (Umbelliferae)	Caraway, blond caraway	ผล
39.	*Cinnamomum aromaticum*	Lauraceae	Cassia, Chinese cassia	เปลือกไม้ และใบ
40.	*Cinnamomum burmanii*	Lauraceae	Indonesian cassia	เปลือกไม้
41.	*Cinnamomum loureirii*	Lauraceae	Vietnamese cassia	เปลือกไม้
42.	*Cinnamomum tamala*	Lauraceae	Tejpat, Indian cassia	เปลือกไม้ และใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเครื่องเทศที่ปลูกอยู่ทั่วโลก (ต่อ)

	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ใช้
43.	*Cinnamomum zeylanicum*	Lauraceae	Sri Lankan cinnamon, Indian cinnamon	เปลือกไม้ และใบ
44.	*Coriandrum sativum*	Apiaceae (Umbelliferae)	Coriander	ใบ และผล
45.	*Crocus sativus*	Iridaceae	Saffon	เกสรตัวเมีย
46.	*Cuminum cyminum*	Apiaceae (Umbelliferae)	Cumin	ผล
47.	*Curcuma longa*	Zingiberaceae	Turmeric	เหง้า และใบ
48.	*Cymbopogon citratus*	Poaceae	West Indian lemongrass	ใบ
49.	*Cymbopogon nardus*	Poaceae	Sri Lankan citronella	ใบ
50.	*Elettaria cardamomum*	Zingiberaceae	Small cardamom	ผล และเมล็ด
51.	*Elettaria cardamomum*	Zingiberaceae	Sri Lankan cardamom	ผล และเมล็ด
52.	1.*Ferula assa-foetida* 2.*Ferula foetida* 3.*Fferula narthex*	Apiaceae (Umbelliferae)	Asafoetida	เหง้า
53.	*Foeniculum vulgare*	Apiaceae	Bitter fennel	ใบ กิ่ง และผล
54.	*Foeniculum vulgare*	Apiaceae	Sweet fennel	ใบ กิ่ง และผล
55.	*Garcinia cambogia*	Clusiaceae	Garcinia, Camboge	เปลือกผล
56.	*Garcinia indica*	Clusiaceae	Garcinia, Kokum	เปลือกผล
57.	*Hyssopus officinalis*	Lamiaceae	Hyssop	ใบ
58.	*Illicum verum*	Dliciaceae	Star anis, Chinese anise	ผล
59.	*Juniperus communis*	Cupressaceae	Common juniper	ผล
60.	*Kaempferia galangal*	Zingiberaceae	Galangal	เหง้า
61.	*Laurus nobilis*	Lauraceae	Laurel, true laurel, bay leaf, sweet flag	ใบ
62.	*Levisticum officinale*	Apiaceae	Garden lovage, lovage	ผล และใบ
63.	1. *Lippia graveolens* 2. *Lippia berlandieri*	Verbenaceae	Mexican oregano	ใบ และปลายราก
64.	*Mangifera indica*	Anacardiaceae	Mango	ผลอ่อน
65.	*Melissa officinalis*	Lamiaceae	Balm, lemon balm, melissa	ใบ และปลายราก
66.	*Mentha arvensis*	Lamiaceae	Japanese mint, field mint, corn mint	ใบ และปลายราก
67.	*Mentha citratete*	Lamiaceae	Bergamot	ใบ และปลายราก
68.	*Mentha x piperita*	Lamiaceae	Peppermint	ใบ และปลายราก

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเครื่องเทศที่ปลูกอยู่ทั่วโลก (ต่อ)

	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ใช้
69.	*Mentha spicata*	Lamiaceae	Spearmint, garden mint	ใบ และปลายราก
70.	*Murraya koenigii*	Rutaceae	Curry leaf	ใบ
71.	*Myristica argentea*	Myristicaceae	Papuan nutmeg	ลูก
			Papuan mace	ดอก
72.	*Myristica fragrans*	Myristicaceae	Indonesian type nutmeg, Indonesian type mace, Siauw type mace	ลูก และดอก
73.	*Nigella damascene*	Ranunculaceae	Damas black cumin, love in a mist	เมล็ด
74.	*Nigella sativa*	Ranunculaceae	Black cumin	เมล็ด
75.	*Ocimum basilicum*	Lamiaceae	Sweet basil	ใบ และปลายราก
76.	*Origanum majorana*	Lamiaceae	Sweet marjoram	ใบ และดอกตูม
77.	*Origanum vulgare*	Lamiaceae	Oregano, origan	ใบ และดอก
78.	*Pandanus amaryllifolius*	Pandanaceae	Pandan wangi	ใบ
79.	*Papaver somniferum*	Papaveraceae	Poppy, blue maw, mawseed	เมล็ด
80.	*Petroselium crispum*	Apiaceae	Parsley	ใบ และราก
81.	*Pimenta dioica*	Myrtaceae	Pimento, allspice, Jamaica pepper	ผลอ่อน และใบ
82.	*Pimenta racemosa*	Myrtaceae	West Indian bay	ผล และใบ
83.	*Pimpinella anisum*	Apiaceae	Aniseed	ผล
84.	*Piper guineense*	Piperaceae	West African or Benin pepper	ผล
85.	*Piper longum*	Piperaceae	Long pepper, Indian long pepper	ผล
86.	*Piper nigrum*	Piperaceae	Black pepper, white pepper, green pepper	ผล
87.	*Punica granatum*	Punicaceae	Pomegranate	เมล็ดแห้งพร้อมเนื้อ
88.	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	Rosemary	ปลายราก และใบ
89.	*Salvia officinalis*	Lamiaceae	Garden sage	ปลายราก และใบ
90.	*Satureja hottensis*	Lamiaceae	Summer savory	ปลายราก และใบ
91.	*Satureja montana*	Lamiaceae	Winter savory	ใบ และกิ่ง
92.	*Schinus molle*	Anacardiaceae	American pepper, Califomian pepper tree	ผล และเปลือกผล
93.	*Schinus terebenthifolius*	Anacardiaceae	'Brazilian pepper'	ผล

เอกสารนี้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเครื่องเทศที่ปลูกอยู่ทั่วโลก (ต่อ)

	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อวงศ์	ชื่อสามัญ	ส่วนของพืชที่ใช้
94.	*Sesamum indicum*	Pedaliaceae	Sesame, gingelly	เมล็ด
95.	*Sinapis alba*	Brassicaceae	White mustard, yellow mustard	เมล็ด
96.	*Syzygium aromaticum*	Myrtaceae	Clove	ดอกตูม
97.	*Tamarindus indica*	Cesalpiniaceae	Tamarind	ผล
98.	*Thymus serpyllum*	Lamiaceae	Mother of thyme, wild thyme, creeping thyme	ปลายราก และใบ
99.	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae	Thyme, common thyme	ปลายราก และใบ
100.	*Trachyspermum ammi*	Apiaceae	Ajowan	ผล
101.	*Trigonella foenumgracecum*	Fabaceae	Fenugreek	เมล็ด และใบ
102.	*Vanilla planifolia syn. Vanilla fragrans*	Orchidaceae	Vanilla	ฝัก
103.	*Vanilla tahitensis*	Orchidaceae	Vanilla	ฝัก
104.	*Vanilla pompona*	Orchidaceae	Pompana vanilla	ฝัก
105.	*Xylopia aethiopica*	Annonaceae	Negro pepper, Guinean pepper	ผล
106.	*Zanthoxylum bungei*	Rutaceae	Chinese prickly ash pepper, Sechuang pepper	ผล
107.	*Zanthoxylum acanthopodium*	Rutaceae	Chinese pepper	ผล
108.	*Zanthoxylum piperitum*	Rutaceae	Japanese pepper	ผล
109.	*Zingiber officinale*	Zingiberaceae	Ginger	เหง้า

ที่มา : Parathasarathy และคณะ (2008)

2.2.5 เครื่องสำอาง เป็นการนำพืชสมุนไพรมาใช้อีกลักษณะหนึ่ง การนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นเครื่องสำอางมีมานานแล้ว และในปัจจุบันได้รับการยอมรับมากขึ้น เนื่องจากปลอดภัยกว่าการใช้สารสังเคราะห์ทางเคมี ทำให้มีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นโดยมีส่วนผสมของพืชสมุนไพรเกิดขึ้นมากมาย เช่น แชมพู ครีมนวดผม สบู่ โลชั่น ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นเครื่องสำอาง เช่น อัญชัน ว่านหางจระเข้ มะคำดีควาย เห็ดหลินจือ เป็นต้น

2.2.6 ผลิตภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นสมุนไพรที่มีฤทธิ์เบื่อเมาหรือมีรสขม ซึ่งมีคุณสมบัติในการปราบหรือควบคุมปริมาณการระบาดของแมลงศัตรูพืช โดยไม่มีพิษตกค้างในผลผลิต ไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิษต่อผู้ใช้และสภาพแวดล้อม ตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ใช้ป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น สะเดา ยาสูบ ตะไคร้หอม ฟ้าทะลายโจร ไพล เป็นต้น

2.3 น้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหย เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติของพืชซึ่งเป็นสารประกอบที่มีความซับซ้อน ระเหยได้ มีกลิ่นแรง โดยปกติน้ำมันหอมระเหยจะได้จากการกลั่นด้วยน้ำ หรือกลั่นด้วยไอน้ำ ซึ่งได้มีการพัฒนาเกิดขึ้นเป็นครั้งแรกเมื่อยุคกลางในประเทศอาหรับ น้ำมันหอมระเหยเป็นที่รู้จักกันดีในด้านของคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค เช่น ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา มีคุณสมบัติเป็นยา ทำน้ำหอม เป็นสารถนอมอาหาร สารต้านจุลินทรีย์ ยาบรรเทาปวด ยาระงับประสาท ต้านการอักเสบ ยาบรรเทากล้ามเนื้อ และรักษาอาการชาได้ ในธรรมชาติน้ำมันหอมระเหยมีบทบาทสำคัญในด้านการป้องกันพืชจากแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อรา รวมถึงแมลงที่มาทำลายพืช อีกทั้งยังป้องกันพืชจากสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร โดยทำให้ลดการอยากอาหารลงได้ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยยังดึงดูดแมลงบางชนิดเพื่อให้เกิดการแพร่กระจายของเกสรหรือเมล็ด หรืออาจเป็นการขับไล่แมลงอื่นๆที่ไม่ต้องการอีกด้วย น้ำมันหอมระเหยสกัดได้จากพืชหลากหลายชนิด โดยทั่วไปมักเป็นพืชที่อยู่ในประเทศในเขตอบอุ่น เช่น ประเทศในเขตทะเลเมดิเตอร์เรเนียน และประเทศเขตร้อนชื้น ลักษณะของน้ำมันหอมระเหย คือ เป็นของเหลว ระเหยได้ ใส ไม่ค่อยมีสี มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ ละลายได้ในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ น้ำมันหอมระเหยสามารถสร้างได้จากทุกส่วนของพืช เช่น ต่า ดอก ใบ ลำต้น กิ่ง เมล็ด ผล ราก เปลือกไม้ และอาจถูกเก็บไว้ใน secretory cell ตามท่อหรือช่อง ในเซลล์ชั้นอิพิเดอร์มิส (epidermis cell) หรือ glandular trichome (Bakkali และคณะ. 2008)

การสกัดน้ำมันหอมระเหยสามารถทำได้หลายวิธี รวมถึงการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลว คลื่นไมโครเวฟ และการกลั่นโดยใช้แรงดันสูงหรือต่ำซึ่งใช้การต้มน้ำหรือการใช้ไอน้ำร้อน น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จะมีปริมาณ คุณภาพ และองค์ประกอบต่างๆแตกต่างกันขึ้นอยู่สภาพอากาศ องค์ประกอบของดิน ส่วนของพืชที่นำมาสกัด และช่วงอายุของพืช ดังนั้นการที่จะได้น้ำมันหอมระเหยที่มีองค์ประกอบต่างๆคงที่ จึงต้องทำการสกัดภายใต้สภาวะเดิม จากส่วนเดียวกันของพืช ซึ่งเจริญเติบโตภายใต้สภาพของดิน และภูมิอากาศเดียวกัน และยังต้องเก็บในช่วงฤดูเดียวกันอีกด้วย

ในปัจจุบันมีน้ำมันหอมระเหยประมาณ 3000 ชนิดที่เป็นรู้จักกันดี ในจำนวนนี้มีประมาณ 300 ชนิดที่มีความสำคัญทางด้านเภสัชกรรม อุตสาหกรรมด้านการเกษตร อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมด้านสุขอนามัย อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมน้ำหอม น้ำมันหอมระเหยหรือส่วนประกอบบางส่วนของน้ำมันหอมระเหยได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตน้ำหอม เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับสุขภาพ ด้านทันตกรรม ด้านการเกษตร โดยใช้เป็นสารถนอมอาหารและเจือปนในอาหาร และใช้เป็นยาธรรมชาติในการรักษาโรค ตัวอย่างเช่น ดี-ลิโมนีน (d-limonene) เจอรานิล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอซิเตท (geranyl acetate) หรือ ดี-คาร์โวน (d-carvone) ได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตน้ำหอม ครีม สบู่ และสารช่วยเพิ่มกลิ่นรสของอาหาร ใช้เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดบ้าน และใช้เป็นตัวทำละลายในด้านอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหยยังถูกนำมาใช้ในการนวดโดยผสมกับน้ำมันพืช หรือผสมในอ่างอาบน้ำ แต่บ่อยครั้งที่มักใช้ในสุคนธบำบัดหรือการบำบัดรักษาด้วยกลิ่นหอม (aromatherapy) น้ำมันหอมระเหยบางชนิดยังมีคุณสมบัติเฉพาะทางด้านยาซึ่งได้ถูกกล่าวไว้ว่าสามารถรักษาอวัยวะภายในหรือระบบร่างกายที่มีความผิดปกติได้ (Bakkali และคณะ. 2008)

2.3.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารธรรมชาติที่ซับซ้อนซึ่งประกอบไปด้วยสารประกอบประมาณ 20-60 ชนิดมีความเข้มข้นแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยจะมีสารประกอบที่เป็นสารประกอบหลักอยู่ 2-3 ชนิด และพบในปริมาณมากประมาณร้อยละ 20-70 ในขณะที่สารประกอบชนิดอื่นๆพบได้ในปริมาณน้อย อย่างเช่น น้ำมันหอมระเหยของออริกาโน (*Origanum compactum*) มีสารประกอบหลักคือ คาร์วาครอล (carvacrol) ประมาณร้อยละ 30 และไทมอล (thymol) ร้อยละ 27 น้ำมันหอมระเหยของผักชี (*Coriandrum sativum*) จะพบลินาลูล (linalool) ประมาณร้อยละ 68 น้ำมันหอมระเหยของ *Artemisia herba-alba* จะพบ แอลฟา-ทูจอน (α-thuyone) และเบต้า-ทูจอน (β-thuyone) ประมาณร้อยละ 57 และการบูร (camphor) ร้อยละ 24 น้ำมันหอมระเหยของการบูร (*Cinnamomum camphora*)จะพบ 1,8-ซิเนออล (1,8-cineole) ร้อยละ 50 น้ำมันหอมระเหยในใบของผักชีลาว (*Anethum graveolens*) จะพบแอลฟา-ฟิลเลนดรีน (α-phellandrene) ร้อยละ 36 และลิโมนีน (limonene) ร้อยละ 31 ในขณะที่ในเมล็ดจะพบคาร์โวน (carvone) ร้อยละ 58 และลิโมนีน ร้อยละ 37 และน้ำมันหอมระเหยของสะระแหน่ญี่ปุ่น (*Mentha piperita*) จะพบเมนทอล (menthol) ร้อยละ 59 และเมนโทน (menthone) ร้อยละ 19 โดยปกติสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยจะเป็นตัวกำหนดคุณสมบัติทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหย และส่วนใหญ่มักเป็นสารที่พืชสังเคราะห์ขึ้นตามธรรมชาติที่แตกต่างกัน 2 กลุ่มด้วยกัน กลุ่มหลักๆเป็นสารเทอร์พีน (terpenes) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) และสารประกอบอะโรมาติก (aromatic) และ อะลิฟาติก (aliphatic) อื่นๆ ซึ่งทั้งหมดเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Bakkali และคณะ. 2008)

2.3.1.1 เทอร์พีน (terpenes)

เป็นสารที่มีโครงสร้างและหน้าที่แตกต่างกันไปตามแต่ละชนิด ซึ่งเกิดขึ้นจากการรวมกันของหน่วยที่มีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอมหลายๆหน่วย ซึ่งเรียกว่า ไอโซพรีน (isoprene) การสังเคราะห์เทอร์พีนเริ่มจากสารตั้งต้นชื่อไอโซเพนทีนิลไดฟอสเฟต (isopentenyl diphosphate (IPP) precursor) และการเติม IPPs เพื่อสร้างพรีนิลไดฟอสเฟต (prenyldiphosphate precusor) ซึ่งทำให้เกิดเทอร์พีนหลากหลายชนิด และเกิดการดัดแปลงอัลลีลิกพรีนิลไดฟอสเฟต (allylic prenyldiphosphate) โดยเอนไซม์ซิลเทเทสจำเพาะ (terpene specific systhetase) เพื่อทำให้เกิดโครงสร้างของเทอร์พีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(terpene skeleton) และในที่สุดจะเกิดการดัดแปลงโดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction)) ของโครงสร้างเทอร์พีน (terpene skeleton) ทำให้มีคุณสมบัติและหน้าที่ที่แตกต่างกันไป (Bakkali และคณะ. 2008)

ตารางที่ 2.2 ชนิดและตัวอย่างของสารกลุ่มโมโนเทอร์พีน

ประเภทของสารประกอบ	ชนิดของโครงสร้าง	ชนิดของสารประกอบ
Carbures	acyclic	myrcene และ ocimene
	monocyclic	terpinenes, *p*-cimene และ phellandrenes
	bicyclic	pinenes, 3-carene, camphene และ sabinene
Alcohols	acyclic	geraniol, linalool, citronellol, lavandulol และ nerol
	monocyclic	menthol, α-terpineol และ carveol
	bicyclic	borneol, fenchol, chrysanthenol และ thuyan-3-ol
Aldehydes	acyclic	geraial, neral และ citronellal
Ketone	acyclic	tegetone
	monocyclic	menthones, carvone, pulegone และ piperitone
	bicyclic	camphor, fenchone, thuyone, ombellulone, pinocamphone และ pinocarvone
Esters	acyclic	linalyl acetate (propionate) และ citronellyl acetate
	monocyclic	menthyl (α-terpinyl acetate)
	bicyclic	isobornyl acetate
Ethers	-	1,8-cineole และ menthofurane
Peroxydes	-	ascaridole
Phenols	-	thymol และ carvacrol

ที่มา: Bakkali และคณะ (2008)

เทอร์พีนชนิดหลักๆที่พบเป็นโมโนเทอร์พีน (monoterpene, C_{10}) และเซสควิเทอร์พีน (sesquiterpene, C_{15}) แต่อาจพบเทอร์พีนในกลุ่มอื่นได้ เช่น เฮมิเทอร์พีน (hemiterpene, C_5) ไดเทอร์พีน (diterpene, C_{20}) ไตรเทอร์พีน (triterpene, C_{30}) และเตตราเทอร์พีน (tetraterpene, C_{40}) และถ้าใน

เอกสารนี้มีไว้เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลของเทอร์พีนมีอะตอมของออกซิเจนเป็นองค์ประกอบอยู่จะเรียกว่าเทอร์พีนอยด์ ซึ่งเป็นสารที่สังเคราะห์ได้จากโมเลกุลของแอซีเตท โดยธรรมชาติแล้วสารชนิดนี้จะมีจุดกำเนิดร่วมกันกับกรดไขมัน แต่จะแตกต่างกับกรดไขมันตรงที่สารเหล่านี้จะมีความเป็นกิ่งก้านสาขาและเป็นวงแหวนมากกว่า ตัวอย่างของสารเทอร์พินอลที่พบได้บ่อยได้แก่ เมทานอล และ การบูรซึ่งเป็นสารในกลุ่มของโมโนเทอร์พีน นอกจากนี้ยังมีฟาร์นิซอล (farnesol) และ อาทีมิซิน (artemisin) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของเซสคริเทอร์พีนด้วย สำหรับอาทีมิซินและอนุพันธ์แอลฟา-อาทีเทอร์ (α-arteether) หรือเป็นที่รู้จักกันในชื่อ qinghaosu เป็นสารที่ยับยั้งโรคไข้มาลาเรีย ซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มของเทอร์พินอลด้วยเช่นกัน (Cowan. 1999)

โมโนเทอร์พีนเป็นสารที่เกิดจากการรวมตัวกันของหน่วยไอโซพรีน (isoprene unit, C_{10}) และเป็นสารที่พบมากที่สุดในน้ำมันหอมระเหยโดยมีมากถึงร้อยละ 90 ของสารประกอบทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยมีโครงสร้างหลากหลาย ซึ่งประกอบไปด้วยสารที่มีหน้าที่ต่างๆมากมาย (ตารางที่ 2.2) เมื่อโมเลกุลของสารมีคุณสมบัติ optically active จะพบบ่อยมากที่มักจะมีเอแนทิโอเมอร์ (enatiomer) 2 ไอโซเมอร์ในพืชที่แตกต่างกัน เช่น (+)-แอลฟา-ไพนีน ((+)-α-pinene) จาก *Pinus palustris*, (-)-เบต้า-ไพนีน ((-)-β-pinene) จาก *Pinus caribaea*, (-)-ลินาลูล ((-)-linalool) จากเมล็ดผักชี และ (+)-ลินาลูล ((+)-linalol) จากต้นการบูรบางชนิด ในบางกรณีจะเกิดรูปแบบของ racemic ขึ้นซึ่งพบได้บ่อย เช่น (±)-ซิโทรแนลลอล ((±)-citronellol) โดยรูปแบบ (+) จะเป็นคุณลักษณะเฉพาะที่พบได้ใน *Eucalyptus citriodora* และรูปแบบของ (-) เป็นรูปแบบที่พบได้ทั่วไปในน้ำมันกุหลาบและเจอราเนียม (Bakkali และคณะ. 2008)

เซสคริเทอร์พีน (sesquiterpenes) เกิดจากการประกอบเข้าด้วยกันของไอโซพรีน 3 โมเลกุล (C_{15}) การต่อกันของโมเลกุลจนเป็นสายยาวจะเพิ่มการเกิดโครงสร้างที่เป็นวงมากขึ้นซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของโครงสร้าง โครงสร้างและหน้าที่ของ sesquiterpenes จะคล้ายคลึงกับกลุ่มของ monoterpenes ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 2.3 ตัวอย่างของพืชที่มีสารเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ เบอร์กามอท (bergamot) ยี่หร่า (caraway) ขึ้นฉ่าย (celery) ตะไคร้หอม (citronella) ผักชี (coriander) ยูคาลิปตัส (eucalyptus) เจอราเนียม (geranium) ลาเวนดิน (lavandin) ลาเวนเดอร์ (lavander) มะนาว (lemon) ตะไคร้ (lemongrass) ส้มจีน (mandarin) มินต์ (mint) ส้ม (orange) สะระแหน่ญี่ปุ่น (peppermint) ใบส้ม (petitgrain) โรสแมรี่ (rosemary) เสจ (sage) และไทม์ (thyme)

2.3.1.2 สารประกอบอะโรมาติก

สารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) เป็นสารที่เกิดจากฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) ซึ่งพบได้น้อยกว่าเทอร์พีน วิถีในการสังเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับเทอร์พีนและอนุพันธ์ของฟีนิลโพรพานิก (phenylpropanic) ในพืชโดยทั่วไปจะเกิดขึ้นแยกกัน แต่ในพืชบางชนิดอาจเกิดขึ้นร่วมกันโดยจะเกิดในวิถี (pathway) ของการสังเคราะห์หลักๆ 1 วิถี เช่น น้ำมันอบเชยสังเคราะห์สารซินนามอลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) เป็นสารประกอบหลักและยูจินอล (eugenol)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เป็นสารประกอบรอง ลักษณะการเกิดเช่นนี้จะเกิดขึ้นในน้ำมันกานพลูและน้ำมันเฟนเนลด้วยเช่นกัน (Bakkali และคณะ. 2008)

ตารางที่ 2.3 ชนิดและตัวอย่างของสารกลุ่มเซสควิเทอร์พีน

ประเภทของสารประกอบ	ตัวอย่าง
Carbures	azulene, β-bisabolene, cadinenes, β-caryophyllene, logifolene, curcumenes, elemenes, farnesenes และ zingiberene
Alcohols	bisabol, cedrol, β-nerolidol, farnesol, carotol, β-santalol, patchoulol และ viridiflorol
Ketones	germacrone, nootkatone, cis-longipinan-2-7-dione, β-vetinone และ turmerones
Epoxide	caryophyllene oxide และ humulene epoxides

ที่มา: Bakkali และคณะ (2008)

สารประกอบอะโรมาติกประกอบด้วย สารกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde) เช่น ซินนามอลดีไฮด์ กลุ่มของแอกอลฮอล์ เช่น ซินนามิกแอลกอฮอล์ (cinnamic alcohol) กลุ่มของฟีนอล เช่น ชาวิคอล (chavicol) และยูจีนอล อนุพันธ์ของเมทอกซี (methoxy derivative) เช่น อะนิทอล (anethol) อิลิมิซีน (elemicine) เอสทรากอล (estragole) และเมทิลยูจีนอล (methyleugenol) และในกลุ่มของสารประกอบเมทิลีนไดออกซี (methylene dioxy compound) เช่น เอพิคอล (apicole) ไมริสทิซิน (myristicine) และเซฟรอล (safrole) พืชที่มักพบสารประกอบเหล่านี้ ได้แก่ เทียนสัตตบุษย์ (anise) อบเชย (cinnamon) กานพลู (clove) จันทน์เทศ (nutmeg) ผักชีฝรั่ง (parsley) โป๊ยกั๊ก (star anise) และพืชบางวงศ์ เช่น Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae และ Rutaceae ในสารที่มีไนโตรเจนและซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น กลูโคซิโนเลท (glucosinolates) และอนุพันธ์ของไอโซไทโอไซยาเนต (isothiocyanate detivative) มักพบในน้ำมันกระเทียมและน้ำมันมัสตาร์ด สารเหล่านี้เป็นสารทุติยภูมิที่มีคุณลักษณะเฉพาะในพืชหลากหลายชนิดและยังพบได้ในผลิตภัณฑ์อบ หรือในผลิตภัณฑ์ย่างด้วย (Bakkali และคณะ. 2008)

2.3.2 วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย

การสกัดน้ำมันหอมระเหยพบว่ามีหลากหลายวิธีที่แตกต่างในการที่จะได้น้ำมันหอมระเหยไม่ว่าจะเป็น การบีบร้อนหรือเย็น (cold or hot expression) การสกัดด้วยตัวทำละลาย การกลั่น หรือการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวภายใต้ความดันสูง (supercritical carbon dioxide) แต่วิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ การกลั่นและการสกัดด้วยตัวทำละลาย องค์ประกอบต่างๆทางเคมีทั้งปริมาณและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
110391

คุณภาพของน้ำมันหอมระเหยจะแตกต่างกันตามวิธีที่ใช้ในการสกัด บางวิธีที่ใช้จะไม่มีการกำจัดสารประกอบซึ่งไม่ละลายน้ำออกไป น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นจะมีองค์ประกอบทางเคมีที่ค่อนข้างซับซ้อน เช่น น้ำมันหอมระเหยจาก French Tarragon (*Artemisia dracunculus*) พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีมากกว่า 50 ชนิด (Deans. 1991) ซึ่งวิธีในการสกัดน้ำมันหอมระเหยมีดังนี้

2.3.2.1 การกลั่น (Distillation)

หลักการโดยทั่วไปของการกลั่นคือการต้มพืชสดหรือแห้งในน้ำกลั่น ซึ่งกระบวนการนี้จะทำให้เกิดการแตกของแกรนด์เซลล์ (grand cell) และมีการปล่อยน้ำมันหอมระเหยออกมา ไอน้ำจะนำพาเอาน้ำมันหอมระเหยออกมาผ่านเครื่องควบแน่น (condenser) ซึ่งจะทำให้ส่วนของน้ำมันหอมระเหยลอยอยู่เหนือส่วนของน้ำ การเก็บน้ำมันหอมระเหยสามารถทำได้โดยนำส่วนของน้ำที่อยู่ด้านล่างออกไปแล้วจึงเก็บส่วนของน้ำมันหอมระเหยที่ได้ไว้ ปกติการกลั่นต้องใช้เวลาประมาณ 3-5 ชั่วโมง ซึ่งน้ำมันหอมระเหยที่ได้จะอยู่ที่ประมาณร้อยละ 1-2 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) สำหรับพืชบางชนิดอาจจะได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่านี้ เช่น โรสแมรี่ (*Rosmarinus officinalis*) ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 3-5 และ *Origanum officinalis* ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 3-7 (Deans. 1991)

การสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องใช้เครื่องกลั่นซึ่งจะทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยปนออกมากับน้ำและแยกตัวเป็นสองชั้น โดยชั้นบนจะเป็นส่วนของน้ำมันหอมระเหยและชั้นล่างเป็นส่วนของน้ำดอกไม้หรือน้ำสมุนไพรที่มีกลิ่นหอม (aromatic water, floral water หรือ hydrolates) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (พัทรารินี. 2550) โดยการกลั่นยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธีคือ

- การกลั่นด้วยน้ำ (Water distillation) เป็นการกลั่นโดยพืชจะแช่อยู่ในน้ำในขณะที่ทำการต้ม มักนิยมใช้กับพืชแห้งและสารในพืชจะต้องทนต่อความร้อนไม่สลายไปเมื่อถูกความร้อน

- การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (Water and steam distillation) เป็นการกลั่นโดยพืชจะไม่แช่อยู่ในน้ำขณะต้ม น้ำต้มเดือดจะอยู่ด้านล่าง ส่วนพืชที่ใช้กลั่นจะวางอยู่บนตะแกรงเหนือน้ำต้มเดือด วิธีนี้มักใช้กับพืชสดหรือพืชแห้งที่มีสารที่ไม่คงทนต่อความร้อน และอาจจะสลายไปเมื่อถูกความร้อนสูงๆ

- การกลั่นด้วยไอน้ำ (Steam distillation) เป็นการกลั่นโดยใช้หม้อต้มน้ำแยกออกไปต่างหาก โดยไอน้ำจะถูกส่งผ่านท่อมายังพืชที่จะใช้กลั่น วิธีนี้นิยมใช้กับพืชสดที่มีสารที่ไม่คงทนต่อความร้อน

2.3.2.2 การแช่ในไขมันเย็น (Enfleurage)

วิธีการนี้เป็นวิธีการเก่าแก่ที่ใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหยในอดีต มักใช้กับดอกไม้ที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยจนไม่สามารถใช้วิธีการกลั่นได้ เช่น มะลิ ซ่อนกลิ่น เป็นต้น การสกัดด้วยวิธีนี้จะต้องนำดอกไม้หรือกลีบดอกไม้สดไปวางบนไขมันเย็นที่ไม่มีกลิ่นซึ่งถูกแผ่เป็นฟิล์มบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระจก ตั้งทิ้งไว้นานหลายชั่วโมงหรืออาจเป็นวัน ไขมันจะดูดซับความหอมที่ระเหยออกจากดอกไม้มาสะสมไว้ในไขมันเย็น จากนั้นก็เปลี่ยนเอาดอกไม้ใหม่มาเปลี่ยนวางไว้ใหม่ ทำเช่นนี้หลายครั้งจนมีปริมาณความหอมมากพอหรืออิ่มตัว ไขมันที่ทำหน้าที่ดูดซับกลิ่นหอมจากดอกไม้ไว้นี้เรียกว่า pomade จากนั้นจึงนำไปสกัดอีกทีด้วยแอลกอฮอล์เพื่อแยกน้ำมันหอมระเหยออกจากไขมันเย็น น้ำมันหอมระเหยที่ได้นี้จะเรียกว่า absolute สำหรับไขมันที่นำมาใช้จะเป็นไขมันจากสัตว์ซึ่งจะต้องไม่มีกลิ่นและมีความบริสุทธิ์สูง ได้แก่ น้ำมันหมู ไขมัน และมีความหนืดที่เหมาะสม เพราะถ้าแข็งจะดูดซับกลิ่นได้น้อย แต่ถ้าเหลวเกินไปอาจจะไปห่อหุ้มดอกไม้ทำให้เปลี่ยนดอกไม้ใหม่ได้ยาก ทำให้เกิดการสูญเสียไขมันระหว่างการผลิต (พัทรารินี. 2550)

2.3.2.3 การสกัดด้วยไขมันร้อน (Maceration)

การสกัดด้วยไขมันร้อนเป็นวิธีการสกัดที่ใช้กับดอกไม้ที่กลิ่นหอมไม่นาน เมื่อถูกเด็ดออกมาจากต้นแล้วจึงต้องใช้ความร้อนเข้าช่วยกระตุ้นให้ได้น้ำมันหอมระเหย โดยนำดอกไม้ไปแช่ในน้ำมันพืชที่อุ่นให้ร้อนประมาณ 80 องศาเซลเซียส อุ่นนานประมาณ 30 นาที แล้วจึงกรองดอกไม้ออก นำดอกไม้ใหม่มาใส่แล้วอุ่นใหม่ ทำเช่นนี้หลายๆครั้งจนน้ำมันมีปริมาณกลิ่นหอมมากพอหรืออิ่มตัว น้ำมันพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยนี้ เรียกว่า pomade แล้วจึงนำไปสกัดอีกครั้งด้วยแอลกอฮอล์เพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยที่เรียกว่า absolute (พัทรารินี. 2550)

2.3.2.4 การสกัดโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์เหลวภายใต้ความดันสูง (Hypercritical Carbon dioxide)

วิธีการสกัดวิธีนี้ทำได้โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้ความดันสูง 200 เท่าของความดันบรรยากาศ ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีสภาพกึ่งเหลวกึ่งก๊าซ มีคุณสมบัติในการละลายสูง สามารถสกัดน้ำมันหอมระเหยออกมาได้ วิธีนี้จัดว่าเป็นนวัตกรรมใหม่ในปัจจุบันที่นำมาใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ข้อดีของวิธีนี้ คือ คาร์บอนไดออกไซด์จะเป็นเหมือนตัวทำละลายและสามารถสกัดส่วนต่างๆของน้ำมันหอมระเหยออกมาได้อย่างมีความแตกต่างและต่อเนื่อง ปริมาณก๊าซทั้งหมดที่มีอยู่น้อยมากจะถูกกำจัดออกไปจากน้ำมันหอมระเหย และวิธีนี้จะมีประโยชน์โดยเฉพาะกับสารประกอบที่ไม่คงทนต่อความร้อน (พัทรารินี. 2550)

จากการศึกษาการสกัดน้ำมันหอมระเหยของ *Origanum majorana* และ *Artemisia absintheum* ด้วยวิธีนี้พบว่าสามารถให้องค์ประกอบเฉพาะของน้ำมันหอมระเหยในปริมาณสูง วิธีนี้ยังทำให้ได้น้ำมันหอมระเหยของผลไม้ตระกูลส้ม (citrus volatile oil) ที่มีปริมาณโมโนเทอร์พีนไฮโดรคาร์บอน (Monoterpene hydrocarbon) ได้สูงถึงร้อยละ 90 นอกจากนี้การสกัดด้วยวิธีนี้ยังคงรักษาสีของน้ำมันหอมระเหยและเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาสูงด้วย (Deans. 1991)

2.3.2.5 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (Solvent Extraction)

โดยปกติตัวทำละลายที่นิยมใช้ คือ ตัวทำละลายพวกแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล และเอทานอล แต่ตัวทำละลายอื่นๆก็สามารถนำมาใช้ในการสกัดได้ เช่น เฮกเซน (hexane) เบนซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(benzene) หรือ ปิโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) ตัวทำลายเหล่านี้จะเป็นตัวสกัดน้ำมันหอมระเหยออกมาจากพืช แล้วจึงนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหยออกมาอีกทีหนึ่ง วิธีนี้จะได้น้ำมันหอมระเหยปริมาณมาก มักนิยมใช้ในโรงงานเพราะต้องลงทุนสูง น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะเรียกว่า concrete เมื่อทำให้บริสุทธิ์จะเรียกว่า absolute ถึงแม้ว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้ด้วยวิธีนี้จะนิยมใช้ในด้านอาหารและยา แต่ปัญหาของวิธีนี้คือ การตกค้างของตัวทำละลายซึ่งอาจจะทำให้วิธีถูกขัดขวางไม่เป็นนิยมได้ (พัทรารินี. 2550; Deans. 1991)

2.3.2.6 การสกัดด้วยการบีบ (Expression)

การสกัดด้วยวิธีนี้จะเป็นวิธีการสกัดกับพืชตระกูลส้ม เช่น ส้ม มะนาว เบอร์กามอท หรือพืชที่มีน้ำมันหอมระเหยสะสมอยู่ในต่อมใต้ผิวของเปลือก ซึ่งจะแตกออกได้ง่ายเมื่อถูกบีบ และสารสำคัญมักสลายตัวได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน (พัทรารินี. 2550)

2.3.3 ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

Agaoglu และคณะ (2007) พบว่าน้ำมันอบเชยเป็นน้ำมันที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeroginosa, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Mycobacterium smegmatis, Micrococcus luteus* และ *Candida albicans*

Al-Bayati (2008) รายงานว่าการใช้น้ำมันไทม์ร่วมกับน้ำมันเทียนสัตตบุษย์สามารถต้านแบคทีเรีย *S. aureus, Bacillus cereus* และ *Proteus vulgaris* ได้

Natta และคณะ (2008) รายงานว่าน้ำมันขิงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี ซึ่งได้แก่ *S. aureus, B. cereus* และ *Listeria monocytogenes*

Nguefack และคณะ (2004) พบว่าน้ำมันยี่หร่า น้ำมันไทม์ น้ำมันตะไคร้ มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญและการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus fumigatus, A. flavus* และ *Fusarium moniliforme*

Omidbeygi และคณะ (2007) พบว่าน้ำมันไทม์และน้ำมันซัมเมอร์ซาวอรี่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 350 พีพีเอ็มและ 500 พีพีเอ็ม ตามลำดับ

Oussalah และคณะ (2007) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจาก Apanish oregano, Greek oregano, savory อบเชยจีน และเปลือกอบเชยเทศ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ *E. coli, L. monocytogenes, Salmonella* Typhimurium และ *S. aureus* โดยมีค่า MIC (minimum inhibitory concentration ร้อยละ ≤ 0.05 ปริมาตรต่อปริมาตร

Rusenova และ Parvanov (2009) ได้ทำการทดสอบด้วยวิธี agar dilution method พบว่า น้ำมันอบเชย น้ำมันออริกาโน น้ำมันตะไคร้ และน้ำมันไทม์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยมีค่า MIC อยู่ระหว่างร้อยละ 0.015-2 ปริมาตรโดยปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sacchetti และคณะ (2005) รายงานว่า น้ำมันตะไคร้และน้ำมันไทม์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ *Candida albicans, Rhodotorula glutinis, Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae* และ *Yarrowia lypolytica*

Shukla และ Tripathi (1986) รายงานว่าน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ที่ระดับความเข้มข้น 1000 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งเชื้อรา 28 ชนิดได้อย่างสมบูรณ์

Singh และคณะ (2005a) พบว่าน้ำมันดอกจันทน์เทศสามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium graminearum* ได้ดีโดยเกิดโซนการยับยั้งอย่างสมบูรณ์ในการทดลองแบบวิธี poison food medium

Singh และคณะ (2005b) รายงานว่าน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus terreus*, *F. graminearum* และ *A. flavus* ได้ดี

Singh และคณะ (2007) รายงานว่าน้ำมันอบเชยที่ได้จากใบและเปลือกไม้มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger, A. terreus, A. flavus, A. parasiticus, F. moniliforme* และ *F. graminearum*

2.4 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

สำหรับการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย มีเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในการทดสอบทั้งสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราอยู่ 2 วิธี คือ agar diffusion method (paper disc หรือ well) และ dilution method (agar หรือ broth) การทดสอบและการประเมินคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยทำได้ค่อนข้างยากเนื่องจากคุณสมบัติการระเหยได้ คุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ และโครงสร้างที่ซับซ้อนของน้ำมันหอมระเหย ในการทดสอบจึงจำเป็นต้องมีการดัดแปลงวิธีการบางอย่างจากวิธีที่กล่าวมาโดยได้ถูกพัฒนาเพื่อให้เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ (Kalemba และ Kunicka. 2003)

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารธรรมชาติที่ไม่ละลายน้ำและมีความหนืดสูง ด้วยคุณลักษณะเช่นนี้อาจทำให้ความสามารถในการทำเจือจางลดลงหรือเป็นสาเหตุให้เกิดการกระจายตัวของน้ำมันไม่สม่ำเสมอเมื่อผสมในอาหารถึงแม้ว่าจะมีการใช้สารช่วยเพิ่มการละลายก็ตาม และจะต้องทำการตรวจสอบว่าสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) หรือตัวทำละลายในระดับความเข้มข้นที่นำมามีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์หรือไม่ นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยยังเป็นสารที่มีความซับซ้อนซึ่งมีส่วนประกอบของสารที่สามารถระเหยได้ ถ้าใช้ระยะเวลาในการบ่มนานเกินไปอาจทำให้เกิดการระเหยหรือการสลายตัวของสารประกอบบางอย่างระหว่างการทดสอบได้ ดังนั้นในการทดสอบจึงควรจำเป็นต้องหลีกเลี่ยงสภาวะที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เช่นนี้ (Kalemba และ Kunicka. 2003)

สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่นำมาใช้ในการทดสอบจะต้องเลี้ยงในอาหารเหลวภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบจะได้มาจากศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ แต่ก็สามารถใช้เชื้อที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกเองได้จากแหล่งต่างๆเช่น จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วย นม เนยแข็ง พืช ขนมปัง และสัตว์ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบจะต้องอยู่ในช่วงการเจริญที่เหมาะสมและมีจำนวนเซลล์ที่จำเพาะต่อการทดสอบ โดยปัจจัยเหล่านี้จะมีผลต่อการทดสอบด้วย สำหรับการทดสอบมักจะนิยมทดสอบซ้ำประมาณ 2-7 ซ้ำ โดยการทดสอบจะทำร่วมไปกับ negative control ซึ่งใช้น้ำหรือตัวทำละลายแทนน้ำมันหอมระเหย ในขณะที่ positive control จะใช้ยาปฏิชีวนะซึ่งจะใช้ประเมินความไวของเชื้อที่ใช้ทดสอบและ เพื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยด้วย อย่างไรก็ตาม Janssen และคณะ (1987) ได้กล่าวไว้ว่า การเปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยกับยาปฏิชีวนะไม่สามารถทำได้ด้วยวิธีนี้ การเจริญของจุลินทรีย์สามารถตรวจสอบได้ด้วยสายตาหรือการใช้เครื่องมือช่วย การวัดความขุ่นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบ โดยทำการวัดค่า optical density (OD) ที่เปลี่ยนแปลงไป การวัดการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยวิธี Impedimetric monitoring จัดเป็นวิธีที่เป็นประโยชน์เช่นเดียวกันกับระบบที่ใช้ในทางการค้าที่ได้ถูกผลิตขึ้น สำหรับวิธีอื่นอย่างเช่น bioautography ก็ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบด้วย (Kalemba และ Kunicka. 2003)

2.4.1 Agar diffusion method

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางเพราะมีความถูกต้อง แม่นยำและเชื่อถือได้ถึงแม้ว่าผลที่ได้จะเป็นแบบกึ่งเชิงปริมาณ ผู้เขียนบางท่านกล่าวว่าเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเท่านั้น และไม่สามารถทำซ้ำได้บ่อย อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังสามารถตรวจสอบระดับการยับยั้งการเจริญและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของจุลินทรีย์ได้ด้วย การทดสอบด้วยวิธีนี้จะต้องใช้จานเพาะเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-12 เซนติเมตร แต่โดยทั่วไปมักใช้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร และเติมอาหารลงไปในจานเพาะเชื้อ 10-20 มิลลิลิตร และจึงทำการเพาะเชื้อลงไป สำหรับการทดสอบด้วยวิธี agar diffusion นี้จะทำได้ 2 วิธี คือ การใช้กระดาษกรอง หรือเจาะอาหารแข็งให้เป็นหลุม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของกระดาษกรองหรือหลุม ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ และชนิดของตัวทำละลายเป็นปัจจัยที่สำคัญมากที่สุดสำหรับการทดสอบด้วยวิธีนี้ ซึ่งไม่บ่อยนักที่จะใช้น้ำมันหอมระเหยบริสุทธิ์ในการทดสอบโดยปกติมักผสมในตัวทำละลาย บางครั้งกระดาษกรองจะถูกจุ่มในสารละลายของน้ำมันหอมระเหยอย่างไรก็ตามไม่แนะนำให้ใช้วิธีนี้เนื่องจากไม่สามารถทราบปริมาณที่แน่นอนของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ได้ โดยจะทิ้งจานเพาะเชื้อไว้ระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้สารประกอบต่างๆของน้ำมันหอมระเหยแพร่ผ่านอาหารก่อนแล้วจึงนำไปบ่ม ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจะถูกตรวจสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบกระดาษกรองหรือหลุม โดยวัดเป็นหน่วยของมิลลิเมตรหรือเซนติเมตร ซึ่งอาจวัดรวมไปกับขนาดของกระดาษกรองหรือหลุม หรืออาจจะไม่วัดรวมกับขนาดของกระดาษกรองหรือหลุมก็ได้ โดยผลที่ได้จะแสดงเป็นสัญลักษณ์ เช่น 0, + หรือ ++ เป็นต้น (Kalemba และ Kunicka. 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Agar diffusion method เป็นวิธีที่ถูกพิจารณาว่าไม่เหมาะสมในการที่จะใช้ทดสอบกับน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากองค์ประกอบที่ระเหยได้มีแนวโน้มที่จะเกิดการระเหยไปพร้อมกับตัวทำละลายในช่วงระหว่างการบ่ม ในขณะที่สารประกอบที่ละลายได้ไม่ดีจะเกิดการแพร่ที่ไม่ดีนักในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่วิธีนี้ก็ยังคงเป็นวิธีที่นิยมกันการในการตรวจสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราของน้ำมันหอมระเหย เพราะเป็นวิธีที่ง่ายและใช้น้ำมันหอมระเหยในปริมาณน้อย วิธีนี้ยังเป็นวิธีที่แนะนำให้ใช้เป็นวิธีในการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยในขั้นต้น (per-screening method) จากที่มีอยู่จำนวนมากให้เหลือน้อยลงได้ (Kalemba และ Kunicka. 2003)

2.4.2 Dilution method

วิธีการเจือจางในอาหารวุ้น (Agar dilution method) ใช้ในการทดสอบสำหรับเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา แต่วิธีนี้มีการดัดแปลงสำหรับใช้ในอาหารเหลว ส่วนใหญ่ใช้ในการทดสอบเชื้อรา ซึ่งเร็วๆนี้วิธี broth micro dilution เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากซึ่งจะทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยที่ทดสอบใน microtitre plates และตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยการวัดระดับความขุ่นหรือนับเซลล์ด้วยวิธี plate count สำหรับผลการทดสอบสามารถนำเสนอได้ 2 ทาง คือ 1) ดัชนีบ่งบอกถึงการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (growth inhibition index) ซึ่งก็คืออัตราส่วนของร้อยละของการยับยั้ง (percentage ratio) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ เชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันหอมระเหย และ 2) ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration; MIC หรือ maximal inhibitory dilution; MID) หรือ ความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้จุลินทรีย์ตาย (minimal lethal concentration; MLC) สำหรับการทดสอบคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งเชื้อราอาจตรวจสอบได้โดยดูจากผลการยับยั้งการสร้างสปอร์และการผลิตสารพิษของเชื้อราได้ (Kalemba และ Kunicka. 2003)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (minimal inhibitory concentration; MIC) หมายถึงค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยในอาหารเหลวซึ่งให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อหรือไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงการเจริญของเชื้อที่สังเกตเห็นได้ ในการประเมินกิจกรรมในการทำให้จุลินทรีย์ตาย (lethal activity) จะทำการถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารเหลวที่ไม่พบว่ามีการเจริญของเชื้อลงในอาหารใหม่และทำการบ่มต่อ ความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยส่งผลให้การเจริญของจุลินทรีย์ถูกยับยั้งทั้งหมดซึ่งได้ยอมรับให้เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้จุลินทรีย์ตาย ซึ่งก็คือความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าแบคทีเรีย (minimal bactericidal concentration; MBC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการฆ่าเชื้อรา (minimal fungicidal concentration; MFC) ในบางครั้งค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้จุลินทรีย์ตาย หมายถึงค่าความเข้มข้นที่ส่งผลให้จำนวนจุลินทรีย์ลดลงมากกว่าร้อยละ 99.9 ของจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นที่เติมลงไป นักวิจัยส่วนใหญ่ที่ใช้วิธีการเจือจาง (dilution method) มักจะสนใจที่จะหาค่า MIC มีเพียงไม่กี่รายงานเท่านั้นที่จะรายงานผลเป็นค่า MLC ด้วย ผู้เขียนบางคนได้ใช้ความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยของคำจำกัดความของ MIC และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MLC ในการอธิบายเป็นช่วงความเข้มข้น 2 ช่วงติดต่อกัน ได้แก่ ความเข้มข้นสูงสุดที่ยังพบการเจริญของเชื้อ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อย่างสมบูรณ์ในขั้นตอนแรกของการบ่มจะได้เป็นค่า MIC และในขั้นตอนที่สองของการบ่มจะได้เป็นค่า MLC (Kalemba และ Kunicka. 2003)

2.4.3 Non-conventional method

2.4.3.1 Microatmosphere method

วิธีนี้มีการดัดแปลงมาจากวิธี agar disc diffusion ซึ่งเหมาะสมมากสำหรับการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยในสถานะของไอ (vapour phase) และใช้สำหรับตรวจหากิจกรรมของน้ำมันหอมระเหยซึ่งถูกใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในบรรยากาศ (atmosphere presevative) ในการทดสอบนี้กระดาษกรองที่ชุ่มไปด้วยน้ำมันหอมระเหยจะถูกวางติดไว้ที่ฝาของจานเพาะเชื้อและจากนั้นจึงนำไปบ่มโดยการคว่ำจานเพาะเชื้อ ผลที่ได้จะแสดงเป็นขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนยับยั้งหรืออาจแสดงผลเป็นปริมาณที่น้อยที่สุดของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory quantity; MIQ) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด (Kalemba และ Kunicka. 2003)

2.4.3.2 Bioautography

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจสอบสารสกัดจากพืช โดยสารสกัดประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆมากมายซึ่งสามารถแยกได้ด้วยวิธี paper chromatography หรือ thin layer chromatography และเมื่อระเหยตัวทำละลายออกไปแล้ว อาหารและจุลินทรีย์จะถูกใช้ทดสอบบนกระดาษหรือเพลตโครมาโตกราฟ (chromatographed paper or plate) ซึ่งการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกตรวจสอบอย่างละเอียดเมื่อเสร็จสิ้นระยะเวลาการบ่ม บริเวณจุดที่มีสาระสำคัญ (active spot components) จะไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งต่อมาสารนี้จะถูกแยกออกและนำไปวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของสารนั้นๆ สำหรับเทคนิคนี้ไม่ค่อยเป็นที่นิยมใช้ในการทดสอบกับน้ำมันหอมระเหยเนื่องจากมีสารที่เกิดการระเหยได้สูง (Kalemba และ Kunicka. 2003)

2.4.3.3 Turbidimetry

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้กันทั่วไปในการทดสอบกิจกรรมของน้ำมันหอมระเหยซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาโดยการใช้คอมพิวเตอร์และเครื่องมือในการตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีอยู่เพียงเล็กน้อยได้และจะแสดงผลเป็นค่า optical density (OD) โดยจะเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยใน polystyrene microtitre plate ชนิดก้นแบนที่มี 96-100 หลุม และเมื่อครบระยะเวลาการบ่มจึงทำการเขย่าจานทดสอบแรงๆบนแท่นสั่น และวัดค่าทันทีด้วยเครื่อง multiscan photometer ค่าที่อ่านได้จะถูกบันทึกไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป ความขุ่นของอิมัลชั่นของน้ำและน้ำมันจะรบกวนการอ่านค่าที่ได้ ด้วยสาเหตุนี้จึงต้องอาจต้องใช้ตัวบ่งชี้ (indicator) บ้างในบางครั้ง (Kalemba และ Kunicka. 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3.4 Bioimpedimetric method

การวัดความต้านทานต่อไฟฟ้ากระแสสลับในทางชีวภาพเป็นวิธี non-conventional อีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย การตรวจสอบด้วยวิธีนี้ไม่เพียงแต่จะทำได้ง่ายแต่ยังเป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็วด้วย วิธีนี้อาศัยความสัมพันธ์กันระหว่างปัจจัยทางไฟฟ้าที่เปลี่ยนไป (altered electrical parameter) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญ (growth culture) ซึ่งสัมพันธ์กับกิจกรรมเมทาบอลิกของเชื้อจุลินทรีย์ และจำนวนเซลล์ในหน่วยของ CFU ต่อมิลลิลิตร ระบบการตรวจสอบจะรายงานผลเป็นเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ (detection time; DT) ซึ่งหมายถึงเวลาที่ใช้ในการให้เชื้อเจริญเติบโตถึงปริมาณเชื้อที่กำหนด (threshold quality) ไว้ (ปกติมักใช้ที่ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร) กิจกรรมของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สามารถแสดงผลเป็นความล่าช้าของ detection time ของการตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยเปรียบเทียบกับ negative control หรือ อาจแสดงเป็นสัดส่วนของจำนวนเซลล์ที่ลดลง (Kalemba และ Kunicka. 2003)

การวัดความต้านทานไฟฟ้าที่ใช้ในทางการค้าจะมีอุปกรณ์ครบครันที่สามารถใช้ในการตรวจสอบได้ระหว่าง 32 ถึง 512 การทดสอบในเวลาเดียวกันได้ซึ่งทำให้การทดลองเป็นไปอย่างรวดเร็วและเชื่อถือได้ ขนาดของหลุมจะสามารถบรรจุได้ระหว่าง 2 ถึง 100 มิลลิลิตรและมีฝาพลาสติกปิดอย่างแน่นหนาเพื่อป้องกันไม่ให้มีการระเหยของน้ำมันหอมระเหย ประโยชน์อื่นๆของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ คือใช้เวลาในการทดสอบสั้นกว่า 2-3 เท่าซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ (Kalemba และ Kunicka. 2003)

2.4.3.5 In situ system

ปกติเป็นที่ยอมรับว่ากิจกรรมของน้ำมันหอมระเหยเมื่อทดสอบในหลอดทดลองจะมากกว่าเมื่อทดสอบในแหล่งกำเนิดจริง เช่น อาหาร หรือในร่างกายผู้ป่วย เพื่อที่จะประเมินประโยชน์ของน้ำมันหอมระเหยในฐานะของสารถนอมอาหารดังนั้นจึงต้องมีการทดลองในระบบของอาหารเฉพาะเพื่อตรวจหากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งในบางครั้งอาจได้ข้อมูลสนับสนุนจากผลการวิจัยในหลอดทดลอง งานวิจัยเหล่านี้ได้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศมีศักยภาพสูงในการใช้ในกระบวนการแปรรูป และเช่นเดียวกันก็มีการศึกษาเพื่อประเมินคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยในการรักษาโรคซึ่งเป็นการวิจัยทางการแพทย์โดยศึกษากับคนไข้ หรือการศึกษากับสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตามมีการดำเนินงานวิจัยในรูปแบบนี้น้อยมาก (Kalemba และ Kunicka. 2003)

<u>การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหย</u>

วิธีการทดสอบคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมีหลายวิธี ก่อนที่จะทำการทดสอบต้องแน่ใจว่าเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบอยู่ในระยะที่มีอัตราการเจริญสูง ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารวุ้นเอียงบ่มไว้เป็นเวลา 3 วันก่อนการทดสอบซึ่งจะทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวที่เหมาะสม เช่น IsoSensitest Broth และ IsoSensitest Agar จะเป็นอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการทดสอบนี้มากเพราะเป็นอาหารที่ใช้คัดเลือกยาปฏิชีวนะ อาหาร IsoSensitest เป็นอาหารที่มีสารอาหารครบถ้วนตามความต้องการของจุลินทรีย์ทั้งหมดยกเว้นจุลินทรีย์ที่จู้จี้มากที่สุด นอกจากนี้อาหารชนิดอื่นที่ใช้แทนได้ คือ Tryptic Soya Broth และ Tryptic Soya Agar (Difco) แต่จะมีองค์ประกอบทางเคมีน้อยกว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวจะถูกถ่ายลงในอาหารใหม่ และทำการบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการทดสอบ (Dean. 1991)

1. เทคนิคการแพร่ในอาหารวุ้น (paper disc method)

วิธีนี้เป็นการทดสอบโดยวางกระดาษกรองลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเชื้อไว้แล้ว จากนั้นเติมสารที่จะทดสอบลงบนกระดาษกรองนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมหลังจากสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มตรวจสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตการเกิดโซนยับยั้งรอบๆกระดาษกรอง สำหรับเทคนิคนี้จะพบข้อเสียเปรียบคือ ถ้าหากจานเพาะเชื้อมีความชื้นเล็กน้อยอาจทำให้สารที่ใช้ทดสอบแพร่กระจายบนพื้นผิวรอบๆกระดาษกรองได้มาก ซึ่งจะทำให้เข้าใจว่าสารที่ใช้ทดสอบมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ สิ่งสำคัญที่สุดที่จะทำให้เกิดความถูกต้องแม่นยำของการทดสอบด้วยวิธีนี้ คือเริ่มตั้งแต่กระดาษกรองจะต้องสัมผัสกับผิวหน้าของอาหารที่ได้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไว้แล้วเพื่อส่งผลให้เกิดการยับยั้งเกิดขึ้น นอกจากนี้ปริมาณของสารที่ใช้ในการทดสอบก็มีส่วนสำคัญต่อความถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งโดยปกติแล้วจะใช้ไมโครปิเปตต์สำหรับควบคุมปริมาณสารที่ใช้ และวางจานเพาะเชื้อทิ้งไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้สารเกิดการแพร่ลงในอาหารเสียก่อนแล้วจึงคว่ำจานเพาะเชื้อก่อนนำไปบ่ม (Dean. 1991)

2. การทดสอบการแพร่ในหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อ (well test)

เทคนิค well test ทำได้โดยการเจาะหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเพาะเชื้อไว้แล้ว จากนั้นจึงใส่สารที่จะทดสอบลงไปหลุม ข้อดีของวิธีนี้คือ สารตัวอย่างทั้งหมดจะถูกจำกัดอยู่ในหลุมและแพร่ผ่านไปในอาหารเป็นแนวรัศมี ปริมาณของสารในหลุมสามารถควบคุมได้อย่างแม่นยำถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีปริมาตรแน่นอนในการทดสอบแต่ละครั้ง สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตรและเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จะสามารถใส่สารที่จะทดสอบลงไปได้ปริมาตร 12 - 15 ไมโครลิตร สิ่งที่สำคัญคือ ต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 30-60 นาทีเพื่อที่จะปล่อยให้สารเกิดการแพร่ก่อนที่จะนำไปบ่มในที่มืดโดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส ถ้าใช้อุณหภูมิในการบ่มสูงกว่านี้อาจส่งเสริมให้เกิดการระเหยของสารที่ใช้ทดสอบได้ โดยหลังสิ้นสุดการบ่มบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบๆหลุมจะถูกวัดด้วยเครื่องมือวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (vernier caliper) (Dean. 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การทดสอบในหลอดทดลองโดยการผสมสารแขวนลอยเซลล์กับสารที่จะทดสอบ (suspension test)

วิธีนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ค่าทางคณิตศาสตร์ (mathematical expression) ของประสิทธิภาพในการฆ่าจุลินทรีย์ของสารละลายที่ใช้ทดสอบ วิธีนี้จะทำการปิเปตตัวอย่างออกมาจากหลอดทดลองที่มีเซลล์แบคทีเรียผสมกับสารที่ใช้ทดสอบเมื่อครบระยะเวลาแต่ละช่วงเพื่อตรวจสอบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่รอดชีวิตอยู่ และสร้างกราฟระหว่างจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตกับเวลา ซึ่งจะได้กราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ของการตายในแบบลอการิทึม จากกราฟจะสามารถคำนวณค่า decimal reduction time ได้ ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงเวลาที่ทำให้จำนวนเชื้อแบคทีเรียลดลงร้อยละ 90 หรือ 1 log cycle วิธีนี้เป็นการวัดประสิทธิภาพของสารที่จะทดสอบโดยตรงและสามารถทดสอบกับปัจจัยต่างๆได้ เช่น ความเข้มข้น ชนิดของจุลินทรีย์ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง (Dean. 1991)

รูปแบบในการทดสอบที่ง่ายคือการเพาะเชื้อที่มีการเจริญเติบโตดีลงในอาหารเหลวซึ่งได้ใส่สารที่จะทดสอบไว้แล้ว และบ่มไว้ในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำไปตรวจสอบความขุ่นที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว แต่ปัญหาอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นคือน้ำมันหอมระเหยไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกันกับอาหารเหลวได้ง่ายแต่ถ้าเขย่าอย่างสม่ำเสมอก็จะช่วยลดปัญหาเหล่านี้ลงได้ (Dean. 1991)

<u>การทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราของน้ำมันหอมระเหย</u>

1. วิธีการแพร่ในอาหารวุ้น (paper disc method)

นักวิจัยหลายท่านพยายามที่จะประเมินคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยใช้เทคนิค paper disc ปัญหาหลักของการทดสอบกับเชื้อราและยีสต์ คือ การเจริญเติบโตเข้าใกล้บริเวณจุดศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อจะเกิดขึ้นช้ากว่าการเจริญของแบคทีเรีย โดยปกติใช้เวลาประมาณ 7-10 วันเพื่อให้มีการเจริญของเส้นใยอย่างเพียงพอสำหรับการประเมินผล ในระหว่างการบ่มเป็นเวลานานนี้สารที่ทดสอบจำนวนหนึ่งจะเกิดการระเหยเกิดขึ้นซึ่งทำให้การประเมินผลในเชิงปริมาณเป็นไปได้ยากซึ่งในบางงานวิจัยจะมีการใช้วิธีในการทดสอบโดยวางกระดาษกรองที่ชุ่มไปด้วยน้ำมันหอมระเหยที่ฝาของจานเพาะเชื้อ และนำไปบ่มโดยการคว่ำจานเพาะเชื้อไว้ หลังจากการบ่มจะมีการตรวจสอบโซนการยับยั้งที่เกิดขึ้น (Dean. 1991)

2. การวัดน้ำหนักแห้งของเชื้อรา

วิธีนี้เป็นทางเลือกที่ใช้ในการทดสอบอีกวิธีหนึ่งเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดขึ้นจากการทดสอบวิธีแรก โดยจะใช้การวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่ลดลงเมื่อสัมผัสกับน้ำมันหอมระเหย ในการทดสอบจะต้องเขย่าฟลาสก์อย่างต่อเนื่องเพื่อให้เชื้อรามีการสัมผัสกับน้ำมันหอมระเหยได้ดี ฟลาสก์ที่ไม่มีการเติมน้ำมันหอมระเหยจะใช้เป็นชุดควบคุม หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 10 วัน ของผสมต่างๆในฟลาสก์จะถูกกรองผ่านกระดาษกรองใยแก้ว (dried glass fiber filter, whatman GF/C) ที่ได้ชั่งน้ำหนักไว้ก่อนแล้วและทำการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อหลายๆครั้ง จากนั้นนำกระดาษกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใยแก้วนี้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ และจึงนำไปคำนวณค่าการยับยั้ง (index of inhibition) จากสูตรดังนี้

$$\text{การยับยั้ง (ร้อยละ)} = \frac{[C-T]}{C} \times 100$$

เมื่อ C คือ น้ำหนักเฉลี่ยของเส้นใยเชื้อราจากฟลาสก์ชุดควบคุม และ T คือ น้ำหนักเฉลี่ยของเส้นใยจากฟลาสก์ที่มีสารที่ต้องการทดสอบ (Dean. 1991)

2.5 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมซึ่งมีอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่จำนวน 1 คู่ หรือมากกว่า 1 คู่ ซึ่งทำให้อนุมูลอิสระมีความไม่เสถียรสูงและเป็นสาเหตุในการเข้าทำลายโมเลกุลอื่นๆ โดยการดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นเพื่อทำให้ตัวเองมีความเสถียร Reactive oxygen species (ROS) เป็นโมเลกุลที่เกิดขึ้นในร่างกาย อย่างเช่น superoxide anion และ hydrogen peroxide เป็นอะตอมที่มีการเกิดปฏิกิริยาสูง และเป็นไปได้ที่จะเข้าทำลายแบบชั่วคราว อนุมูลอิสระจะมีการสร้างขึ้นอย่างต่อเนื่องในร่างกายมนุษย์ซึ่งมีจำเป็นในการให้พลังงาน กระบวนการขับสารพิษ (detoxification) การส่งสัญญาณเคมี (chemical signaling) และระบบภูมิต้านทาน ROS จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ endogenous superoxide dimutase, glutathione peroxide และ catalase แต่ถ้ามี ROS มากเกินไปหรือที่เรียกว่า oxidative stress จะเหนี่ยวนำให้ระบบการป้องกันล้มเหลวและจะทำลายโครงสร้างของเซลล์ ดีเอ็นเอ ไขมัน และโปรตีน ซึ่งจะเพิ่มความเสี่ยงของกระบวนการในการเกิดโรคต่างๆมากกว่า 30 ชนิด โดยโรคที่พบมากที่สุดจะเกี่ยวข้องกับระบบประสาทในสมอง คือ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) อาการความจำบกพร่องเล็กน้อย (mild cognitive impairment; MCI) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease; PD) นอกจากนี้ยังมีโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทในสมองอื่นๆ ที่เกี่ยวกับการเกิด oxidative stress เช่น โรคปลอกประสาทเสื่อมแข็ง (multiple sclerosis) โรควัวบ้าในคน (Creutzfeldt-Jacob disease) และ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningoencephalitis) โรคต่างๆ เหล่านี้มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพในการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันแบบจำเพาะเจาะจงและอย่างต่อเนื่องซึ่งมี F_2-isoprostane เป็นสัญลักษณ์ สำหรับโรคอื่นๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) หัวใจล้มเหลว (cardiac failure) โรคตับจากการดื่มแอลกอฮอล์ (alcohol-induced liver disease; ALD) โรคลำไส้ใหญ่อักเสบ (Ulcerative colitis) และโรคมะเร็ง ซึ่งเกิดจากหลายสาเหตุประกอบกันโดยมี reactive nitrogen species (RNS) และ ROS เป็นองค์ประกอบ อนุมูลไฮดรอกซิลเป็นที่รู้กันว่าสามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบทั้งหมดของโมเลกุลดีเอ็นเอ โดยจะเข้าทำลายเบสพิวรีนและเบสไพริมิดีน และโครงสร้างของดีออกซีไรโบสด้วย นอกจากดีเอ็นเอแล้ว ROS ยังเข้าโจมตีองค์ประกอบของเซลล์อื่นๆด้วยรวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นส่วนประกอบของฟอสโฟลิปิด โซ่ข้าง (side chain) ของกรดอะมิโนที่เป็น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนประกอบในโปรตีนโดยเฉพาะซิสเทอีน (cysteine) และ เมทไธโอนีน (methionine) (Ali และคณะ. 2008)

ร่างกายของเรามีกลไกการต้านการเกิด oxidative stress ซึ่งเกิดจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกัน กลไกการซ่อมแซม กลไกทางกายภาพ และการป้องกันด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ การป้องกันด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ ประกอบด้วย superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase และอื่นๆ ส่วนสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ คือ กรดแอสคอบิกหรือวิตามิน ซี α-tocopherol หรือวิตามิน อี กลูตาไธโอน (glutathione; GSH) แคโรทีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ และอื่นๆ สารเหล่านี้จะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกเพียง 1 กลไกหรือมากกว่า เช่น กิจกรรมในการรีดิวซ์ การกำจัดอนุมูลอิสระ การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะที่เป็นโปรออกซิแดนซ์ และการกำจัดโมเลกุลออกซิเจนที่ไม่มีอนุมูลหรืออิเล็กตรอนเดี่ยว ความเป็นไปได้ที่จะลดความเสี่ยงของการเกิดโรคเรื้อรังและการพัฒนาการป้องกันโรคโดยการเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติภายในร่างกายหรือโดยใช้อาหารเสริมสุขภาพที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ (Ali และคณะ. 2008)

2.6 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระได้ถูกจำกัดความไว้ว่าเป็นสารใดๆก็ตามที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆจะสามารถชะลอและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นที่เกิดการออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิหรือสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain-breaking antioxidant) และสารต้านอนุมูลอิสระทุติยภูมิหรืออนุมูลที่ใช้ป้องกัน (preventative antioxidation) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันช้าลง ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้อาจมีผลทั้งในด้านการกำจัดสารตั้งต้นหรือการกำจัดโมเลกุลออกซิเจนที่ไม่มีอนุมูลหรืออิเล็กตรอนเดี่ยว (singlet oxygen) สารต้านอนุมูลอิสระที่เข้าทำลายพันธะปฏิกิริยาลูกโซ่อาจมีอยู่ตามธรรมชาติหรืออาจมีการสังเคราะห์ขึ้น เช่น Butylated hydroxytoluene (BHT), Butylated hydroxyanisole (BHA), *tert*-Butylhydroquinone (TBHQ) และ gallates สารต้านอนุมูลอิสระชนิดสังเคราะห์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกันอย่างแพร่หลาย การใช้สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติได้ถูกสนับสนุนให้ใช้เพื่อให้เกิดความปลอดภัย สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติจะมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระคล้ายคลึงกันหรืออาจมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่มีการสังเคราะห์ขึ้น (Antolovich และคณะ. 2001)

สารต้านอนุมูลอิสระอาจป้องกันได้ในระบบหนึ่งแต่อาจล้มเหลวหรืออาจเป็นสาเหตุของความเสียหายในอีกระบบหนึ่ง สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันอาจจะทำให้ไม่เกิดการป้องกันต่อเป้าหมายอื่นๆ เช่น ดีเอ็นเอ และโปรตีน และในบางครั้งอาจทำให้เกิดความรุนแรงมากขึ้น เช่น ก่อให้เกิดความเสียหายขึ้นได้ โอกาสแบบนี้จะไม่เกิดขึ้นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในฟู้ดแมทริกซ์ (food matrix) นอกเสียจากว่าจะมีสารเหล่านั้นอยู่ในปริมาณมากเกินพอ และจะไม่ทำให้รสชาติและลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) ของอาหารเปลี่ยนไปซึ่งไม่เหมือนกับการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกไซด์ของไขมัน ตัวอย่างเช่น BHA เป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกไซด์ของไขมันที่มีประสิทธิภาพ และถ้าใช้ในปริมาณมากจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดมะเร็งในกระเพาะอาหารส่วนหน้าของหนู และยังถูกแนะว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ (oxidative DNA damage) (Aruoma. 2003)

ความสนใจในความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชยังคงมีอยู่ ซึ่งได้มีรายงานการพบสารสำคัญในสารสกัดของโรสแมรี่ (rosemary) เสจ (sage) เปลือกเมล็ดโกโก้ (cocoa shell) ข้าวโอ๊ต (oat) ชา (tea) มะกอก (olive) กระเทียม (garlic) ขิง (ginger) เปลือกหอมแดง (red onion) องุ่น (grape) เปลือกแอปเปิ้ล (apple cuticle) ชะเอม (licorice) ลูกจันทน์เทศ (nutmeg) กานพลู (clove) ออริกาโน (oregano) ไทม์ (thyme) เปลือกเมล็ดถั่ว (peanut seed coat) มะม่วง (mango) และวานิลลา (vanilla) นอกจากนี้ยังมีการอภิปรายกันมากเกี่ยวกับวิตามินอี วิตามินซี เบต้าแคโรทีน ฟลาโวนอยด์และพอลีฟีนอลอื่นๆที่พบในสารสกัดของพืชบางชนิดซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญต่อการป้องกันโรค ฟลาโวนอยด์ เป็นสารธรรมชาติที่เกิดจากอนุพันธ์ของเบนโซแกมมาไพโรน (benzo-γ-pyrone) ซึ่งเป็นสารที่มีอยู่ทุกหนทุกแห่งในเซลล์ของพืช ดังนั้นผู้บริโภคจึงได้รับสารนี้จากอาหาร(Aruoma. 2003)

2.6.1 การจัดแบ่งประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

การจัดแบ่งประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร (food antioxidants) โดยอาศัยหน้าที่ของสารสามารถจัดแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ 1) สารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิ (primary antioxidant) หรือสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำลายการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain-breaking antioxidant) 2) สารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์เสริมกัน (synergistic antioxidant) และสารต้านอนุมูลอิสระชนิดทุติยภูมิ (secondary antioxidant)

2.6.1.1 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิ (Primary antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิจะหยุดการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระและทำให้เกิดเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้จะมีหน้าที่ในการเติมอนุมูลไขมันลงในปฏิกิริยาทำให้เกิดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเชิงซ้อนของไขมัน กลุ่มของ hindered phenolic antioxidants (เช่น Butylated hydroxytoluene; BHT, Butylated hydroxyanisole; BHA, *tert*-Butylhydroquinone; TBHQ และ tocopherol) และ polyhydroxyohenolic antioxidants (เช่น gallates) จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิ สารประกอบฟีนอลลิกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมีหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ ยูจีนอล (eugenol) วานิลลิน (vanillin) และโรสแมรี่ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติในการทำลายการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ สารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิจะมีประสิทธิภาพที่ระดับความเข้มข้นต่ำมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และที่ระดับความเข้มข้นสูงๆสารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมินี้จะกลายเป็นตัวโพรออกซิแดนซ์ (prooxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิ (AH) อาจทำหน้าที่ชะลอหรือยับยั้งขั้นตอนเริ่มต้น (initiation step) โดยเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระของไขมันหรือยับยั้งขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาแพร่ขยาย (propagation reaction) โดยเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลเปอร์ออกซี (peroxy radical; LOO·) หรืออนุมูลอัลคอกซี (alkoxy radical; LO·)

$$AH + L\cdot \longrightarrow A\cdot + LH$$

$$AH + LOO\cdot \longrightarrow A\cdot + LOOH$$

$$AH + LO\cdot \longrightarrow A\cdot + LOH$$

อนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ (A·) อาจเข้าไปขัดขวางปฏิกิริยาลูกโซ่ของการแพร่ขยาย (chain-propagation reactions) โดยเกิดเป็นสารประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบของเปอร์ออกซี (peroxy antioxidant compound)

$$A\cdot + LOO\cdot \longrightarrow LOOA$$

$$A\cdot + LO\cdot \longrightarrow LOA$$

สารต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม hindered phenolic จะมีหมู่อัลคิล (alkyl group) หรือหมู่ที่มีการปลดปล่อยอิเล็กตรอนแทนที่อยู่ในตำแหน่งออโธ (ortho) หรือ พารา (para) ในโครงสร้างของวงแหวน (aromatic ring) ซึ่งจะลดการเกิดปฏิกิริยาของหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) หมู่ที่มีการให้อิเล็กตรอนจะเพิ่มความหนาแน่นของอิเล็กตรอนบนหมู่ไฮดรอกซิลโดยจะมีผลกระทบต่อการเหนี่ยวนำและเพิ่มการเกิดปฏิกิริยากับอนุมูลของไขมัน การถูกแทนที่ด้วยหมู่บิวทิล (butyl group) หรือเอทิล (ethyl group) ที่ตำแหน่งพาราจะเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้มากกว่าหมู่เมทิล (methyl) อย่างไรก็ตามการแทนที่ด้วยหมู่ที่มีการดึงดูดอิเล็กตรอน เช่น ไนโตร หรือหมู่ที่มีกิ่งก้านยาว หรือหมู่ที่มีอัลคิลเป็นกิ่งก้านสาขา (branched alkyl group) ที่ตำแหน่งพาราจะลดกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่ม hindered phenolic กับอนุมูลอิสระเป็นผลให้เกิดการสร้างอนุมูลฟีนอกซีอิสระ (free phenoxy radical) อนุมูลฟีนอกซีอิสระถูกทำให้เสถียรโดยการดึงอิเล็กตรอนที่ไม่ครบคู่ออกจากโครงสร้างวงแหวน (aromatic ring) และทำให้มีความเสถียรต่อโดยหมู่ที่มีใหญ่กว่าที่ตำแหน่งออโธ การแทนที่นี้จะลดจำนวนการเกิดปฏิกิริยาการแพร่ขยายซึ่งบางทีอาจเกี่ยวข้องกับอนุมูลที่เป็นอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระ สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของ polyhydroxyphenolic พบการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมีและกลไกที่เกี่ยวข้องน้อยมาก มีการยอมรับว่าปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระกับอนุมูลเปอร์ออกซีมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดเป็นออโธควิโนน (orthoquinone) (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดทำงานร่วมกัน (Synergistic antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระชนิดทำงานร่วมกันสามารถถูกจัดแบ่งกลุ่มได้อย่างกว้างๆได้เป็น 2 ประเภท คือ ตัวขจัดออกซิเจน (oxygen scavenger) และตัวกำจัดโลหะหนัก (chelator) สารเหล่านี้มีกลไกการทำงานหลายกลไกโดยอาจทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลฟีนอกซี (phenoxy radical) ดังนั้นจึงเป็นการรีเจนเนอเรต (regenerate) สารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิขึ้นมาใหม่ เพราะฉะนั้นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของฟีนอลิกจะสามารถใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำๆได้ถ้าเติมสารที่ออกฤทธิ์เสริมกัน (synergist) ลงไปในผลิตภัณฑ์อาหารด้วย สารที่ออกฤทธิ์เสริมกันนี้ทำให้อาหารมีความเป็นกรดซึ่งจะช่วยทำให้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิมีความเสถียรมากยิ่งขึ้น (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

ตัวขจัดออกซิเจน เช่น กรดแอสคอร์บิก แอสคอร์บิล ปามิเตต (ascorbyl palmitate) ซัลไฟท์ (sulfite) และ อิริทอเบต (erythorbate) จะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนอิสระและขจัดออกในระบบปิด กรดแอสคอร์บิก และแอสคอร์บิก ปามิเตต จะทำหน้าที่เป็นสารที่ออกฤทธิ์เสริมกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิโดยเฉพาะกับโทโคฟีรอล (tocopherol) ตัวกำจัดโลหะหนักเช่น EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) กรดซิตริก และฟอสเฟตไม่จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ แต่จะมีประสิทธิภาพสูงในการเป็นสารที่ออกฤทธิ์เสริมกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิและตัวขจัดออกซิเจน โดยคู่ของอิเล็กตรอนที่ไม่สามารถใช้ร่วมกันได้ (unshared pair of electron) ที่มีอยู่ในโมเลกุลช่วยส่งเสริมการกำจัดโลหะหนัก (chelating action) โดยจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีความเสถียรกับโลหะหนักที่เป็นตัวโพรออกซิแดนซ์ (prooxidant metal) เช่น เหล็กและทองแดง ซึ่งจะสนับสนุนการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นและเพิ่มพลังงานกระตุ้นของการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นได้เป็นจำนวนมาก (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

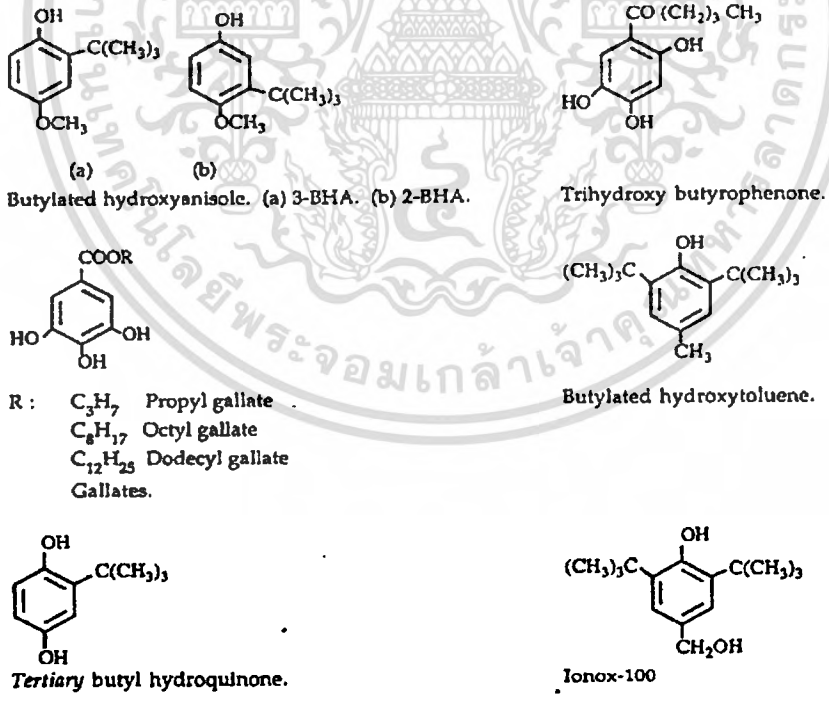
2.6.1.3 สารต้านอนุมูลอิสระชนิดทุติยภูมิ (Secondary antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระชนิดทุติยภูมิหรือสารต้านอนุมูลอิสระชนิดป้องกัน (preventive antioxidants) เช่น กรดไทโอไดโพรพิโอนิก (thiodipropionic acid) และไดลอริลไทโอไดโพรพิโอเนต (dilauryl thiodipropionate) ซึ่งจะมีหน้าที่ในการสลายเปอร์ออกไซด์ของไขมัน (lipid peroxides) ให้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีความเสถียร สำหรับไดลอริลไทโอไดโพรพิโอเนตเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในทำให้เปอร์แอซิด (peracid) ไม่ทำงานในระบบซึ่งมีกรดเปอร์ฟอร์มิก (performic acid) นอนเอนอล (nonanal) เอทิลโอลีเอท (ethyl oleate) หรือ คอเลสเตอรอล (cholesterol) ซึ่งในระบบนี้ไดลอริลไทโอไดโพรพิโอเนตจะถูกออกซิไดซ์เป็นซัลฟอกไซด์ (sulfoxide) และป้องกันการเกิดของกรดนอนเอโนอิก (nonanoic acid) 9-อีพอกซีเอทิลโอลีเอท (9-epoxyethyl oleate) และ 5,6-อีพอกซี-คลอเลสเตอรอล (5,6-epoxy-cholesterol) ตามลำดับ (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

2.6.1.4 สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ (Miscellaneous antioxidants)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบที่อยู่ในกลุ่มของสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ เช่น ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบอื่นที่เกี่ยวข้อง และกรดอะมิโนที่มีหน้าที่เป็นทั้งสารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิและสารที่เสริมฤทธิ์ สำหรับไนเตรทและไนไตรท์ เป็นสารที่ใช้ในการถนอมอาหารประเภทเนื้อ (meat curing) ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยเปลี่ยนฮีมโปรตีน (heme protein) ไปเป็นไนตริกออกไซด์โดยการคีเลต (chelating) กับไอออนของโลหะ โดยเฉพาะเหล็กที่ไม่มีฮีม (nonheme iron) ทองแดงและโคบอลต์ ซึ่งพบได้ในเนื้อ เบต้าแคโรทีนและคาโรทีนอยด์ที่เกี่ยวข้องจะเป็นมีประสิทธิภาพในการกำจัดโมเลกุลออกซิเจนที่ไม่มีอนุมูลหรืออิเล็กตรอนเดี่ยว (singlet oxygen) และป้องกันการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ สังกะสีเป็นธาตุที่ยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ดีในระดับเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะไปเปลี่ยนแปลงหรือป้องกันการเข้าจับของเหล็ก ซีลีเนียมเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์และการเกิดกิจกรรมของกลูตาไทโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์ เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) และคะตะเลส (catalase) ทำหน้าที่ในการกำจัดออกซิเจนที่ละลายได้หรือออกซิเจนที่อยู่ในช่องว่างเหนือสารตัวอย่าง (headspace oxygen) และช่วยป้องกันการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)



รูปที่ 2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์บางชนิด

ที่มา : Rajalakshmi และ Narasimhan (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ

2.6.2.1 สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants)

สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งรวมทั้ง BHT (Butylated hydroxytoluene), BHA (Butylated hydroxyanisole), TBHQ (*tert*-Butylhydroquinone) โพรพิล (propyl) ออกทิล (octyl) และโดดีซิลกัลเลท (dodecyl gallate) (รูปที่ 2.1) สารต้านอนุมูลอิสระแบบโพลีเมอริก (polymeric antioxidant) เช่น Anoxomer, Ionox-330 และ Ionox-100 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ BHT ได้แนะนำไว้แต่ยังไม่ได้ใช้ในเชิงการค้า โดยทั่วไปสารต้านอนุมูลอิสระชนิดปฐมภูมิชนิด BHT, BHA หรือ TBHQ จะกำหนดให้ใช้ในระดับ 100-200 พีพีเอ็ม สำหรับ gallates กำหนดให้ใช้ในระดับ 200-500 พีพีเอ็ม เพื่อทำให้ไขมันและน้ำมันคงตัว ในเชิงการค้าสารที่พร้อมใช้จะมีตัวทำละลายที่ใช้ในอาหาร เช่น propylene glycol หรือ glycerol monooleate ซึ่งเป็นสารที่ช่วยเสริมฤทธิ์เช่นเดียวกับกรดซิตริก (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

2.6.2.2 สารต้านอนุมูลจากวัสดุที่ใช้ในบรรจุอาหาร (Antioxidants from food packaging material)

ปัจจุบันได้มีการนำพลาสติกมาใช้บรรจุอาหารกันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ฟิล์ม ภาชนะบรรจุและวัสดุที่ใช้เคลือบซึ่งทำมาจากโพลีเอทีลีนทั้งชนิดที่มีความหนาแน่นสูง (high-density polyethylene) และความหนาแน่นต่ำ (low-density polyethylene) โพลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinyl chloride) โพลีโพรพีลีน (polypropylene) และโคพอลิเมอร์ของเอทีลีน (copolymer of ethylene) และไวนิลอะซิเตต (vinyl acetate) วัตถุเจือปนบางชนิดที่เติมลงไปในพลาสติกจะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดความคงตัวต่อความร้อน เป็นสารพลาสติไซเซอร์ (plasticizer) และดูดซับแสงยูวี สารจะถูกเติมลงไปในระหว่างกระบวนการผลิตและการประดิษฐ์ หรือหลังจากการขึ้นรูป สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ชนิดป้องกันและทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่จะถูกเติมลงไปเพื่อป้องกันการเสื่อมสลาย (oxidative degradation) ของโพลีเมอร์ระหว่างการประดิษฐ์และการเก็บรักษา สารต้านอนุมูลอิสระที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ประกอบด้วย hindered phenol, อะโรมาติกเอมีน (aromatic amine) ควินิน (quinine) และ สารประกอบไนโตร (nitro compound) สารต้านอนุมูลอิสระชนิดป้องกัน ได้แก่ ฟอสไฟต์เอสเทอร์ (phosphite ester) ซัลไฟด์ (sulfide) และ ไดไทโอฟอสเฟต (dithiophosphate) สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดหรือผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้อาจจะเคลื่อนย้ายเข้าไปในผลิตภัณฑ์อาหารเป็นวัตถุเจือปนที่ไม่ตั้งใจเติมลงไป

การเติมสารต้านอนุมูลอิสระผ่านการเคลื่อนย้ายจากวัสดุที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ก็สามารถทำได้ เนื่องจาก BHA และ BHT มีคุณสมบัติระเหยได้ (steam volatility) ดังนั้นจึงใช้สารทั้งสองนี้เป็นวัตถุเจือปนที่สำคัญเพื่อเติมลงในวัสดุของบรรจุภัณฑ์สารนี้จะเคลื่อนย้ายเข้าไปสู่อาหารที่อยู่ในบรรจุภัณฑ์ได้ สารเหล่านี้สามารถเติมลงไปในวัสดุที่ใช้ทำบรรจุภัณฑ์ทั้งที่เป็นแบบขี้ผึ้งพาราฟิน (paraffin wax) ที่ใช้สำหรับทำ waxed inner liner หรือใช้ในแผ่นกระดานที่ทำบรรจุภัณฑ์เพื่อเป็น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิมัลชัน ซึ่งจะเป็นประโยชน์มากโดยเฉพาะในอาหารที่มีไขมันต่ำ เช่น อาหารเช้าที่เป็นธัญพืชหรือผสมลงในเค้ก ซึ่งเป็นการยากที่จะได้รับการสัมผัสอย่างเหมาะสมกับไขมัน เพราะทั้ง BHA และ BHT เป็นสารที่ระเหยได้ที่อุณหภูมิโดยรอบจึงสามารถแพร่ได้ทีละน้อยจากขี้ผึ้งเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

2.6.2.3 สารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ (Natural antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติได้ถูกพัฒนาขึ้นอย่างมากในรอบ 10 ปีที่ผ่านมาเพราะว่าข้อจำกัดที่เพิ่มขึ้นในการใช้สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์และส่งเสริมให้มีความตระหนักถึงผลกระทบต่อสุขภาพ โดยปกติผู้บริโภคจะชอบสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นธรรมชาติมากกว่าเพราะถูกพิจารณาแล้วว่าปลอดภัย ข้อดีและข้อเสียของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติและสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์แสดงไว้ในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ข้อดีและข้อเสียของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

ข้อดี	ข้อเสีย
1. เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเนื่องจากพิจารณาแล้วว่ามีความปลอดภัยและไม่ใช่สารเคมี 2. ตามกฎหมายไม่ได้กำหนดว่าต้องทำทดสอบความปลอดภัย (safety test) ถ้าส่วนประกอบในอาหารถูกพิจารณาแล้วว่าปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS)	1. ถ้าเป็นสารที่บริสุทธิ์จะมีราคาแพงมาก แต่ถ้าไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ประสิทธิภาพจะลดน้อยลง 2. คุณสมบัติของสารที่เตรียมด้วยวิธีการต่างกันจะมีความผันแปรถ้าไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 3. บ่อยครั้งที่ไม่ทราบถึงความปลอดภัย 4. อาจทำให้เกิดสี รสชาติ หรือกลิ่นรสที่ผิดปกติไปในผลิตภัณฑ์อาหาร

ที่มา : Rajalakshmi และ Narasimhan (1996)

ส่วนประกอบในอาหารโดยทั่วไปจะมีสารประกอบที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (ตารางที่ 2.5) อย่างไรก็ตามส่วนประกอบเหล่านี้จะสามารถใช้ได้ในผลิตภัณฑ์เท่านั้น ซึ่งจะเข้ากันได้กับลักษณะเนื้อสัมผัส สี และรสชาติของผลิตภัณฑ์ที่ได้ ดังนั้นการวิเคราะห์และการทำให้บริสุทธิ์ของสารประกอบที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงกลายเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการใช้สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติอย่างมีประสิทธิภาพในทางการค้า สารต้านอนุมูลอิสระที่มีตามธรรมชาติ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดซิตริก ยูจีนอล โปรตีน ฟลาโวนอยด์ วิตามินอี วิตามินซี เบต้าเคโรทีน สเตอรอยด์ กรดยูริก วานิลลิน กรดฟีนอลิก เลซิทิน (lecithin) กรดไฟติก (phytic acid) กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) กรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรสมารินิก (rosmarinic acid) ลิกแนน (lignans) เคอร์คูมิน (curcumin) คาร์นอซีน (carnosine) คาร์โนซอล (carnosol) และ nordihydroguaiaretic acid

วิตามินอี (α-tocopherol) และวิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งเป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในระดับการค้า วิตามินอีสังเคราะห์และอะซิเตทของวิตามินอี คือ *dl*-α-tocopherol และ *dl*-α-tocopheryl acetate สำหรับ trolox-C เป็นอนุพันธ์ของ α-tocopherol และ *d*-α-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate ซึ่งเป็นรูปแบบของ α-tocopherol ที่ละลายน้ำได้ กรดซิตริก กรดทาร์ทาริก และเลซิทิน เป็นสารประกอบที่พบในส่วนประกอบของอาหารซึ่งถูกใช้เป็นสารที่ออกฤทธิ์เสริมในผลิตภัณฑ์อาหาร กรดไฟติกเป็นสารประกอบหลักในเมล็ดพืชทั้งหมดซึ่งเป็นสาระสำคัญในการรวมตัวกับโลหะ (chelating agent) (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

ตารางที่ 2.5 สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่พบในส่วนประกอบของอาหาร

แหล่งที่พบ	สารต้านอนุมูลอิสระ
น้ำมันและเมล็ดพืชที่มีน้ำมัน	โทโคเฟอรอล (tocopherol) และโทโคไตรอินอล (tocotrienol) ซีซามอล (sesamol) และสารที่เกี่ยวข้อง โอลีฟออยเรซิน (olive oil resin) ฟอสโฟลิปิด
ข้าวโอ๊ต และรำข้าว	สารประกอบที่เป็นอนุพันธ์ของลิกนินหลายชนิด
ผลไม้และผัก	กรดแอสคอร์บิก กรดไฮดรอกซีคาร์บอกซีลิก (hydroxycarboxylic acid) ฟลาโวนอยด์ คาโรทีนอยด์
เครื่องเทศ สมุนไพร ชา โกโก้	สารประกอบฟีนอลิก
โปรตีนและโปรตีนไฮโดรไลเซท	กรดอะมิโน ไดไฮโดรไพริดีน (dihydropyridine) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction)

ที่มา : Rajalakshmi และ Narasimhan (1996)

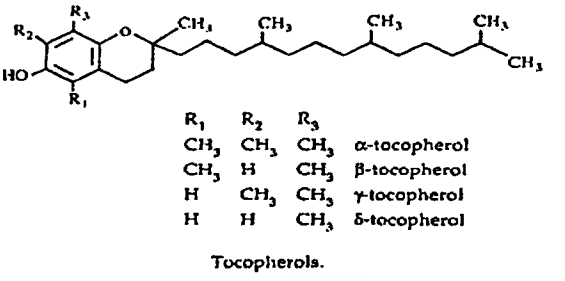
2.6.3 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติที่สำคัญ

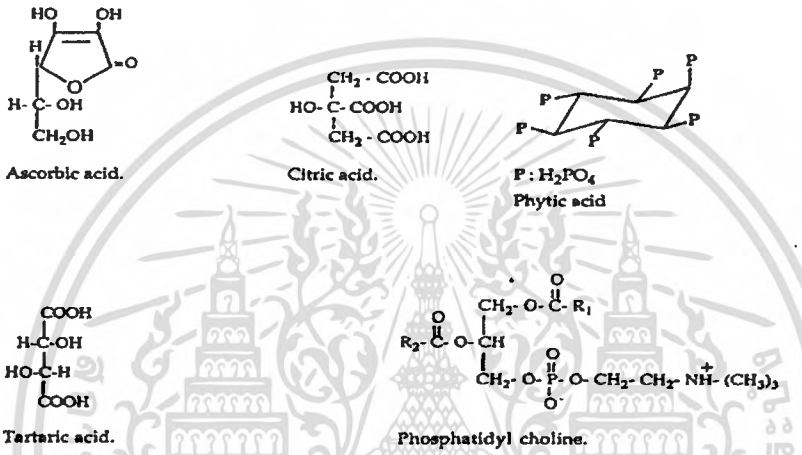
ในปัจจุบันมีรายงานมากมายที่ได้ตีพิมพ์เกี่ยวกับการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติจากพืช สัตว์ จุลินทรีย์ และผลิตภัณฑ์อาหาร สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในพืช ได้แก่ เปลือกแอปเปิ้ล กานพลู เปลือกเมล็ดโกโก้ กระเทียม ดอกและลูกจันทน์เทศ มะกอก ข้าวโอ๊ต ออริกาโน พริกไทย เปลือกหอมแดง โรสแมรี่ น้ำมันงา และชา

สารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นสารประกอบฟีนอลิก (ยกเว้น tocopherol) ซึ่งมี ortho-substituted active group ในขณะที่สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (ยกเว้น gallate) มีหมู่ para-substituted สารสำคัญที่เป็นสารประกอบหลักบางชนิดที่ได้มีรายงานจนถึงทุกวันนี้ คือ ฟลาโวนอยด์ และสารประกอบที่เกี่ยวข้องในสารสกัดพืช ฟีนอลิกในเครื่องเทศและสมุนไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีน และโปรตีนไฮโดรไลเซท เปปไทด์ กรดอะมิโน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction product) (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)





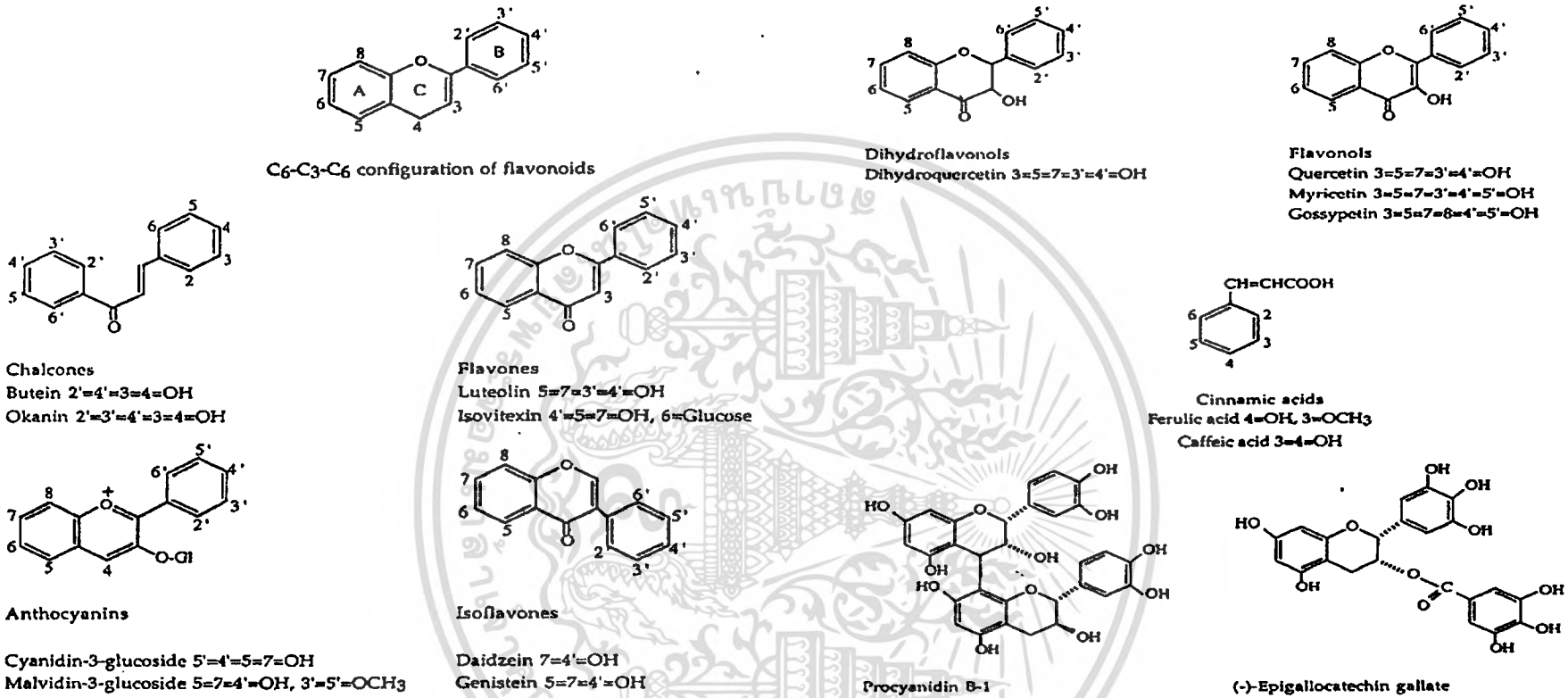
รูปที่ 2.2 สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ที่มา: Rajalakshmi และ Narasimhan (1996)

2.6.3.1 ฟลาโวนอยด์และสารประกอบที่เกี่ยวข้อง

ฟลาโวนอยด์เป็นสารทุติยภูมิที่สามารถพบได้มากในพืช สามารถพบได้ในเกือบทุกส่วนของพืช โครงสร้างเคมีจะเป็นโครงสร้างแบบ C_6-C_3-C_6 โดยกลุ่มย่อยต่างๆจะถูกจัดแบ่งกลุ่มโดยขึ้นอยู่กับการแทนที่ในวงแหวน C และตำแหน่งในวงแหวน B กลุ่มย่อยหลักๆของสารในกลุ่มนี้ คือ ฟลาโวนอล (flavonol) ฟลาโวน (flavone) ไอโซฟาโวน (isoflavone) แคทีชิน (catechin) โปรแอนโธไซยานิดิน (proanthocyanidin) และ แอนโธไซยานิน (anthocyanin) (รูปที่ 2.3) ชาลโคน (chalcone) ฟลาวาโนน (flavonone) ลิวโคแอนโธไซยานิน (leucoanthocyanin) และไดไฮโดรฟลาโวนอล (dihydroflavonol) เป็นสารตั้งต้นสำหรับกลุ่มย่อยที่แตกต่างกันในวิถีชีวสังเคราะห์ (biosynthesis pathway) กรดซินนามิก (cinnamic acid) และกรดฟีนอลิกเป็นสารที่มีสัมพันธ์ใกล้ชิดกับฟลาโวนอยด์ และบางชนิดยังเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ด้วย สารประกอบเหล่านี้ส่วนมากจะเป็นลักษณะเฉพาะของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในระบบจำลอง สมบัติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของฟลาโวนอยด์และสารประกอบที่เกี่ยวข้อง

ที่มา: Rajalakshmi และ Narasimhan (1996)

การต้านอนุมูลอิสระได้ถูกรายงานไว้ในสารสกัดจำนวนมากจากใบไม้ เมล็ดและเปลือกของเมล็ด ผล และลำต้น ซึ่งส่วนใหญ่มักเป็นฟลาโวนอยด์ และกรดซินนามิก

ฟลาโวนอยด์ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ ตัวกำจัดโลหะ (chelators) และตัวขจัดซุปเปอร์ออกไซด์ไอออน (superoxide anion scavenger) การพบหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3′-, 4′- และ 5′- ในวงแหวน B จะเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการที่พบหมู่ไฮดรอกซิลเพียงตำแหน่งเดียว และการพบหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 3 และมีการเกิดพันธะคู่ขึ้น 2-3 พันธะในวงแหวน C ดูเหมือนว่าจะทำให้มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระมีประสิทธิภาพขึ้นด้วย (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

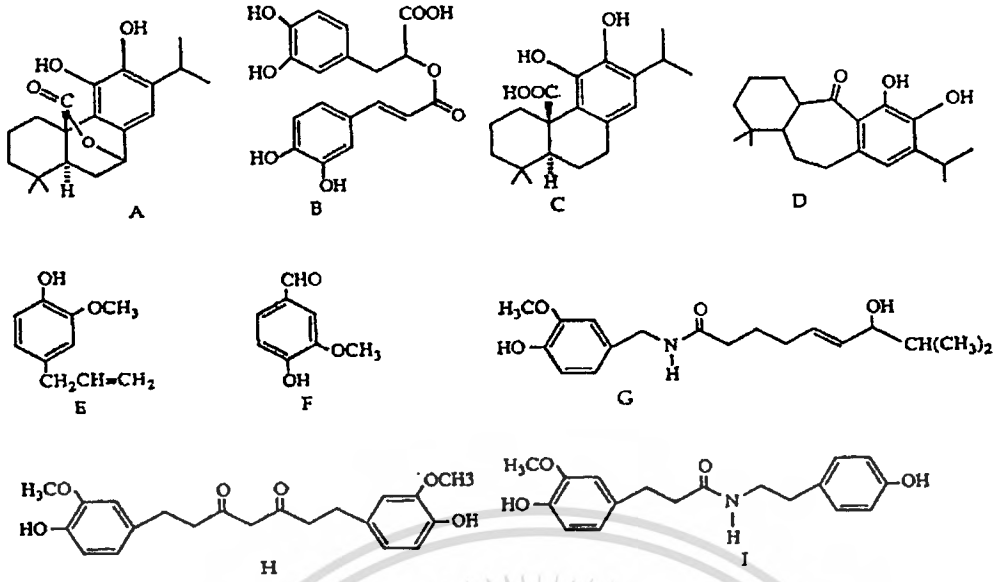
2.6.3.2 ฟีนอลิกจากเครื่องเทศและสมุนไพร

สารต้านอนุมูลอิสระจากเครื่องเทศและสมุนไพรมีความสำคัญสำหรับการประยุกต์ใช้ในปริมาณมาก เครื่องเทศไม่เพียงแต่จะใช้เพื่อให้กลิ่นรสเท่านั้นแต่ยังใช้เพื่อการถนอมอาหารมาเป็นเวลานานหลายร้อยปีแล้ว ได้มีในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ยุคแรกๆเกี่ยวกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมาก่อนหน้านี้ได้ใช้เครื่องเทศหรือสารสกัดจากเครื่องเทศ จากการศึกษาได้ชี้ให้เห็นว่ามีสารสกัดมากมายที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกและการวิเคราะห์ active component จากสมุนไพรและเครื่องเทศหลากหลายชนิด เช่น โรสแมรี่ งา ไทม์ ดอกจันทน์ ออริกาโน ขมิ้น ขิง พริกไทย กานพลู และพืชจำพวกพริก ส่วนมากมีรายงานว่าสารประกอบเหล่านี้มีประสิทธิภาพเหมือนกับ BHA, BHT และ α-tocopherol ข้อเสียหลักของสารสกัดจากเครื่องเทศ คือ สี กลิ่นรส และรสชาติของเครื่องเทศ มีการศึกษามากมายที่ได้ทำการวิเคราะห์และแยกสารประกอบที่ไม่มีกลิ่นและรสชาติ ถึงแม้ว่าสารประกอบที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากมายได้ถูกจำแนกชนิดในสมุนไพรและเครื่องเทศ แต่มีเพียงกระบวนการผลิตระดับใหญ่ของโรสแมรี่และงาเท่านั้นที่ได้มีการพัฒนาเพื่อผลิตเป็นสารบริสุทธิ์ที่ไม่มีรสชาติ และไม่มีกลิ่น ในทางการค้าสารต้านอนุมูลอิสระโรสแมรี่จะทำให้อยู่ในรูปผงละเอียดซึ่งสามารถละลายในไขมันและน้ำมัน แต่ไม่สามารถละลายในน้ำได้ และได้มีผู้แนะนำให้ใช้ปริมาณ 200-1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์อาหารจะทำให้อาหารคงตัวได้ ซึ่งโครงสร้างของสารประกอบบางชนิดได้แสดงไว้ดังรูปที่ 2.4

2.6.3.3 โปรตีน เปปไทด์ กรดอะมิโน และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด

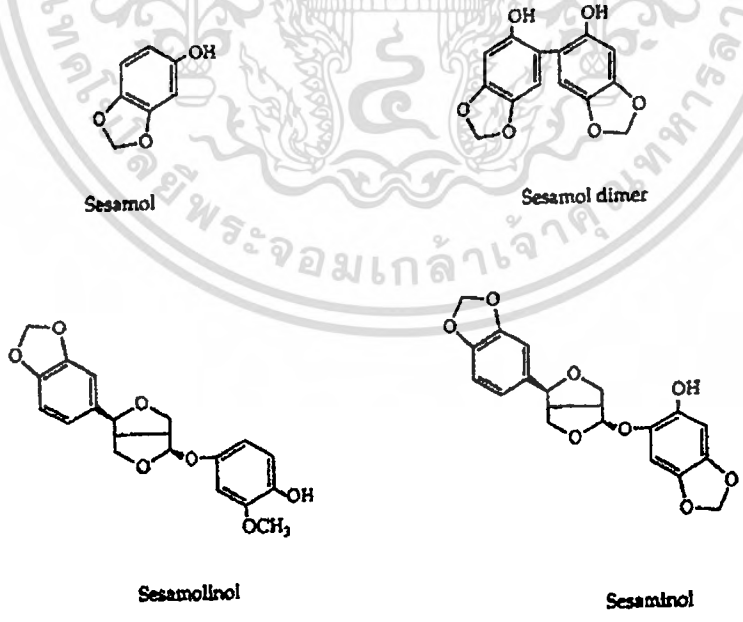
โปรตีน เปปไทด์ กรดอะมิโน และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด เป็นสารที่รู้กันดีว่ามีประสิทธิภาพในด้านคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยทั่วไปสารเหล่านี้จะมีหน้าที่เป็นสารที่ออกฤทธิ์เสริมหรือสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ กลูเทน (gluten) อัลบูมินของไข่ (egg albumen) และเคซีน (casein) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพในน้ำมันดอกคำฝอย และน้ำมันซาร์ดีน การผสมกันของโปรตีนจากถั่วเหลืองและไกลอะดิน (gliadin) จะมีประสิทธิภาพในน้ำมันดอกคำฝอย โปรตีนถั่วเหลืองเป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากกว่าเส้นใยของถั่วในการรักษาสีของเนื้อสับ soy protein

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 สารประกอบที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากเครื่องเทศ : (A) carnosol จากโรสแมรี่ (B) rosmarinic acid จากโรสแมรี่ (C) carnosic acid จากโรสแมรี่ (D) rosmaridiphenol จากโรสแมรี่ (E) eugenol จากกานพลู (F) vanillin จากฝักของวานิลลา (G) capsaicin จากพืชตระกูลพริก (H) tetrahydrocurcumin จากขมิ้น (I) ferulic acid amide จากพริกไทยดำ

ที่มา: Rajalakshmi และ Narasimhan (1996)



รูปที่ 2.5 สารประกอบบางชนิดของงาที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่มา: Rajalakshmi และ Narasimhan (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hydrolysate, autolyzed yeast proteins และ hydrolyzed vegetable proteins จะมีหน้าที่เป็นสารที่ออกฤทธิ์เสริมกับสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ เมื่อใช้เพียงลำพัง autolyzed yeast proteins ร้อยละ 10 จะเทียบเท่ากับ BHA ร้อยละ 0.02 ในน้ำมันข้าวโพด แต่เมื่อใช้ร่วมกันจะเทียบเท่ากับ BHA เพียงร้อยละ 0.005 เท่านั้น (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

สารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มของเปปไทด์ เช่น เทอร์มิริน (turmerin) เป็นเปปไทด์ที่ละลายน้ำได้ ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 40 ชนิดซึ่งพบอยู่ในขมิ้น (*Curcuma longa*) และเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในระบบจำลอง เปปไทด์จะยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้ร้อยละ 70-88 เมื่อเปรียบเทียบกับเคอร์คูมิน (curcumin) จะยับยั้งได้ร้อยละ 70-85 และ BHA ร้อยละ 80 ซึ่งเกิดขึ้นใน L-α-phosphatidylcholine vesicle, liposome และ erythrocyte ghost นอกจากนี้ carnosine และ β-alanine-histidine dipeptide ที่พบใน skeleton muscle เป็นสารที่มีประสิทธิภาพมากในการยับยั้ง oxidative rancidity ในอาหาร และยังพบว่า carnosine ในเนื้อหมูบดที่แช่แข็งมีประสิทธิภาพมากกว่า BHT, α-tocopherol และ sodium tripolyphosphate นอกจากนี้ carnosine อาจจะมีหน้าที่เป็นตัวกำจัดโลหะหรือสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิ (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

กรดอะมิโนส่วนมากมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระซึ่งขึ้นอยู่กับค่าพีเอชของอาหารและความเข้มข้น และได้มีการพบว่าไกลซีน (glycine) เมทไธโอนีน (methionine) ฮีสทีดีน (histidine) ทริปโตฟาน (tryptophan) โพรลีน (proline) และไลซีน (lysine) เป็นกรดอะมิโนที่0มีประสิทธิภาพในไขมันและน้ำมัน ไกลซีนยังเป็นกรดอะมิโนที่มีอยู่ในรายชื่อของสาร GRAS เพื่อเติมในไขมันและน้ำมันที่ความเข้มข้นถึงร้อยละ 0.01 กรดอะมิโนมีหน้าที่เป็นตัวเสริมฤทธิ์กับสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆ มีรายงานจำนวนมากที่แสดงผลของประสิทธิภาพการเป็นตัวเสริมฤทธิ์ของกรดอะมิโนในระบบจำลองของไขมัน น้ำมัน ผลิตภัณฑ์นม และผลิตภัณฑ์เนื้อ Trolox-amino acid เกิดได้จากการสร้างพันธะของ Trolox-C กับกรดอะมิโนหลายชนิดซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่า Trolox-C ในระบบของ linoleate emulsion ได้มีรายงานว่าการรวมกันของฮีสทีดีนและกรดแอสคอบิกจะมีประสิทธิภาพสูงในน้ำมันข้าวโพด และการรวมกันของซิสทีนกับ BHT หรือ tocopherol จะทำให้มีประสิทธิภาพสูงในไขมันนม (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดจะเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการความร้อนหรือการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเป็นที่ทราบกันว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวกำจัดโลหะ เมื่อไม่นานนี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับการวิเคราะห์และประเมินสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารประกอบที่ระเหยได้ประเภทเฮเทอโรไซคลิกซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด เช่น 1-methylpyrrole เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในช่องว่างเหนือตัวอย่างของน้ำมันข้าวโพดที่ผ่านความร้อน บางรายงานได้แสดงให้เห็นว่า thaizole, oxazole และ furanone จะเกิดขึ้นในระบบจำลองของ L-cysteine และ D-glucose ซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกันกับ alkylthiophenes, 2-thiophenethiol, 2-methyl-3-furanthiol และ furfuryl mercaptan ที่มีสมบัติต้าน

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน ระดับของการไม่อิ่มตัวในวงแหวนเฮเทอโรไซคลิก และชนิดของสารที่แทนที่จะทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบเหล่านี้แตกต่างกัน (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

2.6.3.3 แหล่งของสารธรรมชาติอื่นๆ

ลิกแนน (lignan)

ลิกแนนฟีรอล (lignanpherol) ต่างๆที่ได้จากเมล็ดงาเป็นสารที่มีกิจกรรมในการต้านอนุมูลอิสระ ในน้ำมันงาดิบและน้ำมันงาอบจะมีความคงตัวของการเกิดออกซิเดทีฟสูงกว่าน้ำมันที่ได้จากพืชผัก โดยเปรียบเทียบอัตราการเกิดออโตออกซิเดชันของน้ำมันงาดิบและน้ำมันงาอบกับน้ำมันจากพืชผักต่างๆที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทั้งน้ำมันงาดิบและน้ำมันงาอบยังคงมีความคงตัวหลังจากบ่มเป็นเวลา 50 วัน ในขณะที่น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกคำฝอยและน้ำมันสลัด จะเกิดการออกซิไดซ์หลังจากบ่มเป็นเวลา 10-20 วัน สารประกอบอื่นๆในเมล็ดงาและน้ำมันงาที่พบว่ามีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ คือ ซีซามอล (sesamol) ซีซามอลินอล (sesamolinol) ซีซามินอล (sesaminol) พิโนรีซินอล (pinoresinol) และ ซีซามอลไดเมอร์ (sesamol dimer) (รูปที่ 2.5) ซีซามอล หรือ 3,4-methylenediphenoxyphenol เป็นสารที่เกิดขึ้นโดยการไฮโดรไลซิสของซีซาโมลิน (sesamolin) ซึ่งเป็นลิกแนนของงาที่เกิดขึ้นระหว่างการ bleaching, hydrogenation หรือสภาวะในการทำให้บริสุทธิ์อื่นๆ ซีซามอลยังเกิดขึ้นได้ระหว่างการทอดซึ่งจะทำให้เกิดความคงตัวในอาหารที่ทอดด้วย สารนี้ยังถูกเปลี่ยนไปเป็นซีซามอลไดเมอร์ ได้อย่างรวดเร็วและต่อมาจะกลายเป็นซีซามอลไดเมอร์ควิโนน (sesamol dimer quinine) ซึ่งเป็นสารที่แสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันหมู น้ำมันถั่วเหลืองและเมทิลโอลีเอท (methyl oleate) (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

แคโรทีนอยด์ (carotenoid)

แคโรทีนอยด์ เช่น เบต้าแคโรทีน แคนทาแซนทิน (canthaxanthin) แอสตาแซนทิน (astaxanthin) ไฟโทอีน (phytoene) และลูทีน (lutein) จะพบได้ในส่วนประกอบของอาหารมากมาย แคโรทีนอยด์เป็นสารที่ถูกใช้เป็นสารสีธรรมชาติและมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดโมเลกุลออกซิเจนที่ไม่มีอนุมูลหรืออิเลคตรอนเดี่ยว ซึ่งจะป้องกันการเกิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ โดยแคโรทีนอยด์ได้ถูกเสนอให้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระปฐมภูมิที่ภายใต้สภาวะความดันออกซิเจนต่ำซึ่งการเกิดโมเลกุลออกซิเจนที่ไม่มีอนุมูลหรืออิเลคตรอนเดี่ยวจะไม่เกิดขึ้น ความสามารถของแคโรทีนอยด์ที่จะกำจัดโมเลกุลออกซิเจนที่ไม่มีอนุมูลหรืออิเลคตรอนเดี่ยวจะสัมพันธ์กับจำนวนพันธะคู่ที่อยู่ในโมเลกุล แคโรทีนอยด์ที่มีพันธะคู่จำนวน 9, 10 หรือ 11 คู่ จะมีความสามารถในกำจัดดีกว่าโมเลกุลที่มีพันธะคู่ 8 คู่หรือน้อยกว่า สำหรับเบต้าแคโรทีนได้พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำให้น้ำมันถั่วเหลืองมีความเสถียรภายใต้สภาวะโฟโตออกซิไดซิง (photooxidizing) (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) คะตะเลส (catalase) และซุปเปอร์ออกไซด์ไดมิวเทส (superoxide dimutase; SOD)

กลูโคสออกซิเดสจะมีผลในการกำจัดออกซิเจนที่ละลายได้หรือออกซิเจนที่อยู่ในช่องว่างเหนือตัวอย่าง เช่นในน้ำอัดลม มายองเนส และน้ำสลัด ในทางการค้าแหล่งที่ได้มาของเอนไซม์ คือ คัดเลือกมาจากเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger* เอนไซม์จะกระตุ้นปฏิกิริยาระหว่างออกซิเจนกับกลูโคส ทำให้ได้กรดดี-กลูโคนิก (D-gluconic acid) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กลูโคสออกซิเดสในทางการค้าจะมีคะตะเลสซึ่งจะทำการไฮโดรไลซ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำกับออกซิเจน ซึ่งป้องกันไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ให้เกิดการสะสมในอาหาร เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ ไดมิวเทสจะกำจัดอนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์และมีบทบาทในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในทางชีวภาพ และยังสร้างความคงตัวให้กับผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วย การผสมกันของซุปเปอร์ออกไซด์ไดมิวเทส และคะตะเลสจะช่วยลดกลิ่นที่ถูกออกซิไดซ์ในนมที่มีลิโนเลอิกสูงที่ไม่มีการเติมทองแดงลงไปและได้ผ่านการให้ความร้อน (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

สารประกอบที่เกี่ยวข้องกับพอร์ไฟริน (Porphyrin-related compound)

ตัวอย่างของสารในกลุ่มของสารประกอบที่เกี่ยวข้องกับพอร์ไฟริน ได้แก่ คลอโรฟิลล์ ฟีโอไฟทิน (pheophytin) และบิลิรูบิน (bilirubin) ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ คลอโรฟิลล์เป็นสารโปรออกซิแดนซ์ในที่ที่มีแสง อย่างไรก็ตามทั้งคลอโรฟิลล์และพอร์ไฟรินจะทำให้เกิดการสลายของไตรกลีเซอไรด์ในน้ำมัน rapeseed และน้ำมันถั่วเหลืองช้าลงเมื่ออยู่ในที่มืด ในจำนวนอนุพันธ์ของคลอโรฟิลล์ทั้ง 4 ชนิด (คลอโรฟิลล์ เอและบี และฟีโอไฟทิน เอและบี) คลอโรฟิลล์ เอจะมีประสิทธิภาพดีที่สุด (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

สเตอรอล (sterol)

สารในกลุ่มนี้ได้แก่ ฟูโคสเตอรอล (fucosterol) และ Δ^5-avenasterol ซึ่งจะมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในน้ำมันที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ในสารสกัดจากเมล็ดคานารี (*phalaris canariensis*) จะพบสารสเตอรอลมากมาย เช่น gramisterol, cycloartenol, sitosterol, campesterol และ triteepene alcohol ester ของกรดคาเฟอิก โดยสารเหล่านี้จะเป็นตัวกำหนดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดนี้ ซึ่งสารสเตอรอลนี้จะทำหน้าที่โดยการสร้างชั้นบางๆที่ผิวหน้าของน้ำมันและยับยั้งการเกิดออกซิเดชันโดยทำหน้าที่เป็นตัวให้ไฮโดรเจนอะตอม (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

สารอื่นๆ

สารอื่นๆในที่นี้รวมทั้งสารประกอบที่เป็นควันจากสารสกัดพืชและฟีนอลจากส่วนของควันไม้ สารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆอาจถูกแยกมากจากจุลินทรีย์และสาหร่าย สารประกอบฟีนอลิก flavoglucin เป็นสารที่ได้จากเชื้อรา *Eurothricum chevalieri* ซึ่งมีประสิทธิภาพมากในน้ำมันหมูและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันพืช นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระอื่นๆรวมทั้ง curvulic acid และ protocatechuic acid ที่แยกได้มากจาเชื้อราอีกด้วย (Rajalakshmi และ Narasimhan. 1996)

2.7 วิธีวิเคราะห์สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

มีวิธีทางเคมีและทางเคมีกายภาพต่างๆมากมายในการที่จะวิเคราะห์กระบวนการออกซิเดชันโดยวิธีที่ใช้ คือ การตรวจสอบการสร้างอนุมูลอิสระโดยตรง และตรวจสอบการยับยั้งโดยสารต้านอนุมูลอิสระ สำหรับวิธีปฏิบัติที่ใช้กันบ่อยมากกว่า คือ การวัดโดยทางอ้อมซึ่งมีหลากหลายวิธีที่ใช้ประเมินประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถวัดการยับยั้งของสารตัวกลางมากมายหรือวัดผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากปฏิกิริยาออกซิเดชัน การวัดกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระของส่วนประกอบทั้งหมดในตัวอย่างสามารถทำได้ แต่จะใช้เวลานานและมีราคาแพง นอกจากนี้อาจมีการทำงานร่วมกันของสารต้านอนุมูลอิสระและสารที่กำลังตรวจสอบซึ่งจะทำให้ได้ผลไม่ถูกต้อง ดังนั้นจึงได้ความสนใจในการวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด ซึ่งวิธีนี้สามารถที่จะแสดงเป็นปริมาณได้โดยกำหนดปริมาณที่เหมาะสมของสารมาตรฐานที่จะทำให้ถึงจุดยุติได้ (Antolovich และคณะ. 2001)

ความสนใจที่จะใช้ในการทดสอบกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระคือการใช้สารตั้งต้นและสภาวะในการทดสอบซึ่งได้จำลองขึ้นเพื่อความเหมาะสม และสามารถบ่งบอกถึงปริมาณของผลที่ได้โดยเทียบกับสารมาตรฐาน วิธีทั่วไปทางเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์นั้นมีมากมาย ในอดีตได้มีการอธิบายเกี่ยวกับวิธีในการวิเคราะห์ตลอดจนมีการพัฒนาของวิธีต่างๆเพื่อไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมในอาหารหรือระบบทางชีววิทยา (Antolovich และคณะ. 2001)

2.7.1 Peroxide value

ค่าที่ได้จะแสดงถึงไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และออกซิเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในไขมันหรือวัตถุดิบที่มีส่วนของไขมัน โดยคำนวณจากวิธีไอโอโดเมตริกไทเทรชัน (iodometric titration) ซึ่งเป็นวิธีที่ถูกพัฒนามากว่า 60 ปีมาแล้วในการใช้ตรวจสอบ โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเปอร์ออกไซด์จะออกซิไดซ์สารละลายไอโอไดด์ให้เป็นไอโอดีนซึ่งต่อมาจะถูกไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานไทโอซัลเฟตและมีแป้งเป็นตัวบ่งชี้ของจุดยุติ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นดังสมการ

$$ROOH + 2H^+ + 2I^- \longrightarrow I_2 + ROH + H_2O$$

$$ROOR + 2H^+ + 2I^- \longrightarrow I_2 + 2ROH$$

$$I_2 + 2S_2O_2^{2-} \longrightarrow S_4O_6^{2-} + 2I^-$$

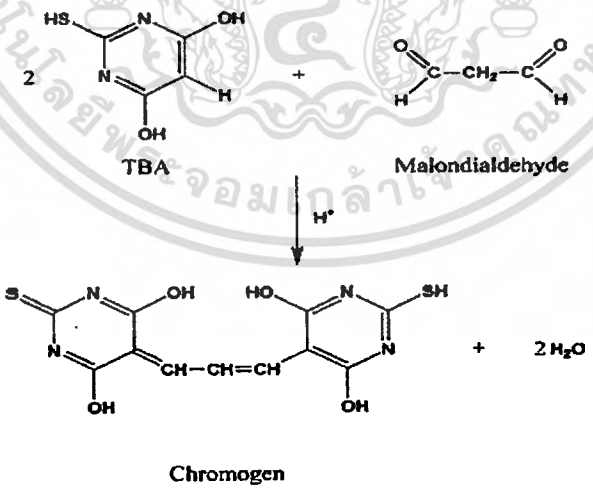
ซึ่ง ROOH คือ ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ของไขมัน และ ROOR คือ เปอร์ออกไซด์ของไขมัน และ peroxide value จะถูกคำนวณเป็นมิลลิอิควิวาเลนท์ (milliequivalent) ของออกซิเจนเปอร์ออกไซด์ต่อกิโลกรัมตัวอย่าง วิธีนี้เป็นวิธีที่เป็นที่รู้จักกันดีแล้ว มีความว่องไวและความจำเพาะต่ำเพราะอาจมีความเป็นไปได้ที่ไอโอดีนที่เกิดขึ้นจะเข้าขวางพันธะของกรดไขมันไม่อิ่มตัวทำให้ผลที่ได้ต่ำกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเป็นจริง หรือการที่ไอโอไดด์ถูกออกซิไดซ์ด้วยออกซิเจนที่ละลายลงไปในสารละลาย และความหลากหลายในการเกิดปฏิกิริยาของเปอร์ออกไซด์ที่แตกต่างกัน ในขณะที่ไฮโดรเปอร์ออกไซด์จะเป็นสารปฐมภูมิของการเกิดออกซิเดชันของไขมันและมีหน้าที่เป็นตัวกลางในกระบวนการออโตออกซิเดชันของไขมันต่อไป ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระจะถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการสร้างหรือการกระทำของอะตอมที่ไม่เสถียรเหล่านี้ตามวิธีของการประเมินกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Antolovich และคณะ. 2001)

2.7.2 Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS)

วิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์มากว่า 40 แล้ว และในปัจจุบันยังคงเป็นวิธีที่ใช้กันมากในการตรวจสอบการเกิดออกซิเดชันของไขมัน วิธีนี้จะเป็นการวัดการเกิดมาลอนเดียลดีไฮด์ (malondialdehyde; MDA) โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแยกออกมาของเอนโดเปอร์ออกไซด์ (endoperoxide) ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดออกซิเดชันของไขมัน มีสมมติฐานว่าการเกิด MDA เกิดจากกรดไขมันที่มีพันธะน้อยกว่า 3 พันธะ เช่น กรดลิโนเลอิก ซึ่งเกิดผ่านกระบวนการออกซิเดชันทุติยภูมิของสารประกอบคาร์บอนิลปฐมภูมิ เช่น non-2-enal และ MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาบิทิวริค (thiobarbituric acid) จนเกิดเป็นสีชมพู (รูปที่ 2.6) และนำไปวัดค่าด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 532-535 นาโนเมตร (Antolovich และคณะ. 2001)



รูปที่ 2.6 การเกิดสีโดยการทำปฏิกิริยาของ MDA และ TBA

ที่มา: Antolovich และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3 การตรวจวัดอนุมูลอิสระ

มีวิธีต่างๆที่ได้ถูกพัฒนาขึ้นสำหรับการวัดกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระโดยวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ละลายน้ำหรือละลายในไขมันได้ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระจำเพาะบางทีอาจขึ้นอยู่กับชนิดของอนุมูลอิสระอย่างเช่น อนุมูลไฮดรอกซิล อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์ หรืออนุมูลไนตริกออกไซด์ ความคล้ายคลึงอย่างหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดอนุมูลอิสระและการวัดโดยตรงในการยับยั้งอนุมูลอิสระจะถูกกำหนดโดยการเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไป หรืออีกทางหนึ่งการเกิดอนุมูลจะถูกเชื่อมต่อกับการเกิดออกซิเดชันของสารตั้งต้น ซึ่งการวัดผลในการยับยั้งของอนุมูลอิสระจะขึ้นอยู่กับการตรวจสอบอนุมูลและผลิตภัณฑ์ของการเกิดออกซิเดชัน (Antolovich และคณะ, 2001) การวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีหลากหลายวิธี วิธีที่ใช้ส่วนมากจะเกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบที่มีสี ซึ่งวิธีที่นิยมใช้จะต้องทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีความว่องไว (Ali และคณะ. 2008)

2.7.3.1 ABTS assay

วิธีนี้ยึดหลักการยับยั้งของการสร้างอนุมูลที่เป็นประจุบวกของ 2,2′-Azinobis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid) หรือ ABTS ซึ่งไม่ได้เกี่ยวข้องกับสารตั้งต้น ABTS จะดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 342 นาโนเมตรซึ่งเป็นจุดที่สามารถละลายน้ำได้มากและมีความเสถียร สารตั้งต้นที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เมื่อถูกออกซิไดซ์ในที่ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะเกิดเป็นอนุมูลของไอออนบวกของโลหะที่เสถียรซึ่งจะมีคุณลักษณะในการดูดกลืนแสงและมีความสามารถในการดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่นที่ 414 นาโนเมตร อย่างไรก็ตามจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่มากเป็นอันดับสองในช่วงความยาวคลื่นที่ 645, 734 และ 815 นาโนเมตร วิธีที่ใช้กันนี้ได้ถูกกล่าวไว้โดย Rice-Evans และ Miller และขึ้นอยู่กับการเกิดอนุมูลเฟอริลไมโอโกลบิน (ferrylmyoglobin radical) ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobindy) กับ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งต่อมาจะเป็นอิสระในการทำปฏิกิริยากับ ABTS และเกิดเป็นอนุมูลไอออนบวกของ ABTS การสะสมของ $ABTS^{\cdot+}$ จะเกิดขึ้นในสถานะของเหลวสามารถวัดได้โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยวัดในช่วงที่ใกล้อินฟราเรดที่ 734 นาโนเมตร ซึ่งจะมีการรบกวนน้อยที่สุดจากการดูดกลืนแสงของสารประกอบอื่นๆ และจากความขุ่นของตัวอย่าง (Antolovich และคณะ. 2001)

ผลที่ได้จะแสดงโดยเปรียบเทียบกับ Trolox ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ซึ่งให้เป็นค่าของ Trolox equivalent antioxidant activity (TEAC) ซึ่ง TEAC จะเท่ากับความเข้มข้นเป็นมิลลิโมลาร์ของสารละลาย trolox จะให้ความสามารถของการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับของสารละลายของสารตั้งต้นความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ค่า TEAC จะมีผลต่อความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอน (Antolovich และคณะ. 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.3.2 Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) radical

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุดในการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างพืช ซึ่งเป็นวิธีที่ขึ้นอยู่กับความสามารถในการกำจัดอนุมูลของ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร (Ali และคณะ. 2008) หรือบางรายงานอาจวัดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Antolovich และคณะ. 2001) เมื่อสารละลายของ DPPH ถูกผสมกับสารตั้งต้นที่สามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมได้ รูปแบบของอนุมูลอิสระที่ถูกรีดิวซ์จะเกิดขึ้นโดยมีการสูญเสียของสี การแสดงอนุมูลของ DPPH โดย Z* และโมเลกุลที่ให้ไฮโดรเจนอะตอมคือ AH ซึ่งเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น คือ

$$Z^* + AH \longrightarrow ZH + A^*$$

2.7.3.3 FRAP assay

วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) จะขึ้นอยู่กับการลดลงของ ferroin analog สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+} ของ tripyridyltriazine $Fe(TPTZ)^{3+}$ จะเกิดเป็นสีฟ้าของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} ผลที่ได้คือการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร และสามารถแสดงเป็นค่าเทียบเท่าของ Fe^{2+} เป็นหน่วยของไมโครโมลาร์ หรือสัมพันธ์กับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน นักเขียนบางคนอ้างว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว และทำได้ทั้งแบบด้วยมือและอัตโนมัติ วิธีนี้ได้ถูกเตรียมไว้ทดแทนความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดที่มีประโยชน์อย่างมาก โดยปราศจากการวัดและการรวมความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด วิธีนี้เริ่มต้นจากการใช้วัดพลาสมาแต่ได้ถูกขยายผลต่อมาเพื่อใช้ในของเหลวทางชีวภาพอื่นๆ อาหาร สารสกัดจากพืช และน้ำผลไม้ (Antolovich และคณะ. 2001)

2.7.3.4 Phycoerythyrin assay

วิธีนี้โปรตีนที่เรืองแสงได้สูง เช่น β-phycoerythrin และ R-phycoerythrin (PE) ซึ่งได้จากสาหร่ายสีแดงจำนวนหลากหลายสายพันธุ์จะถูกนำมาใช้เป็นเป้าหมายในการทำลายของอนุมูลอิสระ อนุมูลของเปอร์ออกซิลจะเกิดขึ้นโดยการใช้อุณหภูมิในการสลายตัวของ 2,2′-Azobis (2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) และจะทำให้การเรืองแสงของ phycoerythrin หมดไป ในขณะที่การเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปจะไปทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับเปอร์ออกซิลและจะยับยั้งการสูญเสียความเข้มของสารเรืองแสงและการยับยั้งนี้จะเป็นสัดส่วนกับกิจกรรมของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antolovich และคณะ. 2001)

Phycoerythrin จะเป็นสารที่ใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการต้านทานอนุมูลไฮดรอกซิล โดยอนุมูลไฮดรอกซิลจะเกิดจากระบบของ acorbate-Cu^{2+} ที่บริเวณที่มีการเข้าจับของทองแดงบนมาโครโมเลกุล ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นปฏิกิริยาดังนี้

$$\text{Target-}Cu^{2+} + HO^{\cdot} \longrightarrow \text{damaged target} + Cu^{2+}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยสารต้านอนุมูลอิสระสามารถตรวจสอบได้โดยการสูญเสียการเรืองแสงจะช้าลง โดยจะมีสัดส่วนกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สุดท้ายผลที่ได้จะสามารถคำนวณได้โดยใช้ความแตกต่างของพื้นที่ใต้กราฟของการเสื่อมสลายของ phycoerythrin ระหว่าง blank กับตัวอย่างและแสดงค่าเทียบเท่ากับ trolox (Antolovich และคณะ. 2001)

2.8 จุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก

ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักโดยทั่วไปไม่สนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ยกเว้นอาจสนับสนุนการเจริญของเชื้อราซึ่งบางชนิดสามารถสร้างสารพิษขึ้นได้ ไส้กรอกหมักปกติเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเสี่ยงในน้อยในการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามสิ่งที่เกี่ยวข้องมี 2 ประเด็น คือ 1) การเจริญของจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารพิษ เช่น *Staphylococcus aureus* ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในเนื้อก่อนที่จะเริ่มการหมักและ 2) การอยู่รอดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Salmonella* และ *Listeria* (Varnam และ Sutherland. 1995)

2.8.1 การเจริญของ *Staphylococcus aureus* ระหว่างการหมัก

สารพิษ (enterotoxin) ที่สร้างจากเชื้อ *S. aureus* เป็นคงปัญหาหลักที่พบในการผลิตไส้กรอกหมัก ถึงแม้ว่าเมื่อเร็วๆนี้การควบคุมกระบวนการหมักที่มีการพัฒนามากขึ้นได้ช่วยลดปัญหานี้ก็ตาม เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่มักพบว่าปนเปื้อนในเนื้อดิบ แม้ว่าการเจริญของเชื้อนี้ปกติจะถูกทำให้ช้าลงโดยการเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสีย แต่ธรรมชาติของ S. aureus ที่ปกติสามารถทนต่อสภาพที่มีเกลือ และไนไตรท์ได้ จึงถูกคัดเลือกให้อยู่ได้ในสภาวะที่มีส่วนผสมเหล่านี้ถ้าการหมักเกิดขึ้นล่าช้า การเจริญของเชื้อและการผลิตสารพิษจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วภายใต้สภาวะเหล่านี้ ขณะที่ตัวเซลล์ตายแต่สารพิษที่เชื้อสร้างขึ้นยังคงมีอยู่ในอาหาร (Varnam และ Sutherland. 1995)

ไส้กรอกหมักที่พึ่งทำเสร็จใหม่ๆ แนะนำให้ตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเพื่อให้แน่ใจว่ามีความปลอดภัย มีผู้แนะนำว่าทันทีที่ไส้กรอกหมักเสร็จควรมีจำนวน *S. aureus* น้อยกว่า 10^4 CFU ต่อกรัม แต่ถ้าไม่สามารถทำการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ได้ทันทีหลังหมักอาจใช้วิธี thermonuclease test เพื่อตรวจหาสารพิษในผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามจะต้องตระหนักว่าการทดสอบในห้องปฏิบัติการเป็นวิธีที่มีความสำคัญรองลงมาเพื่อใช้ในการควบคุมระหว่างการผลิต ซึ่งควรลดค่าพีเอช ลงอย่างรวดเร็วโดยการสร้างกรดแลคติกที่ได้จากการหมัก หรือการเติมสารที่ทำให้เป็นกรด เช่น กลูโคโนเดลต้าแลคโตน (glucono-delta-lactone) (Varnam และ Sutherland. 1995)

2.8.2 การอยู่รอดของแบคทีเรียก่อโรค

ไส้กรอกหมักเป็นผลิตภัณฑ์จากเนื้อดิบและไม่สามารถรับประกันได้ว่าจะไม่พบจุลินทรีย์ก่อโรค ในสภาวะปกติของการหมักไส้กรอกจะเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ แต่เชื้ออาจสามารถรอดชีวิตอยู่ได้สำหรับเชื้อ *Salmonella* เป็นเชื้อที่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ซึ่งเชื้อ *Salmonella* เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่พบใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไส้กรอกอิตาเลียน (salami) โดยมักเกิดขึ้นในประเทศออสเตรเลีย อีตาลี และอังกฤษ ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ระยะเวลาสั้นในการผลิตจะทำให้การรอดชีวิตของ *Salmonella* เพิ่มขึ้นด้วย เช่น การรายงานพบเชื้อ *Salmonella* Typhimurium DT 124 ในไส้กรอกซาลามิเยอรมันซึ่งทำให้เกิดโรคระบาดในช่วงเดือนธันวาคม ปี 1987 ถึงเดือนมกราคม ปี 1988ในประเทศอังกฤษ ซึ่งมีผู้ป่วยจำนวน 101 ราย (Cowden และคณะ. 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าอาจปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักโดย Boonmar และคณะ (1997) ได้ตรวจพบเชื้อ *Salmonella* ในแหนมหมูถึงร้อยละ 81.25 โดยตรวจสอบแล้วว่าเป็น *S. java*, *S. anatum*, *S. derby* และ *S. panama* อย่างไรก็ตามกรณีที่เชื้อ *Salmonella* สามารถอยู่รอดได้ดีในไส้กรอกหมักอาจเป็นเพราะ *Salmonella* เป็นแบคทีเรียที่ปรับตัวให้อยู่รอดได้ดีในสภาวะเครียด เช่น สภาวะที่มีเกลือ กรด และสารยับยั้งชนิดต่างๆ (Jay และคณะ. 2005) การปรับตัวของ *Salmonella* อาจเกิดขึ้นได้เมื่อมีการใช้สารทำให้เกิดสภาพกรด เช่น กลูโคเด้ลต้าแลคโตน (Varnam และ Sutherland. 1995)

เชื้อ *Listeria monocytogenes* เป็นเชื้อที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก ซึ่งในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าการบริโภคไส้กรอกหมักที่มีการปนเปื้อนของเชื้อนี้มีปัจจัยเสี่ยงที่จะเกิดโรค listeriosis ในขณะที่ประเทศเบลเยียมได้พบการปนเปื้อนของเชื้อ *L. monocytogenes* ในไส้กรอกหมักร้อยละ 11.69 การแยกเชื้อ *L. monocytogenes* ได้จากไส้กรอกหมักอาจจะนำไปสู่ความเสี่ยงที่จะพบถึงเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ เช่น *Campylobacter* และ *Escherichia coli* ที่สร้างสารพิษ verocytotoxin โดยเฉพาะสายพันธุ์ O157:H7

เชื้อ *Campylobacter* เป็นเชื้อที่มีความไวสูงต่อการเปลี่ยนแปลงค่า a_w และค่าพีเอช ดังนั้นการรอดชีวิตของเชื้อ *Campylobacter* จึงเกิดขึ้นได้น้อย สำหรับเชื้อ *E. coli* ที่สร้างสารพิษ verocytotoxin มักเกี่ยวข้องกับการบริโภคแฮมเบอร์เกอร์เนื้อที่ปรุงไม่สุก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักพบในเนื้อวัว แต่ก็สามารถแยกได้จากเนื้อแกะ เนื้อหมู และสัตว์ปีกได้เช่นกัน การรอดชีวิตของจุลินทรีย์เหล่านี้ในไส้กรอกหมักดูเหมือนว่าจะมีความเป็นไปได้น้อย แต่ยังไม่พบหลักฐานที่เกี่ยวข้องกับการเป็นโรคจากจุลินทรีย์เหล่านี้ (Varnam และ Sutherland. 1995)

2.8.3 เชื้อราที่สร้างสารพิษ (mycotoxin producing fungi)

เชื้อราที่สร้างสารพิษอาจถูกแยกได้จากทั้งในไส้กรอกที่บ่มด้วยเชื้อราและไส้กรอกที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อราที่ไม่ต้องการ ประสิทธิภาพในการค้นพบเชื้อราเหล่านี้ยังคงเป็นปัญหาในผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยเฉพาะในไส้กรอกหมักที่ใช้วัตถุดิบที่ไม่ดีจะทำให้มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราและสร้างสารพิษขึ้น ในบางการศึกษาพบว่าการสร้างสารพิษจากเชื้อราถูกยับยั้งได้โดยการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ การลดค่า a_w และการรมควัน ในทางตรงกันข้ามเชื้อราบางสายพันธุ์ของ *Aspergillus* จะสามารถผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ได้ในปริมาณสูงระหว่างการหมักไส้กรอก โดยบทบาทของกล้าเชื้อได้รับความสนใจน้อยแต่ที่อุณหภูมิต่ำเชื้อ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* จะสามารถแสดงการยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในบางครั้งมีการโต้แย้งกันในเรื่องความสามารถของเชื้อราในการสร้างสารพิษในไส้กรอกหมัก ซึ่งทำให้เกิดความสับสนเกี่ยวกับความสำคัญในการคัดเลือกเชื้อราสำหรับใช้ในการบ่ม เพื่อทำให้มั่นใจในความปลอดภัยจึงใช้สายพันธุ์ของเชื้อราที่ไม่เป็นพิษ แต่ถึงอย่างไรก็ตามจะต้องเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษได้ ในทำนองเดียวกันไส้กรอกที่ไม่ใช้เชื้อราในการบ่มจะต้องมั่นใจได้ว่าสภาวะในระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่งจะป้องกันการเจริญจากเชื้อราได้ (Varnam และ Sutherland. 1995)

2.9 เครื่องเทศที่ใช้ในการทดลอง

2.9.1 กระทือ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Zingiber zerumber* (L.) Smith

ชื่อวงศ์ ZINGIBERACEAE

ชื่อท้องถิ่น กระทือป่า กะแวน กะแอน แสมดำ แฮวดำ เฮียวดำ (ภาคเหนือ) เฮียวแดง (แม่ฮ่องสอน)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชล้มลุกที่มีลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดินสีเหลืองซีดๆ เหง้ามีขนาดใหญ่ เนื้อข้างในสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ใบออกตรงข้ามสลับตั้งฉากกัน ใบยาวเรียวเขียวดกหนา ทึบ ซ้อนกันเป็นแผงติดต่อกันไปยืดยาว ช่อดอกโผล่ขึ้นจากหัวใต้ดิน อัดกันแน่นสีแดง ตอนปลายประกอบด้วยกลีบเลี้ยงสีเขียวปนแดงจำนวนมาก ดอกสีขาวนวล มีลักษณะเป็นหลอดที่ปลายกลีบมีรูปร่างเหมือนปากอ้า

ส่วนที่ใช้เป็นยา หัวหรือเหง้าสด สารเคมีที่สำคัญ ในเหง้าพบน้ำมันหอมระเหย ซึ่งประกอบด้วยสารหลายตัว เช่น methylgingerol, zingerone และ citral เป็นต้น สรรพคุณทางยา แก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อและปวดท้อง แก้บิด(ปวดเบ่งและมีมูกหรือ อาจมีเลือดปนด้วย) ใช้เหง้าสดขนาด 20 กรัม ย่างไฟพอสุก นำมาโขลกกับน้ำปูนใส ประมาณ 1/2 แก้ว (110 มิลลิลิตร) คั้นเอาน้ำมาดื่มเมื่อมีอาการ (พัทรารินี. 2550)

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 ขมิ้นอ้อย

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Curcuma Zedoaria* Rose.

ชื่อวงศ์ ZINGIBERACEAE

ชื่อสามัญ Zedoary, Luya-Luyahan

ชื่ออื่น ๆ ว่านเหลือง (กลาง) สากเบือ (ละว้า) ขมิ้นขึ้น (เหนือ) ละเมียด (เขมร)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ขมิ้นอ้อยเป็นพืชล้มลุกมีอายุได้หลายปี โดยมีความสูงราว 0.5-2.5 เมตร มีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายขมิ้นชันมากแต่ต้นสูงกว่า ขนาดเหง้าและใบใหญ่กว่า เหง้ามักโผล่ขึ้นมาเหนือดินเล็กน้อยและมีเนื้อในสีเหลือง จัดเป็นพืชใบเดี่ยว รูปใบหอกกลับ ปลายใบแหลม โคนใบสอบ ท้องใบจะมีขนอ่อนนุ่ม กลีบดอกสีนวล ใบประดับที่อยู่ส่วนล่างของช่อมีสีเขียว ปลายแกมชมพู ในฤดูแล้งใบจะแห้งลงหัว บางครั้งเรียกว่า ขมิ้นหัวขึ้น ขนาดใบกว้างราว 15-17 เซนติเมตร ยาวราว 40-50 เซนติเมตร

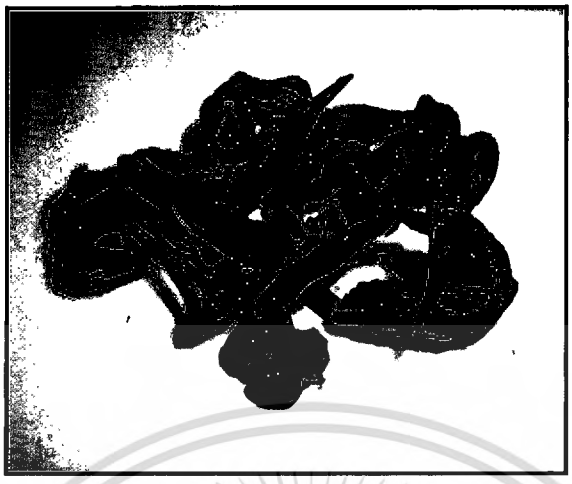
ดอก ออกเป็นช่อ ก้านดอกยาวแทงออกจากเหง้าที่อยู่ในดิน ช่อดอกมีใบประดับสีขาวเจือเขียว ปลายกลีบเป็นสีชมพู ใบประดับที่อยู่ส่วนบนรูปใบหอกสีแดงเข้ม กลีบดอกสีเหลืองนวลจะบานจากส่วนล่างขึ้นส่วนบน ดอกจะบานครั้งละ 2-3 ดอก

ขยายพันธุ์ ด้วยเหง้า เจริญได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย ไม้พันธุ์นี้มีชื่อเรียกต่างออกไป เช่น ภาคกลางเรียก ว่านเหลือง ภาคเหนือเรียก ขมิ้นขึ้น

สรรพคุณ ส่วนที่ใช้ เหง้าที่อยู่ใต้ดิน ใช้ได้ทั้งสดและแห้ง ใช้หุงกับน้ำมันมะพร้าว นำมาใส่แผล จะทำให้แผลหายเร็ว เพราะหัวขมิ้นอ้อยนั้น มีรสฝาด (tannin) และใช้บรรเทาอาการฟกช้ำบวมได้ ส่วนเหง้าสดนั้นนำมาบดแล้วนำมาผสมกับน้ำปูนใส สามารถนำมาดื่มรักษาโรคท้องร่วงได้ นอกจากนี้ยังนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหยได้ (พัทรารินี. 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.3 จันทน์เทศ



ชื่อวิทยาศาสตร์ *Myristica fragrans* Houtt.

ชื่อวงศ์ MYRISTICACEAE

ชื่อสามัญ ลูกจันทน์เทศ Nutmeg Tree หรือ Myristica ดอกจันทน์ Mace หรือ Macis

ชื่อท้องถิ่น ลูกจันทน์ ลูกจันทน์เทศ ดอกจันทน์ ดอกจันทน์เทศ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จันทน์เทศเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางถึงใหญ่มีความสูงประมาณ 30 - 60 ฟุต ใบมีสีเขียวเข้ม รูปแบบปลายหอกใบยาวประมาณ 2 - 5 นิ้ว มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียเกิดแยกกันคนละต้น โดยดอกตัวผู้จะเกิดเป็นกลุ่ม ส่วนดอกตัวเมียจะเกิดเป็นดอกเดี่ยวๆ และมีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ ดอกสีเหลืองอ่อน กลีบเลี้ยงเชื่อมกันเป็นรูปคนโทคว่ำ ปลายแยกเป็น 3 แฉก ไม่มีกลีบดอก ต้นตัวเมียเท่านั้นที่ความสำคัญทางเศรษฐกิจ ส่วนต้นตัวผู้จะปลูกไว้สำหรับผสมเกสรกับต้นตัวเมีย ดอกจันทน์เทศจะผลิในราวเดือนมีนาคม ถึง เดือนมิถุนายน ผลมีรูปร่างเกือบกลมเป็นผลชนิดฉ่ำน้ำขนาดประมาณลูกหมาก มีสีเหลืองอมเขียว เมื่อผลสุกจะแตกออกเป็นสองส่วน ภายในมีรกหุ้มเมล็ดสีแดงสด เรียกว่า รกจันทน์ หรือ ดอกจันทน์ เมล็ดมีขนาดใหญ่ 1 เมล็ด มีเปลือกแข็งสีน้ำตาลเรียกว่า ลูกจันทน์ ต้นจันทน์เทศจะออกดอกและผลได้เมื่อต้นมีอายุราว 8-9 ปี

ส่วนที่นำมาใช้คือ “รกและเมล็ด” โดยเมล็ดที่ชาวบ้านเรียกกันว่าลูกจันทน์นั้นจะประกอบไปด้วย น้ำมันที่ไม่หอมระเหย (Fixed oil) ร้อยละ 25 – 40 ในอุณหภูมิห้องเป็นของแข็งเรียกว่า “Nutmeg butter” และมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 8 – 15 ประกอบด้วย Myristicin และ Safrole ส่วนดอกจันทน์เทศที่ชาวบ้านเรียกว่ารก (Mace) นั้นมีสารสำคัญคือ balsam ที่มีกลิ่นหอมร้อยละ 24.5 และน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 4 – 7 ประกอบด้วย Terpene และจากสารสำคัญที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนั้นทำให้มีการนำรกและเมล็ดไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการค้าและการรักษา (พัทราริณี. 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.4 เทียนตาตั๊กแตน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Anethum graveolens* Linn.

ชื่อวงศ์ UMBELLIFERAE

ชื่อสามัญ Dill

ชื่อพื้นเมือง เทียนข้าวเปลือก เทียนตาตั๊กแตน (ภาคกลาง) ผักชี (ขอนแก่น และเลย) ผักชีตั๊กแตน ผักชีเทียน (พิจิตร) ผักชีเมือง (น่าน)

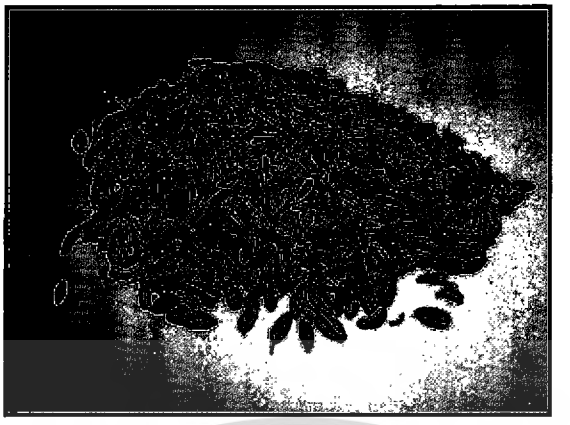
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ผักชีลาวเป็นพืชล้มลุกตระกูลเดียวกับผักชี ลำต้นมีสีเขียวเข้มขนาดเล็ก ลักษณะใบเป็นใบประกอบแบบขนนกมีสีเขียวสดออกเรียงสลับกัน ดอกมีขนาดเล็กสีเหลืองออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกมีลักษณะคล้ายกับซี่ร่ม ผลแก่เป็นรูปไข่แบนมีสีน้ำตาลอมเหลือง ถ้านำไปใช้เป็นเครื่องเทศจะเก็บได้ก็ต่อเมื่อดอกเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แต่ส่วนใหญ่จะพบในรูปของการทานสดเป็นผักมากกว่า ซึ่งควรเก็บก่อนที่จะออกดอก ผักชีลาวมีสองชนิด คือ ชนิดที่มาจากยุโรป (Dill) และชนิดที่มีกำเนิดในเอเชียเขตร้อน (Indian Dill) ในประเทศไทยมีการปลูกเพื่อใช้ทานเป็นผักมากกว่าปลูกเพื่อใช้ผลมาทำเครื่องเทศเพราะมีคุณภาพน้อยกว่าประเทศอินเดีย

สารสำคัญที่พบ ผลผักชีลาวมีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งปริมาณน้ำมันที่ได้ขึ้นอยู่กับแหล่งเพาะปลูกและฤดูกาลที่เก็บเกี่ยวนอกจากนี้แล้วยังประกอบด้วย สารดิลลาโนไซด์ สารประเภทกรดฟีโนลิค โปรตีน ไขมัน เป็นต้น น้ำมันผักชีลาว (Dill seed oil) ได้จากการนำผลแก่แห้งไปกลั่นด้วยไอน้ำ สารสำคัญที่พบคือ คาร์โวน ดี-ไลโมนีน และอัลฟ่า-เฟลเลนดรีน สารอื่นที่มีปริมาณรองลงมาคือ ไดไฮโดรคาร์โวน ยูจีนอล ไพนีน และอะนีโทล เป็นต้น

สรรพคุณทางยา นำผลแก่แห้งของผักชีลาวบดให้เป็นผง ชงกับน้ำดื่มวันละ 4-5 แก้ว แก้อาการปวดท้อง แน่นท้อง ท้องอืดท้องเฟ้อ ช่วยขับลมหรือใช้ต้นสดของผักชีลาวผสมกับนมให้เด็กอ่อนดื่มแก้ท้องอืดท้องเฟ้อได้เช่นกัน ส่วนน้ำมันมักใช้ผสมในยาย่อยอาหาร ยาแก้ท้องอืดท้องเฟ้อ (พัทรารินี. 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.5 เทียนสัตตบุษย์



ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pimpinella anisum* Linn.

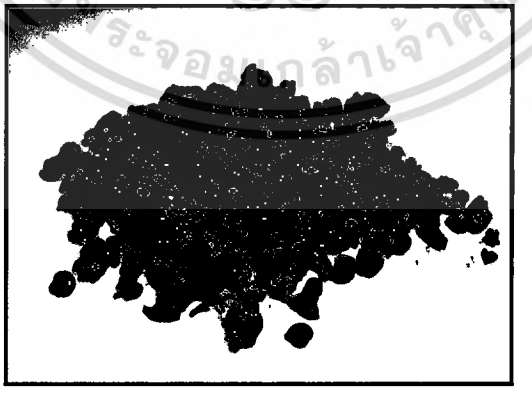
ชื่อวงศ์ UMBELLIFERAE

ชื่อสามัญ Anise

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กสูง 30-60 เซนติเมตร ใบเป็นฝอยแบบขนนก ช่อดอกสีขาวรูปร่ม คล้ายเทียนข้าวเปลือก เมล็ดคล้ายเทียนข้าวเปลือก แต่มีรอยยาวตลอดเมล็ด มาจากต่างประเทศ

สรรพคุณทางยา เมล็ด รสเผ็ดหอมหวานร้อนเล็กน้อย แก้ลมครรภรักษา แก้พิษระส่ำระสาย แก้ไข้ แก้หอบ แก้สะอึก ใช้ผสมร่วมกับชะเอมจีนทำยาอมแก้ไอ น้ำมัน ขับเสมหะ ฆ่าเชื้อโรค ขับลม แก้ท้องอืดเฟ้อในเด็ก ฆ่าแมลงเล็กๆ เช่น หมัด เหา ฆ่าเชื้อรา เป็นต้น (พัทราริณี. 2550)

2.9.6 พริกหอม



ชื่อวิทยาศาสตร์ *Zanthoxylum limonella* Alston

ชื่อวงศ์ RUTACEAE

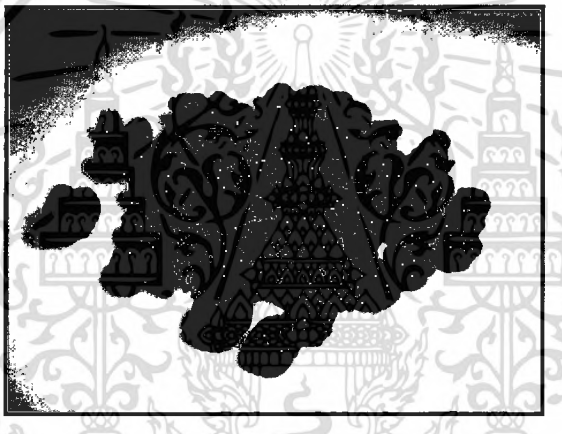
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่ออื่น มะแขว่น (เหนือ) พริกหอม ดอกพริกหอม ใบพริกหอม ผลพริกหอม รากพริกหอม กำจัดต้น หมากมาศ มะข่วง ลูกระมาศ หมักข่วง หมากนาศ

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนกเรียงสลับ ใบยาวรีหรือรูปขอบขนาน ปลายใบเรียวแหลม ดอกออกเป็นช่อที่บริเวณปลายยอด ดอกย่อยสีขาว ผลมีลักษณะแห้งกลม ผิวขรุขระสีน้ำตาล เมื่อแก่จะแตกจนเห็นเมล็ดกลมสีดำ ผิวเรียบมัน มีกลิ่นหอม และมีรสเผ็ดเล็กน้อย

สรรพคุณทางยา ผลใช้เป็นส่วนประกอบในยาบำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต บำรุงธาตุ แก้ลมภายในอุทร ช่วยให้เจริญอาหาร แก้วิงเวียนศีรษะ เนื้อไม้ เป็นส่วนผสมในยาต้ม แก้โลหิตเป็นพิษ และขับระดูพิการ (พัทรารินี. 2550)

2.9.7 เร่ว



ชื่อวิทยาศาสตร์ *Amomum xanthioides* Wall.

ชื่อวงศ์ ZINGIBERACEAE ชื่อสามัญ Bastard Cardamom

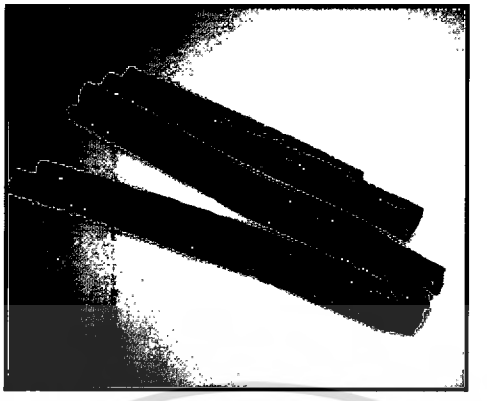
ชื่ออื่น หมากเหน่ง หมากเนิง มะอี้ หมากอี้ มะหมากอี้ หน่อเน่ง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ จัดเป็นพืชล้มลุกสูงประมาณ 2 –4 เมตร มีลำต้นใต้ดินเรียกว่า “เหง้า” ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับรูปใบเรียวปลายแหลมกว้าง 7 เซนติเมตร ยาว 0.5 เมตร ก้านใบสั้นมาก ดอกออกเป็นช่อออกโดยตรงจากเหง้ากลีบดอกสีชมพูอ่อน ผลเป็นผลแห้งค่อนข้างกลมหรือรูปไข่สีน้ำตาลแดงมีหนามและจะมีขนยาวสีแดงปกคลุม ผลมีขนาดเล็กประมาณ 1.4 – 2 เซนติเมตร ภายในมีเมล็ดสีน้ำตาลมีกลิ่นคล้ายการบูร

ส่วนที่นำมาใช้เป็นยาคือ “เมล็ดแห้ง”โดยช่วงที่เก็บเป็นยาคือช่วงที่ผลแก่โดยมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์พบว่าเมล็ดเร่วมีน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในน้ำมันหอมระเหยจะพบสารคือ Borneol, Camphor, Bornyl acetate, Geraneol, Geranyl acetate, Palmitic acid และ vanillic acid ซึ่งน้ำมันหอมระเหยนี้จะไปกระตุ้นลำไส้ก่อให้เกิดการขับลมจึงใช้รักษาอาการท้องอืดท้องเฟ้อแน่นจุกเสียดและอาการคลื่นไส้อาเจียนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.8 อบเชยเทศ



ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinnamomum zeylanicum*

ชื่อวงศ์ LAURACEAE

ชื่อสามัญ Cinnamon

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ อบเชยเป็นต้นไม้ขนาดกลางจัดอยู่ในวงศ์ Lauraceae มีชนิดใหญ่ๆ 5 ชนิดคือ อบเชยศรีลังกา (*Cinnamomum zeylanicum*) คนไทยเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า "อบเชยเทศ" มีราคาแพงที่สุด อบเชยอินโดนีเซีย หรืออบเชยชวา (*Cinnamomum burmanii* Blume) ได้รับความนิยมสูงสุดในปัจจุบัน อบเชยญวน (*Cinnamomum loureirii* Nees) มีรสหวานแต่ไม่ค่อยหอม ปลูกได้ดีมากในประเทศไทย และประเทศไทยเราส่งออกอบเชยชนิดนี้ อบเชยจีน (*Cinnamomum cassia* Nees ex. Blume) มีเปลือกหนาและเนื้อหยาบ อบเชยไทย (*Cinnamomum bejolghota*) หรืออบเชยต้น พบในป่าเขาที่ยังอุดมสมบูรณ์ในประเทศ แต่ยังไม่ใช้นำมาปลูกเพื่อผลิตเปลือกอบเชย อบเชยไทยมีมากกว่า 16 สายพันธุ์ และยังไม่เคยมีการศึกษาวิจัยด้านสรรพคุณ เปลือกอบเชยไทยจะหนากว่าอบเชยชนิดอื่น

สรรพคุณ อบเชยทำให้ท้องเป็นปกติดี แก้อาการจุกเสียด แน่นท้อง ขับลม ช่วยรักษาแผลในกระเพาะอาหาร แก้ท้องร่วง ขับปัสสาวะ ย่อยไขมัน (อาจเป็นเพราะไปช่วยกระตุ้นการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการย่อยไขมัน) ทำให้สดชื่น แก้อ่อนเพลีย มีสารต้านแบคทีเรีย และสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ อบเชยที่ใช้ปรุงอาหารจะใช้ชนิดหลอด (ม้วนเปลือกให้เป็นหลอด) ใช้ปรุงอาหารเช่นทำพะโล้ ใช้ทำยาไทยหลายตำรับ ตำราไทยระบุว่าอบเชยมีกลิ่นหอม มีรสสุขุม มีสรรพคุณใช้บำรุงจิตใจ แก้อ่อนเพลีย บำรุงกำลัง ขับลม บำรุงธาตุ แก้บิด แก้ไข้สันนิบาต ใช้ปรุงยานัตถุ์แก้ปวดหัว นอกจากการใช้เปลือกตำราไทยยังระบุว่ารากและใบมีกลิ่นหอม รสสุขุม ใช้ต้มดื่มขับลมบำรุงธาตุ แก้ท้องอืดเฟ้อ (พัทราริณี. 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างเครื่องเทศแห้งที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ กระทือ ขมิ้นอ้อย จันทน์เทศ เทียนตาตั๊กแตน เทียนสัตตบุษย์ พริกหอม เร่ว และอบเชย (ตารางที่ 3.1) โดยเครื่องเทศแห้งทั้งหมดซื้อมาจากร้านขายสมุนไพร ในกรุงเทพมหานคร

ตารางที่ 3.1 เครื่องเทศที่นำมาใช้ในการกลั่นน้ำมันหอมระเหย

ชนิดของเครื่องเทศ	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	ส่วนที่นำมาใช้
กระทือ	-	*Zingiber zerumbet*	เหง้า
ขมิ้นอ้อย	Zedoary	*Curcuma zedoaria*	เหง้า
จันทน์เทศ	Mace	*Myristica fragrans*	เปลือกหุ้มเมล็ด
เทียนตาตั๊กแตน	Dill	*Anethum graveolens*	เมล็ด
เทียนสัตตบุษย์	Anise	*Pimpinella anisum*	เมล็ด
พริกหอม	-	*Zanthoxylum limonella*	ผล
เร่ว	Bastard cardamom	*Amomum xanthioides*	ผล
อบเชยเทศ	cinnamon	*Cinnamomum zeylanicum*	เปลือก

3.1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 20 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Salmonella* Senftenberg DMST 7113 และ *Salmonella* Rissen DMST 7097 ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (DMST Culture Collection: Medical Microbial Culture Collection, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Thailand) และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Hanseniaspora uvarum* TISTR 515, *Pichia membranaefaciens* TISTR 5093, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, *Schizosaccharomyces pombe* TISTR 509, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044, *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research) *Pediococus pentosaceus* P0805 แยกได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อหมูสด (พัชรีและสุนิสา. 2550) *Lactococcus lactis* 13IS3 แยกได้จากเนื้อปลากราย (นิระชา ศรีวงษ์. 2550) *Enterococcus faecalis* 4IS17 แยกได้จากกุ้งจ่อมและ *Enterococcus faecium* 1IS11 แยกได้จากหอยแมลงภู่สด (ฐิติรัตน์. 2552)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Mueller Hinton Agar (MHA, Difco), Mueller Hinton Broth (MHB, Difco), de Man- Rogosa- Sharpe broth (MRS, Difco), Potato Dextrose Agar (PDA, Scharlau), Potato Dextrose Broth (PDB, Biomark), Saboraud Dextrose Agar (SDA, Himedia), Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD, Difco), Baird-Parker Agar Base (BP, Difco), Plate Count Agar (PCA), Meat Model Agar (MMA), Starch Agar (SA), Beef Sausage Agar (SMA), และสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β-carotene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) กรดแกลลิก (gallic acid) ทวีน 40 (tween 40) ทวีน 80 (tween 80) วิตามิน อี (alpha-tocopherol) กรดแอซิติก (acetic acid) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) โพแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulphate) โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) มิกซ์ฟอสเฟต (mixed phosphate) เมทานอล (methanol) โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulphate) โพแทสเซียมไอโอไดด์ (potassium iodide) โพแทสเซียมเทลลูไรท์ (potassium tellurite) โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride), 2-thiobarbituric acid (TBA), 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), ferric chloride hexahydrate, ferrous sulfate heptahydrate, sodium acetate trihydrate, 2,4,6-tri-2-pyridyl-2-triazine, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Xanthine, Xanthine oxidase, Nitro-blue tetrazolium (NBT), sodium dodecyl sulfate (SDS), Butylated hydroxyltoluene (BHT), soluble starch, เพนนิซิลิน จี (penicillin G) ฟลูโคนาโซล (fluconazole) สารละลายไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide; DMSO) สารละลายแป้งความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำกลั่นผสม tween 80 ร้อยละ 0.5 สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10 สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และความเข้มข้นร้อยละ 70

3.1.5 เครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator รุ่น Heizbad HB-digit) เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer รุ่น UV-1601) เครื่องวัดพีเอช (testo 205) เครื่องบดผสม (kitchenAid model 5K5SS) ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย ตู้อบลมร้อน ตู้บ่มเชื้อ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ desiccator

3.1.6 อุปกรณ์ทางจุลินทรีย์และเครื่องแก้วที่ใช้ ได้แก่ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ออโตปิเปตต์ (Autopipette) กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ตะเกียงแอลกอฮอล์ ปิเปตต์ขนาด 1 มิลลิลิตรและ 10 มิลลิลิตร หลอดปั่นเหวี่ยง จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง ปากคีบ ลูปเขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ยเชื้อ แท่งแก้วงอ และอุปกรณ์เครื่องแก้วที่จำเป็นอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ

3.2.1.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เตรียมโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำ โดยนำพืชสมุนไพรแห้งมาปั่นหรือบดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งพืชสมุนไพรแห้งปริมาณ 150 กรัม ใส่ลงในขวดกลั่น เติมน้ำให้ท่วมพืช จากนั้นให้ความร้อนประมาณ 3-4 ชั่วโมง รอจนกระทั่งปริมาณน้ำมันที่ได้นั้นคงที่จึงหยุดให้ความร้อน และจดบันทึกปริมาณน้ำมันที่ได้ เก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดสีชา จนกว่าจะนำไปใช้ทดสอบ

3.2.1.2 การศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ก) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรีย 6 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Salmonella* Rissen DMST 7097, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ในอาหาร MHB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงยีสต์ 6 ชนิด ได้แก่ *Candida lipolytica* TISTR 5655, *Hanseniaspora uvarum* TISTR 515, *Pichia membranaefaciens* TISTR 5093, *Rhodotorula glutinis* TISTR 5159, *Schizosaccharomyces pombe* TISTR 509 และ *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 ในอาหาร PDB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งในการล้างเซลล์แต่ละครั้งทำได้โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงไปแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้างต้น เทส่วนใสทิ้งไป แล้วจึงทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 5 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเป็น 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เป็น 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร

สำหรับการเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 และ *Fusarium moniliforme* TISTR 3175 ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อราบน PDA slant ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญเต็มที่และเกิดการสร้างสปอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นผสม Tween 80 ร้อยละ 0.5 ใส่ลงไปในหลอด PDA slant ที่มีเชื้อราเจริญอยู่แล้วใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อขูดเบาๆ เพื่อให้สปอร์หลุดออกมา จากนั้นกรองเอาเส้นใยออกโดยกรองผ่านกรวยกรองที่มีสำลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อได้สปอร์แขวนลอยแล้วให้นำไปนับสปอร์ด้วย haemacytometer ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ข) การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี agar disc diffusion

ทำการทดสอบตามวิธีของ Sahin และคณะ (2004) ซึ่งทำได้โดย ขั้นแรกถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่จะทดสอบ (แบคทีเรีย 6 ชนิด และยีสต์ 6 ชนิด) ที่เตรียมไว้โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงในสารแขวนลอยเซลล์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด และกดที่ด้านข้างของหลอด จากนั้นทำการ swab ลงบนผิวหน้าอาหาร MHA และ SDA สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและยีสต์ ตามลำดับ สำหรับเชื้อราจำนวน 4 ชนิดที่จะทดสอบ ทำการปิเปตต์สารแขวนลอยของสปอร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงบนผิวหน้าอาหาร PDA เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอปราศจากเชื้อ และทิ้งไว้ให้แห้งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตรที่ปราศจากเชื้อ 1 ชิ้นลงบริเวณกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ ปิเปตต์น้ำมันหอมระเหยปริมาตร 10 ไมโครลิตรหยดลงบนกระดาษกรองนี้ สำหรับ negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมันหอมระเหย ส่วน positive control สำหรับแบคทีเรีย ใช้เพนนิซิลิน จีความเข้มข้น 5000 IUต่อมิลลิลิตรสำหรับทดสอบ และ positive control สำหรับเชื้อราและยีสต์ ใช้ฟลูโดนาโซลความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสำหรับทดสอบ โดยทำการทดสอบทั้งหมด 2 ซ้ำ นำจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับจานเพาะเชื้อที่มียีสต์และเชื้อรานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (inhibition zone) ในหน่วยของมิลลิเมตร ทำการทดลอง 2 ซ้ำแล้วทำการหาค่าเฉลี่ย

ค) การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยวิธี Agar dilution

ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดโดยใช้วิธี agar dilution (Collins และคณะ. 2001) ขั้นแรกเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน 18 ระดับ (20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.015 และ 0.0078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเติมน้ำมันหอมระเหยจาก stock ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อและน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตรที่เหมาะสมลงไปในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ โดยปริมาตรของสารละลายของน้ำมันหอมระเหยและปริมาตรของน้ำกลั่นรวมกันได้ 1 มิลลิลิตร (วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ก) จากนั้นทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (MHA, SDB และ PDA) ที่ยังหลอมเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อนั้นทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัว แล้วจึงหยดสารแขวนลอยเซลล์หรือสปอร์ของจุลินทรีย์ทั้งหมด 16 ชนิดที่ได้เตรียมไว้แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามข้อ 3.2.1.2 ลงไปตรงกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 72 ชั่วโมงสำหรับ ยีสต์และเชื้อรา ตามลำดับ โดย negative control ให้ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมันหอมระเหย และ positive control ของแบคทีเรียใช้เพนนิซิลิน จี (penicillin G) ที่ระดับความเข้มข้น 7.8-4000 IUต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์และเชื้อราใช้ฟลูโคนาโซล (fluconazole) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.156 ถึง 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มแล้วจะทำการประเมินผล โดยดูที่จานเพาะเชื้อที่ไม่มีการเจริญเกิดขึ้น โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

3.2.1.3 การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

ก) การวัดความสามารถในการกำจัด 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Singh และคณะ (2008) โดยนำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดมาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม นำน้ำมันหอมระเหยแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาผสมกับสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ในเมทานอล (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ โดยเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้เมทานอลแทนน้ำมันหอมระเหย และใช้ alpha-tocopherol และ Butylated hydroxyltoluene (BHT) เป็น postitive control เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นจึงนำมาคำนวณหาการยับยั้ง DPPH radical (ร้อยละ) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\%I = (Ao-As)/Ao \times 100$$

โดย Ao คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย จากนั้นสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radicals กับน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อหาค่า IC_{50} ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถกำจัด DPPH radical ได้ร้อยละ 50

ข) β-carotene bleaching test

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Eyob และคณะ (2008) โดยใช้ β-carotene 2 มิลลิกรัม ผสมกับคลอโรฟอร์มปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้เป็นสารละลายผสมของ β-carotene-chloroform จากนั้นปิเปตต์สารละลายผสมนี้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในฟลาสก์ก้นกลม (round-bottom rotary boiling flask) เติมกรดลิโนเลอิก 20 มิลลิกรัมและ tween 40 ปริมาณ 0.2 กรัมลงไป นำไประเหยคลอโรฟอร์มออกด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงค่อยๆเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงไปอย่างช้าๆ และเขย่าอย่างแรงเพื่อให้เกิดเป็นอิมัลชั่น จากนั้นปิเปตสารละลายนี้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างน้ำมันหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (ค่าที่ได้นี้เป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาที่ 0 นาที , t=0) จากนั้นนำหลอดทดลองไปบ่มไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 105 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 105 นาที (t=105) สำหรับ negative control ทำการทดลองเช่นเดียวกัน แต่ใช้เมทานอลปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรแทนน้ำมันหอมระเหย ส่วน postitive control ใช้ alpha-tocopherol และ Butylated hydroxyltoluene (BHT) คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ Antioxidative activity (AA%) ตามสูตร

$$AA\% = [1-(A^{0}_{sample}-A^{105}_{sample}) / (A^{0}_{control}-A^{105}_{control})] \times 100$$

เมื่อ A^{0}_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เวลาที่ 0 นาที (t=0)

A^{105}_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหลังจากบ่มเป็นเวลา 105 นาที (t=105)

$A^{0}_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เวลาที่ 0 นาที

$A^{105}_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมหลังจากบ่มเป็นเวลา 105 นาที

ค) Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

FRAP assay เป็นวิธีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นตัวรีดิวซ์ของน้ำมันหอมระเหย โดยหาความสามารถในเปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Lado และคณะ (2004) สารละลายที่ใช้ในการทดสอบ คือ FRAP reagent ซึ่งประกอบด้วย acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ สารละลาย Ferric chloride hexahydrate ($FeCl_3 . 6H_2O$) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) วิธีการวิเคราะห์ทำได้โดยปิเปต FRAP reagent ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ โดยเทียบกับ blank ซึ่งใช้ FRAP reagent ที่ไม่มีตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหย และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ Fe^{2+}-TPTZ ในหน่วยมิลลิโมลาร์ต่อตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย 1 มิลลิกรัม

ทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ในช่วงความเข้มข้น 0 - 3 มิลลิโมลาร์ (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น แต่ใช้สารละลาย ferrous sulfate heptahydrate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆแทนน้ำมันหอมระเหย และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับระดับความเข้มข้นของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย ferrous sulfate heptahydrate จะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง และหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของ Fe^{2+}-TPTZ

ง) Superoxide anion-scavenging activity

การวิเคราะห์ความสามารถในการกำจัด superoxide anion ทำตามวิธีการของ Sakanaka และคณะ (2005) โดยผสมสารละลาย xanthine ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร nitro-blue tetrazolium ความเข้มข้น 0.48 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (วิธีการเตรียมในภาคผนวก ข) และน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปความให้ร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมเอนไซม์ xanthine oxidase ความเข้มข้น 0.0026 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 18.8 ไมโครลิตรลงไปเพื่อเริ่มปฏิกิริยาและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม sodium dodecyl sulfate ความเข้มข้น 69 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงไปเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ และนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาการยับยั้ง superoxide anion (ร้อยละ) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\%I = [(C - S) / C] \times 100$$

เมื่อ C คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ control (บัฟเฟอร์แทนน้ำมันหอมระเหย)

S คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ sample (น้ำมันหอมระเหย)

3.2.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหย

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยทำตามวิธีการของ Dastmalchi และคณะ (2007) โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปีเปตต์น้ำมันหอมระเหยปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultra pure water) ปริมาตร 6 มิลลิลิตรและเติมสาร Folin-Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าและทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง ผสมและทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก

ทำกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับวิธีการข้างต้นแต่ใช้สารละลายกรดแกลลิก แทนน้ำมันหอมระเหย เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกรดแกลลิกจะได้กราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นตรง และหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

3.2.2 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *L. monocytogenes*

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีการข้อ 3.2.1.2 (ก) ให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ 1.0 x 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้ในการทดสอบ

3.2.2.2 ทดสอบด้วยวิธี agar dilution checkerboard

ทำการทดสอบผลของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด คือ น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันพริกหอม น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศ และน้ำมันจันทน์เทศผสมกับน้ำมันพริกหอม ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *L. monocytogenes* โดยวิธี checkerboard ตามวิธีการของ Rosato และคณะ (2007) ขั้นแรกเตรียม stock solution ของน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมในสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 จากนั้นทำการปีเปตต์ stock solution ของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 และ ชนิดที่ 2 ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1 : 1) ลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ที่ยังหลอมเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อนั้นเพื่อทำให้ได้ระดับความเข้มข้น 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าของค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดซึ่งได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1 ทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัว แล้วจึงหยดสารแขวนลอยของจุลินทรีย์ (1.0 x 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร) ลงไปตรงกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ *P. fluorescens* จากนั้นทำการประเมินผลของน้ำมันหอมระเหยโดยคำนวณเป็นค่า fractional inhibitory concentration (FIC) ในการคำนวณค่า FIC index (FICI) จะมีสูตรดังนี้

$$\text{FIC index} = FIC_A + FIC_B$$

เมื่อ FIC_A = ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด A (MIC_A combination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยผสม / ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิด A เพียงอย่างเดียว (MIC_A alone)

FIC_B = ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด B (MIC_B combination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยผสม / ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิด B เพียงอย่างเดียว (MIC_B alone)

ซึ่งถ้าค่า $FIC \leq 0.5$ ถือว่ามีฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect)

$0.5 < FIC < 1$ ถือว่า additive หรือ ไม่มีความแตกต่าง (indifferent effect)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FIC > 1 ถือว่าเป็นปฏิปักษ์กัน (antagonistic effect)

3.2.3 การศึกษาผลของส่วนผสมอาหารต่อฤทธิ์ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบนี้ได้ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีจากผลการทดลองในข้อ 3.2.2 ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก 4 ชนิด คือ *Pediococcus pentosaceus* P0805, *Lactococcus lactis* 13IS3, *Enterococcus faecalis* 4IS17, *Enterococcus faecium* 1IS11 และแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิด คือ *Salmonella* Senftenberg DMST 7113, *Salmonella* Rissen DMST 7097, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 บนอาหารจำลอง (food model media) 3 ชนิด คือ starch agar, meat agar และ sausage agar

3.2.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีการข้อ 3.2.1.2 (ก) สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคปรับความขุ่นของเซลล์เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 2 และ Mcfarland Standard เบอร์ 5 ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งจะได้ปริมาณจุลินทรีย์เท่ากับ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตรสำหรับใช้ในการทดสอบ

3.2.3.2 อาหารจำลอง (food model media)

อาหารจำลองทั้ง 3 ชนิด คือ starch agar, meat agar และ sausage agar มีส่วนผสมและวิธีการเตรียมดังนี้

ก) starch agar ประกอบด้วย beef extract 3 กรัม soluble starch 10 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

ข) meat agar ประกอบด้วย beef extract 30 กรัม น้ำมันวัว 10 มิลลิลิตร วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

ค) sausage agar ประกอบด้วย beef extract 30 กรัม น้ำมันวัว 10 มิลลิลิตร โซเดียมคลอไรด์ 12 กรัม โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต 3 กรัม กลูโคส 10 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกให้ได้ 5.5

โดยอาหารจำลองทั้ง 3 ชนิดจะทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3.2.3.3 วิธีการทดสอบ

ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันอบเชย และน้ำมันจันทน์เทศโดยใช้วิธี agar dilution (Collins และคณะ. 2001) ขั้นแรกเตรียม stock solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันหอมระเหยที่มีระดับความเข้มข้นต่างกัน 19 ระดับ (22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.015 และ 0.0078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเติมน้ำมันหอมระเหยจาก stock solution ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อ และน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตรที่เหมาะสมลงไปในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ โดยปริมาตรของสารละลายของน้ำมันหอมระเหยและปริมาตรของน้ำกลั่นรวมกันได้ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม (starch agar, meat agar และ sausage agar) ที่ยังหลอมเหลวอยู่ ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อนั้นทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัว แล้วจึงหยดสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียทั้งหมด 9 ชนิดที่ได้เตรียมไว้แล้วตามข้อ 3.2.3.1 ลงไปตรงกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. fluorescens* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกรณีของ negative control ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมันหอมระเหย โดยทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มแล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่ทดสอบ หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

3.2.4 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยผสมในการต้านจุลินทรีย์และชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

การทดลองในขั้นนี้ได้ใช้น้ำมันหอมระเหยผสมของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีเพื่อเติมลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* และเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *Sal.* Rissen ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดลองนี้พิจารณาจากการผลทดลองที่ทำก่อนการทดลองจริง (preliminary study ซึ่งได้ทดสอบผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 12 ระดับในภาคผนวก ง) ซึ่งได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลการใช้น้ำมันหอมระเหยผสมทั้งหมด 5 ทรีทเมนต์ ทำการทดลองดังต่อไปนี้

3.2.4.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเพาะเชื้อ *P. pentosaceus* P0805 ที่แยกได้จากเนื้อหมูสด (พัชรีและสุนิสา. 2550) ลงในอาหาร MRS broth สำหรับเชื้อ *S. aureus* TISTR 118 และ *Sal.* Rissen DMST 7097 เพาะเลี้ยงในอาหาร MHB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างเซลล์ 2 ครั้งในการล้างเซลล์แต่ละครั้งทำได้โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงไปแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเช่นเดียวกับข้างต้น เทส่วนใสทิ้งไป แล้วจึงทำให้ได้สารแขวนลอย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยของเชื้อ *P. pentosaceus* ให้เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 2 และเจือจางต่อไปอีก 100 เท่า เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียเป็น 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *S. aureus* และ *Sal.* Rissen ปรับความขุ่นของเซลล์แขวนลอยให้เท่ากับ Mcfarland Standard เบอร์ 5

3.2.4.2 การใช้น้ำมันหอมระเหยผสมต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Sal.* Rissen ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

ทำการเตรียมไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อทั้งหมด 1.9 กิโลกรัม โดยมีส่วนผสมดังนี้ เนื้อวัวร้อยละ 51.45 มันวัวร้อยละ 28.07 ข้าวสุกร้อยละ 14.03 เกลือร้อยละ 1.3 น้ำตาลทรายร้อยละ 0.47 กระเทียมบดร้อยละ 4.6 การผลิตไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อทำได้โดยนำเนื้อวัวและมันวัวมาล้างให้สะอาดหั่นและบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดเนื้อ จากนั้นผสมเครื่องปรุงทั้งหมดลงในเนื้อบดแล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (kitchenAid model 5K5SS) ที่อัตราความเร็วเบอร์ 1ใช้เวลาในการผสม 3 นาที แบ่งส่วนผสมของไส้กรอกทั้งหมดที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้วออกเป็น 5 ส่วนเท่าๆกัน เพื่อนำมาเติมน้ำมันหอมระเหยผสมที่ความเข้มข้นต่างๆกันทั้งหมด 5 รูปแบบได้แก่ 1) ชุดควบคุมไม่เติมน้ำมันหอมระเหยผสม 2) เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศ 1375 พีพีเอ็ม 3) เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศ 1375 พีพีเอ็ม 4) เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศ 1375 พีพีเอ็ม และ 5) เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศ 1375 พีพีเอ็ม หลังจากที่ผสมเข้ากันดีแล้ว บรรจุไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อลงในถุงพลาสติก จากนั้นเติมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อ *P. pentosaceus* ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ 10^4 เซลล์ต่อกรัม *S. aureus* ปริมาณ 10^7 เซลล์ต่อกรัม และ *Sal.* Rissen ปริมาณ 10^7 เซลล์ต่อกรัมและมัดให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด จำนวน *S. aureus* และจำนวน *Salmonella* และวัดค่าพีเอช ตามวิธีการดังต่อไปนี้

ก) การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด *S. aureus* และ *Salmonella* ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

นำไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อปริมาณ 25 กรัมใส่ลงไปในถุงตีป่นปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาณ 225 มิลลิลิตรลงไปในถุงตีป่น ตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ในการหาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ทำโดยใช้เทคนิค pour plate ซึ่งได้ปีเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้าย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปลอดเชื้อ เติมอาหาร MRS (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) ลงไปและผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว คว่ำจานแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการตรวจหาจำนวนเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salmonella และ *S. aureus* ทำโดยใช้เทคนิค spread plate โดยปิเปตตัวอย่างที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงบนผิวหน้าอาหาร Baird-parker agar ที่เติมโพแทสเซียมเทลลูไรท์และไข่แดง สำหรับการตรวจหาจำนวน *S. aureus* และอาหาร XLD agar สำหรับการตรวจหาจำนวน *Salmonella* เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ คว่ำจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับอาหาร XLD agar และ 48 ชั่วโมงสำหรับอาหาร Baird-parker agar นับโคโลนีสีดำบนจานที่มีจำนวน 15-150 โคโลนี และคำนวณจำนวน *Salmonella* และ *S. aureus* ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมตัวอย่างของตัวอย่าง)

สำหรับการวิเคราะห์เชื้อ *P. pentosaceus* วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค pour plate โดยปิเปตต์ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้าย ปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ยังหลอมเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสลงไปและผสมให้เข้ากัน รอจนอาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นับจำนวนโคโลนีที่มีจำนวน 30-300 โคโลนี และคำนวณในรูป CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง

ข) วัดค่าพีเอช

ทำการวัดค่าพีเอชของไส้กรอกโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (testo 205)

3.2.4.3 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยผสมต่อการชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

ทำการเตรียมไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อทั้งหมด 5 ทรีทเมนต์ที่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus*, *S. aureus* และ *Sal.* Rissen ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (ได้ค่าพีเอชประมาณ 4.5) แล้วนำไปเก็บรักษาในสภาพควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 98 (บรรจุใน desiccators ที่มีสารละลายเกลืออิ่มตัวของโพแทสเซียมซัลเฟต) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน และทำการวิเคราะห์ค่ากรดไทโอบาบิทูริก (thiobarbituric acid value; TBA value) ของแต่ละทรีทเมนต์ที่เวลา 0, 2, 9, 18 และ 27 วัน และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อในวันที่ 27 ของการเก็บรักษา ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

ก) การวิเคราะห์การเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวด้วยวิธี TBA

ทำตามวิธีของ Kirk และ Sawyer (1991) แช่ไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อจำนวน 10 กรัมลงในน้ำปริมาตร 50 มิลลิลิตรเป็นเวลา 2 นาทีเพื่อทำให้ตัวอย่างเปื่อยยุ่ย จากนั้นจึงนำไปใส่ในฟลาสก์สำหรับกลั่น เติมน้ำปริมาตร 47.5 มิลลิลิตรลงไปและกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงไปตามด้วยลูกแก้ว 2-3 เม็ด นำไปกลั่นและเก็บส่วนที่กลั่นได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตรออกมา ปิเปตต์ส่วนที่กลั่นได้นี้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วที่มีฝาปิด และเติมสารละลายกรดไทโอบาบิทูริก (2-thiobarbituric acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.02 โมลาร์ในกรดแอซิติกความเข้มข้นร้อยละ 90 (TBA reagent) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงไป เขย่าและนำไปต้มในน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดือดเป็นเวลา 35 นาทีและปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร (D) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ เทียบกับ blank ซึ่งเตรียมโดยใช้น้ำปริมาตร 5 มิลลิลิตรผสมกับ TBA reagent ปริมาตร 5 มิลลิลิตรนำไปต้มและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกัน โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะนำไปคูณกับค่า K ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.8 และแสดงผลออกมาอยู่ในรูปของค่า TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) ซึ่งมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมของมาลโลนาลดีไฮด์ (malonaldehyde) ต่อกิโลกรัมของตัวอย่าง (mg MAD/kg sample)

ข) การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธีการพรรณนาเชิงทั่วไป (descriptive analysis)

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ผ่านการฝึกฝนมาก่อน จำนวน 7 คน ในการเตรียมตัวอย่างสามารถทำได้โดยนำตัวอย่างทั้งหมดมาปรุงให้สุกด้วยการทอด จากนั้นแบ่งไส้กรอกแต่ละทรีทเมนต์ให้มีปริมาณเท่าๆกัน จัดใส่ลงในภาชนะที่มีรหัสเป็นเลข 3 หลักซึ่งไส้กรอกแต่ละทรีทเมนต์จะมีรหัสตัวอย่างที่แตกต่างกันและผู้ทดสอบชิมแต่ละคนจะได้รหัสตัวอย่างที่แตกต่างกันด้วย จากนั้นทำการเสริฟ์ตัวอย่างไส้กรอกทั้งหมดโดยเรียงลำดับการเสริฟ์ตามที่ได้กำหนดไว้ ซึ่งผู้ทดสอบชิมแต่ละคนจะได้ลำดับการเสริฟ์ตัวอย่างไส้กรอกที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งจะเสิรฟ์พร้อมน้ำสะอาดและใบประเมินคุณภาพ ในไส้กรอกแต่ละเทรีทเมนต์จะประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสในด้านสีที่ปรากฏ (color) กลิ่นหืน (rancid flavor) ความเปรี้ยว (acidity) ลักษณะเนื้อสัมผัส (texture) และความชอบรวม (overall acceptability) โดยผู้ทดสอบชิมให้คะแนนของคุณลักษณะดังกล่าว ซึ่งแบ่งสเกลการให้คะแนนเป็น 5 ระดับ (คะแนน 1-5 ระดับ) ซึ่งบ่งบอกความเข้มของคุณลักษณะจากอ่อนไปจนถึงเข้มมากดังนี้

1) คุณลักษณะของสีที่ปรากฏ: คะแนน 1 หมายถึง สีแดงซีด คะแนน 2 หมายถึง สีแดง คะแนน 3 หมายถึง สีแดงเข้ม คะแนน 4 หมายถึง สีแดงผสมน้ำตาล และคะแนน 5 หมายถึง สีน้ำตาล

2) คุณลักษณะของกลิ่นหืน: คะแนน 1 หมายถึง ไม่มีกลิ่น คะแนน 2 หมายถึง กลิ่นหืนเล็กน้อย คะแนน 3 หมายถึง กลิ่นหืนปานกลาง คะแนน 4 หมายถึง กลิ่นค่อนข้างหืน และคะแนน 5 หมายถึง กลิ่นหืนมาก

3) คุณลักษณะของความเปรี้ยว: คะแนน 1 หมายถึง เปรี้ยวน้อย คะแนน 2 หมายถึง เปรี้ยว คะแนน 3 หมายถึง เปรี้ยวปานกลาง คะแนน 4 หมายถึง เปรี้ยวมาก และคะแนน 5 หมายถึง เปรี้ยวมากที่สุด

4) คุณลักษณะด้านเนื้อสัมผัส: คะแนน 1 หมายถึง เนื้อละเอียดมาก คะแนน 2 หมายถึง เนื้อละเอียดปานกลาง คะแนน 3 หมายถึง เนื้อละเอียดน้อย คะแนน 4 หมายถึง เนื้อหยาบ และคะแนน 5 หมายถึง เนื้อหยาบมาก

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) คุณลักษณะด้านความชอบรวม: คะแนน 1 หมายถึง ชอบ คะแนน 2 หมายถึง ชอบเล็กน้อย คะแนน 3 หมายถึง ชอบปานกลาง คะแนน 4 หมายถึง ชอบมาก และคะแนน 5 หมายถึง ชอบมากที่สุด

3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้ analysis variance (ANOVA) และ Duncan's multiple range test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลแต่ละทรีทเมนต์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยในเครื่องเทศ

เมื่อนำเครื่องเทศทั้ง 8 ชนิดมากลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีกลั่นไอน้ำพบว่าเครื่องเทศที่มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากกว่าร้อยละ 1.0 ได้แก่ จันทน์เทศ เร่ว ขมิ้นอ้อย และเทียนตาตั๊กแตน โดยจันทน์เทศมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุด (ร้อยละ 1.5) ส่วนอบเชย พริกหอม เทียนสัตตบุษย์และกระทือ มีปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยกว่าร้อยละ 1.0 โดยกระทือมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 0.5 (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในเครื่องเทศแต่ละชนิด

ชนิดของเครื่องเทศ	ปริมาณน้ำมันหอมระเหย[a] ± SD (มิลลิลิตร/น้ำหนักพืชแห้ง 100 กรัม)
กระทือ	0.5 ± 0.06
ขมิ้นอ้อย	1.0 ± 0.06
จันทน์เทศ	1.5 ± 0.15
เทียนตาตั๊กแตน	1.1 ± 0.10
เทียนสัตตบุษย์	0.6 ± 0.15
พริกหอม	0.6 ± 0.10
เร่ว	1.2 ± 0.15
อบเชย	0.7 ± 0.06

[a]ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 ผลการศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เบื้องต้นโดยวิธี Agar disc diffusion

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดด้วยวิธี Agar disc diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เกือบทุกชนิดคือ น้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ และน้ำมันพริกหอม (ตารางที่ 4.2) โดยเฉพาะน้ำมันอบเชยพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบได้ดีที่สุด เนื่องจากมีขนาดของบริเวณการยับยั้งกว้างที่สุด (21-42 มิลลิเมตร) สำหรับน้ำมันกระทือ น้ำมันเร่ว และน้ำมันขมิ้นอ้อยพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้น้อยมาก โดยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

E. coli, *L. monocytogenes* และ *Sal.* Rissen ได้ และเชื้อแบคทีเรียที่พบว่าไวต่อน้ำมันหอมระเหยทุกชนิด คือ *B. cereus* และ *S. aureus* โดยพบว่า *S. aureus* มีความไวต่อน้ำมันอบเชยมากที่สุด ซึ่งสามารถวัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 42 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *B. cereus* ซึ่งวัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 38.25 มิลลิเมตร น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอม สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีเช่นกัน โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีขนาดของบริเวณการยับยั้งกว้างกว่าเชื้ออื่น คือ 22.5 และ 20.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำมันจันทน์เทศมีผลทำให้เชื้อ *S. aureus* มีการเจริญของเชื้อน้อยมากจนไม่สามารถวัดบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้นได้

น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดี ได้แก่ น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันพริกหอม และน้ำมันอบเชย โดยเฉพาะน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีที่สุดเพราะมีผลทำให้เชื้อยีสต์ทั้งหมดไม่มีการเจริญเกิดขึ้นเลย สำหรับน้ำมันอบเชย น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน และน้ำมันจันทน์เทศนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีเช่นเดียวกัน โดยน้ำมันจันทน์เทศสามารถยับยั้งการเจริญของ *H. uvarum*, *P. membranaefaciens* และ *R. glutinis* ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่น้ำมันเทียนตาตั๊กแตนสามารถยับยั้งการเจริญของ *H. uvarum* และ *R. glutinis* ได้อย่างสมบูรณ์เช่นเดียวกัน สำหรับน้ำมันพริกหอมพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ค่อนข้างดีโดยยีสต์ที่มีความไวต่อน้ำมันชนิดนี้มากที่สุด คือ *R. glutinis* ซึ่งวัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 42.3 มิลลิเมตร

สำหรับในกลุ่มของเชื้อรา น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ ได้แก่ น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันพริกหอม และน้ำมันอบเชย ซึ่งน้ำมันที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีที่สุด คือ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ เนื่องจากน้ำมันชนิดนี้มีผลทำให้เชื้อรา *A. flavus*, *A. ochraceus* และ *A. parasiticus* ไม่มีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นเลย และยังมีผลทำให้เชื้อ *F. moniliforme* มีการเจริญที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญแบบสภาวะปกติซึ่งเป็นผลให้ไม่สามารถวัดบริเวณการยับยั้งที่เกิดขึ้นได้ สำหรับน้ำมันจันทน์เทศมีผลทำให้การเจริญของเชื้อ *A. ochraceus* และ *A. parasiticus* เกิดขึ้นไม่สม่ำเสมอเช่นกัน แต่สามารถยับยั้งเชื้อ *A. flavus* ได้ดีโดยไม่พบการเจริญของเชื้อเกิดขึ้นเลย เช่นเดียวกับน้ำมันอบเชยที่ทำให้เชื้อ *A. ochraceus* และ *F. moniliforme* ไม่มีการเจริญเกิดขึ้น ในขณะที่น้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยเชื้อที่มีความไวต่อน้ำมันชนิดนี้มากที่สุด คือ *F. moniliforme* โดยวัดขนาดบริเวณการยับยั้งได้ 47.5 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *A. ochraceus* วัดขนาดบริเวณการยับยั้งได้ 41.5 มิลลิเมตร โดยเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ยังมีการเจริญที่เบาบางมากเมื่อเทียบกับการเจริญในสภาวะปกติอีกด้วย เชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบมีความต้านทานต่อน้ำมันกระทือ น้ำมันเร่ว และน้ำมันขมิ้นอ้อย เนื่องจากไม่พบการเกิดบริเวณการยับยั้งเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศโดยการทดสอบด้วยวิธี Agar disc diffusion

จุลินทรีย์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร)*									
	น้ำมันหอมระเหย								ยาปฏิชีวนะ	
	กระทือ	ขมิ้นอ้อย	จันทน์เทศ	เทียนตาต๊กแตน	เทียนสัตตบุษย์	พริกหอม	เร่ว	อบเชย	เพนนิซิลิน จี (5000 IU/ml)	ฟลูโคนาโซล (2 มก./มล.)
แบคทีเรีย										
Bacillus cereus	10.5	10	22.5	12.75	13.5	20.5	13.25	38.25	13.5	-
Escherichia coli	-[b]	-	8.75	8.25	8	15	-	24.5	10	-
Listeria monocytogenes	-	-	8.25	8	7.5	13.25	-	20.75	17.5	-
Pseudomonas fluorescens	-	7	7.5	8	8	12.5	7	21	-	-
Salmonella Rissen	-	-	8	8.25	8	14.5	-	22.5	18.5	-
Staphylococcus aureus	11.5	8.75	PI	22.75	-	21.5	10.25	42	46.5	-
ยีสต์										
Candida lipolytica	8.5	-	13	33.75	CI	32.5	10.25	69.5	-	16
Hanseniaspora uvarum	9.25	-	CI	CI	CI	33.25	13	CI	-	-
Pichia membranaefaciens	7	7	CI	41	CI	19.75	9	48	-	10
Rhodotorula glutinis	10.25	9.75	CI	CI	CI	42.3	25	77.5	-	-
Schizosaccharomyces pombe	9.75	8	25.5	27.25	CI	34	15.25	CI	-	-
Zygosaccharomyces rouxii	9	7	14	20.75	CI	23	11	55	-	34
เชื้อรา										
Aspergillus flavus	-	-	CI	24.5	CI	17	-	58	-	-
Aspergillus ochraceus	-	-	PI	41.5	CI	25.75	-	CI	-	-
Aspergillus parasiticus	-	-	PI	14.75	CI	11.75	-	59.75	-	-
Fusarium moniliforme	-	-	16.75	47.5	PI	23.5	-	CI	-	-

*ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ

[b]ไม่เกิดโซนการยับยั้ง

PI = เกิดการยับยั้งการเจริญได้บางส่วน (Partially Inhibition)

CI = เกิดการยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ (Completely Inhibition)

เมื่อเทียบกับ positive control พบว่าการใช้เพนนิซิลิน จี ที่ระดับความเข้มข้น 5000 IU ต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้เกือบทุกสายพันธุ์ยกเว้น *P. fluorescens* โดยเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อเพนนิซิลิน จี มากที่สุดคือ *S. aureus* วัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 46.5 มิลลิเมตร ในขณะที่เพนนิซิลิน จี ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และเชื้อราได้ สำหรับฟลูโคนาโซลที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ 3 ชนิด คือ *Z. rouxii*, *C. lipolytica* และ *P. membranaefaciens* วัดขนาดของบริเวณการยับยั้งได้ 34, 16 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่ฟลูโคนาโซลไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้เนื่องจากไม่พบการเกิดบริเวณการยับยั้งเลย

4.3 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dilution

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิด พบว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4.3) โดยน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้อย่างสมบูรณ์ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *E. coli* ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจึงจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียนี้ได้อย่างสมบูรณ์ และยีสต์ที่ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยมากที่สุด คือ *S. pombe* (ค่า MIC เท่ากับ 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)ในขณะที่เชื้อ *C. lipolytica*, *H. uvarum*, *P. membranaefaciens*, *R. glutinis* และ *Z. rouxii* ถูกยับยั้งได้ในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า คือ มีค่า MIC เท่ากับ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น เช่น น้ำมันเทียนตาตั๊กแตนและน้ำมันพริกหอมพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดี โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ 1-2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเร่วและน้ำมันจันทน์เทศมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *R. glutinis* ได้ดีกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น นอกจากนี้น้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. ochraceus* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้นเพียง 0.015 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *F. moniliforme* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ระดับความเข้มข้น 0.031 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ และน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ทั้ง 4 ชนิด โดยระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์จะมีระดับความเข้มข้นในช่วง 1-4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป และน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตนและน้ำมันพริกหอมในระดับความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. ochraceus* และ *F. moniliforme* ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่เชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ต้องใช้ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 2 มิลลิกรัมขึ้นไปจึงจะยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้ได้ สำหรับน้ำมันเร่ว กระทือ และขมิ้นอ้อยไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเหล่านี้ได้เลยในทุกระดับความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum inhibition concentration) ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ

เชื้อจุลินทรีย์	ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)									
	ชนิดของน้ำมันหอมระเหย								ยาปฏิชีวนะ	
	กระทือ	ขมิ้นอ้อย	จันทน์เทศ	เทียนสัตตบุษย์	เทียนสัตตบุษย์	พริกหอม	เร่ว	อบเชย	เพนนิซิลิน จี (IU/มล.)	ฟลูโคนาโซล (มก./มล.)
แบคทีเรีย										
Bacillus cereus	> 20	> 20	12	6	6	6	12	0.5	250	> 1
Escherichia coli	> 20	> 20	18	10	10	16	> 20	2.0	125	> 1
Listeria monocytogenes	> 20	> 20	18	18	> 20	20	> 20	1.0	62.5	> 1
Pseudomonas fluorescens	> 20	> 20	20	10	16	16	> 20	2.0	> 4000	> 1
Salmonella Rissen	> 20	> 20	20	16	> 20	20	> 20	2.0	31.25	> 1
Staphylococcus aureus	> 20	> 20	8	6	> 20	6	12	2.0	31.25	> 1
ยีสต์										
Candida lipolytica	> 20	> 20	4	2	4	2	6	0.25	> 4000	0.02
Hanseniaspora uvarum	12	> 20	6	2	6	1	6	0.25	> 4000	0.04
Pichia membranaefaciens	> 20	> 20	6	2	6	2	14	0.25	> 4000	0.04
Rhodotorula glutinis	12	14	2	1	1	1	1	0.25	> 4000	> 1
Schizosaccharomyces pombe	> 20	14	6	2	6	2	6	0.063	> 4000	0.08
Zygosaccharomyces rouxii	> 20	18	6	2	6	2	6	0.25	> 4000	0.01
เชื้อรา										
Aspergillus flavus	> 20	> 20	6	2	4	6	> 20	0.031	> 4000	> 1
Aspergillus ochraceus	> 20	> 20	4	1	1	1	> 20	0.015	> 4000	> 1
Aspergillus parasiticus	> 20	> 20	6	2	4	6	> 20	0.031	> 4000	> 1
Fusarium moniliforme	> 20	> 20	6	1	1	1	> 20	0.031	> 4000	> 1

สำหรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด พบว่าเพนนิซิลิน จี มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 31.25 ถึงมากกว่า 4000 IUต่อมิลลิลิตร โดยแบคทีเรียที่ไวต่อเพนนิซิลิน จี มากที่สุด คือ *S. aureus* และ *Sal.* Rissen (ค่า MIC เท่ากับ 31.25 IUต่อมิลลิลิตร) ยกเว้น *P. fluorescens* ยีสต์และเชื้อราที่มีความต้านทานต่อเพนนิซิลินจีที่ความเข้มข้นสูงสุด (4000 IUต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่การเจริญของ *C. lipolytica*, *H. uvarum*, *P. membranaefaciens*, *S. pombe* และ *Z. rouxii* สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยฟลูโคนาโซลซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.01 ถึง 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดย *Z. rouxii* มีความไวต่อฟลูโคนาโซลมากที่สุด (MIC เท่ากับ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่สำหรับ *R. glutinis* ต้านทานต่อฟลูโคนาโซล เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียและเชื้อราที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ในการทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion และ agar dilution พบว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นที่ทดสอบ ซึ่งผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่มีผู้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ (López และคณะ. 2005; Agaoglu และคณะ. 2007; Rusenova และ Parvanov. 2009) Gupta และคณะ (2008) ได้รายงานว่าน้ำมันอบเชยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bacillus* sp., *E. coli* and *L. monocytogenes* ซึ่ง Prabuseenivasan และคณะ (2006) ได้รายงานว่าสารสำคัญในน้ำมันอบเชยที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ คือ cinnamaldehyde นอกจากนี้ Senanayake และคณะ (1978) ยังได้รายงานว่าในน้ำมันอบเชยที่สกัดได้จากเปลือกอบเชยมีสารประกอบทั้งหมด 72 ชนิด ได้แก่ cinnamaldehyde ร้อยละ 75 cinnamyl acetate ร้อยละ 5 caryophyllene ร้อยละ 3.3 linalool ร้อยละ 2.4 eugenol ร้อยละ 2.2 1:8-cineole ร้อยละ 2 *p*-cymean ร้อยละ1.1 α-terpinesol ร้อยละ 0.7 coumarin ร้อยละ 0.7 benzylbenzoate ร้อยละ 0.7 α-phellandrene ร้อยละ 0.6 α-humulene ร้อยละ 0.6 limonene ร้อยละ 0.5 และสารประกอบอื่นๆในปริมาณเล็กน้อย โดยสารในน้ำมันอบเชยที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากที่สุดคือ cinnamaldehyde โดย Ali และคณะ (2005) พบว่าสารนี้มีบทบาทในการยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวและสายพันธุ์ที่ต้านทาน นอกจากนี้ Kim และคณะ (1995) ยังพบว่าสาร eugenol และ linalool สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium และ *L. monocytogenes* ได้

ในการทดลองครั้งนี้ยังพบว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ และน้ำมันพริกหอมมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Singh และคณะ (2005b) ที่ได้รายงานว่าน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium graminearum*, *A. flavus* และ *Penicillium citrinum* ได้ดีกว่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และยังได้รายงานไว้ว่าในน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีสารประกอบทั้งหมด 35 ชนิด โดยสารประกอบหลักคือ carvone ร้อยละ 55.2 limonene ร้อยละ 16.6 dill apiole ร้อยละ 14.4 linalool ร้อยละ 3.7 *trans*-dihydrocarvonene ร้อยละ 2.8 *cis*-dihydrocarvonene ร้อยละ 2.6 สำหรับในการทดลองครั้งนี้พบว่าน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าแบคทีเรียซึ่งมี

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jirovetz และคณะ (2003) ที่ได้รายงานว่าน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ยีสต์และแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะเชื้อ *S. aureus* และมีประสิทธิภาพน้อยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ Delaquis และคณะ (2002) ได้รายงานว่าส่วนของน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนที่ได้จากการกลั่นที่มีสาร D-limonene และ carvone สามารถยับยั้งการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ดี

สำหรับน้ำมันเทียนสัตตบุษย์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ทดสอบได้ดีซึ่งเห็นได้จากการทดสอบด้วยวิธี agar disc diffusion ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจเป็นเพราะน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีสาร volatile oil ในปริมาณสูง Tabanca และคณะ (2006) ได้รายงานว่าในน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีสารประกอบหลายชนิด ได้แก่ anethole ร้อยละ 94.2 methyl chavicol ร้อยละ 2.0 γ-himachalene ร้อยละ 1.4 pseudoisoeugenyl-2-methyl butyrate ร้อยละ 0.7 และสารประกอบอื่นๆในปริมาณเล็กน้อย Kosalec และคณะ (2005) ได้รายงานด้วยว่าน้ำมันเทียนสัตตบุษย์สามารถยับยั้งเชื้อราได้โดยให้บริเวณการยับยั้งที่ใหญ่ คือ 21-30 มิลลิเมตร โดยสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันเทียนสัตตบุษย์นี้อาจเป็นผลมาจากสารประกอบสำคัญที่เป็นสารประกอบหลัก คือ anethol ซึ่ง Shukla และ Tripathi (1987) ได้รายงานว่า anethol ที่ระดับความเข้มข้น 600 พีพีเอ็มสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับ Muller-Riebau และคณะ (1995) ที่ได้รายงานว่าสาร anethol สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Rhizoctonia solani* และ *Sclerotinia sclerotiorum* ได้ ในขณะที่การยับยั้งเชื้อการเจริญของแบคทีเรียของน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีประสิทธิภาพน้อยซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gupta และคณะ (2008) และ Agaoglu และคณะ (2007)

สำหรับน้ำมันจันทน์เทศพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี ซึ่ง Singh และคณะ (2005a) ได้รายงานว่าน้ำมันจันทน์เทศสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ และยังพบว่าในน้ำมันจันทน์เทศมีสารสำคัญทั้งหมด 49 ชนิด ได้แก่ sabinene ร้อยละ 20.22 terpinen-4-ol ร้อยละ 12.08 safrole ร้อยละ 10.32 α-pinene ร้อยละ 9.7 β-phellandrene ร้อยละ 6.56 γ-terpinene ร้อยละ 5.93 β-pinene ร้อยละ 5.5 และอื่นๆ โดยสารประกอบรองเช่น eugenol ร้อยละ 1.88 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าสารประกอบหลัก

4.4 การศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

4.4.1 การหาความสามารถในการกำจัด 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical

จากผลการศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลของ DPPH เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ α-tocopherol และ Butylated hydroxyltoluene (BHT) พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลของ DPPH ดีที่สุดคือน้ำมันอบเชย โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำจัดอนุมูลของ DPPH ดีรองลงมา คือ น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอม ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 3.93 และ 5.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 4.1) สำหรับน้ำมันขมิ้นอ้อย น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันกระทือ น้ำมันเทียนเร่วและน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนพบว่าต้องใช้ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมในการที่จะกำจัดอนุมูลของ DPPH ได้ร้อยละ 50 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 47.85, 86.88, 110.43, 119.8 และ 128.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารมาตรฐาน α-tocopherol และ BHT ยังคงเป็นสารที่มีสมบัติในการกำจัด DPPH radical ได้ดี โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.05 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4.4.2 β-carotene bleaching test

จากผลการศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β-carotene bleaching test เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิด คือ α-tocopherol และ Butylated hydroxyltoluene (BHT) พบว่าน้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันพริกหอม น้ำมันอบเชย และน้ำมันเทียนสัตตบุษย์มีสมบัติต้านออกซิเดชันได้ดี (รูปที่ 4.2) โดยน้ำมันจันทน์เทศมีสมบัติในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ดีที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) เท่ากับร้อยละ 68.52 แต่ยังคงมีสมบัติดีไม่เท่ากับสารมาตรฐาน α-tocopherol และ BHT ซึ่งมีค่า antioxidant activity สูงถึงร้อยละ 89.94 และ 87.18 ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยที่มีสมบัติดีรองลงมาคือ น้ำมันพริกหอม น้ำมันอบเชย และน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ มีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับร้อยละ 66.16, 61.46 และ 60.91 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำมันขมิ้นอ้อย น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน น้ำมันกระทือ และน้ำมันเร่วมีสมบัติในการต้านออกซิเดชันได้ไม่ดีเท่ากับน้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันพริกหอมและน้ำมันอบเชย โดยมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ น้อยกว่าร้อยละ 50 (รูปที่ 4.2)

4.4.3 Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

จากผลการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี FRAP พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่มีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ได้ดีที่สุด คือ น้ำมันอบเชย โดยมีค่าความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 2.11 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม (รูปที่ 4.3) ซึ่งหมายความว่าน้ำมัน 1 มิลลิกรัมสามารถเปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) ในปริมาณ 2.11 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน 2 ชนิดที่ใช้ทดสอบ (α-tocopherol และ BHT) พบว่าค่าที่ได้ใกล้เคียงกับ BHT คือ 2.41 มิลลิโมลาร์ แต่ยังดีไม่เท่ากับ α-tocopherol ซึ่งมีความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ดีมากที่สุด โดยสามารถทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ได้ถึง 7.44 มิลลิโมลาร์ต่อสาร 1 มิลลิกรัม สำหรับน้ำมันพริกหอม น้ำมันจันทน์เทศ มีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ได้ดีใกล้เคียงกัน ทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ได้ 0.26 และ 0.22 มิลลิโมลาร์ต่อสาร 1 มิลลิกรัม น้ำมันที่มีสมบัติในการเป็นรีดิวซ์ที่ดีรองลงมา คือ น้ำมันขมิ้นอ้อย น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ น้ำมันกระทือ และน้ำมันเร่ว โดยเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ เท่ากับ 0.17, 0.15, 0.14 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ต่อสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 มิลลิกรัม ตามลำดับ และพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ต่ำที่สุด คือ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ เพียง 0.02 มิลลิโมลาร์ต่อสาร 1 มิลลิกรัม

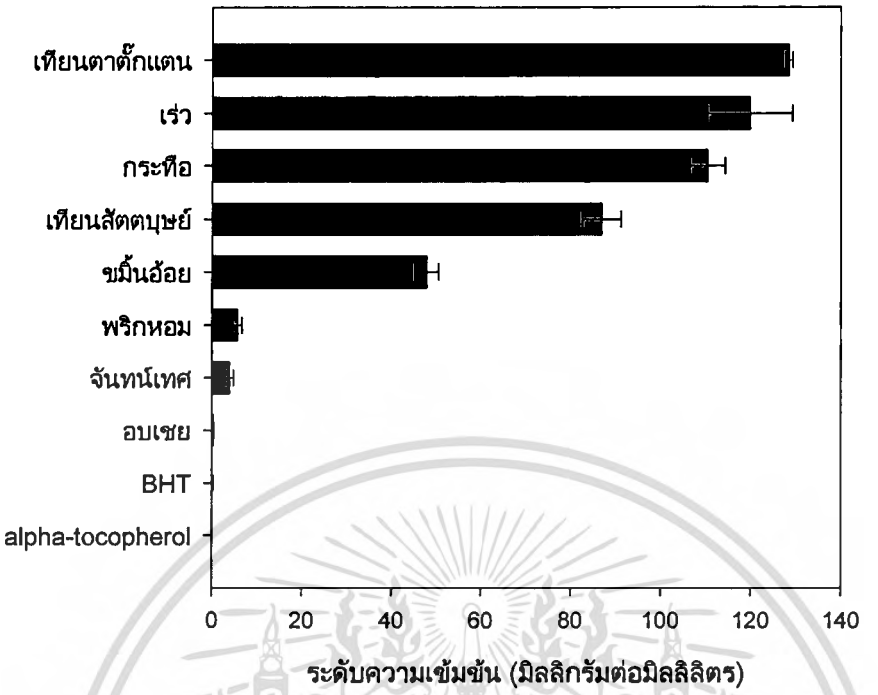
4.4.4 Superoxide anion-scavenging activity method

จากผลการทดสอบความสามารถในการกำจัด superoxide anion ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำมันอบเชยมีความสามารถในการกำจัด superoxide anion ได้ดีที่สุดโดยมีความสามารถในการกำจัดคิดเป็นร้อยละ 84.30 (รูปที่ 4.4) รองลงมา คือ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ซึ่งมีค่าการกำจัดคิดเป็นร้อยละ 82.62 ซึ่งน้ำมันทั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการกำจัด superoxide anion ได้ดีกว่ากรดแอสคอร์บิก (ร้อยละ 82.40) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน สำหรับน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นๆพบว่ามีสามารถในการกำจัดที่ไม่แตกต่างกันมากนัก โดยน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนมีค่าการกำจัดคิดเป็นร้อยละ 80.83 รองลงมา คือ น้ำมันเร่ว น้ำมันกระทือ น้ำมันขมิ้นอ้อย น้ำมันพริกหอม และน้ำมันจันทน์เทศ โดยมีค่าการกำจัดคิดเป็นร้อยละ 80.55, 79.95, 79.46, 79.07 และ 78.28 ตามลำดับ (รูปที่ 4.4) สำหรับค่าการกำจัดอาจมีค่าเพิ่มขึ้นได้ถ้ามีการเพิ่มระดับความเข้มข้นซึ่งจะเห็นได้จากกรดแอสคอร์บิกที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะให้ค่าการกำจัดที่แตกต่างกัน โดยที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะให้ค่าการกำจัดที่มากกว่าที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ ร้อยละ 97.03 ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้ค่าการกำจัดเท่ากับ 82.40 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยอาจมีผลต่อค่าการกำจัด superoxide anion โดยเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นจะทำให้ค่าร้อยละของการกำจัดเพิ่มขึ้นด้วย

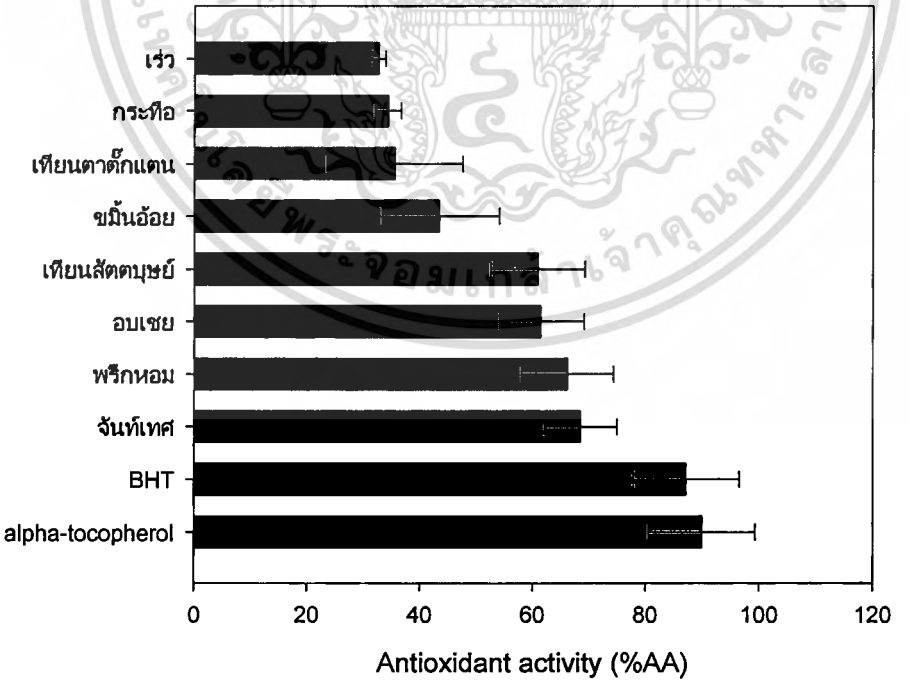
4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากที่สุด คือ น้ำมันอบเชย รองลงมาคือ น้ำมันพริกหอม น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนสัตตบุษย์ และน้ำมันขมิ้นอ้อย (รูปที่ 4.5) ซึ่งมีค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 140.9, 75.2, 51.54, 22.53 และ 15.26 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ สำหรับน้ำมันกระทือ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน และน้ำมันเร่วพบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดค่อนข้างน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเพียง 7.11, 2.96 และ 2.29 ไมโครกรัมกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

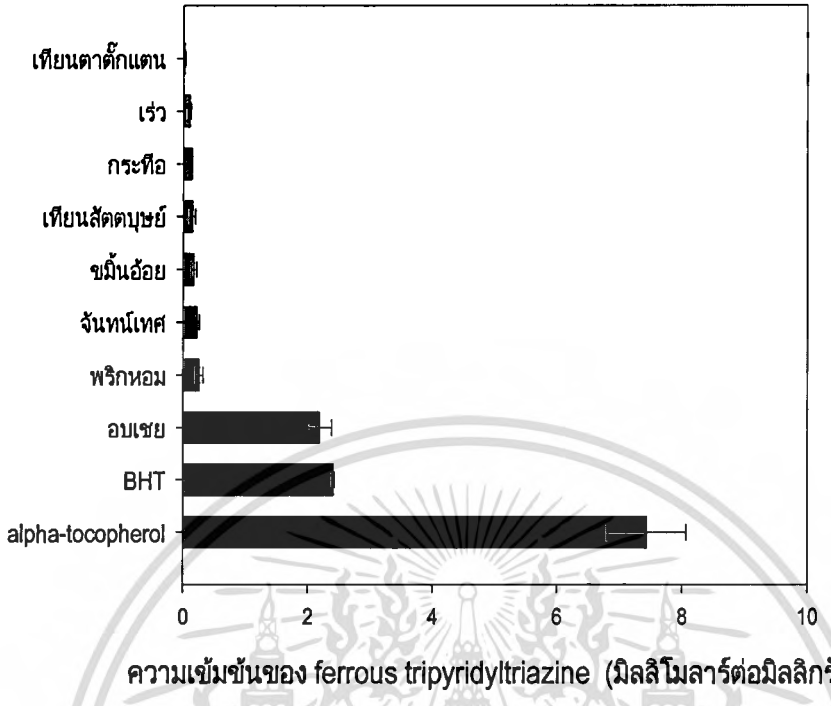


รูปที่ 4.1 ค่า Inhibition concentration 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ ด้วยวิธีการวัดความสามารถในการกำจัด 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl radical

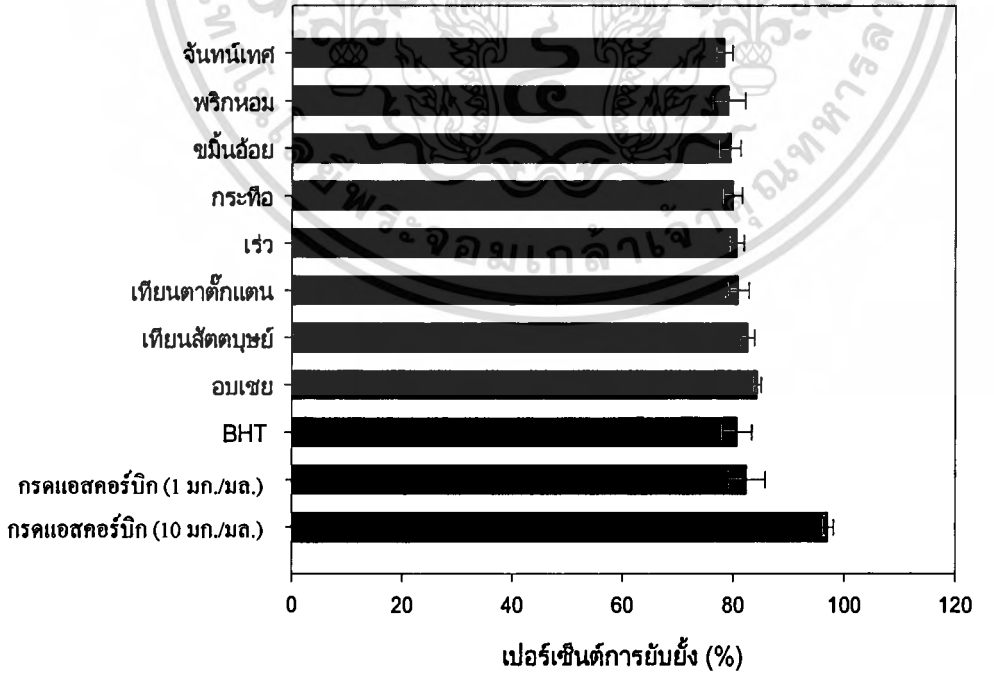


รูปที่ 4.2 ค่า Antioxidant activity (%) ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ ด้วยวิธี β-carotene bleaching test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

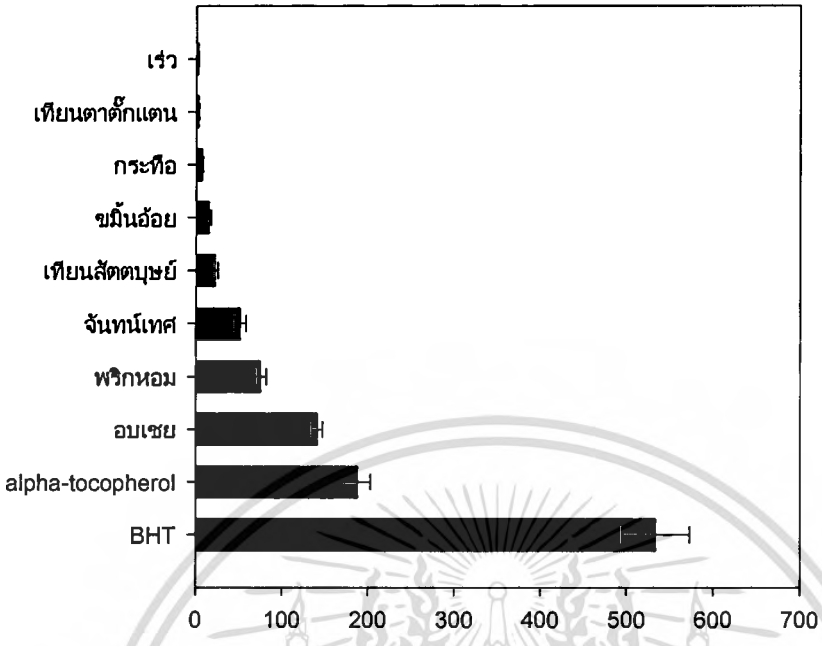


รูปที่ 4.3 ความสามารถในการรีดิวซ์ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power assay



รูปที่ 4.4 ความสามารถในการยับยั้ง superoxide anion ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Superoxide anion-scavenging activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ

จากการศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 8 ชนิดพบว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (รูปที่ 4.5) โดย Shan และคณะ (2005) ได้รายงานว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วย phenolic acid, phenolic volatile oil, phenolic diterpene และ flavonoid และในงานวิจัยของ Singh และคณะ (2007) ได้รายงานว่า cinnamaldehyde และ eugenol ซึ่งเป็นสารฟีนอลิกในกลุ่มของ volatile oil มีสมบัติในการกำจัด 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical เช่นเดียวกับคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันจันทน์เทศซึ่งอาจเป็นผลมาจากสาร methy eugenol ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกโดยเป็นส่วนประกอบใน volatile oil ที่พบในปริมาณน้อย (Singh และคณะ. 2005a) สำหรับน้ำมันพริกหอมซึ่งมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีอาจเป็นเพราะสารสำคัญในน้ำมันพริกหอมที่ทำให้สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยพบว่าในน้ำมันพริกหอมมีสารประกอบทั้งหมด 33 ชนิดซึ่งสารประกอบหลักได้แก่ limonene ร้อยละ 31.09 terpin-4-ol ร้อยละ 13.94 และ sabinene ร้อยละ 9.13 (Itthipanichpong และ Ruangrungsi. 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, Sal.* Rissen, *P. fluorescens* และ *L. monocytogenes*

จากการศึกษาอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยหลายชนิดร่วมกันที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด พบว่า คู่น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens, Sal.* Rissen และ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้ โดยเฉพาะเชื้อ *P. fluorescens, Sal.* Rissen และ *S. aureus* มีความไวต่อน้ำมันผสมชนิดนี้ ซึ่งพิจารณาได้จากค่า FIC index ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.5 (ตารางที่ 4.4) ให้ผลเป็น synergistic effect มีความหมายว่าเมื่อใช้น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศทดสอบการยับยั้งเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้จะให้ผลในการยับยั้งได้ดีเป็นทวีคูณกว่าการใช้น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันจันทน์เทศเพียงชนิดเดียว ในขณะที่เชื้อ *L. monocytogenes* มีความต้านทานต่อน้ำมันผสมชนิดนี้เนื่องจากให้ค่า FIC index มากกว่า 0.5 ให้ผลเป็น additive หรือ indifferent effect มีความหมายว่าการใช้น้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศเพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* นั้นให้ผลได้ดีกว่าเพียงเล็กน้อย หรืออาจไม่มีความแตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันจันทน์เทศเพียงชนิดเดียว

สำหรับคู่น้ำมันอบเชยและน้ำมันพริกหอมพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *P. fluorescens, Sal.* Rissen และ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้เช่นเดียวกันกับน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศ โดยเฉพาะเชื้อ *P. fluorescens, Sal.* Rissen และ *S. aureus* มีความไวต่อน้ำมันผสมชนิดนี้ ซึ่งพิจารณาได้จากค่า FIC index ที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.5 ในขณะที่เชื้อ *L. monocytogenes* มีความต้านทานต่อน้ำมันผสมชนิดนี้เนื่องจากให้ค่า FIC index มากกว่า 0.5 แสดงว่าน้ำมันอบเชยเมื่อผสมกับน้ำมันพริกหอมให้ผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว และสำหรับคู่น้ำมันจันทน์เทศผสมกับน้ำมันพริกหอมพบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดได้ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้อาจบอกได้ว่าน้ำมันที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดมากที่สุด คือ น้ำมันอบเชย เนื่องจากคู่น้ำมันผสมที่มีน้ำมันอบเชยผสมอยู่จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดได้และใช้ระดับความเข้มข้นที่ค่อนข้างต่ำ คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อทำการทดลองโดยผสมน้ำมันอบเชยลงไป คือคู่ของน้ำมันจันทน์เทศผสมกับน้ำมันพริกหอมกลับไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดได้เลย

จากการทดลองนี้น้ำมันอบเชยจัดว่าเป็นน้ำมันที่มีประสิทธิภาพและให้ผลดีในการผสมกับน้ำมันชนิดอื่นๆ เนื่องจากสามารถใช้ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าน้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอม ซึ่งสารสำคัญที่มีในน้ำมันอบเชยที่พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ซินนามอลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) ซึ่งได้มีรายงานว่าสารสำคัญนี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *B. cereus, Bacillus subtilis, S. aureus, E. coli, Salmonella typhi, P. aeroginosa* (Singh และคณะ. 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และค่า FIC index (FICI) ของน้ำมันอบเชย จันทน์เทศ และพริกหอม

	Listeria monocytogenes				*Pseudomonas fluorescens*				*Salmonella* Rissen				*Staphylococcus aureus*			
	MIC_a	MIC_c	FIC	FICI	MIC_a	MIC_c	FIC	FICI	MIC_a	MIC_c	FIC	FICI	MIC_a	MIC_c	FIC	FICI
อบเชย - จันทน์เทศ																
อบเชย	1	0.5	0.5	0.57	2	0.5	0.25	0.38	2	0.5	0.25	0.32	2	0.5	0.25	0.32
จันทน์เทศ	18	1.13	0.07		20	2.5	0.13		20	1.25	0.07		8	0.5	0.07	
อบเชย – พริกหอม																
อบเชย	1	0.5	0.5	0.57	2	0.5	0.25	0.32	2	0.5	0.25	0.32	2	0.5	0.25	0.32
พริกหอม	20	1.25	0.07		16	1	0.07		20	1.25	0.07		6	0.38	0.07	
จันทน์เทศ-พริกหอม																
จันทน์เทศ	18	-[a]	-	-	20	-	-	-	20	-	-	-	8	-	-	-
พริกหอม	20	-	-		16	-	-		20	-	-		6	-	-	

[a]ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

MIC_a = MIC ของตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดเดียว

MIC_c = MIC ของตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม

FIC = ค่า MIC ของตัวอย่างน้ำมันระเหยเมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันผสม / ค่า MIC ของตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยเพียงชนิดเดียว

FICI = FIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 1 + FIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 2

และ *L. monocytogenes* (Gill และ Holly. 2004) จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารสำคัญชนิดนี้จะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อทำการผสมกับน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น เช่น น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมอาจส่งเสริมให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเดิม

4.7 ผลของส่วนผสมอาหารต่อฤทธิ์ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองนี้ได้คัดเลือกน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศเพื่อนำมาศึกษาสมบัติการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมด 9 ชนิด ในอาหารจำลอง 3 ชนิด คือ starch agar, meat agar และ sausage agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 5 ชนิดมีความไวต่อน้ำมันอบเชยมากกว่าน้ำมันจันทน์เทศโดยค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันอบเชยในอาหารจำลองทั้ง 3 ชนิด (0.015-14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่ำกว่าค่า MIC ของน้ำมันจันทน์เทศ 14-22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.5) สำหรับผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยน้ำมันอบเชยในอาหารต่างชนิดกันพบว่า *Sal.* Rissen, *Sal.* Senftenberg, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* มีความไวต่อการถูกยับยั้งในอาหาร sausage agar มากที่สุด (MIC 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ *Sal.* Rissen, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยในอาหาร meat agar (MIC 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในอาหาร starch agar และ sausage agar ในขณะที่ *P. fluorescens* มีความต้านทานในอาหาร starch agar มากกว่าในอาหารชนิดอื่น โดยเฉพาะ *S.* Senftenberg มีค่า MIC ในอาหาร starch agar สูงถึง 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อพิจารณาผลของน้ำมันจันทน์เทศในอาหารจำลองต่างชนิดกันจะเห็นได้ว่าผลที่ได้มีความแตกต่างกันกับน้ำมันอบเชยโดยเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีความต้านทานต่อน้ำมันจันทน์เทศในอาหาร sausage agar (MIC 14-22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่าในอาหารอีกสองชนิด โดยแบคทีเรียที่มีความต้านทานมากที่สุดในอาหาร sausage agar คือ *S.* Rissen เนื่องจากมีค่า MIC สูงถึง 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับในอาหาร meat agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีค่า MIC เท่ากับ 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้น *S. aureus* ที่มีความต้านทานมากที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ในอาหาร starch agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมีความต้านทานต่อน้ำมันจันทน์เทศแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเนื่องจากมีค่า MIC ที่ใกล้เคียงกัน (MIC 6-8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

เมื่อพิจารณาค่า MIC ของน้ำมันอบเชยในอาหารจำลองทั้ง 3 ชนิด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชยได้ดีกว่าแบคทีเรียก่อโรคโดยเฉพาะ *L. lactis* และ *E. faecalis* ค่อนข้างมีความต้านทานต่อน้ำมันอบเชยในอาหาร meat agar มากที่สุด (MIC 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ขณะที่ *P. pentosaceus* และ *E. faecium* มีความต้านทานสูงสุดต่อน้ำมันอบเชยใน starch agar ในกรณีของน้ำมันจันทน์เทศพบว่า *P. pentosaceus, E. faecalis* และ*E. faecium* มีความต้านทานมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ค่า Minimum inhibitory concentration ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศใน starch agar, meat agar และ sausage agar

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ	Minimum inhibitory concentration (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	น้ำมันอบเชย			น้ำมันจันทน์เทศ		
	Starch agar	Meat agar	Sausage agar	Starch agar	Meat agar	Sausage agar
แบคทีเรียก่อโรค						
Salmonella Rissen	0.063	1	0.063	8	6	22
Salmonella Senftenberg	14	1	0.063	6	6	18
Staphylococcus aureus	0.25	1	0.063	6	10	14
Listeria monocytogenes	0.063	1	0.063	6	6	18
Pseudomonas fluorescens	0.063	0.015	ND	8	6	ND
แบคทีเรียแลคติก						
Pediococcus pentosaceus	4	2	1	4	6	22
Lactococcus lactis	0.063	2	0.063	4	6	8
Enterococcus faecalis	0.125	2	0.5	6	20	22
Enterococcus faecium	4	2	2	4	6	22

ND = not detected (ตรวจไม่พบ)

ที่สุดในอาหาร sausage agar โดยมีค่า MIC สูงถึง 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้เชื้อ *E. faecalis* ยังมีความต้านทานมากที่สุดในอาหาร meat agar โดยมีค่า MIC เท่ากับ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความไวต่อน้ำมันจันทน์เทศในอาหาร starch agar มากที่สุด (4-6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อพิจารณาผลของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศใน sausage agar ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจะเห็นได้ว่า *P. pentosaceus* และ *E. faecium* ค่อนข้างมีความต้านทานสูงต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดนี้ ฉะนั้นจึงเป็นผลดีหากนำเชื้อทั้งสองชนิดนี้มาเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ แต่เชื้อ *P. pentosaceus* มีความเหมาะสมกว่า เนื่องจากเป็นเชื้อที่ปกตินิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกหมัก (Jessen. 1995) สำหรับเชื้อ *E. faecium* ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อ เนื่องจากมีรายงานว่าเป็นเชื้อก่อโรคในมนุษย์ (Devriese และ Pot. 1995) ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *P. pentosaceus* สำหรับเป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกที่มีการเติมน้ำมันหอมระเหยในการทดลองขั้นต่อไป

จากการศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยน้ำมันอบเชยในอาหาร meat agar แสดงให้เห็นว่า *Sal.* Rissen, *S. aureus*, *L. monocytogenes, L. lactis* และ *E. faecalis* ค่อนข้างมีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันอบเชย อาจเป็นเพราะในอาหารชนิดนี้ประกอบด้วย beef extract ซึ่งเป็นส่วนผสมอาหารที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลัก และมีสัดส่วนที่สูงกว่าประกอบกับไม่มีสารยับยั้งชนิดอื่นเป็นส่วนผสมเช่นเดียวกับใน sausage agar ซึ่ง Jay และคณะ (2005) กล่าวว่าเนื้อวัวประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 19.5 ไขมันร้อยละ 11 เถ้าร้อยละ 1.0 และน้ำร้อยละ 69 โดยโปรตีนอาจมีคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์จากการถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหยได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Juven และคณะ (1993) ที่พบว่า การเติม bovine serum albumin ลงในอาหาร nutrient agar และ minimal medium จะช่วยป้องกัน *Salmonella* Typhimurium จากการถูกยับยั้งโดย thymol ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในน้ำมันไทม์ได้ โดยปกติสารประกอบฟีนอลิกในน้ำมันหอมระเหยจะเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่เมมเบรนของเซลล์แบคทีเรียเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง การเติม bovine serum albumin ซึ่งเป็นโปรตีนลงไปในอาหารจะช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับโปรตีนที่เซลล์เมมเบรนได้ โดยสารประกอบฟีนอลิกจะเข้าจับกับหมู่อะมิโนและหมู่ไฮดรอกซิลเอมีนของ bovine serum albumin ที่เติมลงไปจึงช่วยให้เซลล์แบคทีเรียรอดชีวิตจากน้ำมันหอมระเหยได้ นอกจากนี้บางครั้งยังพบว่าจุลินทรีย์บางชนิดที่ใช้ทดสอบมีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหยของน้ำมันจันทน์เทศใน sausage agar มากที่สุด อาจเป็นเพราะใน sausage agar มีไขมันเป็นส่วนประกอบมากกว่าในอาหารอีกสองชนิด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Singh และคณะ (2003) ซึ่งได้รายงานว่าน้ำมันไทม์ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตรสามารถลดจำนวนแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพในฮอทดอกที่ไม่มีไขมันและฮอทดอกที่มีไขมันต่ำ แต่กลับมีประสิทธิภาพต่ำในฮอทดอกที่มีไขมันสูง เช่นเดียวกับที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้มากกว่า 1.3 log CFU ต่อกรัมในฮอท

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดอกที่ไม่มีไขมัน แต่กลับมีประสิทธิภาพน้อยในการยับยั้งในฮอทดอกที่มีไขมันต่ำและฮอท ดอกที่มีไขมันสูง

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร sausage agar โดยน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ พบว่าค่า MIC ของน้ำมันจันทน์เทศต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมีค่าค่อนข้างสูง แต่ในน้ำมันอบเชยกลับให้ผลที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะสาร active components ที่เป็นองค์ประกอบหลักในอบเชย คือ cinnamaldehyde (ร้อยละ 75) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีเช่นเดียวกับการรายงานของ Gupta และคณะ. (2006) และ Prabusseenivasan และคณะ (2006) และยังพบว่าสาร eugenol (ร้อยละ 2.2) และ linalool (ร้อยละ 2.4) ที่มีในน้ำมันอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *Sal.* Typhimurium และ *L. monocytogenes* ได้เช่นกัน (Kim และคณะ. 1995) Dorman และ Deans (2000) ได้กล่าวว่าองค์ประกอบ โครงสร้างและหมู่ฟังก์ชัน (functional group) มีบทบาทสำคัญต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยปกติสารประกอบที่มีหมู่ฟีนอลิกมักจะมีประสิทธิภาพที่สุด นอกจากองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกันแล้ว สภาพแวดล้อมในอาหารที่ทดสอบ เช่น โซเดียมคลอไรด์ ค่าพีเอช โปรตีนหรือไขมัน อาจมีผลส่งเสริมหรือต่อต้านประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เช่นกัน (Burt. 2004; Gutierrez และคณะ. 2008) การมีเกลือเป็นส่วนผสมของอาหารประกอบกับค่าพีเอชที่ต่ำใน sausage agar อาจช่วยเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยน้ำมันอบเชย Tassou และคณะ (1995) ได้ทดสอบน้ำมันมิ้นท์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ผสมในอาหารที่มีเกลืออยู่ด้วยพบว่ามีผลกระทบอย่างรุนแรงต่อการเจริญของ *Salmonella* Enteritidis ซึ่งเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันระหว่างเกลือและน้ำมันมิ้นท์ นอกจากนี้ Gutierrez และคณะ (2009) พบว่าค่าพีเอชต่ำ (พีเอช 5) มีผลช่วยเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในอาหาร Tryptic Soy Broth

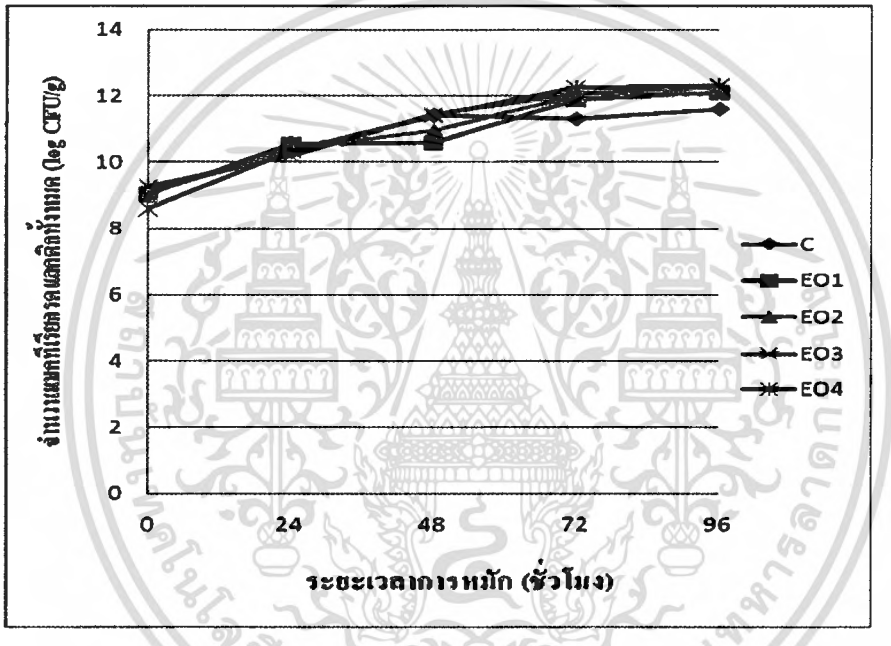
4.8 ผลของน้ำมันหอมระเหยผสมในการต้านจุลินทรีย์และชะลอปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

4.8.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่างการหมัก

จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยผสมของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเวลาหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง พบว่าในไส้กรอกทุกทรีทเมนต์มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 0.92-1.74 log CFU ต่อกรัม และเมื่อระยะเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ไส้กรอกทรีทเมนต์ที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม (EO1) และไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม (EO2) มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (0.52 และ 0.14 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ) ในขณะที่ไส้กรอกทรีทเมนต์อื่นๆมีจำนวนจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นประมาณ 1 log CFU ต่อกรัม โดยเมื่อระยะการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในชุดควบคุมลดลงเล็กน้อยประมาณ 0.11 log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.6) และเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 96 ชั่วโมง ในขณะที่ไส้กรอกที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมทั้ง 4 ทรีทเมนต์มีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึง 96 ชั่วโมงของระยะเวลาการหมักซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นอยู่ในช่วง 3.03-3.74 log CFU ต่อกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้น จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในไส้กรอกแต่ละทรีทเมนต์ที่ทุกๆช่วงของระยะเวลาการหมักไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

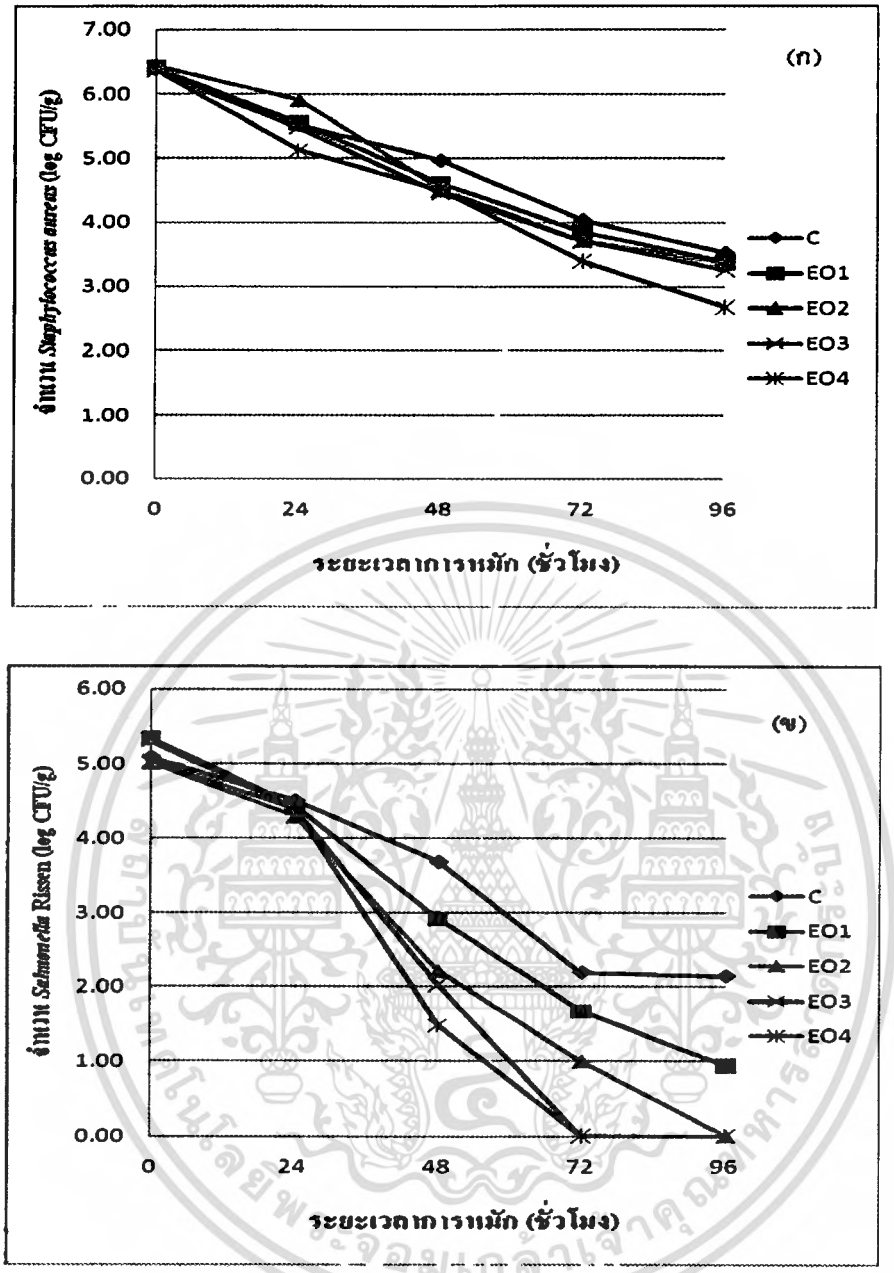


รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (C คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย; EO1 คือ น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม; EO2คือ น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม; EO3 คือ น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม; EO4 คือ น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม)

4.8.2 การเปลี่ยนแปลงจำนวน *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Rissen ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่างการหมัก

สำหรับการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อพบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง ไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด (EO4) มีจำนวนเชื้อ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 จำนวน *Staphylococcus aureus* (ก) และ *Salmonella* Rissen (ข) ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (C คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย; EO1 คือ น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม; EO2 คือ น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม; EO3 คือ น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม; EO4 คือ น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม)

แบคทีเรียลดลงมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไส้กรอกทรีทเมนต์อื่น คือ ลดลง 1.26 log CFU ต่อกรัม (รูปที่ 4.7 ก) จากนั้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ทรีทเมนต์ที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมทุกทรีทเมนต์มีจำนวนเชื้อ *S. aureus* ลดลงขึ้นตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้นโดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวน *S. aureus* ในไส้กรอกแต่ละทรีทเมนต์ที่เติมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิด (P>0.05) รวมทั้งในชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยผสม ทั้งที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมงของการหมัก และเมื่อหมักจนครบ 96 ชั่วโมงพบว่าตัวอย่างไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด (EO4) มีจำนวน *S. aureus* ลดลงมากกว่าไส้กรอกทรีทเมนต์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยมีจำนวน *S. aureus* ลดลงเท่ากับ 3.70 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่ไส้กรอกทรีทเมนต์อื่นๆมีจำนวน *S. aureus* ลดลง 2.89-3.13 log CFU ต่อกรัมเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวน *S. aureus* เริ่มต้น

สำหรับเชื้อ *Sal.* Rissen พบว่าเมื่อหมักไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงจำนวนเชื้อ *Sal.* Rissen ในไส้กรอกทุกทรีทเมนต์เริ่มมีจำนวนลดลงอยู่ในช่วง 4.29-4.50 log CFU ต่อกรัม และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศที่ทุกระดับความเข้มข้น (EO1, EO2, EO3 และ EO4) มีจำนวนจุลินทรีย์ *Sal.* Rissen ลดลงมากกว่าในไส้กรอกชุดควบคุมที่ทุกช่วงเวลาของการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (รูป4.7 ข) โดยจำนวน *Sal.* Rissen ในไส้กรอกทรีทเมนต์ที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด (EO4) ลดลงเร็วที่สุด ซึ่งพบว่า *Sal.* Rissen รอดชีวิตน้อยที่สุดคือ 1.48 log CFU ต่อกรัมหลังจากหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเมื่อหมักครบระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็ม (EO3) และน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็ม (EO4) มีจำนวน *Sal.* Rissen จนไม่สามารถตรวจพบได้ เมื่อหมักจนครบระยะเวลา 96 ชั่วโมง ไส้กรอกที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมเกือบทุกทรีทเมนต์มีจำนวน *Sal.* Rissen ลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้ ยกเว้นไส้กรอกทรีทเมนต์ที่เติมน้ำมันอบเชยในระดับความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ 125 พีพีเอ็ม (EO1) ยังคงมี *Sal.* Rissen รอดชีวิต คือมีจำนวน 0.95 log CFU ต่อกรัม แต่ยังมีจำนวนน้อยกว่าไส้กรอกชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย คือ มีจำนวน *Sal.* Rissen 2.14 log CFU ต่อกรัม

4.8.3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่างการหมัก

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำหอมระเหยผสมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกับชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมพบว่าค่าพีเอชของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงระยะ 24 ชั่วโมงของการหมัก (ตารางที่ 4.6) และเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นค่าพีเอชของไส้กรอกในแต่ละทรีทเมนต์มีค่าลดลงเล็กน้อย โดยเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชในทุกทรีทเมนต์ลดลงอยู่ในช่วง 4.23-4.28 แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างค่าพีเอชของไส้กรอกแต่ละทรีทเมนต์ที่แต่ละช่วงเวลาของการหมักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศที่ใช้ในการทดลองในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเป็นค่าที่มีความสัมพันธ์กับค่า MIC ที่ได้จากการทดลองในอาหาร sausage agar โดยน้ำมันอบเชยได้เพิ่มค่าความเข้มข้นเป็นจำนวน 2, 4, 8 และ 16 เท่าของค่า MIC โดย shelef (1983) ได้กล่าวว่าการที่จะทำให้ได้ผลการยับยั้งแบคทีเรียได้เช่นเดียวกับการศึกษาในห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องเพิ่มระดับความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการหมักซึ่งมีผลทำให้พีเอชของไส้กรอกลดลง และยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เช่น *Salmonella* sp., *Listeria* sp. *S. aureus*, *B. cereus* และ *Clostridium botilinum* นอกจากนี้การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของกรดแลคติกจะมีประสิทธิภาพดีในอาหารที่มีค่าพีเอชต่ำ โดย Holzapfel (1998) ได้กล่าวว่าการลดลงอย่างรวดเร็วของค่าพีเอชในไส้กรอกหมักโดยมีค่าต่ำกว่า 5.3 จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp. และ *S. aureus* ได้ดีซึ่งตรงกับผลการทดลองในครั้งนี้ กรดแลคติกเป็นกรดอ่อนที่สามารถแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออนและส่วนของกรดที่ไม่แตกตัว โดยส่วนของกรดที่ไม่แตกตัวจะมีคุณสมบัติในการละลายได้ในไขมันซึ่งจะแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์โดยผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และเกิดการแตกตัวขึ้นภายในเซลล์ส่งผลให้มีความเป็นกรดสูงและทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมช้าลง (Holzapfel. 1998; Brul และ Coote. 1999; Ouwehand และ Vesterlund. 2004) ซึ่งจะเห็นได้จากการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าเชื้อ *S. aureus* และ *Sal.* Rissen ลดลงในไส้กรอกทุกทรีทเมนต์อันเนื่องมาจากค่าพีเอชที่ลดลงและผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ได้จากการหมักส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่สำหรับไส้กรอกที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมพบว่าจำนวนของ *S. aureus* และ *Sal.* Rissen จะลดลงมากกว่าในชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย โดย Holley และ Patel (2005) ได้กล่าวว่าค่าพีเอชของอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อกิจกรรมของน้ำมันหอมระเหย ในสภาพที่มีพีเอชต่ำ น้ำมันหอมระเหยบางชนิด เช่น น้ำมันไทม์และ phenolic oleuropein จะมีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) มากขึ้นทำให้ละลายได้ดีมากขึ้นในส่วนที่เป็นไขมันของอาหาร และสามารถละลายได้ง่ายขึ้นในส่วนที่เป็นไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งจะช่วยส่งเสริมกิจกรรมในการต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ดีขึ้น จากผลทดลองในครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Sal.* Rissen มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วกว่า *S. aureus* โดยปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้องกับการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วของ *Sal.* Rissen คือ โครงสร้างของผนังเซลล์ สำหรับ *Sal.* Rissen ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีโครงสร้างของผนังเซลล์เป็นไขมันมากถึงร้อยละ 11-22 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งแตกต่างจาก *S. aureus* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่โครงสร้างของผนังเซลล์เป็นเพปติโดไกลเคน (น้ำตาลและกรดอะมิโน) (นงลักษณ์และปรีชา, 2550) ประกอบกับค่าพีเอชในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่มีค่าลดลงเรื่อยๆตลอดระยะเวลาการหมักจึงอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เชื้อ *Sal.* Rissen มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหยได้น้อยกว่า *S. aureus* ทำให้ปริมาณเชื้อ ของ *Sal.* Rissen ลดลงมากกว่า

สำหรับการทดลองในครั้งนี้พบว่าน้ำมันหอมระเหยไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเห็นได้ชัดว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นและส่งผลให้พีเอชลดลงชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไม่ได้ถูกยับยั้งโดยน้ำมันหอมระเหย แต่ยังสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อยๆทำให้เกิดการหมักไส้กรอกได้ซึ่ง Jay และคณะ (2005) ได้กล่าวไว้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีความต้านทานต่อเครื่องเทศมากที่สุด และสอดคล้องกับการทดลองของ Darmadji และคณะ (1993) ที่ได้พบว่ากระเทียมและผักชีสามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* และ *Pseudomonas fragi* ในขณะที่ไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *P. pentosaceus* และ *L. plantarum*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8.4 การเปลี่ยนแปลงค่า TBARS ของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่างการเก็บรักษา

ในการเก็บรักษาไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่ทดลองเติมน้ำมันหอมระเหยผสมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 27 วัน พบว่าหลังจากเก็บรักษาไส้กรอกเป็นเวลา 9 วัน ไส้กรอกทุกทรีทเมนต์มีค่า TBARS ค่อยๆลดลง (ตารางที่ 4.7) โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จนเมื่อระยะการเก็บรักษาครบ 18 วันค่า TBARS ในชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมมีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 0.34 มิลลิกรัมมาลโลนาลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม เป็น 0.41 มิลลิกรัมมาลโลนาลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม และเพิ่มขึ้นต่อเนื่องเป็น 0.46 มิลลิกรัมมาลโลนาลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมเมื่อมีระยะการเก็บรักษาครบ 27 วัน ในขณะที่ไส้กรอกที่เติมน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆมีค่า TBARS ค่อยๆลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งวันที่ 27 ของการเก็บรักษาไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็มต่ำสุด (EO1) มีค่า TBARS เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 0.37 มิลลิกรัมมาลโลนาลดีไฮด์ต่อกิโลกรัมเป็น 0.40 มิลลิกรัมมาลโลนาลดีไฮด์ต่อกิโลกรัม แต่สำหรับไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็ม (EO2) ไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีเอ็ม (EO3) และไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็ม (EO4) พบว่าค่า TRABS ยังคงลดลงอีกในวันที่ 27 ของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อทุกๆทรีทเมนต์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทรีทเมนต์	ค่า TBARS[a] (mg MDA/kg) ± SD					
	วันที่ 0 (ของการผลิต)	วันที่ 0 (ของการเก็บรักษา)	วันที่ 2	วันที่ 9	วันที่ 18	วันที่ 27
C[c]	1.21 ± 0.49A[b]	0.69 ± 0.47A	0.38 ± 0.09A	0.34 ± 0.10A	0.41 ± 0.10A	0.46 ± 0.12A
EO1[d]	1.31 ± 0.83A	0.80 ± 0.36A	0.53 ± 0.21A	0.40 ± 0.25A	0.37 ± 0.18A	0.40 ± 0.09A
EO2[e]	1.66 ± 0.67A	0.82 ± 0.44A	0.43 ± 0.18A	0.36 ± 0.19A	0.36 ± 0.10A	0.35 ± 0.03A
EO3[f]	1.78 ± 1.02A	0.88 ± 0.32A	0.54 ± 0.35A	0.45 ± 0.23A	0.42 ± 0.23A	0.41 ± 0.05A
EO4[g]	2.15 ± 1.10A	1.14 ± 0.40A	0.76 ± 0.32A	0.60 ± 0.31A	0.55 ± 0.14A	0.39 ± 0.02A

[a] ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

[b] ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

[c] ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย)

[d] เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็ม และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม

[e] เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็ม และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม

[f] เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็ม และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม

[g] เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็ม และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม

จากผลการศึกษาการต้านออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศพบว่าน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศมีผลต่อการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในไส้กรอก ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ได้พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Botsoglou และคณะ (2002) ได้รายงานว่าการเติมน้ำมันออริกาโนที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมลงในเนื้อวัวดิบและเนื้อวัวที่ปรุงสุกสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ และยังมีรายงานว่าน้ำมันจากดอกจันทน์เทศสามารถลดการหืนในมันหมูได้โดยช่วยชะลอการเกิด autooxidation ระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวในมันหมูกับออกซิเจนในอากาศ (Hirasa และ Takemasa. 1998) นอกจากน้ำมันหอมระเหยจะช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้แล้ว ยังอาจมีปัจจัยอื่นที่ช่วยลดการเกิด oxidative rancidity ได้ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย เช่น กรดแลคติกที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการหมักไส้กรอกเป็นเวลา 2 วันก่อนทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน (ค่าพีเอชประมาณ 4.4-4.5) โดย Naveena และคณะ (2006) ได้พบว่าการจุ่มเนื้อกระบือลงในน้ำมันกานพลูร่วมกับกรดแลคติกและทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะสามารถลดค่า TBARS ได้อย่างมีประสิทธิภาพได้ดี ในขณะที่เนื้อกระบือที่จุ่มกรดแลคติกเพียงอย่างเดียวสามารถลดค่า TBARS ได้เช่นกันแต่ไม่ดีเท่ากับการใช้ร่วมกับน้ำมันกานพลู ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าค่า TBARS ในชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยมีค่าลดลงในช่วง 9 วันแรกของการเก็บรักษา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากกรดแลคติกที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก นอกจากนี้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้อาจมีผลต่อการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันด้วย สำหรับผลการทดลองนี้พบว่าการเติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นสูง คือ 252, 504 และ 1008 พีพีเอ็มร่วมกับน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็มจะสามารถลดค่า TBARS ได้ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 27 วัน ในขณะที่การเติมน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด คือ 126 พีพีเอ็มสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันได้เพียงแค่ 18 วันของการเก็บรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Estévez และ Cava (2006) ที่รายงานว่าระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยมีผลต่อความคงตัวของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยทดลองเติมน้ำมันโรสแมรี่ในไส้กรอก frankfurter พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำมันโรสแมรี่ที่ 300 และ 600 พีพีเอ็มสามารถลดการเกิด TBARS ได้ดีกว่าการเติมน้ำมันโรสแมรี่ที่ระดับความเข้มข้น 150 พีพีเอ็มซึ่งไม่สามารถลดการเกิด TBARS ได้

4.8.5 การเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

จากการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เก็บรักษาเป็นเวลา 27 วัน ในด้านสี พบว่าผู้ทดสอบชิมส่วนใหญ่ได้ให้คะแนนในด้านสีของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อในทุกทรีทเมนต์ว่ามีสีแดงผสมน้ำตาล และเมื่อพิจารณากลิ่นหืน พบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อชุดควบคุม ไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม (EO1) และไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม (EO2) ระหว่าง 2.15-2.43 ซึ่งหมายถึงมีกลิ่นหืนเล็กน้อย และไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม (EO3) และไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม (EO4) ได้คะแนน 1.72 เท่ากัน หมายถึงไม่มีกลิ่นหืน

ในด้านของความเปรี้ยวของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อเก็บรักษาครบ 27 วันพบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความเปรี้ยวของไส้กรอกที่มีการเติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม (EO3) มากที่สุด โดยมีความแตกต่างกับไส้กรอกควบคุมที่มีความเปรี้ยวน้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็ม (EO1) ไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็ม (EO2) และไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็ม (EO4) พบว่ามีความเปรี้ยวในระดับใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

เมื่อพิจารณาในด้านลักษณะเนื้อสัมผัสพบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อทุกทรีทเมนต์ว่ามีลักษณะเนื้อสัมผัสละเอียดน้อยถึงละเอียดปานกลางโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อพิจารณาในด้านความชอบรวมพบว่าผู้ทดสอบชิมให้คะแนนความชอบในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อในทุกทรีทเมนต์อยู่ในระดับชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง โดยไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม (EO1) มีคะแนนความชอบมากที่สุด

ตารางที่ 4.8 การประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อเก็บรักษาครบ 27 วัน

ทรีทเมนต์	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส[a] ± SD				
	สี	กลิ่นหืน	ความเปรี้ยว	ลักษณะเนื้อสัมผัส	ความชอบรวม
C[c]	3.65 + 0.35B[b]	2.15 + 0.14A	1.86 + 0.43B	3.15 + 0.72A	2.43 + 0.14A
EO1[d]	4.64 + 0.07A	2.22 + 0.22A	2.07 + 0.07AB	3.07 + 0.50A	2.65 + 0.21A
EO2[e]	4.22 + 0.08AB	2.43 + 0.72A	2.29 + 0.00AB	2.79 + 0.36A	2.00 + 0.14A
EO3[f]	4.37 + 0.23AB	1.72 + 0.58A	2.79 + 0.21A	2.79 + 0.50A	2.00 + 0.00A
EO4[g]	4.29 + 0.00AB	1.72 + 0.72A	2.29 + 0.00AB	2.57 + 0.40A	2.36 + 0.36A

[a]ค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง 2 ซ้ำ

[b]ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

[c]ชุดควบคุม (ไม่มีการเติมน้ำมันหอมระเหย)

[d]เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 126 พีพีเอ็ม และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม

[e]เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็ม และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม

[f]เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็ม และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม

[g]เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็ม และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาคุณสมบัติการการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศทั้ง 8 ชนิดพบว่า น้ำมันอบเชย น้ำมันพริกหอม น้ำมันจันทน์เทศ น้ำมันเทียนตาตั๊กแตน และน้ำมันเทียนสัตตบุษย์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ ได้ ในขณะที่น้ำมันกระทือ น้ำมันขมิ้นอ้อย และน้ำมันเร่วมีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศ และน้ำมันพริกหอมมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีเช่นกัน และเมื่อนำน้ำมันอบเชย น้ำมันจันทน์เทศและน้ำมันพริกหอมมาผสมกันเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์พบว่า คู่ของน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศและคู่ของน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันพริกหอมแสดงการเสริมฤทธิ์กัน (FICI < 0.5) ในการยับยั้งการเจริญของ *P. fluoreescens, Sal.* Rissen และ *S. aureus* และเมื่อคัดเลือกคู่ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศมาประยุกต์ใช้ในไส้กรอกเนื้อที่ได้มีการเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติกและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลงไป พบว่าไส้กรอกที่เติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็มสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Sal.* Rissen ได้ดีที่สุด โดยเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมงพบจำนวน *S. aureus* เท่ากับ 2.68 log CFU ต่อกรัม ในขณะที่ *Sal.* Rissen ไม่สามารถตรวจพบได้ การเติมน้ำมันหอมระเหยผสมลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อพบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* ซึ่งเป็นกล้าเชื้อในการหมักไส้กรอก นอกจากนี้น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 252 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม น้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 504 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม และน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1375 พีพีเอ็ม ยังช่วยชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันโดยพบว่ามีค่า TBARS ลดลงเรื่อยๆตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 27 วัน

จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำๆได้เมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อนำมาทดสอบในไส้กรอกพบว่าต้องใช้ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่าที่ทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งการที่ใช้ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สูงเกินไปมักทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับในกลิ่นและรสชาติ ดังนั้นจึงอาจมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ร่วมกับสารถนอมอาหารจากธรรมชาติชนิดอื่น เช่น กรดแลคติก หรืออาจใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้าง bacteriocins ได้ในปริมาณสูงเป็นกล้าเชื้อในการหมัก เพื่อที่จะช่วยลดระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยซึ่งจะทำให้ผู้บริโภคยอมรับได้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ฐิติรัตน์ ใจฉลาด. 2552. "การพัฒนากล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมัก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2550. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิระชา ศรีวงษ์. 2550. "การคัดเลือกและการพัฒนากล้าเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมัก." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พัชรี ตรีบวรกุศล และสุนิสา กิตติศรีโสภิต. 2550. "การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสดและไส้กรอกหมักของไทย." โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พัทรารินี มุนิลโพ. 2550. **การสกัดพืชหอมน้ำมันหอมระเหย.** นนทบุรี : พิมพ์ทอง.

พิสุทธิพร ฉ่ำใจ. 2537. **สมุนไพร สรรพคุณและประโยชน์เพื่อการนำไปใช้.** กรุงเทพฯ : ต้นธรรม.

Agaoglu, S., Dostbil, N. and Alemdar, S. 2007. "Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry." **Bulletin of the Veterinary Institutein Pulawy.** 51 : 53-57.

Al-Bayati, F.A. 2008. "Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts." **Journal of Ethnopharmacology.** 116 : 403-406.

Ali, S.M., Khan, A.A., Ahmed, I., Musaddiq, M., Ahmed, K.S., Polasa, H., Rao, L.V., Habibullah, C.M., Sechi, L.A. and Ahmed, N. 2005. "Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gartric pathogen *Helicobacter pylori*." **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.** 4 : 20-26.

Ali, S.S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A. and Bora, U. 2008. "Indian medicinal herbs as sources of antioxidants." **Food Research International.** 41 : 1-15.

Allen, J.C. and Hamilton, R.J. 1994. **Rancidity in Foods.** Great Britain : Blackie Academy and Professional.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K. 2001. "Methods for testing antioxidant activity." **Analyst.** 127 : 183-198.

Aruoma, O.I. 2003. "Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods." **Mutation Research.** 9 (20) : 523-524.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. "Biological effects of essential oils-A review." **Food and Chemical Toxicology.** 46 : 446-475.

Boonmar, S., Marnrim, N., Pornruangwong, S. and Bangtrakulnonth, A. 1997. "Contamination of *Salmonella* in chicken and pork products." **Kasetsart Journal (Natural Science).** 31 : 413-418.

Botsoglou, N.A., Christaki, E., Fletouris, D.J., Florou-Paneri, P. and Spais, A.B. 2002. "The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage." **Meat Science.** 62 : 259-265.

Brul, S. and Coote, P. 1999. "Review-preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanism." **International Journal of Food Microbiology.** 50 : 1-17.

Burt, S. 2004. "Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods – a review." **International Journal of Food Microbiology.** 94 : 223-253.

Collin, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M. 2001. **Collin and Lyne's Microbiology Methods.** New York : Oxford University.

Cowan, M.M. 1999. "Plant products as antimicrobial agents." **Clinical Microbiology Reviews.** 12 : 564-582.

Cowden, J.M., O'Mahony, M., Bartlett, C.L.R., Rana, B., Smyth, B., Lynch, D., Tillett, H., Ward, L., Roberts, D., Gilbert, R.J., Baird-Parker, A.C. and Kilsby, D.C. 1989. "A national outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 124 caused by contaminated salami sticks." **Epidemiology and Infection.** 103 : 219-225.

Darmadji, P., Izumimoto, M. and Kataoka, K. 1993. "Antibacterial effects of spices on fermented meat." **Journal of Food Science.** 83 : 9-15.

Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Laakso, I. and Hiltunen, R. 2007. "Chemical composition and antioxidant activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts." **LWT-Food Science and Technology.** 40 : 1655-1663.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Deans, S.G. 1991. Evaluation of antimicrobial activity of essential (volatile) oils. In H.F. Linskens and J.F. Jackson, **Essential Oils and Waxs** (pp. 309-320). Germany : Springer-Verlag.

Delaquis, PJ., Stanish, K., Girard, B. and Mazza, G. 2002. "Antimicrobial activity of individual and mixed fraction of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils." **International Journal of Food Microbiology**. 74 : 101-109.

Devriese, L.A. and Pot. B. 1995. The genus *Enterococcus*. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (pp.327-367). London. Blackie Academic and Professional.

Dorman, H.J.D. and Dean, S.G. 2000. "Antimicrobial agents from plants : antibacterial activity of plant volatile oils." **Journal of Applied Microbiology**. 88 : 308-316.

Dzudie, T., Kouebou, C.P., Essia-Ngang, J.J. and Mbofung, C.M.F. 2004. "Lipid sources and essential oils effects on quality and stability of beef patties." **Journal of Food Engineering.** 65 : 62-72.

Estévez, M. and Cava, R. 2006. "Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters." **Meat Science**. 72 : 348-355.

Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S. and Cava, R. 2007. "Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté." **LWT-Food Science and Technology.** 40 : 58-65.

Eyob, S., Martinsen, B.K., Tsegaye, A., Appelgren, M. and Skrede, G. 2008. "Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) P.C.M. Jansen)." **African Journal of Biotechnology.** 7 (15) : 2585-2592.

Gill, A.O. and Holley, R.A. 2004. "Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*." **Applied and Environmental Microbiology.** 70 : 5750-5755.

Gupta, C., Garg, A.P., Uniyal, R.C. and Kumari, A. 2008. "Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens." **African Journal of Microbiology Research.** 2 : 258-261.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gutierrez, J. and Barry-Ryan, C. 2009. "Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components." **Food Microbiogy.** 26 : 142-150.

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C. and Bourke, P. 2008. "The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients." **International Journal of Food Microbiology.** 124 : 91-97.

Hirasa, K. and Takemasa, M. 1998. **Spice Science and Technology.** New York : Marcel Dekker Inc.

Holley, R.A. and Patel, D. 2005. "Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials." **Food Microbiology.** 22 : 273-292.

Holzapfel, W.H. 1998. The gram-positive bacteria associated with meat and meat products. In A. Davies and R. Board, **The Microbiology of Meat and Poultry** (pp. 35-84). London : Blackie Academy and Professional.

Itthipanichpong, C. and Ruangrungsi, N. 2002. "Chemical compositions and pharmacological effects of essential oil from the fruit of *Zanthoxylum limonella*." **Journal of the Medical Association of Thailand.** 85 : S344-S354.

Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C. and Baerheim Svendsen, A. 1987. "Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspect of the test methods." **Planta Medica.** 53 : 395-398.

Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. **Modern Food Microbiology, 7th ed.** New York : Springer Science and Business Media, Inc.

Jessen, B. 1995. Starter cultures for meat fermentation. In G. Campbell-Platt and P.E. Cook, **Fermented Meats** (pp. 130-159). Glasgow : Blackie Academic and Professional.

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Stoyanova, A.S., Georgiev, E.V. and Damianova, S.T. 2003. "Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of long-time stored dill (*Anethum graveolens* L.) seeds from Bulgaria." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 51 : 3854-3857.

Juven, B.J., Kanner, J., Schved, F. and Weisslowicz, H. 1993. "Factors that interact with antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents." **Journal of Applied Bacteriology.** 76 : 626-631.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kalemba, D. and Kunicka, A. 2003. "Antibacterial and antifungal properties of essential oils." **Current Medicinal Chemistry.** 10 : 813-823.

Kim, J., Marshall, R. and Wei, C. 1995. "Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne phatogens." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 43 : 2839-2845.

Kirk, R.S. and Sawyer, R. 1991. **Pearson's Composition and Analysis of Foods.** Singapore : Longman Scientific and Technical.

Kosalec, I., Pepeljnjak, S. and Kustrak, D. 2005. "Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*)." **Acta Pharmaceutica.** 55 : 377-385.

Koutsoumanis, K., Lambropoulou, K. and Nychas, G.-J.E. 1999. "A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplement with a natural antimicrobial." **International Journal of Food Microbiology.** 49 : 63-74.

Kulisic, T.K., Radonic, A., Katalinic, V. and Milos, M. 2004. "Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil." **Food Chemistry**. 85 : 633-640.

Lado, C., Then, M., Varga, I., Szoke, E. and Szentmihályi, K. 2004. "Antioxidant property of volatile oils determined by the ferric reducing ability." **Zeitschrift für Naturforschung.** 56c : 354-358.

Liu, D.C., Tsau, R.T., Lin, Y.C., Jan, S.S. and Tan, F.J. 2009. "Effect of various levels of rosemary or Chinese mahogany on the quality of fresh chicken sausage during refrigerated storage." **Food Chemistry.** 117 : 106-113.

López-Malo, A. Palou, E. and Alzamora, S.M. 2005. Naturally occurring compounds-plant sources. In P. Michael Davidson, John N. Sofos and A.L. Branen, **Antimicrobials in Food** (pp. 429-451). New York : Taylor and Francis Group.

López, P., Sánchez, C., Batlle, R. and Nerín, C. 2005. "Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53 : 6939-6946.

Muller-Riebau, F., Berger, B. and Yegen, O. 1995. "Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 43 (8) : 2262-2266.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Natta, L., Orapin, K., Krittika, N. and Pantip, B. 2008. "Essential oils from Zingiberaceae for anti food-borne bacteria." **International Food Research Journal.** 15 : 337-346.

Naveena, B.M., Muthukumar, M., Sen, A.R., Babji, Y. and Murthy, T.R.K. 2006. "Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display." **Meat Science.** 74 : 409-415.

Nguefack, J., Leth, V., Zollo, P.H.A. and Mathur, S.B. 2004. "Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi." **International Journal of Food Microbiology.** 94 : 329-334.

Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. and Naghdibadi, H. 2007. "Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste." **Food Control.** 18 : 1518-1523.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. 2007. "Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7. *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*." **Food Control.** 18 : 414-420.

Ouwehand, A.C. and Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In S. Salminen, A.V. Wright and A. Ouwehand, **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Function Aspects** (pp. 375-395). New York : Marcel Dekker, Inc.

Pandit, V.A. and Shelef, L.A. 1994. "Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)." Food Microbiology. 11 : 57-63.

Parthasarathy, V.A., Kandiannan, K. and Srinivasan, V. 2008. **Organic Spices.** New Delhi : New India.

Peel, B., Bothwell, J., Simmons, G.C. and Frost, A. 1995. "A study of the number and phage patterns of *Staphylococcus aureus* in an abattoir." **Australian Veterinary Journal.** 51 : 126-130.

Politeo, O., Jukic, M. and Milos, M. 2006. "Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants." **Croatica Chemica Acta.** 79 : 545-552.

Pontello, M., Sodano, L., Nastasi, A., Mammina, C., Astuti, M.m Domenichini, M., Belluzzi, G., Soccini, E., Silvestri, M.G., Gatti, M., Gerosa, E. and Montagna, A. 1998. "A community-based outbreak of *Salmonella* enteric serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy." **Epidemiology and Infection.** 120 : 209-214.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. 2006. "In vitro antibacterial activity of some plant essential oils." **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 6 : 39.

Rajalakshmi, D. and Narasimhan, S. 1996. Sources and Methods of Evaluation. In D.L. Madhavi, S.S. Deshpande and D.K. Salunkhe, **Food antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives** (pp. 65-158). New York : Marcel Dekker.

Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D. and Milillo, M.A. 2007. "Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin." **Phytomedicine.** 14 : 727-732.

Rusenova, N. and Parvanov, P. 2009. "Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance." **Trakia Journal of Science.** 7 : 37-43.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M. and Bruni, R. 2005. "Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods." **Food Control.** 91 : 621-632.

Sahin, F., Güllüce, M., Daferera, D., Sökmen, A., Sökmen, A. and Polissiou, M. 2004. "Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey." **Food Control.** 15 : 549-557.

Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y. 2005. "Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha)." **Food Chemistry.** 89 : 569-575.

Senanayake, U.M., Lee, T.H. and Wills, R.B.H. 1978. "Volatile constituents of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) oils." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 26 : 822-824.

Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M. and Corke, H. 2005. "Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phonolic constituents." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 53 : 7749-7759.

Shelef, L.A. 1983. "Antimicrobial effects of spices." **Journal of Food Safety.** 6 : 29-44.

Shelef, L.A., Jyothi, E.K. and Bulgarelli, M.A. 1984. "Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods." **Journal of Food Science.** 49 : 737-740.

Shukla, H.S. and Tripathi, S.C. 1987. "Antifungal substance in the essential oil of anise (*Pimpinella anisum* L.)." **Agricultural and Biological Chemistry.** 51 : 1991-1993.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., Heluani, C. and Lampasona, M.P. 2008. "Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*." **Food and Chemical Toxicology.** 46 : 3295-3302.

Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C.S. and Catalan, C. 2005a. "Antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Myristica fragrans* Houtt. (aril part)." **Journal of Food Science.** 70 : M141-M148.

Singh, G., Maurya, S., Lampasona, M.P. and Catalan, C. 2005b. "Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxdative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52." **Journal of Food Science.** 70 (4) : M208-M215.

Singh, G., Maurya, S., Lampasona, M.P. and Catalan, C. 2007. "A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatiles oils, oleoresins and their constituents." **Food and Chemical Toxicology.** 45 : 1650-1661.

Singh, A., Singh, R.K., Bhunia, A.K. and Singh, N. 2003. "Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs." **LWT-Food Science and Technology.** 36 : 787-794.

Skandamis, P.N. and Nychas, G.-J.E. 2001. "Effect of oregano essential oil on microbiological and physic-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres." **Journal of Applied Microbiology.** 91 : 1011-1022.

Tabanca, N., Demirci, B., Ozek, T., Kirimer, N., Baser, K.H.C., Bedir, E., Khan, I.A. and Wedge, D.E. 2006. "Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of essential oils from *Pimpinella* species gathered from Central and Northern Turkey." **Journal of Chromatography A.** 1117 : 194-205.

Tassou, C.C., Drosinos, E.H., and Nychas, G.J.E. 1995. "Effect of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4°C and 10°C. **Journal of Applied Bacteriology.** 78 : 593-600.

Uyttendaele, M., Troy, P.D. and Debevere, J. 1999. "Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on Belgian retail market." **International Journal of Food Microbiology.** 53 : 75-80.

Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. 1995. **Meat and Meat Products: Technology, Chemistry and Microbiology.** London : Chapman and Hall.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J. and Pérez-Álvarez. 2009. "Effect of adding citrus waste water, thyme and oregano essential oil on the chemical, physical and sensory characteristic of bologna sausage." **Innovative Food Science and Emerging Technologies.** 10 : 655-660.

Vrinda Menon, K. and Garg, S.R. 2001. "Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese." **Food Microbiology.** 18 : 647-650.

Vuyst, L.D. and Vandamme, E.S. 1994. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and Application.** Great Britain : The Alden Press.

Wilson, B., Abraham, G. and Manju, V.S. 2005. "Antimicrobial activity of *Curcuma zedoaria* and *Curcuma malabarica* tubers." **Journal of Ethnopharmacology.** 99 : 147-151.

Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M., Gordon, M.H. and Raneva, V.G. 1999. "Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems." **Food Chemistry.** 64 : 59-66.

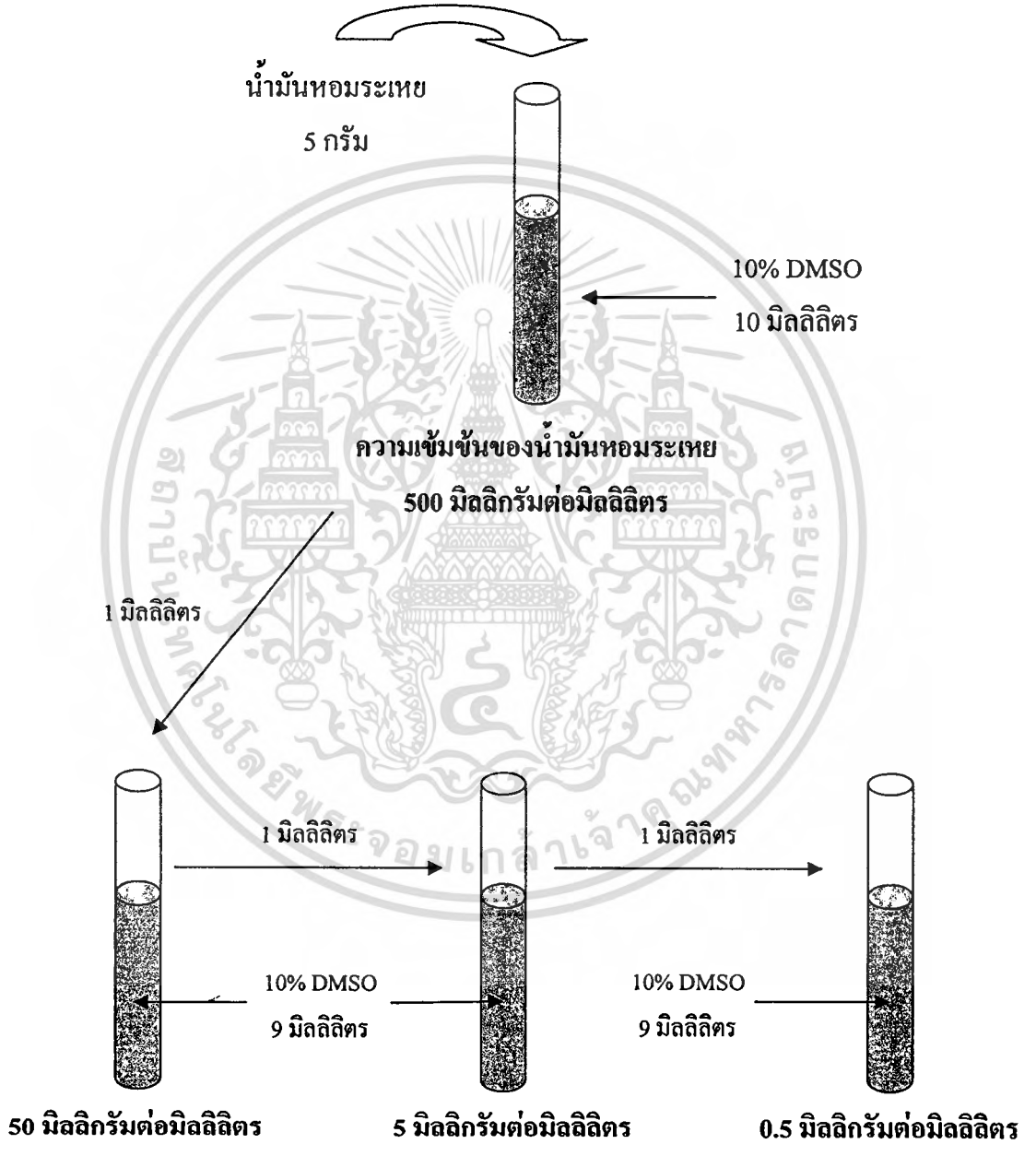
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมน้ำมันหอมระเหยสำหรับการหาความเข้มข้นต่ำสุด ในการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี Agar dilution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. วิธีการเตรียมน้ำมันหอมระเหยสำหรับการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum inhibition concentration, MIC) โดยวิธี Agar dilution

1.1 เตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆดังขั้นตอนต่อไปนี้



จากนั้นนำ stock solution ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆมาผสมกับน้ำกลั่นและอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบดังตารางที่ ก.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 การเตรียมน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นต่างๆกันเพื่อใช้ในการทดสอบหาค่า minimum inhibitory concentration

Stock ของน้ำมันหอมระเหย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	น้ำมันหอมระเหย มิลลิลิตร	น้ำกลั่น มิลลิลิตร	ปริมาตรอาหาร (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)
500	0.88	0.12	19	22
	0.8	0.2	19	20
	0.72	0.28	19	18
	0.64	0.36	19	16
	0.56	0.44	19	14
	0.48	0.52	19	12
	0.40	0.60	19	10
	0.32	0.68	19	8
	0.24	0.76	19	6
	0.16	0.84	19	4
50	0.8	0.2	19	2
	0.4	0.6	19	1
	0.2	0.8	19	0.5
5	1	0	19	0.25
	0.5	0.5	19	0.125
	0.252	0.748	19	0.063
	0.124	0.876	19	0.031
0.5	0.6	0.4	19	0.015
	0.312	0.688	19	0.0078

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีเพื่อใช้ในการวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ DPPH

การเตรียมสารละลาย DPPH ในเมทานอล ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ DPPH เท่ากับ 394.33 กรัมต่อโมล

และ 1 โมล เท่ากับ1000 มิลลิโมล

1000 มิลลิโมล มี DPPH 394.33 กรัม

ถ้า 0.1 มิลลิโมล มี DPPH 394.33 x 0.1 / 1000 = 0.0394 กรัม

ชั่งสาร DPPH 0.0394 กรัม ละลายใน methanol เล็กน้อยแล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ FRAP

2.1 acetate buffer ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์

ชั่ง $C_2H_3NaO_2 . 3H_2O$ 3.1 g ใน $C_2H_4O_2$ 16 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

2.2 สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

2.2.1 การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

เตรียมจากกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นโดยดูจากข้างขวด จะมี

ปริมาณเนื้อกรด 37 % น้ำหนัก/ปริมาตร

ความหนาแน่น 1.19 กรัมต่อลิตร

น้ำหนักโมเลกุล 36.5 กรัมต่อโมล

เริ่มจากหาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกในขวดก่อน จากสูตร

$C = 10dx / MW$

เมื่อ C = ความเข้มข้นหน่วยเป็น normal

d = ความหนาแน่น

x = %ปริมาณเนื้อกรด

จะได้ $C = (10 \times 1.19 \times 37) / 36.5 = 12.06$ N

เนื่องจาก 1 molarity กรดไฮโดรคลอริก เท่ากับ 1 normality กรดไฮโดรคลอริก

N ที่คำนวณได้จึงเท่ากับ 12.06 M

เตรียมสารด้วยวิธีการเจือจาง โดยใช้สูตร

$C_1V_1 = C_2V_2$

ต้องการเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ หรือ 0.04 โมลาร์ จากกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 12.06 โมลาร์ จะได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

V_1 = 0.04 x 1000 / 12.06

= 3.32 มิลลิลิตร

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกมา 3.32 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ใน volumetric flask 1000 มิลลิลิตรที่มีน้ำอยู่แล้ว แล้วค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2.2.2 สารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความ เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ TPTZ เท่ากับ 312.33 กรัมต่อโมล

1000 มิลลิโมล มีสาร TPTZ เท่ากับ 312.33 กรัม

ถ้า 10 มิลลิโมล มีสาร TPTZ เท่ากับ 312.33 x 10 / 1000 = 3.2133 กรัม

ชั่ง TPTZ 3.2133 กรัม ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

2.3 $FeCl_3 . 6H_2O$ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ $FeCl_3 . 6H_2O$ เท่ากับ 270.30 กรัมต่อโมล

1000 มิลลิโมล มีสาร $FeCl_3 . 6H_2O$ เท่ากับ 270.30 กรัม

ถ้า 20 มิลลิโมล มีสาร $FeCl_3 . 6H_2O$ เท่ากับ 270.30 x 20 / 1000 = 5.406 กรัม

ชั่ง $FeCl_3 . 6H_2O$ 5.406 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

2.4 การเตรียม standard curve ของ $FeSO_4 . 7H_2O$

- เตรียม $FeSO_4 . 7H_2O$ ในช่วงความเข้มข้น 0.047 – 10 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ $FeCl_3 . 6H_2O$ เท่ากับ 278.02 กรัมต่อโมล

$FeSO_4 . 7H_2O$ 1000 มิลลิโมล มีเนื้อสาร 278.02 กรัม

ถ้า $FeSO_4 . 7H_2O$ 10 มิลลิโมล มีเนื้อสาร 278.02 x 10 / 1000 = 2.7802 กรัม

เตรียมสารละลายปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ชั่ง $FeSO_4 . 7H_2O$ 2.7802 กรัม

ถ้าเตรียมสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร ชั่ง $FeSO_4 . 7H_2O$ 2.7802 x 10 / 1000 = 0.278 กรัม ดังนั้นสารละลาย $FeSO_4 . 7H_2O$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล ต้อง $FeSO_4 . 7H_2O$ 0.278 กรัม ละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางต่อเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นในช่วงที่ต้องการดังตารางที่ ข.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย $FeSO_4 . 7H_2O$

ความเข้มข้นของ stock solution (มิลลิโมล)	ปริมาตรของ stock solution (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของน้ำ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิโมล)
10	3	7	3
3	5	5	1.5
1.5	5	5	0.75
0.75	5	5	0.375
0.375	5	5	0.188
0.188	5	5	0.094
0.094	5	5	0.047

3. การเตรียม Standard curve ของ Gallic acid ความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัม

ชั่ง Gallic acid 0.2 กรัม ละลายในน้ำ 20 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือ 10000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ตารางที่ ข.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค

ความเข้มข้นของ stock solution (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรของ stock solution (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของน้ำ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
10000	1	9	1000
1000	1	9	100
100	1	9	10
10	1	9	1

4. การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ Superoxide anion-scavenging activity

4.1 สารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0

น้ำหนักโมเลกุลของ Na_2HPO_4 เท่ากับ 141.96 กรัมต่อโมล

น้ำหนักโมเลกุลของ $NaH_2PO_4 . H_20$ เท่ากับ 137.99 กรัมต่อโมล

4.1.1 สารละลายของ Na_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เตรียมได้โดยละลาย Na_2HPO_4 0.071 กรัม ในน้ำเล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 สารละลายของ NaH_2PO_4 . H_20 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เตรียมได้โดยละลาย NaH_2PO_4 . H_20 0.069 กรัม ในน้ำเล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 โดยผสมสารละลายของ Na_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 94 มิลลิลิตรและสารละลายของ NaH_2PO_4 . H_20 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

4.2 สารละลาย nitro-blue tetrazolium ความเข้มข้น 0.48 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0

น้ำหนักโมเลกุลของ nitro-blue tetrazolium เท่ากับ 817.64 กรัมต่อโมล

1000 มิลลิโมล มีสาร nitro-blue tetrazolium เท่ากับ 817.64 กรัม

ถ้า 0.48 มิลลิโมล มีสาร nitro-blue tetrazolium เท่ากับ 817.64 x 0.48 / 1000 = 0.39 กรัม

ชั่ง nitro-blue tetrazolium 0.39 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

4.3 สารละลาย xanthine ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0

น้ำหนักโมเลกุลของ xanthine เท่ากับ 152.11 กรัมต่อโมล

1000 มิลลิโมล มีสาร xanthine เท่ากับ 152.11 กรัม

ถ้า 0.8 มิลลิโมล มีสาร xanthine เท่ากับ 152.11 x 0.8 / 1000 = 0.12 กรัม

ชั่ง xanthine 0.12 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

4.4 สารละลาย sodium dodecyl sulphate ความเข้มข้น 69 มิลลิโมลาร์

น้ำหนักโมเลกุลของ sodium dodecyl sulphate เท่ากับ 288.38 กรัมต่อโมล

1000 มิลลิโมล มีสาร sodium dodecyl sulphate เท่ากับ 288.38 กรัม

ถ้า 69 มิลลิโมล มีสาร sodium dodecyl sulphate เท่ากับ 288.38 x 69 / 1000 = 19.9 กรัม

ชั่ง sodium dodecyl sulphate 19.9 กรัม ละลายในละลายในน้ำเล็กน้อยแล้วค่อยปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาค่าสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดสอบสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศได้ทำการศึกษาด้วยวิธีต่างๆกัน โดยวิธีต่างๆจะมีวิธีการคำนวณที่แตกต่างกัน ในที่นี้จะยกตัวอย่างน้ำมันอบเชยเป็นตัวอย่างแสดงการคำนวณในแต่ละวิธี ดังนี้

1. การหาค่า IC_{50} ด้วยวิธี DPPH assay

ในการคำนวณหาค่า IC_{50} ของน้ำมันอบเชยจะต้องหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมทั้งหมด 4 ระดับ ซึ่งในการทดสอบครั้งนี้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันอบเชยทั้ง 4 ระดับคือ 0.5, 0.25, 0.125 และ 0.063 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำค่าความเข้มข้นทั้ง 4 ระดับไปวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และทำให้เป็นค่าร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical จากสูตร

$$\%I = (Ao-As)/Ao \times 100$$

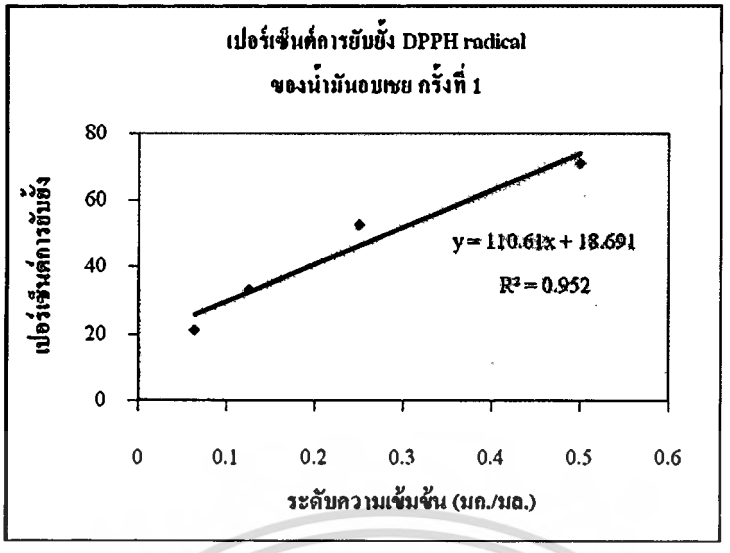
เมื่อ Ao คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เมทานอลแทนน้ำมันอบเชย) และ As คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยในแต่ระดับความเข้มข้น ซึ่งทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยจากผลการทดลองทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงและค่าร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical ดังตารางที่ ค.1

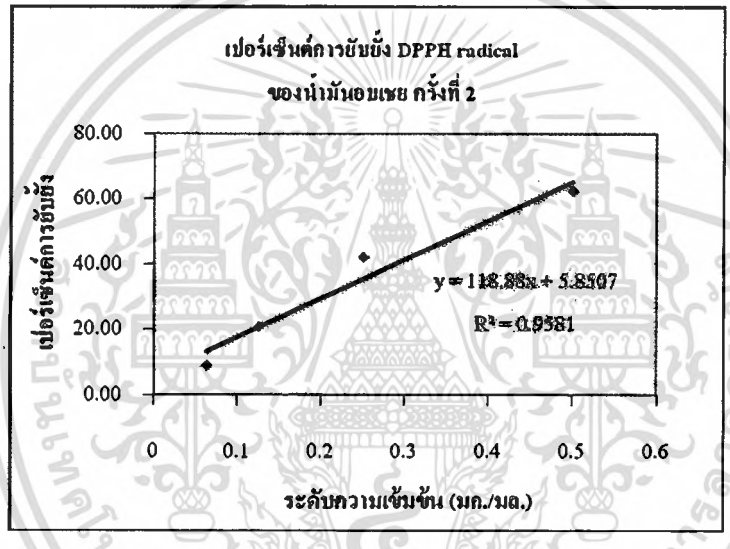
ตารางที่ ค.1 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical

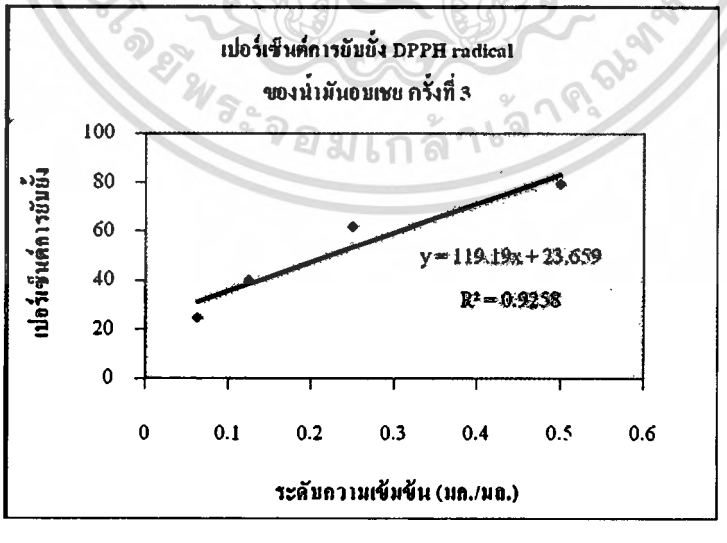
ความเข้มข้นของน้ำมันอบเชย (มก./มล.)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ค่าการดูดกลืนแสง	%I	ค่าการดูดกลืนแสง	%I	ค่าการดูดกลืนแสง	%I
control	0.880	-	0.822	-	1.166	-
0.5	0.254	71.14	0.309	62.40	0.240	79.42
0.25	0.416	52.73	0.475	42.21	0.445	61.84
0.125	0.581	33.40	0.649	21.05	0.696	40.31
0.063	0.693	21.25	0.746	9.250	0.876	24.87

จากนั้นสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical กับน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อหาค่า IC_{50}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้







รูปที่ ค. 1 กราฟการยับยั้ง DPPH radical กับน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อสร้างกราฟระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radicals กับน้ำมันอบเชยที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วจะทำได้สมการเส้นตรง ซึ่งจากสมการเส้นตรงนี้จะสามารถหาค่า IC_{50} ได้ดังนี้

ก) การหาค่า IC_{50} ครั้งที่ 1

สมการเส้นตรง คือ $y = 110.61x + 18.691$

เมื่อ $y = 50$ (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$50 = 110.61x + 18.691$

จะได้ $x = 0.283$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.283 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข) การหาค่า IC_{50} ครั้งที่ 2

สมการเส้นตรง คือ $y = 118.88x + 5.8507$

เมื่อ $y = 50$ (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$50 = 118.88x + 5.8507$

จะได้ $x = 0.371$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.371 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค) การหาค่า IC_{50} ครั้งที่ 3

สมการเส้นตรง คือ $y = 119.19x + 23.659$

เมื่อ $y = 50$ (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$50 = 119.19x + 23.659$

จะได้ $x = 0.221$

ในการทดสอบครั้งที่ 3 ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ 0.221 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำค่า IC_{50} ที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

IC_{50} เฉลี่ย $= (0.283 + 0.371 + 0.221) / 3$

$= 0.292$

ดังนั้นการหาค่า IC_{50} ของน้ำมันอบเชยจึงมีค่าเท่ากับ 0.292 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี β-carotene bleaching test

ในการคำนวณหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันอบเชยจะทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรที่เวลา 0 นาที และ 105 นาที จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยแทนค่าในสูตรดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$AA\% = [1-(A^{0}_{sample}-A^{105}_{sample}) / (A^{0}_{control}-A^{105}_{control})] \times 100$$

เมื่อ A^{0}_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยที่เวลาที่ 0 นาที (t=0)

A^{105}_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยหลังจากบ่มเป็นเวลา 105 นาที (t=105)

$A^{0}_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมที่เวลาที่ 0 นาที

$A^{105}_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมหลังจากบ่มเป็นเวลา 105 นาที

จากผลการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 นาโนเมตรที่เวลา 0 นาที และ 105 นาที (ตารางที่ ค.2) หาผลต่างจากค่าการดูดกลืนแสงทั้งสองค่าเพื่อนำไปหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันอบเชยที่เวลา 0 นาทีและ 105 นาที

ครั้งที่	สารตัวอย่าง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm (t=0)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 470 nm (t=105)	ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสง
1	Control	0.834	0.144	0.690
	น้ำมันอบเชย	0.826	0.285	0.541
2	Control	0.987	0.161	0.826
	น้ำมันอบเชย	0.951	0.490	0.461
3	Control	0.899	0.135	0.764
	น้ำมันอบเชย	0.932	0.334	0.598

เมื่อได้ค่าผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงทั้งในชุดควบคุมและน้ำมันอบเชยแล้ว นำค่าที่ได้มาแทนลงในสูตรที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นเพื่อหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

ก) การหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ครั้งที่ 1

$$AA\% = [1-(A^{0}_{sample}-A^{105}_{sample}) / (A^{0}_{control}-A^{105}_{control})] \times 100$$
$$= [1-(0.541) / (0.690)] \times 100$$
$$= 66.52$$

ข) การหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ครั้งที่ 1

$$AA\% = [1-(A^{0}_{sample}-A^{105}_{sample}) / (A^{0}_{control}-A^{105}_{control})] \times 100$$
$$= [1-(0.461) / (0.826)] \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

= 65.25

ค) การหาค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ครั้งที่ 3

$$AA\% = [1-(A^{0}_{sample}-A^{105}_{sample}) / (A^{0}_{control}-A^{105}_{control})] \times 100$$

$$= [1-(0.598) / (0.764)] \times 100$$

$$= 52.62$$

จากนั้นนำค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ย

$$AA\% \text{ เฉลี่ย} = (66.52 + 65.25 + 52.62) / 3$$

$$= 61.46$$

ดังนั้นน้ำมันอบเชยจึงมีค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 61.46

3. วิธีหาค่าความสามารถในการเป็นตัวรีดิวซ์ด้วยวิธี FRAP assay

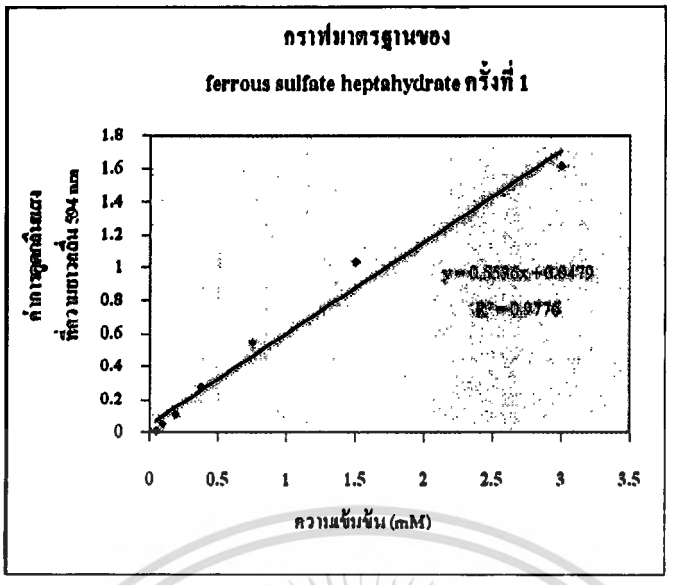
สำหรับวิธีนี้จะเป็นวิธีที่ศึกษาสมบัติในการเป็นตัวรีดิวซ์ของน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม โดยวัดความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) ที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) (รูปที่ ค.2) การทดสอบด้วยวิธี FRAP assay ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และค่าที่ได้จะนำมาแทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate heptahydrate

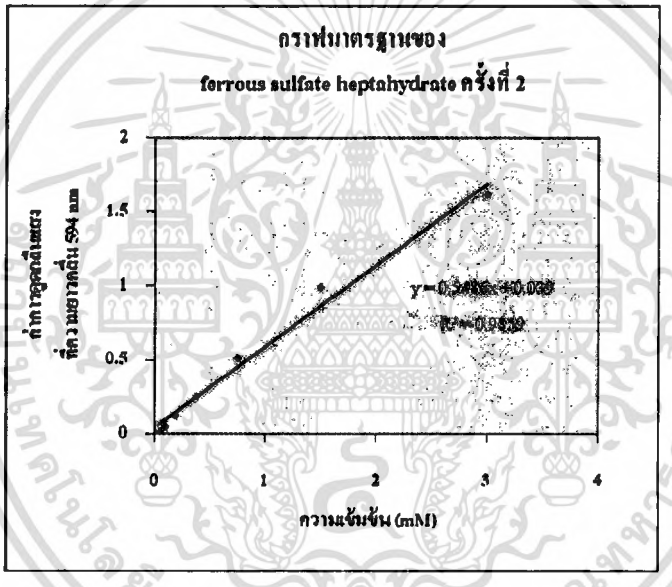
ในขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อใช้ในการทดสอบได้เตรียมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นเมื่อเตรียมที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม จะทำให้ไม่สามารถคำนวณค่าได้จากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐาน และสำหรับน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงค่าที่ได้ไม่อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน จึงต้องทำการเจือจางอีก 10 เท่าเพื่อให้ค่าอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน ซึ่งหาการดูดกลืนแสงที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ ค.3

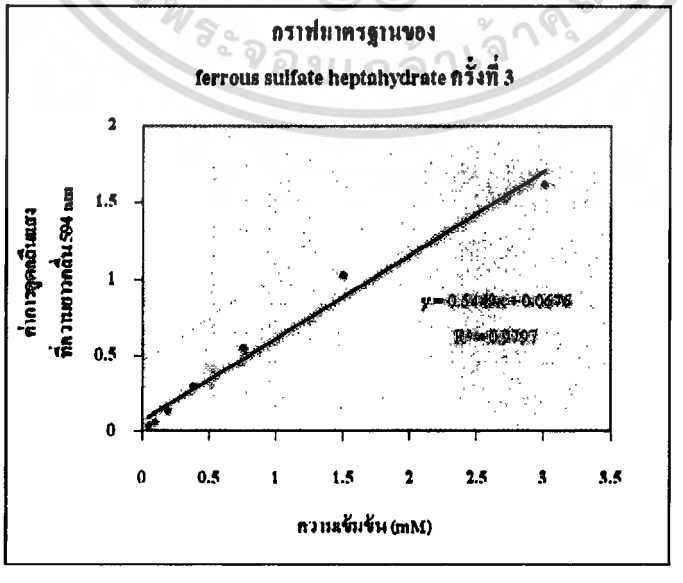
ตารางที่ ค.3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตรของน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ครั้งที่	ระดับความเจือจาง	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 nm
1	10	1.151
2	10	1.151
3	10	1.323

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้







รูปที่ ค. 2 กราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate heptahydrate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อสร้างกราฟมาตรฐานของ ferrous sulfate heptahydrate และค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างแล้ว จึงนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ จากสมการเส้นตรง โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

ก) การหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ครั้งที่ 1

สมการเส้นตรง คือ $y = 0.5536x + 0.0479$

เมื่อ $y = 1.151$ แทนค่าในสมการ

$$1.151 = 0.5536x + 0.0479$$

จะได้ $x = 1.99$

แต่ในการทดสอบได้มีการเจือจาง 10 เท่า ดังนั้นค่าจริงที่ได้ คือ $1.9925 \times 10 = 19.93$ โดยค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็นมิลลิโมลาร์ต่อ 10 มิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในการคิดค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ จะคิดเป็นหน่วยมิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม ดังนั้นค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ครั้งที่ 1 จะมีค่าเท่ากับ 19.93 / 10 เท่ากับ 1.99 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม

ข) การหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ครั้งที่ 2

สมการเส้นตรง คือ $y = 0.5486x + 0.039$

เมื่อ $y = 1.151$ แทนค่าในสมการ

$$1.151 = 0.5486x + 0.039$$

จะได้ $x = (2.027 \times 10) / 10$

$= 2.03$ มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม

ค) การหาค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ครั้งที่ 3

สมการเส้นตรง คือ $y = 0.5449x + 0.0676$

เมื่อ $y = 1.323$ แทนค่าในสมการ

$$1.323 = 0.5449x + 0.0676$$

จะได้ $x = (2.304 \times 10) / 10$

$= 2.30$ มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม

จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ ที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ย

ความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ เฉลี่ย $= (1.99 + 2.03 + 2.30) / 3$

$= 2.11$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นน้ำมันอบเชย 1 มิลลิกรัมสามารถเปลี่ยน สารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{3+}-TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ให้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+}-TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) ได้เท่ากับ 2.11 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศที่เหมาะสมในการเติมลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การศึกษาปริมาณความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศที่เหมาะสมในการเติมลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

1.1 วิธีการทดลอง

ทำการเตรียมไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อทั้งหมด 13 ทรีทเมนต์ (ตารางที่ ง.1) โดยมีส่วนผสมดังนี้ เนื้อวัวร้อยละ 51.45 มันวัวร้อยละ 28.07 ข้าวสุกร้อยละ 14.03 เกลือร้อยละ 1.3 น้ำตาลทรายร้อยละ 0.47 กระเทียมบดร้อยละ 4.6 โดยเติมน้ำมันอบเชยเป็นอัตราส่วน 2, 4, 8 และ 16 เท่าของค่า MIC (63 พีพีเอ็ม) ที่ได้จากการทดลองในอาหาร Sausauge Model Agar และเติมน้ำมันจันทน์เทศเป็นอัตราส่วน 1/4, 1/8 และ 1/16 เท่าของค่า MIC (22,000 พีพีเอ็ม) ที่ได้จากการทดลองในอาหาร Sausauge Model Agar เช่นกัน โดยอัตราส่วนของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่เติมลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

ตารางที่ ง.1 ทรีทเมนต์ของการทำไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเพื่อหาปริมาณน้ำมันผสมที่เหมาะสม

ทรีทเมนต์	ส่วนผสม	
	น้ำมันอบเชย (พีพีเอ็ม)	น้ำมันจันทน์เทศ (พีพีเอ็ม)
1 ชุดควบคุม	ไม่เติม	ไม่เติม
2	126	1375
3	126	2750
4	126	5500
5	252	1375
6	252	2750
7	252	5500
8	504	1375
9	504	2750
10	504	5500
11	1008	1375
12	1008	2750
13	1008	5500

ทำการผลิตไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อโดยนำเนื้อวัวและมันวัวมาล้างให้สะอาดหั่นและบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดเนื้อ จากนั้นผสมเครื่องปรุงทั้งหมดลงในเนื้อบดแล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องบดผสมที่อัตราความเร็วเบอร์ 1ใช้เวลาในการผสมประมาณ 3-5 นาที จากนั้นเติมสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แขวนลอยเซลล์ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ปริมาณ 10^4 เซลล์ต่อกรัม *Staphylococcus aureus* ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัม และ *Salmonella* Rissen ปริมาณ 10^6 เซลล์ต่อกรัม บรรจุไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อลงในไส้เทียมที่ทำด้วยพลาสติกโพลีเอทิลีนมัดให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 และ 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด จำนวน *S. aureus* และ จำนวน *Salmonella* และวัดค่าพีเอช สำหรับชุดชิมให้ใช้ส่วนผสมเช่นเดียวกันกับชุดวิเคราะห์แต่ไม่ต้องเติมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลงไป ทำการบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปทดสอบกลิ่นและรสชาติเพื่อหาระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่รับได้

1.2 ผลการทดลอง

จากการทดลองหาปริมาณน้ำมันผสมที่เหมาะสมในการเติมลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อพบว่าเมื่อครบระยะเวลาการหมักเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีการเจริญดีโดยพบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกซึ่งเห็นได้จากจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นประมาณ 1-2 log cycle หลังระยะการหมักครบ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ ง.2) สำหรับจำนวนเชื้อ *S. aureus* เมื่อครบระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมงพบว่าในทุกๆทรีทเมนต์มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงประมาณ 1 log cycle และจำนวนเชื้อ *Sal.* Rissen หลังครบระยะการหมักพบว่าทรีทเมนต์ส่วนใหญ่มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยทรีทเมนต์ที่มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงมากที่สุด คือ ทรีทเมนต์ที่ 13 ซึ่งเติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 1008 พีพีเอ็มและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 5500 พีพีเอ็มซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง

สำหรับค่าพีเอชของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อแต่ละเทรีทเมนต์พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นมีค่าอยู่ระหว่าง 5.11-5.28 และเมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลาครบ 24 ชั่วโมงแล้วพบว่าพีเอชมีค่าลดลงโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 4.69-4.82 โดยทรีทเมนต์ที่ให้ค่าพีเอชต่ำที่สุดคือ ทรีทเมนต์ควบคุมที่ไม่ได้เติมน้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 4.69 จากค่าพีเอชเริ่มต้น 5.28 สำหรับทรีทเมนต์ที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆพบว่ามีค่าพีเอชลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้น และเมื่อหมักครบ 24 ชั่วโมงแล้วนำไปปรุงให้สุกเพื่อทดสอบกลิ่นและรสชาติพบว่าไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อทรีทเมนต์ที่ 2-6 ให้กลิ่นและรสชาติที่สามารถรับได้ มีกลิ่นหอมแต่ไม่กลบกลิ่นของเนื้อหมัก แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงขึ้น (ทรีทเมนต์ที่ 7-13) พบว่ากลิ่นค่อนข้างแรงทำให้กลบกลิ่นของไส้กรอกหมักทำให้รสชาติค่อนข้างผิดแปลกไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.2 จำนวนจุลินทรีย์แบคทีเรียแลคติก *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Rissen ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมที่ระดับต่างๆ

ทรีทเมนต์	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)					
	Pediococcus pentosaceus		*Staphylococcus aureus*		*Salmonella* Rissen	
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 0	วันที่ 1
1. Control	2.92×10^{9}	1.71×10^{10}	7.90×10^{6}	8.95×10^{5}	3.55×10^{4}	6.25×10^{4}
2. อบเชย 126 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 1375 พีพีเอ็ม	2.28×10^{9}	3.77×10^{10}	3.10×10^{6}	9.05×10^{5}	3.00×10^{5}	2.20×10^{4}
3. อบเชย 126 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 2750 พีพีเอ็ม	2.97×10^{9}	3.14×10^{10}	1.80×10^{6}	9.70×10^{5}	1.90×10^{5}	3.24×10^{4}
4. อบเชย 126 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 5500 พีพีเอ็ม	3.88×10^{9}	1.14×10^{10}	1.70×10^{6}	7.00×10^{5}	2.30×10^{4}	1.50×10^{4}
5. อบเชย 252 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 1375 พีพีเอ็ม	3.67×10^{9}	2.81×10^{10}	1.28×10^{6}	1.85×10^{5}	3.95×10^{5}	6.35×10^{4}
6. อบเชย 252 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 2750 พีพีเอ็ม	1.31×10^{10}	2.25×10^{10}	1.45×10^{6}	8.80×10^{5}	1.65×10^{4}	1.50×10^{4}
7. อบเชย 252 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 5500 พีพีเอ็ม	5.36×10^{9}	2.09×10^{10}	5.50×10^{6}	4.20×10^{5}	2.95×10^{5}	4.10×10^{4}
8. อบเชย 504 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 1375 พีพีเอ็ม	2.58×10^{9}	1.54×10^{10}	2.70×10^{6}	6.10×10^{5}	3.70×10^{5}	4.05×10^{4}
9. อบเชย 504 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 2750 พีพีเอ็ม	3.95×10^{9}	2.43×10^{10}	2.10×10^{6}	6.80×10^{5}	2.25×10^{4}	1.60×10^{4}
10. อบเชย 504 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 5500 พีพีเอ็ม	3.43×10^{9}	2.12×10^{10}	4.40×10^{6}	3.70×10^{5}	1.70×10^{5}	3.30×10^{4}
11. อบเชย 1008 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 1375 พีพีเอ็ม	1.34×10^{9}	2.32×10^{10}	1.70×10^{6}	7.25×10^{5}	7.00×10^{5}	6.35×10^{4}
12. อบเชย 1008 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 2750 พีพีเอ็ม	3.15×10^{8}	1.37×10^{10}	2.60×10^{6}	7.75×10^{5}	5.50×10^{5}	1.59×10^{4}
13. อบเชย 1008 พีพีเอ็ม + จันทน์เทศ 5500 พีพีเอ็ม	2.79×10^{9}	2.9×10^{10}	2.65×10^{6}	1.70×10^{5}	1.16×10^{6}	4.55×10^{4}

ตารางที่ ง.3 ค่าพีเอชของไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อที่เติมน้ำมันหอมระเหยผสมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ทรีทเมนต์ที่	ระดับความเข้มข้น (mg/ml)		ค่าพีเอช	
	น้ำมันอบเชย	น้ำมันจันทน์เทศ	วันที่ 0	วันที่ 1
Control	-	-	5.28	4.69
1	126	1375	5.18	4.74
2	126	2750	5.15	4.73
3	126	5500	5.11	4.70
4	252	1375	5.21	4.75
5	252	2750	5.19	4.70
6	252	5500	5.25	4.78
7	504	1375	5.15	4.72
8	504	2750	5.19	4.75
9	504	5500	5.16	4.77
10	1008	1375	5.22	4.79
11	1008	2750	5.18	4.80
12	1008	5500	5.22	4.82

1.3 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเติมน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้นต่างๆลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อพบว่า น้ำมันหอมระเหยผสมทั้ง 2 ชนิดที่เติมลงไปไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเห็นได้จากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในทุกๆทรีทเมนต์และมีผลสอดคล้องกับค่าพีเอชที่ลดลงในระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิดมีจำนวนลดลงในทุกๆระดับความเข้มข้นซึ่งอาจเป็นผลจากสภาพความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลาการหมักเป็นผลให้ไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้นอาจทำให้เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ ประกอบกับน้ำมันหอมระเหยผสมที่เติมลงไปอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียซึ่งอาจไปรบกวนหรือทำลายโครงสร้างต่างๆของเซลล์ทำให้จำนวนแบคทีเรียลดลง

สำหรับการคัดเลือกปริมาณน้ำมันหอมระเหยผสมที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้จริงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ ได้ทำการคัดเลือกโดยคำนึงถึงกลิ่นและรสชาติเป็นหลัก เนื่องจากจำนวนจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์ได้มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก จากผลการทดสอบจึงได้ทำการคัดเลือกระดับความเข้มข้นของน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับ 1375 พีพีเอ็มเพียงความเข้มข้นเดียว เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นสูง

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่านี้กลิ่นของน้ำมันจันทน์เทศจะกลบกลิ่นของผลิตภัณฑ์เกือบหมด แต่สำหรับน้ำมันอบเชยได้คัดเลือกระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 126, 252, 504 และ 1008 พีพีเอ็ม เนื่องจากน้ำมันอบเชยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้ค่อนข้างดีแม้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ จึงอยากทดลองว่าถ้าระดับความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยเพิ่มขึ้นจะมีผลแตกต่างกับการเติมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้นต่ำหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การหาค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และการคำนวณค่า FIC index

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดสอบหาค่า FIC index ของน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิด ด้วยวิธี agar dilution ซึ่งวิธีนี้จะทดสอบบนอาหารแข็งโดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 20 มิลลิลิตร โดยมีส่วนของน้ำมันหอมระเหยชนิดที่1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร น้ำมันหอมระเหยชนิดที่ 2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 1 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารที่ใช้ทดสอบ 19 มิลลิลิตร โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดเมื่อผสมกับอาหาร 19 มิลลิลิตรแล้วจะมีค่าเท่ากับ 1/2, 1/4, 1/8 และ 1/16 ของค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิด

ตัวอย่างการหาค่า FIC ของคู่น้ำมันหอมระเหยผสมระหว่างน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*

จากการทดลองพบว่าค่า MIC ของน้ำมันอบเชยในการยับยั้ง *L. monocytogenes* เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่าการยับยั้งของน้ำมันจันทน์เทศเท่ากับ 18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคู่ของระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบของน้ำมันหอมระเหยทั้งสองแสดงดังตารางที่ ง.1

ตารางที่ จ.1 รูปแบบการผสมของน้ำมันหอมระเหย

รูปแบบ	น้ำมันอบเชย		น้ำมันจันทน์เทศ	
	จำนวนเท่าของ MIC	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)
1	1/2	0.5	1/2	9
2	1/2	0.5	1/4	4.5
3	1/2	0.5	1/8	2.25
4	1/2	0.5	1/16	1.125
5	1/4	0.25	1/2	9
6	1/4	0.25	1/4	4.5
7	1/4	0.25	1/8	2.25
8	1/4	0.25	1/16	1.125
9	1/8	0.125	1/2	9
10	1/8	0.125	1/4	4.5
11	1/8	0.125	1/8	2.25
12	1/8	0.125	1/16	1.125
13	1/16	0.0625	1/2	9
14	1/16	0.0625	1/4	4.5
15	1/16	0.0625	1/8	2.25
16	1/16	0.0625	1/16	1.125

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก) การคำนวณหาความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันหอมระเหยรูปแบบที่ 1

เมื่อความเข้มข้นของน้ำมันอบเชยเท่ากับ 1/2 เท่าของค่า MIC = 1/2 x 1 = 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ ความเข้มข้นของน้ำมันจันทน์เทศเท่ากับ 1/2 เท่าของค่า MIC = 1/2 x 18 = 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การคำนวณหาความเข้มข้นของ stock solution ที่ต้องการเตรียมโดยคำนวณได้จากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ เมื่อ C_1 คือ ความเข้มข้นของ stock solution ที่ต้องการเตรียม V_1 คือ ปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่จะเติมลงไปในการทดสอบซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตร C_2 คือ ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในการทดสอบซึ่งในที่นี้ น้ำมันอบเชย คือ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันจันทน์เทศ คือ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ V_2 คือ ปริมาตรรวมสุดท้ายในการทดสอบซึ่งเท่ากับ 20 มิลลิลิตร (อาหารที่ใช้ทดสอบ 19 มิลลิลิตร น้ำมันอบเชย 0.5 มิลลิลิตรและน้ำมันจันทน์เทศ 0.5 มิลลิลิตร)

ดังนั้นจากสูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

ความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันอบเชย คือ

$$C_1 = C_2V_2 / V_1$$

$$C_1 = 0.5 \times 20 / 0.5 = 20 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

เตรียมได้โดยชั่งน้ำมันอบเชย 0.2 กรัม ละลายในสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้ stock solution ของน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

และความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันจันทน์เทศ คือ

$$C_1 = C_2V_2 / V_1$$

$$C_1 = 9 \times 20 / 0.5 = 360 \text{ มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร}$$

เตรียมได้โดยชั่งน้ำมันจันทน์เทศ 1.8 กรัม ละลายในสารละลาย DMSO ร้อยละ 10 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จะได้ stock solution ของน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 360 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อเตรียม stock solution จากนั้นปิเปต stock solution ของน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ stock solution ของน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 360 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรชนิดละ 0.5 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ และเทอาหารที่ใช้ทดสอบ (MHA) ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงไป ผสมให้เข้ากันแล้วจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชยในจานเพาะเชื้อเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันจันทน์เทศในจานเพาะเชื้อเท่ากับ 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รอจนอาหารแข็งตัว เมื่ออาหารแข็งตัวแล้วปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อที่จะทดสอบลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบระยะเวลาในการบ่ม (24 ชั่วโมง) ให้นำจานเพาะเชื้อมาตรวจสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะลงไป ซึ่งจะนำค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยรูปแบบการผสมคู่ที่มีความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญได้หรือไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการวิเคราะห์หาค่า FIC และ FICI

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการเตรียม stock solution ในรูปแบบอื่นสามารถทำได้โดยการเจือจาง 2 เท่า (two-fold dilution) จาก stock solution ของน้ำมันทั้งสองชนิดที่เตรียมไว้แล้วข้างต้นจะได้ stock solution ที่เจือจางอีก 3 ระดับคือ น้ำมันอบเชย 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเจือจางแล้วจะได้น้ำมันอบเชยที่มีความเข้มข้น 10, 5 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1/4, 1/8 และ 1/16 ของค่า MIC ตามลำดับ ส่วนน้ำมันจันทน์เทศ 360 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเจือจางแล้วจะได้น้ำมันจันทน์เทศที่มีความเข้มข้น 180, 90 และ 45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาผสมกันอีก 15 รูปแบบดังตารางที่ จ.1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1/4, 1/8 และ 1/16 ของค่า MIC ตามลำดับ (ได้ความเข้มข้นของ stock solution ทุกรูปแบบการผสมตามตารางที่ จ.2) แล้วทำการทดสอบตามวิธีการเช่นเดียวกับรูปแบบที่ 1 ที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

ตารางที่ จ.2 ความเข้มข้นของ stock solution และความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศ

รูปแบบ	น้ำมันอบเชย			น้ำมันจันทน์เทศ		
	Stock solution (mg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC	Stock solution (mg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC
1	20	0.5	1/2	360	9	1/2
2	20	0.5	1/2	180	4.5	1/4
3	20	0.5	1/2	90	2.25	1/8
4	20	0.5	1/2	45	1.125	1/16
5	10	0.25	1/4	360	9	1/2
6	10	0.25	1/4	180	4.5	1/4
7	10	0.25	1/4	90	2.25	1/8
8	10	0.25	1/4	45	1.125	1/16
9	5	0.125	1/8	360	9	1/2
10	5	0.125	1/8	180	4.5	1/4
11	5	0.125	1/8	90	2.25	1/8
12	5	0.125	1/8	45	1.125	1/16
13	2.5	0.0625	1/16	360	9	1/2
14	2.5	0.0625	1/16	180	4.5	1/4
15	2.5	0.0625	1/16	90	2.25	1/8
16	2.5	0.0625	1/16	45	1.125	1/16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) การคำนวณค่า fractional inhibitory concentration (FIC) และ ค่า fractional inhibitory concentration index (FICI)

เมื่อถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปในจานอาหาร MHA แต่ละจานที่ผสมกับน้ำมันหอมระเหยแต่ละรูปแบบการผสม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจผลโดยดูว่าเชื้อเจริญหรือไม่ จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันอบเชยผสมกับน้ำมันจันทน์เทศรูปแบบที่ 1, 2, 3 และ 4 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* (ตารางที่ จ.3) ในการคำนวณจะนำค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันผสมที่สามารถยับยั้งการเจริญได้มาใช้ในการคำนวณหาค่า FIC

ตารางที่ จ.3 การยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* โดยน้ำมันอบเชยร่วมกับน้ำมันจันทน์เทศ

รูปแบบ	น้ำมันอบเชย		น้ำมันจันทน์เทศ		ผลการยับยั้ง
	จำนวนเท่าของ MIC	ความเข้มข้นสุดท้าย* (mg/ml)	จำนวนเท่าของ MIC	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/ml)	
1	1/2	0.5	1/2	9	+
2	1/2	0.5	1/4	4.5	+
3	1/2	0.5	1/8	2.25	+
4	1/2	0.5	1/16	1.125	+
5	1/4	0.25	1/2	9	-
6	1/4	0.25	1/4	4.5	-
7	1/4	0.25	1/8	2.25	-
8	1/4	0.25	1/16	1.125	-
9	1/8	0.125	1/2	9	-
10	1/8	0.125	1/4	4.5	-
11	1/8	0.125	1/8	2.25	-
12	1/8	0.125	1/16	1.125	-
13	1/16	0.0625	1/2	9	-
14	1/16	0.0625	1/4	4.5	-
15	1/16	0.0625	1/8	2.25	-
16	1/16	0.0625	1/16	1.125	-

+ คือ สามารถยับยั้งการเจริญได้

- คือ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการคำนวณหาค่า FIC (fractional inhibitory concentration) และ ค่า FICI (fractional inhibitory concentration index) ทำได้โดยใช้สูตรดังนี้

จากสูตร FIC index = $FIC_A + FIC_B$

เมื่อ FIC_A = ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด A (MIC_A combination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยผสม / ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิด A เพียงอย่างเดียว (MIC_A alone)

FIC_B = ค่า MIC ของน้ำมันระเหยชนิด B (MIC_B combination) เมื่ออยู่ในรูปแบบของน้ำมันหอมระเหยผสม / ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยชนิด B เพียงอย่างเดียว (MIC_B alone)

จากผลการทดลองในตารางที่ จ.3 รูปแบบการผสมน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญได้คือรูปแบบที่ 4 (น้ำมันอบเชย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมกับน้ำมันจันทน์เทศ 1.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ดังนั้น MIC_A combination (A = น้ำมันอบเชย) มีค่าเท่ากับ 0.5 และ MIC_B combination (B = น้ำมันจันทน์เทศ) มีค่าเท่ากับ 1.125 เมื่อค่า MIC ของน้ำมันอบเชย (เพียงอย่างเดียว) และน้ำมันจันทน์เทศ (เพียงอย่างเดียว) ต่อเชื้อ *L. monocytogenes* คือ 1 และ 18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำค่าทั้งหมดนี้มาแทนค่า ตามสูตร ได้ดังนี้

ในกรณีนี้ ค่า FIC_A (อบเชย) มีค่าเท่ากับ 0.5/1 = 0.5

และ ค่า FIC_B (จันทน์เทศ) มีค่าเท่ากับ 1.125/18 = 0.0625

เพราะฉะนั้นค่า FICI = 0.5 + 0.0625 = 0.5625

ซึ่งถ้าค่า $FIC \leq 0.5$ ถือว่ามีฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect)

$0.5 < FIC < 1$ ถือว่า additive หรือ ไม่มีความแตกต่าง (indifferent effect)

$FIC > 1$ ถือว่าเป็นปฏิปักษ์กัน (antagonistic effect)

จากผลการคำนวณค่า FICI ของน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้มข้น 1.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ค่าที่ได้มีค่ามากกว่า 0.5 จึงเป็นการบอกว่าการผสมน้ำมันอบเชยที่ระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและน้ำมันจันทน์เทศที่ระดับความเข้นข้น 1.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ให้ผลไม่แตกต่างมากนักเมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันอบเชยหรือน้ำมันจันทน์เทศเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในการยับยั้งเชื้อนี้

สำหรับการคำนวณหาความเข้มข้นของ stock solution ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศหรือน้ำมันคู่ผสมอื่น เพื่อหาค่า FIC สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่นสรุปได้ดังตารางที่ จ.4 นำมาผสมกัน

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบและคำนวณหาค่า FIC เช่นเดียวกับตัวอย่างการหา FIC ของน้ำมันอบเชยและน้ำมันจันทน์เทศสำหรับการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*

ตารางที่ จ.4 Stock solution ที่เตรียมได้จากค่า MIC และค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในการทดสอบ

ค่า MIC (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	Stock solution ของน้ำมันหอมระเหย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	**20**	0.5
	10	0.25
	5	0.13
	2.5	0.06
2	**40**	1
	20	0.5
	10	0.25
	5	0.13
6	**120**	3
	60	1.5
	30	0.75
	15	0.38
8	**160**	4
	80	2
	40	1
	20	0.5
16	**320**	8
	160	4
	80	2
	40	1
18	**360**	9
	180	4.5
	90	2.25
	45	1.13
20	**400**	10
	200	5
	100	2.5
	50	1.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ
ผลการทดลองในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. จำนวนจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองเติมปริมาณน้ำมันผสมในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อครั้งที่ 1

Starter : *Pediococcus pentosaceus* มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 8.6×10^{6} CFU/ml

แบคทีเรีย 1. *Staphylococcus aureus* มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.2×10^{10} CFU/ml

2. *Salmonella* Rissen มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.9×10^{11} CFU/ml

ตารางที่ ฉ.1 จำนวนจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ครั้งที่ 1)

ทรีทเมนต์	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)														
	Pediococcus pentosaceus					*Staphylococcus aureus*					*Salmonella* Rissen				
	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
C	3.7×10^{8}	1.2×10^{10}	2.4×10^{11}	1.3×10^{10}	1.1×10^{10}	4.8×10^{6}	3.5×10^{5}	3.7×10^{5}	5.4×10^{4}	4.1×10^{3}	1.9×10^{5}	6.2×10^{4}	4.1×10^{3}	2.5×10^{2}	2.0×10^{2}
EO1	1.6×10^{8}	3.8×10^{10}	1.9×10^{11}	1.4×10^{10}	1.6×10^{11}	1.2×10^{6}	4.2×10^{5}	9.9×10^{4}	2.1×10^{4}	3.6×10^{3}	8.9×10^{5}	8.6×10^{4}	1.6×10^{3}	1.0×10^{2}	0
EO2	2.7×10^{8}	1.8×10^{10}	1.3×10^{10}	1.2×10^{11}	1.3×10^{11}	4.5×10^{6}	5.8×10^{5}	7.9×10^{4}	1.7×10^{4}	3.1×10^{3}	1.4×10^{5}	4.2×10^{4}	1.9×10^{3}	0	0
EO3	1.6×10^{9}	1.7×10^{10}	2.0×10^{11}	1.8×10^{11}	3.4×10^{11}	3.6×10^{6}	5.4×10^{5}	5.4×10^{4}	1.8×10^{4}	1.6×10^{3}	1.9×10^{5}	5.6×10^{4}	6.3×10^{2}	0	0
EO4	1.3×10^{8}	1.4×10^{10}	1.3×10^{11}	1.9×10^{11}	2.4×10^{11}	3.1×10^{6}	2.6×10^{5}	4.9×10^{4}	1.4×10^{4}	2.0×10^{2}	1.4×10^{5}	6.8×10^{4}	1.8×10^{2}	0	0

C: ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย)

EO1: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 126 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO2: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 252 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO3: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 504 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO4: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 1008 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

ผลการทดลองเติมปริมาณน้ำมันผสมในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อครั้งที่ 2

Starter : *Pediococcus pentosaceus* มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 7.1×10^6 CFU/ml

แบคทีเรีย 1. *Staphylococcus aureus* มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.67×10^{10} CFU/ml

2. *Salmonella* Rissen มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.76×10^{10} CFU/ml

ตารางที่ ฉ.2 จำนวนจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง(ครั้งที่ 2)

ทรีทเมนต์	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)														
	Pediococcus pentosaceus					*Staphylococcus aureus*					*Salmonella* Rissen				
	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
C	3.8×10^9	2.4×10^{10}	2.7×10^{11}	1.9×10^{12}	2.0×10^{12}	1.8×10^6	2.0×10^5	3.9×10^4	3.1×10^3	2.9×10^3	7.2×10^4	2.4×10^4	1.7×10^3	0	0
EO1	5.2×10^9	5.1×10^{10}	1.4×10^{10}	3.4×10^{12}	4.6×10^{12}	1.7×10^6	1.8×10^5	1.5×10^4	2.4×10^3	1.2×10^3	1.0×10^5	1.4×10^4	2.0×10^2	0	0
EO2	2.4×10^9	7.3×10^{10}	2.4×10^{11}	5.4×10^{12}	5.1×10^{12}	1.5×10^6	1.8×10^5	2.4×10^4	2.4×10^3	1.1×10^3	6.4×10^4	1.2×10^4	0	0	0
EO3	2.4×10^9	3.4×10^{10}	4.8×10^{11}	5.2×10^{12}	5.3×10^{12}	1.6×10^6	1.3×10^5	2.7×10^4	2.1×10^3	1.0×10^3	3.8×10^5	1.8×10^4	0	0	0
EO4	2.1×10^8	3.6×10^{10}	4.7×10^{11}	9.2×10^{12}	8.9×10^{12}	2.0×10^6	1.5×10^5	2.4×10^4	4.5×10^2	3.0×10^2	9.1×10^4	1.5×10^4	0	0	0

C: ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย)

EO1: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 126 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO2: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 252 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO3: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 504 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO4: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 1008 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

ผลการทดลองเติมปริมาณน้ำมันผสมในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อครั้งที่ 3

Starter : *Pediococcus pentosaceus* มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.96 x 10^7 CFU/ml

แบคทีเรีย 1. *Staphylococcus aureus* มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 3.14 x 10^{10} CFU/ml

2. *Salmonella* Rissen มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 2.89 x 10^{12} CFU/ml

ตารางที่ ฉ.3 จำนวนจุลินทรีย์ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ครั้งที่ 3)

ทรีทเมนต์	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)														
	Pediococcus pentosaceus					*Staphylococcus aureus*					*Salmonella* Rissen				
	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
C	1.6 x 10^9	2.9 x 10^{10}	2.7 x 10^{11}	3.2 x 10^{11}	2.9 x 10^{12}	2.0 x 10^6	5.2 x 10^4	5.1 x 10^4	7.3 x 10^3	3.1 x 10^3	1.2 x 10^5	2.1 x 10^4	1.6 x 10^4	1.5 x 10^4	1.3 x 10^4
EO1	1.5 x 10^9	2.2 x 10^{10}	2.8 x 10^{11}	1.2 x 10^{12}	3.5 x 10^{12}	3.3 x 10^6	6.6 x 10^4	5.0 x 10^4	7.5 x 10^3	3.4 x 10^3	1.3 x 10^5	1.7 x 10^4	1.8 x 10^3	1.1 x 10^3	7.2 x 10^2
EO2	2.4 x 10^9	1.1 x 10^{10}	2.4 x 10^{11}	1.6 x 10^{12}	3.1 x 10^{12}	3.1 x 10^6	6.0 x 10^4	1.8 x 10^4	3.2 x 10^3	3.5 x 10^3	1.2 x 10^5	1.5 x 10^4	2.3 x 10^3	1.0 x 10^3	0
EO3	1.6 x 10^9	5.9 x 10^9	2.2 x 10^{11}	2.1 x 10^{12}	4.1 x 10^{12}	2.1 x 10^6	3.9 x 10^4	1.7 x 10^4	3.6 x 10^3	3.7 x 10^3	1.2 x 10^5	1.4 x 10^4	1.9 x 10^3	0	0
EO4	1.9 x 10^9	1.9 x 10^{10}	2.6 x 10^{11}	3.6 x 10^{12}	4.7 x 10^{12}	2.2 x 10^6	5.8 x 10^4	2.9 x 10^4	2.4 x 10^3	1.8 x 10^3	9.5 x 10^4	1.5 x 10^4	1.5 x 10^2	0	0

C: ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย)

EO1: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 126 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO2: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 252 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO3: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 504 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO4: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 1008 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

ตารางที่ ฉ.4 จำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ทรีทเมนต์	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์* (log CFU/g) ± SD				
	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.
Pediococcus pentosaceus					
C	9.12 ± 0.51	10.31 ± 0.20	11.41 ± 0.03	11.30 ± 1.10	11.60 ± 1.35
EO1	9.03 ± 0.77	10.54 ± 0.19	10.59 ± 0.71	11.92 ± 1.56	12.13 ± 0.81
EO2	9.06 ± 0.55	10.39 ± 0.42	10.96 ± 0.73	12.00 ± 0.84	12.10 ± 0.87
EO3	9.26 ± 0.10	10.18 ± 0.38	11.44 ± 0.21	12.10 ± 0.75	12.29 ± 0.66
EO4	8.59 ± 0.61	10.33 ± 0.21	11.40 ± 0.28	12.27 ± 0.87	12.33 ± 0.84
Staphylococcus aureus					
C	6.41 ± 0.23	5.52 ± 0.21	4.96 ± 0.53	4.03 ± 0.64	3.52 ± 0.08
EO1	6.42 ± 0.16	5.57 ± 0.28	4.62 ± 0.41	3.86 ± 0.47	3.39 ± 0.27
EO2	6.44 ± 0.24	5.91 ± 0.24	4.51 ± 0.33	3.71 ± 0.46	3.36 ± 0.28
EO3	6.36 ± 0.18	5.48 ± 0.33	4.46 ± 0.25	3.71 ± 0.49	3.26 ± 0.29
EO4	6.38 ± 0.10	5.12 ± 0.33	4.50 ± 0.14	3.39 ± 0.75	2.68 ± 0.51
Salmonella Rissen					
C	5.07 ± 0.21	4.50 ± 0.26	3.68 ± 0.49	2.19 ± 2.10	2.14 ± 2.06
EO1	5.35 ± 0.52	4.44 ± 0.43	2.92 ± 0.54	1.68 ± 1.55	0.95 ± 1.65
EO2	5.01 ± 0.18	4.29 ± 0.29	2.21 ± 1.92	1.00 ± 1.73	0.00 ± 0.00
EO3	5.31 ± 0.25	4.39 ± 0.32	2.02 ± 1.77	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
EO4	5.03 ± 0.10	4.40 ± 0.38	1.48 ± 1.28	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

*ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

C: ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย)

EO1: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 126 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO2: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 252 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO3: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 504 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO4: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 1008 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

2. ค่าพีเอชในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมักเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ ฉ.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อหมักที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ทรีทเมนต์	ครั้งที่	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)				
		0	24	48	72	96
C	1	5.64	4.59	4.80	4.44	4.36
	2	5.48	4.53	4.34	4.30	4.27
	3	4.85	4.58	4.53	4.32	4.17
EO1	1	5.53	4.65	4.55	4.48	4.51
	2	5.59	4.50	4.33	4.31	4.27
	3	4.91	4.63	4.40	4.36	4.06
EO2	1	5.59	4.57	4.40	4.42	4.50
	2	5.45	4.53	4.34	4.28	4.23
	3	4.88	4.56	4.45	4.31	4.11
EO3	1	5.60	4.58	4.53	4.38	4.33
	2	5.47	4.55	4.33	4.30	4.25
	3	4.90	4.55	4.44	4.29	4.14
EO4	1	5.50	4.65	4.52	4.50	4.39
	2	5.51	4.55	4.38	4.29	4.24
	3	4.92	4.59	4.42	4.28	4.07

C: ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย)

EO1: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 126 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO2: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 252 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO3: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 504 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO4: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 1008 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ค่า TBARS ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน

ตารางที่ จ.6 การเปลี่ยนแปลงของค่า TBARS ในไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 27 วัน

ทรีทเมนต์	ครั้งที่	ระยะเวลาในการหมัก					
		วันที่ 0 (ของการผลิต)	วันที่ 0 (ของการเก็บรักษา)	วันที่ 2	วันที่ 9	วันที่ 18	วันที่ 27
C	1	0.811	0.234	0.367	0.335	0.273	0.335
	2	1.903	1.342	0.491	0.218	0.484	0.429
	3	0.928	0.499	0.281	0.452	0.468	0.624
EO1	1	0.827	0.445	0.757	0.437	0.187	0.421
	2	2.480	1.287	0.257	0.086	0.319	0.296
	3	0.632	0.655	0.569	0.686	0.616	0.491
EO2	1	1.061	0.343	0.686	0.499	0.218	0.39
	2	2.605	1.412	0.265	0.094	0.452	0.312
	3	1.326	0.694	0.343	0.499	0.398	0.359
EO3	1	1.139	0.601	1.029	0.663	0.382	0.46
	2	3.214	1.334	0.312	0.14	0.421	0.351
	3	0.975	0.702	0.265	0.554	0.468	0.421
EO4	1	2.137	1.147	1.193	0.865	0.367	0.382
	2	3.494	1.63	0.46	0.156	0.709	0.406
	3	0.803	0.655	0.616	0.772	0.585	0.367

C: ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย)

EO1: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 126 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO2: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 252 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO3: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 504 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 ppm

EO4: เติมน้ำมันอบเชยความเข้มข้น 1008 ppm และน้ำมันจันทน์เทศความเข้มข้น 1375 pp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส
ประเภทการพรรณนาเชิงทั่วไปของสเกลลำดับคุณภาพ

ผลิตภัณฑ์ ไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ

คำชี้แจง กรุณาทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่น รส และความเนียนของลักษณะเนื้อสัมผัส

ชื่อ วันที่

สีที่ปรากฏ

คะแนน	อธิบายลักษณะสี	รหัสตัวอย่าง				
1	สีแดงซีด					
2	สีแดง					
3	สีแดงเข้ม					
4	สีแดงผสมน้ำตาล					
5	สีน้ำตาล					

กลิ่นหืน

คะแนน	อธิบายกลิ่น	รหัสตัวอย่าง				
1	ไม่มีกลิ่น					
2	กลิ่นหืนเล็กน้อย					
3	กลิ่นหืนปานกลาง					
4	กลิ่นค่อนข้างหืน					
5	กลิ่นหืนมาก					

ความเปรี้ยว

คะแนน	อธิบายรสชาติ	รหัสตัวอย่าง				
1	เปรี้ยวน้อย					
2	เปรี้ยว					
3	เปรี้ยวปานกลาง					
4	เปรี้ยวมาก					
5	เปรี้ยวมากที่สุด					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเนื้อสัมผัส

คะแนน	อธิบายเนื้อสัมผัส	รหัสตัวอย่าง				
1	เนื้อละเอียดมาก					
2	เนื้อละเอียดปานกลาง					
3	เนื้อละเอียดน้อย					
4	เนื้อหยาบ					
5	เนื้อหยาบมาก					

ความชอบรวม

คะแนน	ความชอบรวม	รหัสตัวอย่าง				
1	ชอบ					
2	ชอบเล็กน้อย					
3	ชอบปานกลาง					
4	ชอบมาก					
5	ชอบมากที่สุด					

สรุปและข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....

.....

.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวพรพรรณ วิมุตติโกศล
วัน เดือน ปีเกิด	17 กรกฎาคม 2522 ที่ จ.สมุทรปราการ
ที่อยู่	7 ซ.บุญศิริ 2 ต.ปากน้ำ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 10270
	โทร.02-3845484
ประวัติการศึกษา	2545 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้