การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริกและการควบคุมการเจริญโดยใช้เกลือของกรดอินทรีย์

FUNGAL CONTAMINATION OF CHILLI AND CHILLI PRODUCTS AND GROWTH CONTROL BY ORGANIC ACID SALTS

นางสาวเนตรชนก อดิศรเกษม

นางสาวพรศิริ ธรรมจิต

นายศุภชัย แจ้งกระจ่าง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

FUNGAL CONTAMINATION OF CHILLI AND CHILLI PRODUCTS AND GROWTH CONTROL BY ORGANIC ACID SALTS

NETCHANOK ADISORNKASEM

PORNSIRI THAMMAJIT

SUPACHAI CHEANGKRAJANG

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริกและการควบคุมการเจริญโดยใช้เกลือของกรดอินทรีย์
(Fungal contamination of chilli and chilli products and growth control by organic acid salts)

ชื่อนักศึกษา นางสาวเนตรชนก อดิศรเกษม นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 51050956
นางสาวพรศิริ ธรรมจิต นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 51050967
นายศุภชัย แจ้งกระจ่าง นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 51050991

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2554

คณะกรรมการสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ. ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ	ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล	
กรรมการ	รศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ	

.....
ประธานสาขาวิชา

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริกและการควบคุมการเจริญโดยใช้เกลือของกรดอินทรีย์

ชื่อนักศึกษา นางสาวเนตรชนก อดิศรเกษม
นางสาวพรศิริ ธรรมจิต
นายศุภชัย แจ้งกระจ่าง

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2554

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างพริกและผลิตภัณฑ์จากพริกจำนวน 6 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ พริกสด พริกแห้ง พริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มมาวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อรา โดยพริกทั้งเมล็ด (พริกสดและพริกแห้ง) นำมาวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราด้วยวิธี direct plating และผลิตภัณฑ์จากพริก (พริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้ม) นำมาวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดด้วยวิธี dilution plating พบว่าในตัวอย่างพริกสดพบการปนเปื้อนมากถึงร้อยละ 90.9 และในตัวอย่างพริกแห้งพบการปนเปื้อนรองลงมา (ร้อยละ 79.9) ส่วนในพริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มพบการปนเปื้อนน้อย (<10-4.8×10^2 CFU ต่อกรัม) และได้แยกเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เหล่านี้จำนวน 135 ไอโซเลต มาจำแนกชนิด เชื้อราที่พบมีหลายสกุล ได้แก่ *Aspergillus, Alternaria, Penicillium, Fusarium* และ *Cladosporium* เชื้อราที่พบมากที่สุดคือ *Aspergillus* โดยพบมากถึงร้อยละ 84.44 ของจำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด

เมื่อทำการวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ โพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเบนโซเอต และแคลเซียมโพรพิโอเนตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus flavus* B3DG ที่แยกได้จากพริกป่นหยาบ *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 และ *Aspergillus parasiticus* C5PD ที่แยกได้จากพริกแห้ง ในอาหารพริกจำลองที่ระดับ a_w 3 ระดับ (a_w 0.85, 0.90 และ 0.95) และระดับ pH 2 ระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(pH 5.0 และ 5.5) พบว่าที่สภาวะ a_w และ pH เดียวกัน โพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทั้ง 4 ชนิดมากที่สุด รองลงมาคือ โซเดียมเบนโซเอตและแคลเซียมโพรพิโอเนต และยังพบว่าเชื้อรา *A. parasiticus* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยเกลือของกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าเชื้อ *A. flavus* และเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์โดยเกลือของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด พบว่าที่ระดับ pH เดียวกันค่า MIC ที่ a_w 0.85 มีค่าน้อยกว่าค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.90 และ 0.95 ส่วนในสภาวะ a_w เดียวกันพบว่าค่า MIC ที่ pH 5.0 มีค่าน้อยกว่าค่า MIC ที่ pH 5.5

การศึกษาผลของโพแทสเซียมซอร์เบต (54 และ 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซินโดย *A. flavus* TISTR 3041, *A. flavus* B3DG, *A. parasiticus* TISTR 3041 และ *A. parasiticus* C5PD ในพริกสดที่เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 พบว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของโพแทสเซียมซอร์เบตซึ่งใช้ในการจุ่มพริกสดมีผลทำให้การปนเปื้อนของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ (*A. flavus* และ *A. parasiticus*) ลดลงบนพริกหลังจากเก็บรักษาครบ 7 วัน สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการลดการปนเปื้อนของเชื้อรา (ทุกสปีชีส์ที่ทดสอบ) คือที่ระดับความเข้มข้น 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อราลงเหลือร้อยละ 60.86-63.15 อย่างไรก็ตามสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบไม่มีผลช่วยลดการสร้างอะฟลาทอกซิน

คำสำคัญ : *Aspergillus, Alternaria, Penicillium, Fusarium* และ *Cladosporium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Fungal contamination of chilli and chilli products and growth control by organic acid salts
Students	Netchanok Adisornkasem Pornsiri Thammajit Supachai Cheangkrajang
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Biology
Academic Year	2011
Advisor	Assistant Professor Dr. Suree Nanasombat

ABTRACT

In this study, chilli and chilli products (10 samples each) including whole fresh chilli, whole dried chilli, coarse ground chilli, fine ground chilli, hot chilli paste and sour chilli paste were collected for fungal contamination analysis. Whole fresh chilli and dried chilli samples were analyzed for fungal contamination by direct plating method, while all ground chilli and chilli paste samples were analyzed for total yeast and mold counts by dilution plating method. Whole fresh chilli samples (90.9%) were highly contaminated with mold, whereas whole dried chilli samples had lower mold contamination (79.9%). All ground chilli and chilli paste samples had less fungal contamination with total yeast and mold counts of <10-4.8×10^2 CFU/g. Some molds contaminated in these samples (135 isolates) were identified. They were found to be *Aspergillus, Alternaria, Penicillium, Fusarium* and *Cladosporium.* The most predominance mold was *Aspergillus* (84.44% of total isolates).

Minimum inhibitory concentration of potassium sorbate, sodium benzoate and calcium propionate against *A. flavus* TISTR 3041, *A. flavus* B3DG isolated from coarse ground chilli, *A. parasiticus* TISTR 3276 and *A. parasiticus* C5PD isolated from dried chilli in Chilli Model Agar (CMA) at 3 a_w levels (a_w 0.85, 0.90 and 0.95) and at 2 pH levels (pH 5.0 and 5.5) were determined. At the same a_w and pH levels, potassium sorbate was the most effective to inhibit these mold species, followed by sodium benzoate and calcium propionate. *A. parasiticus* was more resistant to inhibit by these organic acid salts than *A. flavus*. Considering the effect of

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

each organic acid salt to inhibit each mold strain, the MIC values at a_w 0.85 was less than the MIC values at a_w 0.90 and 0.95 at the same pH level. At the same a_w level, the MIC values at pH 5.0 was less than the MIC values at pH 5.5.

Effect of potassium sorbate (54 and 81 mg/ml) on decreasing fungal contamination and aflatoxin production of *A. flavus* TISTR 3041, *A. flavus* B3DG, *A. parasiticus* TISTR 3041 and *A. parasiticus* C5PD in fresh chilli stored at 30°C, 95% relative humidity was studied. Increasing the concentration of potassium sorbate used for chilli dip resulted in decreasing fungal contamination of both strains (*A. flavus* and *A. parasiticus*) on chilli after 7-day storage. The most effective concentration of potassium sorbate to decrease fungal contamination (all species tested) was 81 mg/ml which was able to reduce fungal contamination down to 60.86-63.15%. However, all concentrations of potassium sorbate tested did not affect decreasing of aflatoxin content in fresh chilli.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้คำแนะนำแนวทางในการแปล รวมทั้งช่วยปรับปรุงแก้ไข และตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผศ. ลินจง สุขลำภู และ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่สละเวลาให้คำแนะนำ และร่วมเป็นคณะกรรมการสำหรับการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการจัดหาห้องสอบในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนที่ช่วยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน

ผู้จัดทำ

นางสาวเนตรชนก อดิศรเกษม

นางสาวพรศิริ ธรรมจิต

นายศุภชัย แจ้งกระจ่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	IX
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	3
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 พริกและผลิตภัณฑ์จากพริก	5
2.2 การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้กรดอินทรีย์	9
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราในพริก	19
2.4 วิธีการตรวจหาจำนวนเชื้อราในอาหาร	20
2.5 การจำแนกชนิดเชื้อราในอาหารและเชื้อราในอากาศ	26
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	28
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	31
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	31
3.2 วิธีการทดลอง	32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	39
4.1 การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก	39
4.2 การแยกเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก	39
4.3 ผลของกรดอินทรีย์ร่วมกับค่าพีเอชและค่าปริมาณน้ำอิสระในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus*	45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการประยุกต์ใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการยับยั้งการเจริญ และการลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ในพริกสด 49

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 54

บทที่ 6 เอกสารอ้างอิง 56

ภาคผนวก (ก) 61

ภาคผนวก (ข) 62

ภาคผนวก (ค) 70

ภาคผนวก (ง) 75

ภาคผนวก (จ) 76

ภาคผนวก (ฉ) 84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ชนิดของสารอินทรีย์สำคัญในกลุ่ม capsaicinoids ที่พบในพริก	7
2.2	ความเข้มข้นต่ำสุดของวัตถุกันเสียที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา 4 ชนิด ที่ pH ต่างๆกัน (%)	11
2.3	ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ รา และแบคทีเรีย	13
2.4	ประสิทธิภาพของกรดซอร์บิกในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ รา และแบคทีเรีย	15
4.1	การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกแห้งและพริกสดทั้งเมล็ดโดยวิธี Direct plating	43
4.2	การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกป่นละเอียด พริกป่นหยาบ น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้ม โดยวิธี Dilution plating	44
4.3	ปริมาณเชื้อราที่ปนเปื้อนในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก (ร้อยละ)	45
4.4	ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเบนโซเอต และแคลเซียมโพรพิโอเนตในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus*	48
4.5	ผลของโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการลดการปนเปื้อนและการสร้างอะฟลาทอกซิน โดย *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ในพริกสด	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	เครื่องเทศชนิดต่างๆ	8
2	เชื้อรา *Aspergillus flavus* B3DG ที่แยกได้จากพริกหยาบ	23
3	เชื้อรา *Aspergillus parasiticus* C5PD ที่แยกได้จากพริกแห้ง	24
4	ลักษณะของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus flavus*	41
5	พริกสดชุบด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ ร้อยละ 95	52
6	พริกสดชุบด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่เติมเชื้อ *Aspergillus*	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เนื่องจากคนส่วนใหญ่นิยมนำเครื่องเทศเติมลงในอาหารประกอบกับผู้บริโภคมีความต้องการอาหารที่มีรสชาติมากขึ้น และมีปริมาณโซเดียมและไขมันต่ำ เป็นผลให้มีความสนใจอย่างต่อเนื่องในการใช้เครื่องเทศและสมุนไพรในผลิตภัณฑ์อาหาร พริกเป็นหนึ่งในเครื่องเทศหลายชนิดที่นิยมใช้เติมลงในอาหารเพื่อเพิ่มรสชาติ พริก (chilli pepper) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae พริกอยู่ในสกุล Capsicum มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาเขตร้อน พริก 5 ชนิดหลักๆที่นิยมปลูกในครัวเรือน ได้แก่ *Capsicum annuum, C. baccatum, C. chinence, C. frutescens* และ *C. pubescens* พริกส่วนใหญ่ที่มีการเพาะปลูกเพื่อจำหน่ายเป็นพริกสปีชีส์ *C. annuum* คำว่า "capsicum" เป็นคำที่มาจากภาษากรีกคำว่า "kapso" มีความหมายว่า " to bite" (Shiva และคณะ, 2008) ศัพท์เฉพาะที่ใช้เรียกพริกมีมากมาย เช่น pepper, chili, chile, chilli, aji, paprika และ capsicum ซึ่งคำเหล่านี้มีความหมายเดียวกันกับคำว่า "chilli pepper" พริกในประเทศที่พูดภาษาสเปนจะเรียกว่า pimento ซึ่งปกติเป็นพริกสายพันธุ์ที่มีสีแดง พริกเป็นเครื่องเทศที่จำเป็นสำหรับใช้เป็นส่วนผสมอาหารในหลายประเทศทั่วโลก โดยใช้เพิ่มกลิ่น สี และรสชาติของอาหาร อาจจะใช้เป็นพริกทั้งเมล็ดหรือใช้เป็นพริกป่นหรือใช้ร่วมกับเครื่องเทศชนิดอื่นที่ให้กลิ่นรส (Kothari และคณะ, 2010)

การปนเปื้อนของเชื้อราและการสร้างสารพิษจากเชื้อราในพริกอาจเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนใดๆ ของกระบวนการผลิตตั้งแต่ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โรคที่เกิดจากเชื้อในแปลงเพาะปลูกพริกอาจปนเปื้อนไปสู่ผลของพริกที่เก็บเกี่ยวซึ่งจะนำไปเก็บรักษาต่อไป เชื้อราเหล่านี้ทำให้พริกเน่าเสีย การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก เป็นผลทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและทำให้ไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกแดงจากประเทศอเมริกาและอินเดีย โดยพบ storage fungi ได้แก่ *Aspergillus glaucus, Aspergillus candidus, Aspergillus flavus* และ *Aspergillus ochraceus* ปริมาณเชื้อราที่พบปนเปื้อนเฉลี่ย 1.6×10^{3} CFU/g ในตัวอย่างพริกแดงจากประเทศอเมริกาจำนวน 13 ตัวอย่าง และตัวอย่างพริกแดงจากอินเดียจำนวน 6 ตัวอย่าง พบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราเฉลี่ย 7.9×10^{4} CFU/g นอกจากนี้ยังพบเชื้อราชนิดอื่นๆ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus niger, Penicillium spp. และ *Rhizopus* spp. ในตัวอย่างพริกแดงจากอเมริกาซึ่งมีจำนวนเฉลี่ยของเชื้อราอยู่ที่ 1.6×10^{3} CFU/g และพริกแดงจากประเทศอินเดียมีจำนวนเชื้อราดังกล่าวเฉลี่ย 1.7×10^{5} CFU/g นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสารพิษจากเชื้อราในพริกจากประเทศต่างๆอีก เช่น อะฟลาทอกซิน บี 1 จากพริกในประเทศตุรกี (Aydin และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงควรหาวิธีควบคุมการเจริญของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

การใช้กรดอินทรีย์อ่อนและเกลือของกรดอ่อนเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราในอาหารรวมทั้งผลิตผลทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี เกลือของกรดอ่อนที่นิยมนำมาใช้ในอาหาร ได้แก่ โพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเบนโซเอต และแคลเซียมโพรพิโอเนต โพแทสเซียมซอร์เบตเป็นเกลือของกรดซอร์บิกที่นิยมใช้เป็นสารกันเสียกันอย่างกว้างขวางในอาหาร อาหารสัตว์ ยารักษาโรค และเครื่องสำอางค์ เนื่องจากมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (Stopforth และคณะ, 2005) ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ มีรายงานว่าโพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราในอาหารและในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น *Aspergillus niger* และ *Aspergillus flavus* ในขนมปัง *Penicillium digitatum* ในผลไม้ตระกูลส้ม (Smilanick และคณะ, 2008) *Phytophthora erythroseptica* และ *Phytophthora infestans* ในมันฝรั่ง (Mills และคณะ, 2004)

โซเดียมเบนโซเอตเป็นวัตถุกันเสียอีกชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ชะลอการเน่าเสียของอาหารกันมาก กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของโซเดียมเบนโซเอตเกี่ยวข้องกับพีเอช โซเดียมเบนโซเอตจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่ค่าพีเอชต่ำ และไม่มีประสิทธิภาพที่พีเอชเป็นกลาง (Jay และคณะ, 2005) นอกจากนี้โซเดียมเบนโซเอตยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *A. flavus* (López-Malo และคณะ, 2005) *P. digitatum* และ *Penicillium italicum* (Valencia-Chamorro และคณะ, 2010)

กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิก ซึ่งนิยมใช้ในรูปเกลือแคลเซียมและเกลือโซเดียม นิยมใช้เป็นสารต้านเชื้อราในขนมปัง เค้ก เนยแข็งบางชนิด และอาหารชนิดอื่นๆ ค่า pK ของโพรพิโอนิกเท่ากับ 4.87 และที่ pH 4.0 ร้อยละ 88 ของสารประกอบนี้จะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขณะที่ pH 6.0 จะมีสารประกอบนี้เพียงร้อยละ 6.7 ที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว โมเลกุลของกรดในรูปที่ไม่แตกตัวนี้ จำเป็นต่อกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ของกรด (Jay และคณะ, 2005)

ได้มีรายงานการใช้แคลเซียมโพรพิโอเนตร่วมกับสภาวะ a_w (0.94-0.97) และ pH (4.4-4.8) ระดับต่างๆ การใช้โพรพิโอเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ที่ทุกสภาวะ ยกเว้นที่ระดับ a_w 0.97 และ pH 4.8 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Penicillium roqueforti, Penicillium commune* และ *Eurotium rubrum* ในขนมปังจากข้าวไรน์ (rye bread) (Suhr และ Nielsen, 2004) ดังนั้นการทดลองนี้จึงน่าสนใจที่จะศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อราโดยเกลือของกรดอินทรีย์ทั้งสามชนิดดังกล่าวในสภาวะ a_w และ pH ต่างกันเพื่อจะได้นำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก และการจำแนกชนิดของเชื้อรา

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับ water activity และ pH ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่สร้างสารพิษ

1.2.3 เพื่อประยุกต์ใช้เกลือของกรดอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการชะลอการเจริญของเชื้อราและการสร้าง aflatoxin ของเชื้อราในพริกสด

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ในครั้งนี้จะศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับ water activity และ pH ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสียและก่อให้เกิดสารพิษในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก จากนั้นจึงได้ทำการทดลองนำเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆที่เหมาะสมไปเติมในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริกเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราและก่อให้เกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงผลของการใช้เกลือของกรดอินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก และเพื่อให้ผลิตภัณฑ์เก็บรักษาได้นานขึ้นและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 พริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

พริกเป็นพืชที่ผสมข้ามพันธุ์ได้ง่ายจึงทำให้มีความหลากหลายของสายพันธุ์มากขึ้นทั้งที่เกิดเองตามธรรมชาติและที่มีการผสมเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณลักษณะจำเพาะตามต้องการ เช่น ในกรณีของพริกยักษ์ที่นำมารับประทานเป็นผัก จะมีผลขนาดใหญ่ สีฉูดฉาด เช่น สีแดง สีเหลือง สีเขียว และสีม่วง ไม่เน้นรสชาติเผ็ด ในขณะที่ผลพริกอีกกลุ่มหนึ่งมีขนาดเล็ก แต่มีปริมาณสาร capsaicin ที่ให้รสเผ็ดจำนวนมาก นำไปทำเครื่องเทศหรือใช้เป็นวัตถุดิบสกัดสาร capsaicin เพื่อใช้ทำยา เป็นต้น ในกรณีที่เป็นพริกยักษ์ที่มีความเผ็ดน้อยมาก นิยมนำไปใช้รับประทานเป็นผัก บรรจุกระป๋องทั้งผลหรือหั่นเป็นชิ้นบรรจุกระป๋อง แต่ถ้าพริกที่มีความเผ็ดมักจะนำไปใช้ในรูปของเครื่องเทศคือเครื่องปรุงแต่งรสชาติของอาหารในรูปแบบต่างๆ เช่น นำไปบดเป็นพริกป่น ทำซอสต่างๆ สกัดเอาสารสำคัญภายในออกมาใช้ปรุงแต่งรสชาติอาหาร หรือใช้ทำยา พริกบางชนิดที่มีสีเข้มมาก จะใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมสกัดเอาสารให้สีมาใช้ประโยชน์ (พิทยา, 2551)

สำหรับการผลิตพริกแห้งเพื่อส่งขายภายในประเทศหรือส่งออกนอกประเทศ ผลของพริกสดซึ่งโดยปกติจะมีความชื้นประมาณร้อยละ 65-80 จะถูกทำให้แห้งอย่างช้าๆ จนมีความชื้นคงเหลือร้อยละ 7–10 โดยปกติจะใช้วิธีตากแดดให้แห้ง แต่ในบางพื้นที่ที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม อาจทำการอบแห้งด้วยไอร้อนที่อุณหภูมิ 50–60 องศาเซลเซียส จนมีความชื้นคงเหลือร้อยละ 7–8 โดยอบนาน 24–30 ชั่วโมง (พิทยา, 2551)

2.1.1 การใช้ประโยชน์จากพริกในเชิงอุตสาหกรรม

อาจจำแนกอย่างกว้างๆ เป็น 2 ประเภทคือ

1. เพื่อประโยชน์ทางด้านสี ในกรณีนี้มักจะเลือกพริกที่มีความเผ็ดน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพริกชนิด *Capsicum annuum* (พริกหยวก พริกยักษ์)

2. เพื่อประโยชน์ทางด้านความเผ็ดร้อน จะใช้มากในการปรุงแต่งรสชาติอาหารใช้ทำยาชนิดต่างๆมักเลือกใช้พริกที่มีความเผ็ดมากคือ พริกชนิด *Capsicum frutescens* (พริกขี้หนู) คุณภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของพริกชนิดนี้ในส่วนที่เกี่ยวกับความเผ็ดจะวัดจากปริมาณสารกลุ่ม capsaicinoids ซึ่งถ้ามีมาก พริกจะเผ็ดมากด้วย (ค่าความเผ็ดของพริกวัดเป็นหน่วย scoville unit) (พิทยา, 2551)

2.1.2 องค์ประกอบทางเคมีของพริก

องค์ประกอบสำคัญในพริกอาจจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สารที่ให้ความเผ็ด (capsaicinoids) และสารที่ให้สี (pigments) ซึ่งมีรายละเอียดและโครงสร้างทางเคมีดังนี้

ก. Capsaicinoids จะพบในปริมาณที่แตกต่างกันระหว่างร้อยละ 0.1–1.0 โดยน้ำหนัก เป็นกลุ่มของสารที่มีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกันชนิดที่สำคัญที่สุดคือ capsaicin ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นองค์ประกอบสำคัญที่กำหนดความเผ็ดของผลพริก ซึ่งจากการศึกษาพบว่า แต่ละส่วนของผลจะมีปริมาณสารให้ความเผ็ดที่แตกต่างกันในขณะที่บริเวณเปลือกผลจะมีปริมาณสารให้ความเผ็ดอยู่น้อยมากหรือไม่มีเลยสารเคมีกลุ่มนี้จะมีอยู่มากที่บริเวณแกนกลางของผลที่เมล็ดเกาะอยู่ ชนิดของสารอินทรีย์ที่สำคัญในกลุ่มของ capsaicinoids ได้แก่ capsaicin, dihydrocapsaicin, homocapsaicin, nordihydrocapsaicin, homodihydrocapsaicin, nonanoic acid vanillylamide และ decanoic acid vanillylamide (พิทยา, 2551) (ตารางที่ 2.1)

ข. Pigments ชนิดและปริมาณของสารสีในผลจะขึ้นอยู่กับชนิด (species) พันธุ์ (varieties) และอายุของผล ในผลแก่จะมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ สารในกลุ่ม capsaicinoids ที่มีโครงสร้างทางเคมีใกล้เคียงกันมากและ xanthophylls ซึ่งจากการศึกษาพบมากกว่า 30 ชนิด และชนิดที่สำคัญที่สุดใน *Capsicum annuum* ผลแดง ได้แก่ สาร capsanthin และ สาร capserubin นอกจากนี้ยังพบ β–carotene zeaxanthin บ้างเล็กน้อย (พิทยา, 2551)

2.1.3 คุณค่าทางอาหารของพริก

กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ กรมวิทยาศาสตร์บริการ (2547) ได้วิเคราะห์ผลพริกขี้หนู พริกหยวก และพริกหวานที่จำหน่ายในท้องตลาดของประเทศไทย พบว่าในผลพริกเหล่านี้หนัก 100 กรัม จะประกอบด้วย ความชื้น 64.0–93.4 กรัม โปรตีน 1.0–5.55 กรัม ไขมัน 0.46–6.25 กรัม กาก 1.67–10.60 กรัม เถ้า 0.47–2.10 กรัม คาร์โบไฮเดรต 0.93–12.40 กรัม ค่าพลังงานความร้อน 12.8–124.40 แคลอรี่ แคลเซียม 4.88–66.50 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 23.10–181.70 มิลลิกรัม เหล็ก 0.40–1.66 มิลลิกรัม โซเดียม 0.93–57.30 มิลลิกรัม โพแทสเซียม 219.70–891.20 มิลลิกรัม วิตามินเอ 81.70–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

75,111.1 มิลลิกรัม วิตามินบี 1 0.09–0.40 มิลลิกรัม วิตามินบี 2 0.05–0.42 มิลลิกรัม ไนอาซีน 0.79–9.15 มิลลิกรัม วิตามินซี 33.3–132.30 มิลลิกรัม ซึ่งแสดงถึงคุณค่าทางอาหารของผลพริก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแร่ธาตุและวิตามิน ซึ่งมีอยู่ในปริมาณที่มาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม รวมทั้งวิตามินเอและวิตามินซี ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกายอย่างมาก (พิทยา, 2551)

ตารางที่ 2.1 ชนิดของสารอินทรีย์สำคัญในกลุ่ม capsaicinoids ที่พบในพริก

โครงสร้างพื้นฐาน	ชื่อสาร
(CH3)2.CH.CH.=CH.(CH2)4-CO-R[1/R]	Capsaicin
(CH3)2CH.(CH2)6-CO-R	Dihydrocapsaicin
(CH3)2CH.(CH2)3-CO-R	Nordihydrocapsaicin
(CH3)2CH.(CH2)9-CO-R	Homodihydrocapsaicin
(CH3)2CH.CH=CH.(CH2)3-CO-R	Homocapsaicin
CH3.(CH2)3.CO-R	Nonanoic acid vanillylamide
(CH3)2CH.(CH2)8.CO-R	Decanoic acid vanillylamide

[1/R] คือ –NH-CH2

ที่มา: (พิทยา, 2551)

2.1.4 ความสำคัญทางเศรษฐกิจของพริกในประเทศไทย

ถึงแม้จะไม่ใช่พืชที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทยแต่พริกก็เป็นพืชที่มีประวัติการใช้ประโยชน์ในอาหารไทยและยาพื้นบ้านมานานแพร่หลายในทุกภาคของประเทศ ดังนั้นจึงเป็นพืชเครื่องเทศที่คนไทยบริโภคทุกวันทำให้พริกมีความสำคัญทางเศรษฐกิจตั้งแต่ระดับครัวเรือน ระดับตลาดชุมชนท้องถิ่น จนถึงระดับการส่งออก ปัจจุบันไม่มีสถิติการเพาะปลูก ผลผลิต และปริมาณรวมทั้งมูลค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของพริกในประเทศไทยที่ชัดเจน แต่กรณีของการส่งออก ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกหลักรายหนึ่งในตลาดโลก โดยในปี พ.ศ. 2546 ประเทศไทยส่งพริกแห้งออกจำหน่ายได้ 548 ตัน มูลค่า 57 ล้านบาท และเพิ่มมากขึ้นเป็นเท่าตัวเป็น 1,080 ตัน มูลค่า 73.373 ล้านบาทในปี พ.ศ. 2547 อย่างไรก็ตามถึงแม้จะส่งออกได้มากพอสมควร แต่ประเทศไทยก็ต้องนำเข้าพริกแห้งจากต่างประเทศปีละ 151 ตัน และ 26 ตันในปี พ.ศ. 2546 และ พ.ศ. 2547 เช่นเดียวกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาในรายละเอียดไทยนำเข้าพริกแห้งที่มีรสเผ็ดน้อยแต่มีสีเข้มเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในขณะที่เราส่งออกพริกแห้งที่มีรสชาติเผ็ด เช่น พริกจินดา พริกห้วยสีทน เป็นต้น ทั้งนี้โดยมีแหล่งผลิตพริกเพื่อการส่งออกในจังหวัดภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นหลัก (พิทยา, 2551)

2.1.5 การปนเปื้อนของเชื้อราในเครื่องเทศ

Abdel-Hafez และคณะ (1989) ตรวจหาเชื้อราที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงในเครื่องเทศหลายชนิดของอียิปต์ ได้แก่ เทียนตากบ (caraway) ยี่หร่า (cumin) เทียนข้าวเปลือก (fennel) เทียนสัตตบุศย์ (anise) และเมล็ดผักชี (coriander seeds) พบว่าจำนวนโคโลนีเฉลี่ย 5,020 โคโลนีต่อกรัมของเมล็ดแห้ง ยี่หร่า 7,370 โคโลนีต่อกรัมของเมล็ดแห้ง ต้นเทียนข้าวเปลือก 7,320 โคโลนีต่อกรัมของเมล็ดแห้ง ต้นเทียนสัตตบุศย์ 8,700 โคโลนีต่อกรัมของเมล็ดแห้ง และเมล็ดผักชี 5,340 โคโลนีต่อกรัมของเมล็ดแห้ง เชื้อราที่ปนเปื้อนส่วนใหญ่ ได้แก่ *Aspergillus fumigates* ซึ่งพบในเครื่องเทศทุกชนิดที่ตรวจสอบ แต่พบเชื้อราชนิดนี้ในต้นเทียนสัตตบุศย์และเมล็ดผักชีเพียง 1 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังสามารถแยก *Emericella nidulans* และ *Rhizomucor pusillus* ได้จากตัวอย่างเครื่องเทศเหล่านี้ เชื้อราที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงที่แยกได้จากเมล็ด ได้แก่ *Malbranchea pulchella, Humicola grisea* subsp. *Thermoidea, Myceliophtora thermophila* และ *Talaromyces dupontii*

(A) (B) (C) (D)

รูปที่ 1 เครื่องเทศชนิดต่างๆ (A) เทียนตากบ (B) ยี่หร่า (C) เทียนข้าวเปลือก (D) เทียนข้าวเปลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้กรดอินทรีย์

เป็นที่ทราบกันมานานแล้วว่า กรดอินทรีย์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายเชื้อราคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราขึ้นอยู่กับจำนวนคาร์บอนที่ประกอบอยู่ในกรดนั้น กรดที่มีคาร์บอนเรียงตัวกัน 11-20 อะตอม เป็นกรดที่เหมาะสม กรดที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากันแต่มีการวางเรียงตัวไม่เหมือนกันจะมีประสิทธิภาพไม่เท่ากัน เช่น กรดที่มีคาร์บอนวางเรียงตัวกันเป็นกิ่งก้านสาขา มีประสิทธิภาพในยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้น้อยกว่ากรดที่มีคาร์บอนวางเรียงตัวกันเป็นเส้นตรง (ปรียา, 2524)

นอกจากนี้ถ้ามีกรุ๊ป OH ไปแทนที่ H แล้ว จะทำให้กรดมีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อราลดลงด้วย กรดที่มีกรุ๊ปคาร์บอกซิล (COOH) 2 กรุ๊ป มีคุณสมบัติด้อยกว่ากรดที่มีกรุ๊ปคาร์บอกซิลเพียงกรุ๊ปเดียว กรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวเป็นกรดที่มีโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพดี ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อราจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ลดลง (ปรียา, 2524)

กรดและเกลือที่นิยมใช้ทั่วไปในการถนอมอาหาร ได้แก่ กรดโพรพิโอนิก กรดซอร์บิก และกรดเบนโซอิก ผลิตภัณฑ์ขนมอบ เค้ก ผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ไม่ใช้ยีสต์ และเนยแข็ง นิยมใช้เกลือโพรพิโอเนต (propionate) ส่วนเกลือซอร์เบท (sorbate) ใช้ในผลิตภภัณฑ์ผลไม้ในน้ำเชื่อม เครื่องดื่มต่างๆ และไวน์ กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต มีประสิทธิภาพดีมากในอาหารที่มี pH ต่ำ ดังนั้นจึงนิยมใช้เติมในอาหารที่มีความเป็นกรดสูง เช่น ผลิตภัณฑ์ผลไม้และเครื่องดื่มอัดแก๊ส (ปรียา, 2524)

2.2.1 กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต (benzoic acid and benzoate)

กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตเป็นวัตถุกันเสียที่นิยมใช้กันในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรูปของโซเดียมเบนโซเอตและนิยมใช้ในรูปของเกลือมากกว่ากรด เนื่องจากวัตถุกันเสียชนิดนี้จะละลายได้ง่ายกว่าในรูปของเกลือที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส โซเดียมเบนโซเอตละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ได้สูงถึง 74.2 กรัม และ 66.0 กรัม ตามลำดับ ส่วนในรูปของกรดนั้นจะละลายในน้ำได้น้อยมาก แต่จะละลายได้ดีขึ้นในแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และน้ำมัน กรดเบนโซอิกพบมากตามธรรมชาติในลูกพรุน แครนเบอรี พลัม อบเชย แอปเปิ้ล และมะกอกสุก กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตที่จำหน่ายในท้องตลาดจะอยู่ในรูปของผลึกสีขาวหรือเป็นเกล็ด (ศิวาพร, 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1.1 ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต

วัตถุกันเสียชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ มีผลต่อผนังเซลล์ และเอนไซม์ของจุลินทรีย์ โดยเบนโซเอตจะไปทำให้กระบวนการแทรกซึมอาหารของจุลินทรีย์ผิดปกติ ในขณะเดียวกันจะไปยับยั้งการสร้างเอนไซม์บางชนิดและยับยั้งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตจะสูงที่สุดที่ช่วงความเป็นกรดด่าง 2.5–4.0 ซึ่งต่ำกว่ากรดซอร์บิกและกรดโพรพิโอนิก และจะมีประสิทธิภาพสูงในรูปของกรดที่ไม่แตกตัว จึงเหมาะที่จะใช้กับความเป็นกรดสูงหรือมี pH ต่ำ ดังผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 2.3 กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และราได้ดีกว่าแบคทีเรียดังข้อมูลในตารางที่ 2.4 จะเห็นได้ว่าปริมาณของกรดเบนโซอิก ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสูงกว่าของยีสต์และรา (ศิวาพร, 2546)

2.2.1.2 การใช้กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตในผลิตภัณฑ์อาหาร

กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตจะมีประสิทธิภาพสูงที่ pH ต่ำกว่า 4.5 ดังนั้นอาหารที่ควรใช้วัตถุกันเสียชนิดนี้เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บนั้นจึงควรเป็นอาหารที่มีความเป็นกรดสูงหรือ pH ต่ำ เช่น เครื่องดื่มทั้งชนิดที่อัดคาร์บอนไดออกไซด์และไม่อัดคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำหวาน น้ำผลไม้ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ แยม เยลลี่ ผักดอง ผลไม้ดอง น้ำสลัด ฟรุตสลัด และเนยเทียม เป็นต้น สำหรับปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุข ฉบับที่ 84 นั้น อนุญาตให้ใช้กรดเบนโซอิก โซเดียมเบนโซเอตหรือโพแทสเซียมเบนโซเอตได้ในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมของอาหาร ทั้งนี้อาจใช้วัตถุกันเสียชนิดนี้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับโพแทสเซียมซอร์เบต หรือเอสเทอร์ออฟพารา-ไฮดรอกซิเบนโซอิกแอซิดก็ได้ แต่เมื่อรวมกันแล้วปริมาณที่ใช้จะต้องไม่เกินปริมาณที่กำหนดไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณะสุขฉบับที่ 84 (ศิวาพร, 2546)

2.2.1.3 ความปลอดภัยในการใช้

พบว่าไม่ทำให้เกิดการสะสมในร่างกาย เนื่องจากร่างกายมีกลไกในการขจัดความเป็นพิษของกรดเบนโซอิก โดยกรดเบนโซอิกที่บริโภคเข้าไปจะไปรวมกับโคเอนไซม์ เอ (coenzyme A)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดเป็นเบนโซอิลโคเอนไซม์ เอ (benzoyl coenzyme A) โดยมีเอนไซม์ซินเทเทส (synthetase) เป็นตัวเร่ง จากนั้นเบนโซอิลโคเอนไซม์ เอ จะรวมกับไกลซีน (glycine) เกิดเป็นกรดฮิพพิวริก (hippuric acid) โดยมีเอนไซม์เอซิลทรานเฟอร์เรส(acyltransferase) เป็นตัวเร่ง และถูกขับถ่ายออกทางปัสสาวะ ส่วนที่เหลือที่ไม่ได้ถูกร่างกายขับออกในรูปของกรดฮิพพิวริกนั้น จะถูกขจัดออกทางร่างกาย โดยการรวมตัวกับกรดไกลคิวโรนิก (glycuronic acid) แล้วขับออกทางปัสสาวะในรูปของกรดเบนโซอิลไกลคิวโรนิก (benzoyl glycuronic acid) โดยทั่วไปการขับถ่ายของกรดฮิพพิวริกทางปัสสาวะในคนจะประมาณ 1.0-2.5 กรัมต่อวัน ซึ่งจะเท่ากับกรดเบนโซอิกที่บริโภคเข้าไป 0.7-1.7 กรัม สำหรับความสามารถในการขจัดกรดเบนโซอิกจะแปรผันไปตามชนิดสัตว์ด้วย (ศิวาพร, 2546)

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นต่ำสุดของวัตถุกันเสียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ pH ต่างๆกัน

ชนิดของวัตถุกันเสีย	*Cheatomonium globosum*	*Alternaria solani*	*Penicillium citrinum*	*Aspergillus niger*
		pH 3		
Benzoic acid	0.08	0.10	0.10	0.04
Methyl p-hydroxybenzoate	0.06	0.06	0.05	0.08
Propyl p- hydroxybenzoate	0.008	0.015	0.005	0.02
Propionic acid	0.04	0.04	0.04	0.08
Sorbic acid	0.01	0.005	0.02	0.04
		pH 5		
Benzoic acid	0.10	0.15	0.20	0.20
Methyl p-hydroxybenzoate	0.06	0.08	0.08	0.10
Propyl p- hydroxybenzoate	0.10	0.02	0.01	0.03
Propionic acid	0.04	0.06	0.08	0.08
Sorbic acid	0.06	0.02	0.08	0.08

ที่มา: ศิวาพร (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นต่ำสุดของวัตถุกันเสียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ pH ต่างๆกัน (ต่อ)

ชนิดของวัตถุกันเสีย	*Cheatomonium globosum*	*Alternaria solani*	*Penicillium citrinum*	*Aspergillus niger*
		pH 7		
Benzoic acid	+	+	+	+
Methyl p-hydroxybenzoate	0.10	0.10	0.15	0.16
Propyl p- hydroxybenzoate	0.04	0.05	0.06	0.05
Propionic acid	+	+	+	+
Sorbic acid	+	+	+	+
		pH 9		
Benzoic acid	+	+	+	+
Methyl p-hydroxybenzoate	0.10	0.10	0.15	0.16
Propyl p- hydroxybenzoate	0.04	0.05	0.06	0.05
Propionic acid	+	+	+	+
Sorbic acid	+	+	+	+

ที่มา: ศิวาพร (2546)

2.2.2 กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบต (sorbic acid and sorbates)

กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบตเป็นวัตถุกันเสียอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี กลิ่น และรส เวลาใช้จึงไม่ทำให้กลิ่นรสและสีของอาหารเปลี่ยนแปลง กรดซอร์บิกเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวและเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่มีการนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสีย สำหรับเกลือของกรดชนิดนี้ที่นิยมใช้เป็นวัตถุกันเสีย ได้แก่ แคลเซียมซอร์เบต โซเดียมซอร์เบต และโพแทสเซียมซอร์เบต โดยเฉพาะอย่างยิ่งโพแทสเซียมซอร์เบตจะนิยมใช้กันมากที่สุด กรดซอร์บิกเป็นสารประกอบผงสีขาวหรือเป็นเกล็ด มีการละลายได้ร้อยละ 0.16 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเกลือแคลเซียมซอร์เบตละลายน้ำได้ร้อยละ 1.2 และเกลือโซเดียมซอร์เบตละลายน้ำได้ร้อยละ 32 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วนเกลือโพแทสเซียมซอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมซอร์เบตละลายน้ำได้ร้อยละ 32 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วนเกลือโพแทสเซียมซอร์เบตละลายน้ำได้ร้อยละ 139.2 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงขึ้นการละลายของกรดและเกลือของวัตถุกันเสียชนิดนี้จะเพิ่มขึ้นด้วย (ศิวาพร, 2546)

ตารางที่ 2.3 ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย

ชนิดของจุลินทรีย์	pH	MIC (ppm)
ยีสต์		
Hansenula sp.	4.0	180
Sporogenic yeasts	2.6-4.5	20-100
Asporogenic yeasts	4.0-5.0	70-150
Saccharomyces sp.	3.0-6.0	100-7000
Debaryomyces hansenii	4.8	500
รา		
Aspergillus sp.	3.0-5.0	20-300
Rhizopus nigricans	5.0	30-120
Mucor racemosus	5.0	30-120
Penicillium glaucum	5.0	400-500
Cladosporium herbarum	5.1	100
Byssochlamys nivia	5.3	500
แบคทีเรีย		
Escherichia coli	5.2-5.6	50-120
Bacillus cereus	6.3	555
Lactobacillus sp.	4.3-6.0	300-1800

ที่มา: ศิวาพร (2546)

2.2.2.1 ประสิทธิภาพของกรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบต

กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบตสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายยีสต์และราได้ดีกว่าแบคทีเรียดังรายละเอียดที่แสดงในตารางที่ 2.5 โดยจะเห็นได้ว่าปริมาณของซอร์เบตที่ต้องใช้ยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบตในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์นั้น จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และผนังเซลล์ของจุลินทรีย์รวมทั้งไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum, Bacillus cereus* และ *Bacillus* sp. ได้ด้วย กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบตจะมีประสิทธิภาพดีในรูปที่ไม่แตกตัวหรือในสภาวะที่มี pH ต่ำ ดังนั้นจึงไม่เหมาะที่จะใช้กับอาหารที่มี pH สูง โดยประสิทธิภาพของวัตถุกันเสียชนิดนี้จะสูงสุดในช่วง pH ต่ำกว่า 6.5 จนถึง pH 6.5 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าเบนโซเอตและโพรพิโอเนต แต่จะมีส่วนคล้ายเบนโซเอตและโพรพิโอเนตคือ เมื่อ pH ของอาหารเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพของวัตถุกันเสียดังกล่าวจะลดลง ดังข้อมูลที่แสดงในตารางที่ 2.3 การเติมเกลือและน้ำตาลในอาหาร จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของวัตถุกันเสียชนิดนี้ เช่นเดียวกับการเติมซิสทีน (cystine) และซิสเตอีน (cystein) แต่ถ้าเป็นเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ จะทำให้ประสิทธิภาพของวัตถุกันเสียชนิดนี้ลดลง (ศิวาพร, 2546)

ตารางที่ 2.3 ประสิทธิภาพของกรดเบนโซอิกในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ เชื้อราและแบคทีเรีย (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	**pH**	**MIC (ppm)**
แบคทีเรีย		
Micrococcus sp.	5.5-5.6	50-100
Pseudomonas sp.	6.0	200-480
Streptococcus sp.	5.2-5.6	200-400
Listeria monocytogenes	5.6	3000

ที่มา: ศิวาพร (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ประสิทธิภาพของกรดซอร์บิกในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย

ชนิดของจุลินทรีย์	pH	MIC (ppm)
ยีสต์		
Saccharomyces cerevisiae	3.0	25
Saccharomyces ellipsoideus	3.5	50-200
Torula lypolytica	5.0	100-200
Candida krusei	3.4	100
รา		
Aspergillus niger	2.5-4.0	100-500
Botrytis cinerea	3.6	120-250
Penicillium digitatum	4.0	200
Rhizopus sp.	3.6	120
แบคทีเรีย		
Escherichia coli	5.2-5.6	50-100
Bacillus sp.	5.2-5.6	50-100
Clostridium sp.	5.5-6.3	50-1000
Salmonella sp.	6.7-6.8	100-10000

ที่มา: ศิวาพร (2546)

2.2.2.2 การใช้กรดซอร์บิกหรือเกลือของกรดซอร์เบตในผลิตภัณฑ์อาหาร

ผลิตภัณฑ์อาหารทั่วๆไปนิยมใช้กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบตในการช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ประเภทเนยเทียม เนยแข็ง เครื่องดื่มต่างๆทั้งชนิดที่อัดคาร์บอนไดออกไซด์และไม่อัดคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำหวาน น้ำผลไม้ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบ เช่น ไวน์เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ในผลิตภัณฑ์ แยม เยลลี ฟรุตสลัด ฟรุตคอกเทล น้ำสลัดต่างๆ ผลไม้แห้ง ผักแห้ง ผักดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อ ผลิตภัณฑ์ไก่ ผลิตภัณฑ์ปลา ยา และเครื่องสำอางค์ชนิดต่างๆด้วย ในผลิตภัณฑ์ขนมอบประเภทเค้ก พาย โดนัท หรือประเภทที่มีการทำให้ฟูโดยใช้ผงฟูนั้นจะนิยมใช้กรดซอร์บิกและเกลือเบนโซเอตในการยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา โดยอาจใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพแทสเซียมซอร์เบตร้อยละ 0.05-0.1 ใส่ลงไปบนผลิตภัณฑ์โดยตรงหรือพ่นที่ผิวของผลิตภัณฑ์ ส่วนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม อาจใช้เกลือซอร์เบตเพียงอย่างเดียว หรือผสมกับโซเดียมเบนโซเอตในปริมาณร้อยละ 0.05-0.1 สำหรับผลิตภัณฑ์แยมและเยลลี่จะใช้กรดซอร์บิกหรือเกลือซอร์เบตร้อยละ 0.1 ลงไปโดยตรงหรือจะใช้ร่วมกับวัตถุกันเสียชนิดอื่นก็ได้ (ศิวาพร, 2546)

สำหรับปริมาณที่อนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุขฉบับที่ 84 นั้น ได้อนุญาตให้ใช้กรดซอร์บิกและแคลเซียมซอร์เบต โซเดียมซอร์เบต หรือโพแทสเซียมซอร์เบต ในโพรเซสชีสได้สูงสุดไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโพรเซสชีส ส่วนในเวย์ชีสอนุญาตให้ใช้กรดซอร์บิกสูงสุดไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเวย์ชีส หรือให้ใช้โซเดียมซอร์เบตหรือโพแทสเซียมซอร์เบตได้ไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเวย์ชีส ส่วนในผลิตภัณฑ์มะกอกดองอนุญาตให้ใช้กรดซอร์บิกในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมะกอกดอง โดยอาจใช้กรดซอร์บิกเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับโซเดียมซอร์เบตที่คำนวณเป็นกรดซอร์บิก แต่เมื่อรวมกันแล้วต้องไม่เกินปริมาณดังกล่าว ในผลิตภัณฑ์แยมและเยลลีอาจใช้กรดซอร์บิกเพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับโซเดียมเบนโซเอต โพรพิลพาราเบนแต่เมื่อรวมกันแล้วต้องไม่เกินปริมาณดังกล่าว สำหรับแอปริคอตแห้งนั้น อนุญาตให้ใช้กรดซอร์บิกได้ในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมแอปริคอตแห้ง ให้ใช้เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับโซเดียมซอร์เบต แต่เมื่อรวมกันแล้วต้องไม่เกินปริมาณดังกล่าว ส่วนผลิตภัณฑ์อื่นๆนอกเหนือจากที่ได้กล่าวไว้ ถ้าหากต้องการใช้วัตถุกันเสียชนิดนี้ จะต้องขออนุญาตเป็นกรณีๆไป (ศิวาพร, 2546)

2.2.2.3 ความปลอดภัยในการใช้

กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบตจัดเป็นวัตถุกันเสียที่มีความปลอดภัยในการใช้ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุกันเสียชนิดอื่นๆ จากการศึกษาในหนูทดลอง 100 ตัว เป็นหนูตัวผู้ 50 ตัว และหนูตัวเมีย 50 ตัว ให้หนูทดลองบริโภคอาหารที่มีกรดซอร์บิกผสมอยู่ในระดับร้อยละ 0 และร้อยละ 5 ใช้เวลาทดลองเป็นเวลา 2 ชั่วอายุของหนูทดลอง ผลการทดลองพบว่าในชั่วอายุแรกหนูทดลองที่ได้รับกรดซอร์บิกร้อยละ 5 สำหรับหนูทดลองตัวผู้จะมีอายุในชั่วอายุแรกเป็นเวลา 811 วัน สำหรับหนูทดลองตัวเมียจะมีอายุในชั่วอายุแรกเป็นเวลา 789 วัน ส่วนหนูทดลองตัวผู้ที่ไม่ได้รับกรดซอร์บิกจะมีอายุในชั่วอายุแรก 709 วัน และ 804 วันสำหรับหนูทดลองตัวเมีย จากการนำซากหนูทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ตายแล้วมาทำการตรวจวิเคราะห์ปรากฏว่าไม่พบอาการผิดปกติที่อวัยวะต่างๆเลย สำหรับอาการเนื้องอกนั้นทั้งในกลุ่มของหนูทดลองที่ได้รับและไม่ได้รับกรดซอร์บิก จะมีเพียงกลุ่มละ 2 ตัวเท่านั้นที่เกิดอาการดังกล่าว ส่วนการทดลองในชั่วอายุที่ 2 นั้นได้ดำเนินการเช่นเดียวกับในชั่วอายุแรก เพียงแต่เมื่อหนูมีอายุครบ 250 วัน ได้นำหนูทดลองทั้งหมดมาฆ่าและทำการตรวจวิเคราะห์ซากพบว่า ตับ ไต หัวใจ และอัณฑะของหนูทดลองทั้งหมดไม่มีอาการผิดปกติ ส่วนการทดลองในหนูและสุนัข ผลคือ เมื่อสัตว์ทดลองบริโภคอาหารที่มีกรดซอร์บิกร้อยละ 5 เป็นเวลา 9 วัน จะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและอวัยวะของสัตว์ทดลองเลย แต่ถ้าหากให้สัตว์ทดลองได้รับอาหารที่มีกรดซอร์บิกอยู่ถึงร้อยละ 8 จะทำให้น้ำหนักของตับเพิ่มขึ้น (ศิวาพร, 2546)

การใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีซอร์เบตเป็นวัตถุกันเสียในปริมาณมาก อาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการแพ้หรือระคายเคืองกับผิวหนังของผู้ที่มีความไวต่อสารนี้ อาการดังกล่าวจะพบเฉพาะผู้ที่มีความไวต่อสารนี้ที่ใช้ยาหรือเครื่องสำอางค์ที่มีซอร์เบตเป็นวัตถุกันเสียนั้น ยังไม่พบอาการแพ้กับผู้บริโภคที่บริโภคอาหารที่มีซอร์เบตเป็นวัตถุกันเสีย (ศิวาพร, 2546)

2.2.3 กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนต (Propionic acid and Propionates)

กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนต เป็นวัตถุกันเสียอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมาก เป็นกรดที่รวมอยู่ในกลุ่มของกรดอะลิฟาติกโมโนคาร์บอกซิลิก (aliphatic monocarboxylic acid) พบตามธรรมชาติในอาหารประเภทหมักดองและในสวิสชีส (swiss cheese) สำหรับการใช้ในอาหารนั้นนิยมใช้ในรูปของเกลือมากกว่ากรด เพราะละลายได้ง่ายกว่า เกลือโซเดียมโพรพิโอเนตจะละลายได้ง่ายเกลือแคลเซียมโพรพิโอเนต (ศิวาพร, 2546)

2.2.3.1 ประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนต

กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนตจะมีประสิทธิภาพในการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียได้ดีกว่ายีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถทำลายเชื้อราและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรพ (rope) ในผลิตภัณฑ์ขนมปังหรือผลิตภัณฑ์ขนมอบต่างๆได้เป็นอย่างดี ในขณะเดียวกันจะไม่มีผลต่อยีสต์ที่ช่วยให้ผลิตภัณฑ์ขนมอบฟู จากการทดลองพบว่า กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนตจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียและเป็นสาเหตุให้เกิดอาหารเป็นพิษด้วย เช่น *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cereus, Escherichia coli, Staphylococcus aereus และ *Salmonella senftenberg* เป็นต้น สำหรับประสิทธิภาพของกรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนตจะดีที่สุดในช่วง pH ของอาหารต่ำกว่า 5 จนถึง 5 เมื่อ pH สูงขึ้นประสิทธิภาพของวัตถุกันเสียชนิดนี้จะยิ่งลดลง เช่นเดียวกับประสิทธิภาพของเกลือเบนโซเอตและซอร์เบต แสดงในตารางที่ 2.3 (ศิวาพร, 2546)

2.2.3.2 การใช้กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนตในผลิตภัณฑ์อาหาร

สำหรับการใช้กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนตในอาหารนั้นดังที่ทราบแล้วว่า กรดและเกลือของวัตถุกันเสียชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพในการทำลายราและแบคทีเรียได้ดีกว่ายีสต์ โดยเฉพาะราและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรพ (rope) ในขนมปัง จึงนิยมใช้วัตถุกันเสียชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์ขนมปังกันมาก รวมถึงผลิตภัณฑ์ขนมอบที่อาศัยยีสต์ช่วยในการขึ้นฟู สำหรับในผลิตภัณฑ์ขนมปัง นิยมใช้วัตถุกันเสียชนิดนี้ในรูปของเกลือแคลเซียมมากกว่า เพื่อเป็นการช่วยเพิ่มคุณค่าทางอาหารหรือแคลเซียมให้ผู้บริโภคด้วย ส่วนผลิตภัณฑ์ประเภทเค้กหรือผลิตภัณฑ์ขนมอบประเภทที่ใช้ผงฟูนั้น จะนิยมใช้ในรูปของเกลือโซเดียมหรือโพแทสเซียมโพรพิโอเนตเพราะหากใช้ในรูปของเกลือแคลเซียม แคลเซียมอิออนจะไปทำปฏิกิริยากับผงฟู ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆที่นิยมใช้วัตถุกันเสียชนิดนี้ ได้แก่ เนยแข็งชนิดต่างๆ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่มีเนยแข็งเป็นส่วนประกอบ เช่น cheese spreads นอกจากนี้ยังมีการใช้ในผลิตภัณฑ์ผักแห้ง ผลไม้ และน้ำหวานชนิดต่างๆ เป็นต้น แต่เนื่องจากกรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรพิโอเนตมีข้อจำกัดคือ มีกลิ่นรสคล้ายเนยแข็ง ดังนั้นการใช้วัตถุกันเสียชนิดนี้จะนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบและเนยแข็งชนิดต่างๆ มากกว่าผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่นๆ (ศิวาพร, 2546)

2.2.3.3 ความปลอดภัยในการใช้

จากการศึกษาถึงอันตรายที่จะได้รับจากวัตถุกันเสียชนิดนี้พบว่า กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพรโอเนตเป็นวัตถุกันเสียที่สามารถถูกเมตาบอไลท์ (metabolized) ได้เช่นเดียวกับกรดไขมันชนิดอื่นๆ ถึงแม้จะมีการบริโภคเข้าไปปริมาณมากก็ไม่พบว่ามีการขับถ่ายออกมาทางปัสสาวะ ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลองในหนู (weaning rat) ตัวผู้ 13 ตัว และตัวเมีย 13 ตัว โดยให้บริโภคอาหารที่มีเกลือโซเดียมโพรพิโอเนตผสมอยู่ร้อยละ 3.75 เป็นเวลาติดต่อกัน 1 ปี จากนั้นนำหนูทดลองมาทำการตรวจสอบพบว่า หนูทดลองทั้งหมดไม่มีอาการผิดปกติ ไม่ว่าจะเป็นน้ำหนักตัว อัตราการตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต หัวใจ ปอด กระเพาะ ตับอ่อน หรือถุงน้ำดี สำหรับปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ได้ตามประกาศกระทรวงสาธารณะสุขฉบับที่ 84 นั้น ได้อนุญาตให้ใช้กรดโพรพิโอนิก เกลือแคลเซียมโพรพิโอเนต เกลือโซเดียมโพรพิโอเนต หรือเกลือโพแทสเซียมโพรพิโอเนต ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งได้ไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหารและใช้ในอาหารอื่นๆ ยกเว้นเนื้อสัตว์ได้ในปริมาณสูงสุดไม่เกิน 2,000 มิลลิกรัมต่อ 1 กิโลกรัมอาหาร (ศิวาพร, 2546)

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราในพริก

ผลของความร้อนและ water activity (a_w) ที่มีผลต่อคอนิเดียของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* จากการศึกษาผลของความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่าความร้อนสามารถทำลาย cytoplasmic membrane ทำลายกรดไรโบนิวคลีอิก เปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ เปลี่ยนแปลงความต้องการอาหาร และ pH ทำให้เซลล์มีความไวต่อสารยับยั้งการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เซลล์เจริญเติบโตได้ช้าและจุดที่นักจุลชีววิทยาทางอาหารสนใจมากคือเซลล์ที่ผ่านความร้อนนั้นจะมีคุณสมบัติที่เพิ่มความไวต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ เช่นเดียวกับเซลล์ปกติที่ไม่ได้ผ่านความร้อน ดังนั้นจึงทำให้การตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารได้ผลไม่แน่นอน จำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้นั้นไม่ใช่จำนวนจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ที่ผ่านความร้อนมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปคือ injured cell หรือเซลล์ที่ผิดปกติไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะได้ ต่อมาจึงมีการสนใจศึกษาว่าความร้อนและปริมาณน้ำอิสระนั้นมีผลต่อคอนิเดียของเชื้อรา *A. parasiticus* อย่างไรบ้าง *A. parasiticus* เป็นชนิดของเชื้อราที่ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารสนใจมาก เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ทั่วไปและสร้างสารพิษชนิดที่รู้จักกันดีคือ อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) (วิไล, 2551)

โดยทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *A. parasiticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek Dox agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน เก็บเชื้อไว้ในตู้เย็นตลอดเวลาจนกระทั่งนำมาใช้ ทำการเจือจางคอนิเดียให้ได้ประมาณ 1×10^7 คอนิเดียต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจดูว่าคอนิเดียไม่มีเส้นใยปะปนอยู่ด้วย นำสารแขวนลอยที่มีคอนิเดียอยู่นี้ไปใส่ในภาชนะเหล็กปลอดสนิม นำไปแช่ในหม้ออังไอน้ำที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆกัน นำตัวอย่างไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ yeast

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

extract agar (YA) และ yeast extract agar + 10% NaCl (YSA) จำนวนที่นับได้จาก YA คือ จำนวนเซลล์ที่มีอยู่ทั้งหมดทั้งชนิดที่ปกติและผิดปกติเนื่องจากความร้อน ส่วนจำนวนเซลล์ที่นับได้จาก YSA คือ จำนวนเซลล์ที่ปกติเท่านั้น เนื่องจากเซลล์ที่ผิดปกติมีความไวต่อเกลือจึงไม่สามารถเจริญเติบโตใน YSA ได้ ฉะนั้นจำนวนเซลล์ที่แตกต่างกันจากอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ จำนวนเซลล์ที่ผิดปกติ (วิไล, 2551)

ความร้อนมีผลให้คอนิเดียของ *A. parasiticus* ไม่สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือร้อยละ10 ได้ เวลาในการให้ความร้อนที่เพิ่มขึ้นนั้น มีส่วนในการทำให้คอนิเดียมีความไวต่อเกลือเพิ่มขึ้น หลังจากที่ให้คอนิเดียผ่านความร้อน 4 ชั่วโมง พบว่า คอนิเดียประมาณร้อยละ 99 มีความไวต่อเกลือซึ่งมีผลเช่นเดียวกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ความร้อนมีผลในการทำลาย cytoplasmic membrane จากการวัด OD 260 และ OD 280 แสดงว่ามีสารจำพวกกรดนิวคลีอิกและโปรตีนไหลออกมาอยู่ในสารแขวนลอยที่มีคอนิเดียอยู่ (วิไล, 2551)

นอกจากนี้การศึกษาผลของ a_w ต่อการเจริญเติบโตของคอนิเดียที่ผิดปกติหลังจากผ่านความร้อน 4 ชั่วโมง เลี้ยงคอนิเดียชนิดที่ไม่ผ่านความร้อนและชนิดที่ผ่านความร้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract broth (YB) ที่มี a_w หลายระดับ และทำการตรวจนับการเจริญเติบโตโดยวิธี MPN (ใช้ 5 หลอดทดลอง) คอนิเดียของ *A. parasiticus* ที่ผ่านความร้อนเจริญเติบโตได้ไม่ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี a_w ต่ำกว่าปกติ ส่วนคอนิเดียที่ไม่ผ่านความร้อนสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ (วิไล, 2551)

2.4 วิธีการตรวจหาจำนวนเชื้อราในอาหาร

2.4.1 *Aspergillus*

โดยปกติการเจริญของโคโลนีจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว โคโลนีมีสีขาว เหลือง เหลือง-น้ำตาล น้ำตาลจนถึงดำ หรือสีเขียวเข้ม ส่วนใหญ่ประกอบด้วยคอนิดิโอฟอร์ (conidiophores) ที่หนาแน่น คอนิดิโอฟอร์ (โดยปกติไม่มีผนังกั้น) ก้านชูไม่แตกแขนง โดยบริเวณตรงปลายมีลักษณะโป่งออกเป็นถุงเวสสิเคิล (vesicle) phialide สร้างขึ้นจากเวสสิเคิล (แบบ uniseriate) หรือสร้างบน metulae (แบบ biseriate) เวสสิเคิล phialide และ metulae (ถ้ามี) และรูปแบบการจัดเรียงของคอนิเดีย คอนิเดียในรูปอัดแน่นเป็นแถวตรง (columnar) หรือแบบแถวแยกกัน (radiate) เซลล์เดียว เรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือไม่เรียบ ใสหรือมีสี ราชนิดนี้จะสร้าง Hülle cell (เซลล์เดียวหรือเป็นแถวยาว ผนังเซลล์หนาและเรียบ) หรือ sclerotia (Samson และคณะ, 2004)

Teleomorph: *Eurotium, Emericella, Neosartorya* และ genera อื่นๆ สปีชีส์ *Aspergillus* พบว่าปนเปื้อนอยู่ทั่วไปในสารตั้งต้นที่หลากหลาย ในแถบร้อนและแถบร้อนชื้นจะพบราชนิดนี้ทั่วไปมากกว่าราพวก *Penicillia* ซึ่ง *Aspergillus* หลายชนิดมีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถก่อโรคในคนและสัตว์ได้ หรือเพราะความสามารถในการสร้างสารพิษจากกระบวนการเมตาบอไลท์ บทบาทสำคัญอื่นๆ เช่น ใช้ในกระบวนการหมักอาหารของคนโลกตะวันออก ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดอินทรีย์ หรือเอนไซม์ต่างๆ การจำแนกชนิดจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก แบ่งประเภทออกเป็น 18 กลุ่มและได้รับการยอมรับ 132 ชนิด ได้รวบรวมชนิดและสายพันธุ์ ที่อธิบายไว้ในอนุกรมวิธานที่ตีพิมพ์ไว้ในปี 1965 ในขณะนี้มีมากกว่า 180 ประเภท กับประมาณ 70 ชื่อ teleomorph เพื่อที่จะปกป้องชื่อของ *Aspergillus* ที่ใช้งานในปัจจุบัน ที่กำลังถูกคุกคามหรือถูกแทนที่ด้วยชื่อที่ไม่ถูกต้องในการใช้งานและเพื่อขจัดความไม่แน่นอนของการสะกด การจำแนกประเภทวัน และสถานที่ หรือสิ่งพิมพ์ที่ถูกต้อง เสนอรายชื่อสปีชีส์ที่ใช้ในปัจจุบัน ในวงศ์ *Trichocomaceae* (เชื้อรา, Eurotiales) (Samson และคณะ, 2004)

2.4.2 การจำแนก *Aspergillus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

การใช้อาหารเฉพาะบางชนิดที่ได้รับการยอมรับเพื่อใช้ตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซินของ *A.flavus* และ *A. parasiticus* อย่างรวดเร็วภายใน 3 วัน จะใช้อาหาร Aspergillus differential medium (Bothast และ Fennell, 1974) หรือใช้ Aspergillus flavus and Parasiticus Agar (AFPA) ก็ได้ (Samson และคณะ, 2004)

นอกจากนี้อาจมีอาหารที่มียาปฏิชีวนะ bleomycin ซึ่งช่วยแยกความแตกต่างของ *A. parasiticus* ออกจาก *Aspergillus sojae* อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสองชนิดจะทำให้โคโลนีของ *A. sojae* มีขนาดลดลง ในขณะที่โคโลนีของ *A. parasiticus* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอย่างน้อย 3 มิลลิเมตร ภายใน 6 วัน อาหารที่ใช้คัดเลือกเหล่านี้เหมาะสำหรับการตรวจสารพิษอะฟลาทอกซินในสินค้าประเภทอาหาร ซึ่งทำได้อย่างรวดเร็ว (Samson และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารทุติยภูมิ เช่น mycotoxins มีการนำมาใช้มากกับเชื้อรา *Aspergillus* พิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มสิ่งมีชีวิตและการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ พบความสัมพันธ์ของ Flavi ในระหว่างการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 + B2, G1 + G2 กับกรด cyclopiazonic และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละชนิด (Samson และคณะ, 2004)

2.4.2.1 *Aspergillus flavus*

โคโลนีของ *A. flavus* มีขนาดโคโลนี 3-5 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Czapek agar ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก้านชูสปอร์ (conidiophores) เป็นสีเขียวอมเหลืองค่อนข้างหนา ลักษณะของ conidial head จะแผ่ออกจากจุดศูนย์กลาง (radiate) หลังจากนั้นจะแตกออกเป็นหลายคอลัมน์หลวมๆ มีสีเขียวอมเหลืองไปจนถึงเขียวอมเหลืองแก่ มีลักษณะหยาบขรุขระ มีขนาดความยาวถึง 1 มิลลิเมตร (บางไอโซเลตอาจพบได้จนถึงขนาด 2.5 มิลลิเมตร) vesicle มีลักษณะกลมถึงรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 25-45 ไมโครเมตร Phialides จะเกิดขึ้นโดยตรงบนถุงหรือบน metulae ซึ่งมีขนาด 6-10×4.0-5.5 ไมโครเมตร ส่วน metulae มีขนาด 6.5-10×3-5 ไมโครเมตร คอนิเดียมีลักษณะกลม ขนาดจากเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.6 ไมโครเมตร มีสีเขียวอ่อน ซึ่งคอนิเดียที่เกิดขึ้นใหม่มักจะสร้าง Sclerotia (โครงสร้างระยะฟักตัวต้านทานต่อสภาวะไม่เหมาะสมได้ดี) มีรูปร่างและขนาดที่ไม่แน่นอนมักจะมีสีน้ำตาลจนถึงสีดำ (Samson และคณะ, 2004)

โคโลนีจะเจริญได้รวดเร็วบนอาหาร MEA แต่จะเจริญได้ไม่ดีบนอาหาร CREA และโคโลนีจะเป็นสีส้มบนอาหาร AFPA สารเมตาบอไลท์ที่เป็นพิษชนิดที่สำคัญที่เชื้อราสร้างขึ้น ได้แก่ กรด 3-ไนโตรโพรพิโอนิค (3-nitropropionic acid) กรดไซโครพิอะโซนิค (cyclopiazonic acid) อะฟลาทอกซิน บี 1 (aflatoxin B1) และ กรดแอสเปอร์จิลิค (aspergillic acid) มักพบในอาหาร ได้แก่ ถั่วชนิดต่างๆ เครื่องเทศ น้ำมันธัญพืช ธัญพืช บางครั้งอาจจะพบได้ในผลไม้แห้ง

หมายเหตุ: ค่อนข้างยากที่จะแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *A. flavus* กับเชื้อรา *A. parasiticus*, *A. oryzae* และเชื้อราชนิดอื่นที่คล้ายๆกัน (Samson และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2 เชื้อรา *Aspergillus flavus* B3DG ที่แยกได้จากพริกป่นหยาบ

2.4.2.2 *Aspergillus parasiticus*

โคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* บนอาหาร Czapek agar ที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.5 เซนติเมตร โดยปกติจะประกอบไปด้วยก้านชูอับสปอร์สีเขียวทึบ ส่วนหัวคอนิเดียมีสีเขียวและแผ่รัศมีออกจากจุดศูนย์กลาง (radiate) ก้านชูอับสปอร์ส่วนใหญ่จะมีความยาว 300-700 ไมโครเมตร ลักษณะไม่มีสีและโปร่งแสง คอนิเดียมีรูปร่างเป็นทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5-5.5 ไมโครเมตร มีผนังหุ้มที่มีลักษณะขรุขระชัดเจน เจริญได้รวดเร็วกว่าถ้าเพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA เจริญได้น้อยบนอาหาร CREA สร้างสารเมตาบอไลท์ซึ่งเป็นสารพิษที่สำคัญ ได้แก่ กรดโคจิ (kojic acid), กรดแอสเปอร์จิลิค (Aspergillic acid) และอะฟลาทอกซิน บี1 บี2 จี1 จี2 (aflatoxin B1, B2, G1, G2) เชื้อรานี้พบได้ในอาหาร เช่น เมล็ดธัญชาติ ถั่วต่างๆ และพบในดิน (Samson และคณะ, 2004)

ส่วนใหญ่ *Aspergillus parasiticus* มีลักษณะเฉพาะคือ มีส่วนหัวคอนิเดียที่เป็นแบบรัศมี และมี phialide เกิดขึ้นโดยตรงบนเวสสิเคิล (uniseriate radiate conidial head) และผนังคอนิเดียมีลักษณะขรุขระที่เห็นได้ชัดเจน เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *A. flavus, A. sojae* และ *A. oryzae* (Samson และคณะ, 2004)

2.4.3 การเพาะเลี้ยงสำหรับการจำแนก

ลงเชื้อโดยการจุด 3 จุด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Cz (Czapek's Dox Agar), CYA และ MEA ร้อยละ 2 (Malt Extract Agar) และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยงใน CREA (Creatine agar) อาจมีประโยชน์ สำหรับเชื้อราชนิดทนความแห้งแล้งได้ดี เช่น *Aspergillus penicillioides* และชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของ *Aspergillus* โดย *Eurotium* teleomorph ควรใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek (Yeast autolysate)และ MEA ที่เติมซูโครสลงไปร้อยละ 20-40 สำหรับการเพาะเลี้ยงด้วยจานเพาะเชื้อ Petri dish แบบแก้ว อาจเปลี่ยนไปใช้แบบพลาสติกได้ ส่วนใหญ่มักสร้างสปอร์ภายใน 7 วัน สีและโครงสร้างของคอนิเดีย (แบบ columnar หรือ radiating) จะสังเกตได้ดีที่สุดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สไลด์สำหรับส่องกล้องให้เมาท์ (mount) ด้วยกรดแลกติก โดยอาจเติมหรือไม่เติม aniline blue ก็ได้ จากนั้นหยดแอลกอฮอล์ (ความเข้มข้นร้อยละ 70-90) ลงไปเพื่อกำจัดฟองอากาศและส่วนเกินของคอนิเดีย มี *Aspergillus* เพียงไม่กี่ชนิดที่ก่อโรคในคน (เช่น *Aspergillus fumigatus*) จึงควรระวังและหลีกเลี่ยงการสูดดมเอาคอนิเดียเข้าไป (Samson และคณะ, 2004)

รูปที่ 3 เชื้อรา *Aspergillus parasiticus* C5PD ที่แยกได้จากพริกแห้ง

2.4.4 การตรวจสอบโดยตรง

การเสื่อมเสียของอาหารโดยเชื้อราส่วนใหญ่ สามารถสังเกตการเจริญของเชื้อราโดยตรงได้ด้วยตาเปล่าและใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เนื่องจากโคโลนีเชื้อรามีขนาดใหญ่และการเจริญของเชื้อราตามปกติจะเกิดขึ้นที่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามการสังเกตการเจริญของเชื้อราที่ผิวหน้าจะต้องทำทันทีหลังจากที่มีการเจริญเกิดขึ้น เพราะการเคลื่อนย้ายผลิตภัณฑ์อาจทำให้โครงสร้างเชื้อราแตกหักทำให้ไม่สามารถเห็นลักษณะปรากฏของเชื้อราที่แท้จริงได้ ถ้าการเจริญของเชื้อราสามารถคาดเดาได้แนะนำให้ตรวจสอบผลิตภัณฑ์อาหารด้วยกล้องจุลทรรศน์ การเตรียมสไลด์ทำได้โดยนำชิ้นส่วนของเชื้อราวางบนกระจกสไลด์แล้วหยด mounting medium (เช่น สารผสมของกรดแลคติกกับอะนิลีนบลู (aniline blue) หรือเตรียมสไลด์โดยใช้แอดดิซีฟเทป (adhesive tape) เมื่อทำการตรวจสอบการเจริญของเชื้อราด้วยวิธีการทดสอบโดยตรง (direct examination) แล้วควรถ่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราโดยการลากลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ซึ่งมักจะทำโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอช่วยในการส่องเชื้อรา (Samson และคณะ, 2004)

2.4.4.1 วิธี Direct plating

วิธีนี้เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อราในผลิตภัณฑ์อาหารทุกประเภท สำหรับอาหาร เช่น ข้าวสาลีและถั่ว ส่วนใหญ่จะทำการชะล้างเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าอาหาร (surface disinfection) ก่อนที่จะทดสอบด้วยวิธี direct plating ซึ่งจำเป็นที่ต้องทำเพื่อให้มีการเจริญของเชื้อราที่เข้าบุกรุกทำลายอาหารนั้นจริงๆ แต่มีข้อยกเว้นในกรณีที่การปนเปื้อนที่ผิวหน้าเป็นส่วนหนึ่งของเชื้อราที่เจริญภายในอาหาร (downstream mycobiota) เช่น เม็ดข้าวสาลีที่ใช้ในการผลิตแป้งสาลี ในกรณีนี้ควรจะทำทั้งวิธีที่มีการชะล้างและไม่ชะล้างผิวหน้าอาหารสำรวจทั้งที่มีการฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าและไม่มีการฆ่าเชื้อที่ผิวหน้า (Samson และคณะ, 2004)

การฆ่าเชื้อที่ผิวหน้า (surface disinfection) ให้ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าของตัวอย่างโดยการเติมสารละลายคลอรีนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ลงไปในอาหารแล้วเขย่าแรงๆเป็นเวลา 2 นาที ตัวอย่างอาหารอย่างน้อย 100 ชิ้น ควรได้รับการฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าแล้ววางชิ้นตัวอย่างอาหารลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ส่วนสารละลายคลอรีนควรใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง เมื่อล้างชิ้นตัวอย่างเสร็จแล้วเทสารละลายคลอรีนทิ้ง จากนั้นจึงล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำดีไอออไนซ์ที่ปลอดเชื้ออีก 1 ครั้ง การวางชิ้นตัวอย่างลงบนจานเพาะเชื้อควรทำให้เร็วที่สุด ย้ายชิ้นส่วนอาหาร โดยใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อคีบชิ้นส่วนอาหารที่ผ่านการล้างแล้ววางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ล่วงหน้าจานละ 5-10 ชิ้น จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยไม่ต้องคว่ำจาน จานเพาะเชื้อสามารถเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่เป็นรูเพื่อลดการระเหย การบรรจุจานเพาะเชื้อในถุงพลาสติกที่มีรูร่วมกับการไหลเวียนของอากาศในตู้บ่มจำเป็นต่อการรักษาองค์ประกอบบรรยากาศที่สัมผัสกับจานเพาะเชื้อ มีรายงานว่า การสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ มีอิทธิพลต่อการเจริญของเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองที่ได้รายงานในรูปของร้อยละของตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนโดยเชื้อรา ส่วนการนับโคโลนีของเชื้อราสกุลต่างๆ (differential coumting) หรือแม้แต่การนับชนิด (species) ของเชื้อราก็สามารถทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Samson และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4.2 วิธี Dilution plating

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ควรใช้ปริมาณมากเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยปกติแนะนำให้ใช้ 5 กรัมสำหรับตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น แป้ง และใช้ 40 กรัมสำหรับอาหารที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น เมล็ดธัญพืช ส่วนการเจือจางมักจะทำการเจือจางเริ่มต้นที่ระดับความเจือจาง 1:10 ในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จากนั้นควรทำการแช่ตัวอย่างที่มีเชื้อราอยู่ข้างใน เช่น เมล็ดข้าวสาลี และเมล็ดถั่วเป็นเวลา 30 นาทีในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะนำไปตีป่นด้วย stomacher เป็นเวลา 2 นาทีสำหรับตัวอย่างที่เป็นผงหรือตัวอย่างอื่นๆที่เป็นเนื้อเดียวกันไม่จำเป็นต้องแช่ จากนั้นทำการเจือจางต่อไปผสมตัวอย่างต่อสารละลายเปปโตนเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในอัตรา 1:10 หรือแนะนำให้ใช้อัตราส่วน 1:5 ก็ได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีเชื้อราปนเปื้อนตามปกติค่าความเจือจางสูงที่ใช้คือ 10^{-3} ถ้าตัวอย่างอาหารมีการสัมผัสกับดินจะใช้ระดับความเจือจางสูงสุดที่ 10^{-5} แนะนำให้ใช้เทคนิค spread plate มากกว่า pour plate โดยปิเปตตัวอย่างมา 0.1 มิลลิลิตรต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการบ่มเชื้อโดยสภาวะที่ใช้สำหรับการบ่มเชื้ออยู่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วันโดยไม่ต้องคว่ำจาน (Samson และคณะ, 2004)

2.5 การจำแนกชนิดเชื้อราในอาหารและเชื้อราในอากาศ

การเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้การเจริญและการสร้างสปอร์เป็นไปตามที่ต้องการ อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar (MEA) หรือ Oatmeal agar (OA) เป็นอาหารที่เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราทั่วไป อาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่เติมซูโครสร้อยละ 20 หรือ 40 ใช้ในการเตรียม CBS ตามสูตรการเตรียม CBS ของ Appendix จำนวนของสายพันธุ์ที่ต้องการ อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพิเศษ เช่น Potato-Carrot agar (PCA), Czapek Yeast autolysate agar (CYA), Carnation leaf agar (CLA) อาหาร Creatine agar (CREA) ช่วยในการแยก *Penicillium* บางสายพันธุ์ได้ (Samson และคณะ, 2004)

เชื้อราส่วนใหญ่สามารถบ่มในที่ที่มีแสงหรือในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการแยกเชื้อเมื่อบ่มได้ 5-10 วัน *Fusarium, Trichoderma* และ *Epicoccum* แสดงการสร้างสปอร์ในช่วงแสง daylight ต่างๆ เชื้อรา เช่น *Phoma* ควรเพาะเลี้ยงในที่มืดตามระยะเวลาของการบ่มในที่มืดสลับกับให้แสง สามารถใช้ประโยชน์จากการฉายรังสีที่มีค่าใกล้เคียงรังสี UV เพื่อช่วยกระตุ้นการสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สปอร์ได้ (black light ให้ผลดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 310 นาโนเมตร โดย 360 นาโนเมตรเป็นช่วงคลื่นที่มีพลังงานมากที่สุด) (Samson และคณะ, 2004)

เชื้อราใน Basidiomycetes เช่น *Serpula lacrymans* (ราจุด) ส่วนมากแยกได้โดยตรงจากวัสดุ (เช่นไม้) ใช้ส่วนของฟรุตบอดี (fruitbody) สปอร์ และโครงร่างเส้นใย เช่นเดียวกับราที่ขึ้นในสิ่งแวดล้อมในร่มพวก *Stachybotrys* หรือ *Memnoniella* เจริญบนผิวหน้าได้ง่าย สามารถแยกได้โดยการจัดเตรียม sellotape สำหรับกรณีที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสามารถปล่อยทิ้งได้ (Samson และคณะ, 2004)

2.5.1 การทดสอบโดยตรงด้วยตา

การเจริญของเชื้อราในผลิตภัณฑ์อาหารหรือในจานเพาะเชื้อสามารถยืนยันโดยตรงโดยใช้ตาและจำแนกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เตรียมสไลด์ชิ้นส่วนเชื้อรา (เส้นใย ฟรุตบอดี โครงร่างของสปอร์) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อหรือเข็มเขี่ยที่ทำด้วยแก้ว (glass needle) ซึ่งใช้งานได้ดี ทำมาจากแท่งแก้วโดยทำให้ร้อนแล้วดึงให้มีรูปร่างเป็นเข็ม (Samson และคณะ, 2004)

2.5.2 การเตรียมสไลด์

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปลอดเชื้อเขี่ยชิ้นส่วนของเชื้อราไปวางบนกระจกสไลด์และหยดน้ำ 1 หยด หรือหยด mounting fluid แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ให้ใช้แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์ที่สะอาดเท่านั้น และฆ่าเชื้อเข็มเขี่ยเชื้อด้วยการเผาไฟ ส่วนใหญ่การเขี่ยเชื้อรามักใช้เข็มเขี่ย 2 อัน การเขี่ยเชื้อราจะต้องกดชิ้นส่วนของเชื้อราให้แบนก่อน ส่วนใหญ่มีประโยชน์ในการเขี่ยชิ้นส่วนโครงสร้างของสปอร์รวมไปถึงการเขี่ยเชื้อราจากโคโลนีที่เจริญอยู่บนผิววุ้น แต่ถ้าเข็มเขี่ยเชื้อร้อนไปก็จะทำให้วุ้นละลายได้ (Samson และคณะ, 2004)

สำหรับการเตรียมสไลด์ของเชื้อรา *Aspergillus* และ *Penicillium* และเชื้อราอื่นๆที่สร้างคอนิเดีย (conidia) แบบแห้ง แนะนำให้เติมแอลกอฮอล์ 1 หยด เพื่อชะส่วนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของคอนิเดียก่อนที่จะปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ เชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นโปร่งแสงในจานเพาะเชื้อ สามารถตัดเชื้อที่เจริญให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมแล้วนำไปวางบนแผ่นสไลด์ หยดน้ำ 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ เทคนิคนี้มีประโยชน์มากใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาส่วนของสปอร์ของเชื้อราพวก Deuteromycetes และมีประโยชน์ต่อการศึกษาเชื้อราอื่นๆที่มีโครงสร้างเปราะบางอีกด้วย (Samson และคณะ, 2004)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Guynot และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาถึงปัจจัยหลายชนิดที่นำมาใช้ร่วมกัน ได้แก่ การใช้กรดอ่อน เช่น โพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) แคลเซียมโพรพิโอเนต (calcium propionate) และโซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0–0.3 ร่วมกับค่าพีเอช 4.5–5.5 และค่า a_w 0.80–0.90 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่า โพแทสเซียมซอร์เบตจะมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการป้องกันการเน่าเสียโดยเชื้อรา ซึ่งความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบคือร้อยละ 0.3 โดยไม่คำนึงถึงค่า a_w ประสิทธิภาพของโพแทสเซียมซอร์เบตจะลดลงเล็กน้อยที่ค่า pH 5.5 และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 จะมีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราดีที่สุด

Huang และคณะ (2010) กล่าวถึงประสิทธิภาพของกรดอ่อน 4 ชนิด ที่ใช้ป้องกันการเน่าเสียในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ ทำการประเมินโดยใช้ glycerol based agar medium ค่า MIC ของกรดแต่ละชนิดจะถูกกำหนดให้มีค่า pH 2 ระดับคือ 5.0 และ 6.0 กับค่า a_w 2 ระดับคือ 0.85 และ 0.90 อาหารที่เกิดการเน่าเสียจากเชื้อรา 5 ชนิด ได้แก่ *Eurotium herbariorum, Eurotium rubrum, Aspergillus niger, Aspergillus flavus* และ *Penicillium roqueforti* โดยทั่วไปจะใช้กรดซอร์บิกในการควบคุมการเจริญของเชื้อราในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำเพื่อใช้อ้างอิง ที่ระดับ a_w เท่ากันกรดทั้ง 4 มีค่า MIC ที่ pH 5.0 น้อยกว่าค่า MIC ที่ pH 6.0 และพบว่าในสภาวะ pH เท่ากันที่ระดับ a_w 0.85 มีค่า MIC น้อยกว่าค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.90

López-Malo และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของปัจจัยหลายชนิดร่วมกัน ได้แก่ water activity (a_w 0.99 หรือ 0.95) pH (pH 4.5 หรือ 3.5) และสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น โพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) โซเดียมเบนโซเอต (sodium benzoate) โซเดียมไบซัลไฟต์ (sodium bisulfate) คาร์วาครอล (carvacrol) ซิตรัล (citral) ยูจีนอล (eugenol) ไทมอล (thymol) หรือวานิลิน (vanillin) ที่ความเข้มข้น 0, 100, 200 ถึง 1500 ppm ต่อการเจริญของ *Aspergillus flavus* บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เวลาในการงอกของสปอร์และอัตราการเจริญของเชื้อราตามแนวรัศมี (Radial Growth Rates: RGR) ได้รับอิทธิพลจากปัจจัยต่างๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการใช้สารต้านจุลินทรีย์ที่มีระดับความเข้มข้นเท่ากันพบว่า การลดลงของค่า pH และ a_w มีผลทำให้อัตราการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ลดลงและชะลอการงอกของสปอร์ให้ช้าลง แต่การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์มีผลทำให้เกิดการลดลงของอัตราการเจริญเล็กน้อยจนกระทั่งถึงระดับความเข้มข้นวิกฤต ซึ่งจะมีการลดลงของอัตราการเจริญของเชื้อราอย่างมากหรือเกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งผลของสิ่งที่เกิดขึ้นนี้จะขึ้นอยู่กับระดับ a_w และค่า pH ระยะเวลาที่ใช้ในการงอกของสปอร์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และเมื่อค่า a_w และค่า pH ลดลงจะพบความแตกต่างของประสิทธิภาพของสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ในแต่ละชนิดอย่างมีนัยสำคัญ โดยทั่วไปสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้มาจากธรรมชาติจะขึ้นอยู่กับค่า pH น้อยกว่าสารเคมีต้านจุลินทรีย์ ซึ่งในสภาวะที่มีค่า pH 3.5 เชื้อรา *A. flavus* จะมีความไวต่อการถูกยับยั้งโดย ไทมอล ยูจีนอล คาร์วาครอล โพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมไบซัลไฟต์ และโซเดียมเบนโซเอตมากกว่าวานิลินหรือซิตรัล

Reddy และคณะ (2009) กล่าวถึงประสิทธิภาพของสารฆ่าเชื้อราบางตัวและสารเคมีที่ฆ่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากการสำรวจในข้าวพบการปนเปื้อนจากการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินขึ้นภายหลัง สารฆ่าเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบมี 10 ชนิดโดย คาร์เบนดาซิม (carbendazim) คอนทาฟพลัส (contaf plus) โฟลิเคอร์ (folicur) โพรพิโคนาโซล (propiconazole) และซาฟคอมพลีทลีย์ (saaf completely) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus* และการสร้างอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 1 กรัมหรือมิลลิลิตรต่อกิโลกรัม สารเคมีฆ่าเชื้อราที่ใช้ทดสอบอีก 5 ชนิด ได้แก่ กรดเบนโซอิก (benzoic acid) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างเส้นใยของ *Aspergillus flavus* ได้ร้อยละ 72 ที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อกิโลกรัม ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อกิโลกรัมสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. Parasiticus* และ *A. niger* ได้อย่างสมบูรณ์ และที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อกิโลกรัมสามารถยับยั้งเจริญของ *A. ochraceus* ได้อย่างสมบูรณ์

Gowda และคณะ (2004) กล่าวถึงคุณสมบัติการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ของกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1-0.5 แอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 0.5 คอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulphate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.08-0.5 และกรดเบนโซอิกความเข้มข้นร้อยละ 0.1-0.5 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* ได้อย่างสมบูรณ์ ยูเรีย กรดซิตริก และโซเดียมโพรพิโอเนตมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญได้พอสมควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ลดการเจริญได้ร้อยละ 36-64) กรดโพรพิโอนิกความเข้มข้นร้อยละ 0.05-0.5 โซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 0.1-0.5 กรดเบนโซอิกความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ สารที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซิน ได้แก่ กรดซิตริกความเข้มข้นร้อยละ 0.5-1 (ยับยั้งได้ร้อยละ 91-94) ยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 0.1-0.5 (ยับยั้งได้ร้อยละ 93-96) และคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.08 (ยับยั้งได้ร้อยละ 85) ในสารที่ใช้ทดสอบทั้งหมดนี้ พบว่า กรดโพรพิโอนิก โซเดียมโพรพิโอเนต กรดเบนโซอิก และแอมโมเนีย เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด ส่วนยูเรียและกรดซิตริกมีประสิทธิภาพรองลงมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ พริกสด พริกแห้ง พริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้ม ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้มาจากสถานที่ต่างๆภายในจังหวัดกรุงเทพฯ ได้แก่ ตลาดหัวตะเข้ ตลาดสุวรรณภูมิ บิ๊กซี ท็อปส์

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 ที่ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เชื้อรา *Aspergillus flavus* B3DG ที่แยกได้จากพริกป่นหยาบและเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* C5PD ที่แยกได้จากพริกแห้ง

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Acidified Potato Dextrose Agar (PDA; Difco ประเทศฝรั่งเศส) ที่ปรับพีเอชให้ได้ 3.5 ด้วยสารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ10 (acidified PDA) อาหาร Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) อาหาร Dichloran Glycerol (DG-18) และอาหารพริกจำลอง (ภาคผนวก ก)

3.1.4 สารเคมีและชุดทดสอบ

สารที่ใช้เจือจางตัวอย่าง ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับผสมในอาหาร Acidified PDA ได้แก่ สารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10 เกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมเบนโซเอต โพแทสเซียมซอร์เบต และแคลเซียมโพรพิโอเนต สารเคมีที่ใช้ชะล้างผิวหน้าของพริก ได้แก่ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ชุดทดสอบ DOA-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aflatoxin ELISA ของกรมวิชาการเกษตรซึ่งประกอบด้วยสารอะฟลาทอกซินบี 1 มาตรฐาน AFB_1-HRP Conjugate, Substrate (TMB), Stopping solution, Conjugate buffer และ Washing buffer และเมทานอล

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow; Clean รุ่น V6 บริษัทแลบ เซอร์วิส) ตู้บ่มเชื้อ (บริษัท Memmert Gmblt+co.KG ประเทศญี่ปุ่น) หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave; ToMy รุ่น ES-315 บริษัท ToMy kogyo ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องตีปั่นตัวอย่าง (Stomacher; Masticator รุ่น V220 บริษัท IUL Instruments Masticator ประเทศสเปน) เครื่องวัดพีเอช (pH meter; Testo รุ่น 205 ประเทศเยอรมนี) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (เครื่องวัด a_w; AquaLAB รุ่น 3TE บริษัท Decagon Devices ประเทศสหรัฐอเมริกา) กล้องจุลทรรศน์ (microscope; Olympus CH30 รุ่น CH30RF 200 บริษัท อี ฟอร์ แอล อินเตอร์เนชั่นแนล ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องผสมสาร (vortex; Scientific Industries รุ่น G560E บริษัท Scientific industries Inc. ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader; iEMS Reader MF บริษัท Labysystem) และเครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

ทำการสุ่มตัวอย่าง พริกสด พริกแห้ง พริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มชนิดละ 10 ตัวอย่าง นำตัวอย่างแต่ละชนิดมาทำการวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และวัดค่าพีเอช จากนั้นทำการวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด (total yeast and mold count) และทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC)

ก) การวัดพีเอชของพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

นำตัวอย่างแต่ละชนิดมาทำการตรวจสอบโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter; รุ่น 205 ประเทศเยอรมัน) โดยการนำ probe จุ่มลงในตัวอย่างจนมิด ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นเมล็ดให้ทำการทุบหรือบดให้แตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นอ่านค่าที่ได้แล้วบันทึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ

นำตัวอย่างแต่ละชนิดมาวัดค่าปริมาณน้ำอิสระที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องวัด a_w ของ AquaLAB รุ่น 3TE บริษัท Decagon Device ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการนำตัวอย่างใส่ตลับวัด a_w ประมาณครึ่งตลับ ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นเมล็ดให้ทำการทุบหรือบดให้แตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นอ่านค่าที่ได้แล้วบันทึกผล

ค.) การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ที่มีในตัวอย่างพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

นำตัวอย่างพริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี Dilution plating ส่วนตัวอย่างพริกแห้งทั้งเมล็ดและพริกสดทั้งเมล็ดวิเคราะห์โดยใช้วิธี Direct plating ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

ค.1) วิธี Dilution plating

การวิเคราะห์การปนเปื้อนโดยวิธี dilution plating ทำตามวิธีของ Tournas และคณะ (2011) ชั่งตัวอย่างพริก 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที ปิเปตสารตัวอย่างพริกที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเจือจาง 10^{-2} และทำการเจือจางเช่นนี้ต่อไปจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-5} หลังจากเจือจางแล้ว ปิเปตตัวอย่างที่ 3 ระดับความเจือจางสุดท้ายระดับความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทำซ้ำ 2 จานในแต่ละความเจือจาง ในกรณีนี้เป็นตัวอย่างที่มี a_w สูงใช้อาหาร Acidified PDA และ DRBC ถ้าเป็นตัวอย่างที่มี a_w ต่ำให้ใช้อาหาร Acidified PDA และ DG18 จากนั้นเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสโดยไม่ต้องคว่ำจานอาหารเป็นเวลา 5 วัน ถ้ายังไม่ขึ้นให้บ่มต่อไปอีก 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 10-150 โคโลนีและคำนวณหาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด (CFU ต่อกรัม) และเปรียบเทียบจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.2) วิธี Direct plating

การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดโดยวิธี dilution plating ซึ่งทำตามวิธีของ Tournas และคณะ (2011) โดยทำการชั่งตัวอย่างพริก 50 กรัม ในกรณีนี้จะทำการฆ่าเชื้อที่ผิวหน้าโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ลงในบีกเกอร์ ใส่ตัวอย่างพริกลงไปแล้วเขย่าแรงๆเป็นเวลา 2 นาที และล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำดีไอออไนซ์ที่ปลอดเชื้ออีก 1 ครั้ง วางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด (ชนิดละ 50 กรัม) ได้แก่ Acidified PDA และ DRBC สำหรับตัวอย่างที่มี a_w สูง ในกรณีที่ตัวอย่างมี a_w ต่ำใช้อาหาร Acidified PDA และ DG18 ในการวางตัวอย่างพริกทั้งเมล็ดลงบนผิวหน้าอาหาร ทำโดยการใช้ปากคีบที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการจุ่มแอลกอฮอล์และนำไปเผาไฟ แล้วนำมาคีบตัวอย่างวางลงบนจานอาหาร จากนั้นนำจานอาหารที่มีตัวอย่างไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ถ้าเชื้อยังไม่เจริญให้ทำการบ่มต่อไปอีก 48 ชั่วโมง หลังจากการบ่ม เมื่อเชื้อราขึ้นบนผิวหน้าของตัวอย่าง ให้บันทึกจำนวนชิ้นตัวอย่างที่มีเชื้อราขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ทดสอบ จากนั้นคำนวณหาปริมาณการปนเปื้อนโดยคิดเป็นร้อยละของจำนวนชิ้นตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 50 ชิ้น เช่น ในจำนวนตัวอย่างพริก 50 ชิ้น มีเชื้อราขึ้นบนตัวอย่างพริกจำนวน 40 ชิ้น ดังนั้นมีปริมาณการปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละ 80 ทำการเปรียบเทียบผลที่ได้จากอาหารทั้ง 2 ชนิด

3.2.2 การแยกเชื้อ ศึกษาคุณลักษณะ และจำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราจากตัวอย่างพริกบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดด้วยวิธี Direct plating และ Dilution plating สังเกตเห็นเชื้อราที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยทำการบันทึกลักษณะของโคโลนี สีของโคโลนี และลักษณะเส้นใยของเชื้อรา จากนั้นแยกเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีและสีต่างกัน โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเชื้อราแต่ละโคโลนีลงบนอาหาร PDA ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อบริสุทธิ์แล้วจึงพร้อมที่จะนำมาจำแนกชนิดต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.1 วิธีการจำแนกชนิดของเชื้อรา

ก) การตรวจสอบเชื้อราโดยตรง (Direct macroscopical examination)

ทำการตรวจดูการเจริญของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงด้วยตาและกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ จากนั้นเตรียมสไลด์ชิ้นส่วนเชื้อรา (เส้นใย ฟรุตบอดี โครงร่างของสปอร์) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Samson และคณะ, 2004)

ข) การตรวจสอบโครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination)

นำเข็มเขี่ยเชื้อที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยการเผาไฟมาเขี่ยชิ้นส่วนของเชื้อราวางลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดและหยดน้ำ 1 หยดหรือหยด mounting fluid ได้แก่ น้ำ หรือ shear's mounting fluid (เช่น เชื้อราประเภท Zygomycetes, Coelomycetes และยีสต์) เชื้อราที่สร้างคอนิเดียชนิดแห้งมากๆ (เช่น *Penicillium*) ใช้สารดีเทอร์เจนท์หรือเอทานอล เชื้อราประเภท Deuteromycetes และ Ascomycetes ให้ใช้ mounting fluid เป็นกรดแลคติกหรือกรดแลคติกผสมกับ cotton blue หรือกรดแลคติกผสมกับ aniline blue ลงบนสไลด์แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่สะอาด สำหรับการเตรียมสไลด์ของเชื้อรา *Aspergillus, Penicillium* และเชื้อราอื่นๆที่สร้างคอนิเดียแบบแห้ง (dry conidia) แนะนำให้เติมแอลกอฮอล์ 1 หยดปิดเพื่อชะส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของคอนิเดียก่อนที่จะปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

ในกรณีของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นวุ้นโปร่งแสง (transparent agar) ในจานเพาะเชื้อ สามารถตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเจริญให้เป็นชิ้นรูปสี่เหลี่ยมแล้วนำไปวางบนแผ่นสไลด์หยดน้ำ 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เทคนิคนี้มีประโยชน์มากในการศึกษาส่วนของสปอร์เชื้อราพวก Deuteromycetes เพื่อสังเกตการพัฒนาโครงสร้าง เช่น conidia head และยังมีประโยชน์ต่อการศึกษาเชื้อราอื่นๆที่มีโครงสร้างเปราะบางอีกด้วย เมื่อศึกษาโครงสร้างของเชื้อราแล้วนำมาจำแนกจนถึงระดับสกุล (genus) หรือสปีชีส์ (species) โดยใช้ Dichotomous key ตามภาคผนวก ฉ (Samson และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาผลของกรดอินทรีย์ร่วมกับค่าพีเอชและค่าปริมาณน้ำอิสระในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่แยกได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

3.2.3.1 การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราชนิดที่จะใช้ในการทดสอบลงในอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญจะทำการเก็บเกี่ยวสปอร์โดยเติมสารละลายทวีน 80 ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.45 ไมโครเมตร ลงในหลอดอาหารที่มีเชื้อราเจริญ จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดสปอร์ ทำการปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.2.3.2 ผลของปริมาณน้ำอิสระ ค่าพีเอช และเกลือของกรดอินทรีย์ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus*

ทำการออกแบบสภาวะเพื่อศึกษาผลของปริมาณน้ำอิสระ (a_w) 3 ระดับ ได้แก่ 0.85, 0.90 และ 0.95 ค่า pH 2 ระดับ ได้แก่ 5.0 และ 5.5 (ปรับค่า pH โดยใช้กรดทาร์ทาริก) และเกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมเบนโซเอต โพแทสเซียมซอร์เบต และแคลเซียมโพรพิโอเนต ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* ในอาหารพริกจำลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วิธีการเตรียมดูในภาคผนวก ก

ทำการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* ในอาหารพริกจำลองในสภาวะต่างๆดังกล่าวโดยวิธี agar dilution ตามวิธีการของ Tournas และคณะ (2011) ขั้นแรกเตรียม stock solution ของเกลือของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือของกรดอินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันที่ระดับ 1.0-20.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเติมสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์จาก stock solution ที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อและเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตรที่เหมาะสมลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อ โดยปริมาตรของสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์และปริมาตรน้ำกลั่นรวมกันได้ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเทอาหารพริกจำลองที่ยังหลอมเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ วางทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัวแล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus* ที่ใช้ทดสอบ ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้เตรียมไว้แล้วในข้อ 3.2.3.1 ลงไปตรงกลางของจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดย negative control ใช้น้ำกลั่นแทนเกลือของกรดอินทรีย์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มแล้วทำการประเมิน โดยดูที่จานเพาะเชื้อที่ไม่มีการเจริญเกิดขึ้น โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของเกลือของกรดอินทรีย์ซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

3.2.4 การประยุกต์ใช้เกลือของกรดอินทรีย์ต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* และการลดปริมาณการสร้างสารพิษ Aflatoxin ในพริกสด

3.2.4.1 การเตรียมพริก

การเตรียมพริกสดทำตามวิธีการของ Mecteau และคณะ (2002) ซึ่งทำได้โดยเด็ดขั้วพริกสดพันธุ์แดงจินดาออก แล้วนำไปล้างน้ำ จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที แล้วนำไปชะล้างด้วยสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จากนั้นก็เอามาผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 45 นาที

3.2.4.2 การเตรียมสปอร์เชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดลองนี้มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus flavus* B3DG (แยกได้จากพริกป่นหยาบ), *Aspergillus paraciticus* TISTR 3276 และ *Aspergillus paraciticus* C5PD (แยกได้จากพริกแห้ง) ในการเตรียมสปอร์ของเชื้อรา ขั้นแรกเพาะเลี้ยงเชื้อราและบ่มจนครบ 7 วัน เติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีสปอร์เชื้อรา ทำการขูดสปอร์ของเชื้อราด้วยลูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อใส่ในขวดปลอดเชื้อ จากนั้นปรับความเข้มข้นของสปอร์โดยใช้ Heamacytometer ให้ได้ปริมาณสปอร์ที่อยู่ในช่วง 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.4.3 การประยุกต์ใช้เกลือของกรดอินทรีย์ในพริกสด

การประยุกต์ใช้เกลือของกรดอินทรีย์ในพริกสดทำตามวิธีการของ Gowda และคณะ, 2004 นำพริกสดที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.4.1 มาจุ่มด้วยสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus paraciticus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่คัดเลือกมาจากผลการทดลองในข้อ 3.2.2.1 ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 54 และ 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเปรียบเทียบกับพริกชุดควบคุม (control) ที่จุ่มในน้ำกลั่นแทนการจุ่มในสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ นำพริกสดมาจุ่มในสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ที่แต่ละระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 20 วินาที และนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำตัวอย่างพริกมาคลุกสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เพื่อให้การปนเปื้อนของเชื้อราเป็นร้อยเปอร์เซ็นต์ นำพริกที่คลุกสปอร์เชื้อรามาจัดเรียงใส่จานเพาะเชื้อโดยเรียงเป็นแถวเดียว (ปริมาณ 20 กรัมต่อจาน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญของเชื้อรา จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาการปนเปื้อนด้วยวิธี Direct plating ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) และวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดทดสอบ DOA-Aflatoxin ELISA ของกรมวิชาการเกษตรซึ่งประกอบด้วยสารอะฟลาทอกซิน บี1 มาตรฐาน AFB_1-HRP Conjugate Substrate (TMB) Stopping solution Conjugate Buffer และ Washing buffer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างพริกทั้งหมด 6 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ พริกสด พริกแห้ง พริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้ม แสดงในตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 สำหรับผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกทั้งเมล็ด ได้แก่ พริกสดและพริกแห้ง ซึ่งได้วิเคราะห์โดยใช้วิธี Direct plating บนอาหาร DRBC/DG18 และ Acidified PDA โดยเปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ DG18 และ Acidified PDA พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราเฉลี่ยร้อยละ 60.1 และ 79.9 ตามลำดับ

จากการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับ Santos และคณะ (2008) ที่ได้กล่าวถึงการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในพริก เนื่องจากสภาวะการเพาะปลูกในประเทศที่มีภูมิอากาศอบอุ่นและชื้น และสภาพการเก็บรักษาที่ไม่ดีทำให้ไวต่อการปนเปื้อนของเชื้อรานำไปสู่การสะสมของสารพิษในผลิตภัณฑ์เหล่านั้น นอกจากนี้ เกศรินทร์ รามณี (2552) กล่าวว่า ความชื้นในอากาศถือเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของเชื้อราซึ่ง *Aspergillus flavus* ต้องการความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-90 และในสภาวะเป็นกรดช่วงพีเอช 4-6 จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญที่สุด

4.2 การแยกเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

เมื่อทำการแยกเชื้อราที่เจริญบนอาหาร DRBC/DG18 และ Acidified PDA ได้บริสุทธิ์แล้วนำมาจำแนกชนิด พบว่าเชื้อราจากพริกแห้งทั้งเมล็ดที่เจริญบนอาหาร DG18 มีความหลากหลายมากกว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหาร Acidified PDA โดยเชื้อราที่แยกได้จากอาหาร DG18 พบเชื้อรา 3 สกุล ได้แก่ *Aspergillus parasiticus* C5PD, *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. และ *Penicillium* spp. ขณะที่อาหาร Acidified PDA พบเชื้อราเพียง 2 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp. และ *Alternaria* spp. และในตัวอย่างพริกสดพบการปนเปื้อนของเชื้อรามากกว่าในตัวอย่างพริกแห้ง เชื้อราจากพริกสดที่เจริญบนอาหาร DRBC และ Acidified PDA มีปริมาณใกล้เคียงกันซึ่งมีอัตราการปนเปื้อนเฉลี่ยร้อยละ 89.6 และ 90.9 ตามลำดับ ซึ่งได้แยกเชื้อราจากอาหารทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวมาจำแนกชนิดพบว่าเชื้อราที่เจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนอาหาร Acidified PDA พบว่ามีความหลากหลายมากกว่าเชื้อราที่เจริญบนอาหาร DRBC โดยเชื้อราที่แยกได้จากอาหาร Acidified PDA พบว่าเป็นเชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. และ *Fusarium* spp. ในขณะที่เชื้อราที่แยกจากอาหาร DRBC พบว่าเป็น *Aspergillus* spp. และ *Alternaria* spp.

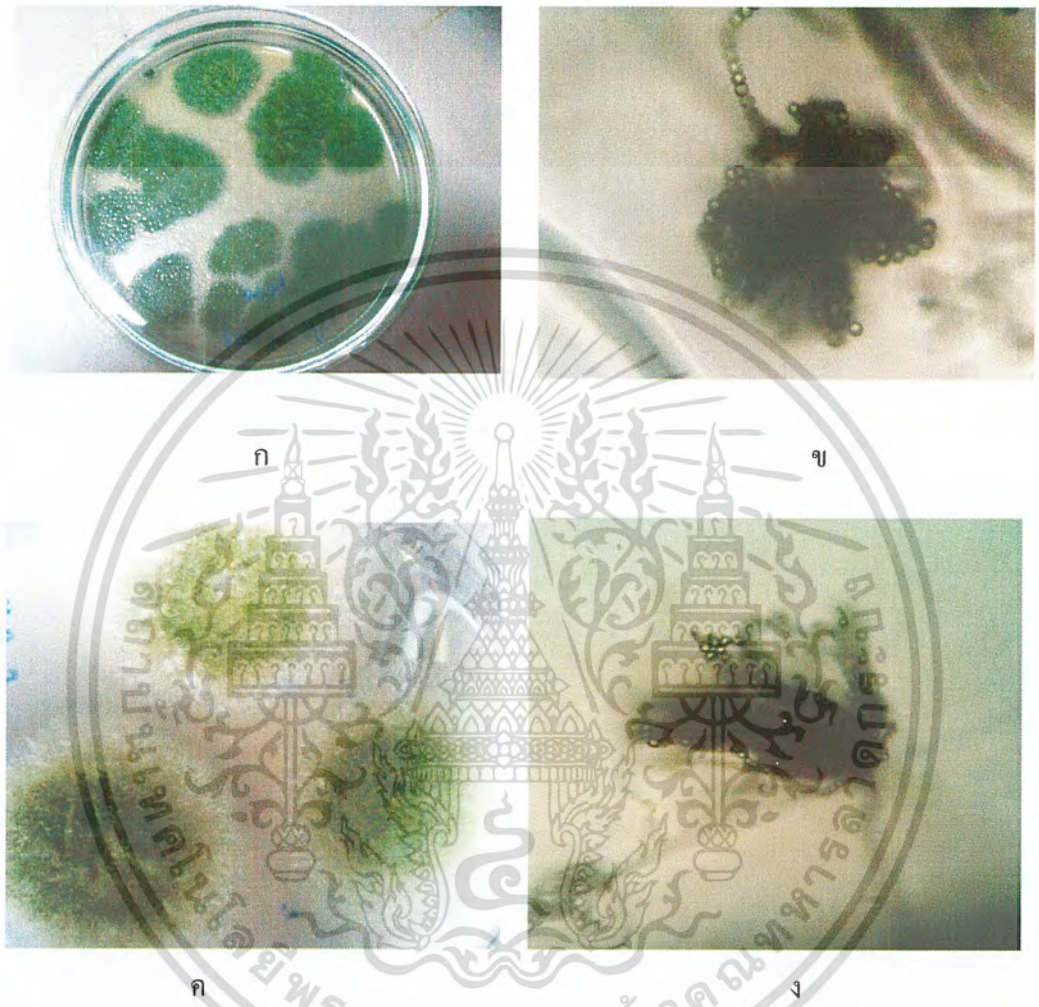
สำหรับการปนเปื้อนของเชื้อราในผลิตภัณฑ์จากพริก ได้แก่ พริกป่นละเอียด พริกป่นหยาบ น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้ม ซึ่งได้วิเคราะห์จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดโดยใช้วิธี Dilution plating บนอาหาร DRBC (ตัวอย่างที่มี a_w สูง) หรืออาหาร DG18 (ตัวอย่างที่มี a_w ต่ำ) และอาหาร Acidified PDA พบว่าผลิตภัณฑ์จากพริกทั้ง 4 ชนิดมีเชื้อราและยีสต์ปนเปื้อนค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 4.2) โดยมีจำนวนการปนเปื้อนอยู่ในช่วง <10-4.8×10^2 CFU/g และจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดค่อนข้างใกล้เคียงกัน และเมื่อแยกเชื้อราจากผลิตภัณฑ์ทั้ง 4 ชนิดมาจำแนกชนิดพบว่า จากตัวอย่างพริกป่นหยาบและน้ำพริกแกงส้มพบเชื้อราเหมือนกัน 3 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. และ *Cladosporium* spp. พริกป่นหยาบและน้ำพริกแกงเผ็ดพบเชื้อราเหมือนกัน 1 สกุล คือ *Aspergillus* spp. นอกจากนี้ยังพบ *Aspergillus flavus* ในพริกป่นหยาบอีกด้วย

เชื้อราที่แยกได้จากพริกแห้งรหัสไอโซเลตคือ C5PD พบว่าเป็นเชื้อรา *A. parasiticus* (รูปที่ 4 ก และ 4 ข) เป็นเชื้อราที่มีลักษณะดังนี้ โคโลนีของเชื้อราชนิดนี้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.5 เซนติเมตร บนอาหาร Acidified PDA เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีก้านชูอับสปอร์สีเขียวทึบ ส่วนหัวของคอนิเดียมีสีเขียวและแผ่รัศมีออกจากจุดศูนย์กลาง (radiate) คอนิเดียมีรูปร่างเป็นทรงกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5-5.5 ไมโครเมตรมีผนังหุ้มที่มีลักษณะขรุขระชัดเจน ส่วนใหญ่ *Aspergillus parasiticus* มีลักษณะเฉพาะคือ มีส่วนหัวคอนิเดียที่เป็นแบบรัศมีและมี phialide เกิดขึ้นโดยตรงบนเวสสิเคิล (uniseriate radiate conidial head) เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *A. flavus, A. sojae* และ *A. oryzae*

เชื้อราที่จำแนกได้จากตัวอย่างพริกป่นหยาบรหัส B3DG พบว่าเป็นเชื้อรา *A. flavus* (รูปที่ 4 ค และ 4 ง) ซึ่งมีลักษณะดังนี้ โคโลนีของ *A. flavus* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 เซนติเมตร เมื่อนำเลี้ยงบนอาหาร Acidified PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก้านชูอับสปอร์ (conidiophore) จะเป็นสีเขียวอมเหลืองค่อนข้างหนา เมื่อส่องดูลักษณะโครงสร้างของเชื้อราชนิดนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าลักษณะของ conidial head จะแผ่ออกจากศูนย์กลาง (radiate) หลังจากนั้นจะแตกออกเป็นหลายคอลัมน์หลวมๆ



ก ข

ค ง

รูปที่ 4 ลักษณะของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* C5PD และ *Aspergillus flavus* B3DG

ก. สีโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ที่เจริญบนอาหาร Acidified PDA

ข. ลักษณะของเวสสิเคิลของ *Aspergillus parasiticus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ค. สีโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่เจริญบนอาหาร DG18

ง. ลักษณะของเวสสิเคิลของ *Aspergillus flavus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Mandeel (2005) ที่สุ่มตัวอย่างเครื่องเทศหลายชนิดที่ได้นำเข้ามาจากประเทศต่างๆ ได้แก่ อินเดีย ปากีสถาน อิหร่าน และสหรัฐอเมริกา สำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พริกแดงที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์พบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus niger* (62 ไอโซเลต) และพบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus* (96 ไอโซเลต) นอกจากนี้ Kiran (2005) ยังพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Alternaria alternate*, *Fusarium* spp. และ *Mucor* spp. ในพริกที่เก็บไว้ในห้องเย็นในประเทศอินเดีย

นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจวัดค่าพีเอชและ a_w ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลซียสของพริกและผลิตภัณฑ์จากพริกทั้ง 6 ชนิด พบว่าพริกสดมีค่าพีเอชเฉลี่ยสูงที่สุดเป็น 5.57 รองลงมาคือ พริกแห้งและพริกป่นละเอียดซึ่งมีค่าพีเอชเฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ 4.84-4.89 พริกป่นหยาบมีค่าพีเอชเฉลี่ยเป็น 5.21 ส่วนผลิตภัณฑ์จากพริก ได้แก่ น้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้ม มีค่าพีเอชเฉลี่ยใกล้เคียงกันที่ 4.82-4.86 พริกสดมีค่า a_w เฉลี่ยสูงสุดคือ 0.958 รองลงมาคือน้ำพริกแกงเผ็ดมีค่า a_w เฉลี่ย 0.902 และน้ำพริกแกงส้มมีค่า a_w เฉลี่ย 0.874 พริกแห้งมีค่า a_w เฉลี่ย 0.590 พริกป่นละเอียดและพริกป่นหยาบมีค่า a_w เฉลี่ยใกล้เคียงกันที่ 0.323-0.369

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและคุณภาพทางจุลินทรีย์ของพริกทั้งหมด 6 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ พริกสด พริกแห้ง พริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้ม สามารถแยกเชื้อและนำมาศึกษาคุณลักษณะพริกที่พบการปนเปื้อนและสามารถแยกเชื้อได้มากที่สุดคือ พริกสด และเชื้อราที่พบมากที่สุดคือ *Aspergillus* spp. (ร้อยละ 84.44) รองลงมาคือ *Penicillium* spp. (ร้อยละ 7.41), *Alternaria* spp. (ร้อยละ 5.19), *Fusarium* spp. (ร้อยละ 1.48) และ *Cladosporium* spp. (ร้อยละ 1.48) (ตารางที่ 4.3)

การที่พบว่าจำนวนเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างพริกป่นหยาบและพริกป่นละเอียดมีปริมาณค่อนข้างน้อย คาดว่าน่าจะเป็นเพราะกรรมวิธีในการผลิตของผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดนี้ ซึ่งอาจมีการผ่านความร้อน ซึ่งความร้อนที่ใช้อาจจะไปช่วยลดค่า a_w ในพริก ทำให้มีปริมาณน้ำไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อรา ซึ่งจะเห็นได้จากค่า a_w ของพริกป่นหยาบและพริกป่นละเอียดมีค่าต่ำมาก (0.323-0.369) นอกจากนี้การที่พบจำนวนเชื้อราและยีสต์ปนเปื้อนน้อยในตัวอย่างน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้ม คาดว่าน่าจะเป็นเพราะกระบวนการผลิตรวมถึงส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยในน้ำพริกแกงเผ็ดจะมีส่วนผสมของ ลูกผักชี ยี่หร่า ข่า ผิวมะกรูด กระเทียม ตะไคร้ หอมแดง พริกแห้ง เกลือป่น พริกไทย รากผักชี และกะปิ ส่วนน้ำพริกแกงส้มมีส่วนผสมของ พริกแห้ง หอมแดง เกลือป่น และน้ำพริกเผา (www.ezythaicooking.com)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกแห้งและพริกสดทั้งเมล็ดโดยวิธี Direct plating

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	pH (25°C)		a_w (25°C)		ปริมาณการปนเปื้อน (ร้อยละ)				จำนวนไอโซเลตของเชื้อรา ที่แยกได้	
		ช่วง	เฉลี่ย	ช่วง	เฉลี่ย	DG18/DRBC		Acidified PDA			
						ช่วง	เฉลี่ย	ช่วง	เฉลี่ย	DG18/DRBC	Acidified PDA
พริกแห้ง	10	4.51-5.18	4.846	0.534-0.688	0.590	16-100	60.1	34-100	79.9	*Aspergillus* (17) *Alternaria* (1) *Penicillium* (1)	*Aspergillus parasiticus* C5PD (1) *Aspergillus* (17) *Alternaria* (1)
พริกสด	10	5.09-6.14	5.571	0.914-0.968	0.958	60-100	89.6	52-100	90.9	*Aspergillus* (19) *Alternaria* (3)	*Aspergillus* (11) *Penicillium* (4) *Alternaria* (1) *Fusarium* (1)

ตารางที่ 4.2 การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกป่นละเอียด พริกป่นหยาบ น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มโดยวิธี Dilution plating

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	pH (25°C)		a_w (25°C)		จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด (CFU/g)		จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้	
		ช่วง	เฉลี่ย	ช่วง	เฉลี่ย	DG18/DRBC	Acidified PDA	DG18/DRBC	Acidified PDA
พริกป่นละเอียด	10	4.18-5.70	4.893	0.248-0.424	0.369	$<10\text{-}1.0\times10^{2}$	$<10\text{-}1.0\times10^{2}$	*Aspergillus* (16)	*Aspergillus* (9)
พริกป่นหยาบ	10	4.75-6.34	5.213	0.201-0.435	0.323	$<10\text{-}4.8\times10^{2}$	$<10\text{-}4.7\times10^{2}$	*Aspergillus flavus* B3DG (1) *Aspergillus* (14) *Penicillium* (2) *Cladosporium* (1)	*Aspergillus* (8) *Penicillium* (1)
น้ำพริกแกงเผ็ด	10	4.76-5.07	4.868	0.842-0.936	0.902	$<10\text{-}3.0\times10^{1}$	$<10\text{-}1.0\times10^{2}$	*Aspergillus* (2)	-
น้ำพริกแกงส้ม	10	4.69-5.07	4.829	0.827-0.908	0.874	$<10\text{-}4.8\times10^{2}$	$<10\text{-}4.7\times10^{2}$	*Aspergillus* (1) *Penicillium* (2) *Cladosporium* (1)	-

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเชื้อราที่ปนเปื้อนในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

เชื้อราที่พบ	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	ร้อยละ
Aspergillus spp.	114	84.44
Penicillium spp.	10	7.41
Alternaria spp.	7	5.19
Fusarium spp.	2	1.48
Cladosporium spp.	2	1.48
รวม	**135**	**100**

มีรายงานว่าเครื่องเทศหลายชนิดที่ใช้เป็นส่วนผสมในน้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้มมีสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อรา เช่น ยี่หร่า (*Ocimum gratissimum*) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ เชื้อรา *Aspergillus ochraceus, Penicillium expansum, Penicillium verrucosum* (Nguefack และคณะ, 2009) ลูกผักชี (*Coriandrum sativum*) น้ำมันหอมระเหยจากลูกผักชีมีสมบัติในการต้านการเจริญของ *Candida albican* (Silva และคณะ, 2011) กระเทียม (*Aillium satium*) มีสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* (Gowda และคณะ, 2004) ข่า (*Alpinia galanga*) มีสมบัติในการต้านการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* (Oonmetta-aree และคณะ, 2006) ตะไคร้ (*Cymbopogon citratus*) มีสมบัติในการต้านการเจริญของเชื้อรา *A. ochraceus* และ *P. expansum* (Nguefack และคณะ, 2009)

4.3 ผลของกรดอินทรีย์ร่วมกับค่าพีเอชและค่าปริมาณน้ำอิสระในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus*

เมื่อพิจารณาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ ได้แก่ โพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเบนโซเอต และแคลเซียมโพรพิโอเนตต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041, *A. flavus* B3DG ที่แยกได้จากพริกป่นหยาบ *A. parasiticus* TISTR 3276, *A. parasiticus* C5PD ที่แยกได้จากตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พริกแห้ง ในอาหารพริกจำลองที่ระดับ a_w 3 ระดับ (a_w 0.85, 0.90 และ 0.95) และระดับ pH 2 ระดับ (pH 5.0 และ 5.5) (ตารางที่ 4.4) พบว่าที่สภาวะ a_w และ pH ระดับเดียวกัน โพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าโซเดียมเบนโซเอตและแคลเซียมโพรพิโอเนต ซึ่งจะเห็นได้จากค่า MIC ของโพแทสเซียมซอร์เบตที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดมีค่าน้อยที่สุด เกลือของกรดที่มีประสิทธิภาพรองลงมาคือ โซเดียมเบนโซเอต ส่วนแคลเซียมโพรพิโอเนตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราต่ำที่สุด นอกจากนี้เกลือของกรดอินทรีย์ 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน โดยพบว่าส่วนใหญ่เชื้อรา *A. parasiticus* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งการเจริญโดยเกลือของกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่าเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งสังเกตได้จากค่า MIC ของ *A. parasiticus* ที่มีค่าสูงกว่าค่า MIC ของเชื้อรา *A. flavus* ที่ระดับ a_w และ pH เดียวกัน เมื่อพิจารณาค่า MIC ของเกลือของกรดแต่ละชนิดที่ระดับ pH เดียวกัน ค่า MIC ที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดที่ระดับ a_w 0.85 มีค่าน้อยกว่าค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.90 และ 0.95 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า MIC ของเกลือของกรดแต่ละชนิดที่ระดับ a_w เดียวกันพบว่าค่า MIC ที่ pH 5.0 จะมีค่าต่ำกว่าค่า MIC ที่ pH 5.5 แสดงให้เห็นว่าเกลือของกรดอินทรีย์จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากขึ้นเมื่อระดับ a_w และ pH ต่ำลง

การที่ค่า MIC ของเกลือของกรดอินทรีย์ทุกชนิดที่ทดสอบที่ใช้ในการทดลองนี้ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในสภาพ pH 5.0 มีค่า MIC ต่ำกว่าค่า MIC ในสภาพ pH 5.5 ที่สภาวะ a_w เท่ากัน และค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.85 มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ที่ a_w 0.90 และ 0.95 ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Haung และคณะ (2010) ซึ่งได้หาค่า MIC ของกรดซอร์บิกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และพบว่าค่า MIC ที่ pH 5.0 ต่ำกว่าค่า MIC ที่ pH 6.0 ในสภาวะ a_w เดียวกัน (เช่น a_w 0.85 pH 5.0 ค่า MIC ของกรดซอร์บิกเท่ากับร้อยละ 0.01 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ต่ำกว่าค่า MIC ที่ a_w 0.85 pH 6.0 ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และได้ค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.85 ต่ำกว่าค่า MIC ที่ a_w 0.90 ในสภาวะค่า pH เดียวกัน (เช่น ค่า MIC ของกรดซอร์บิกที่ pH 5.0 a_w 0.85 มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.01 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ที่ pH 5.0 a_w 0.90 มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.05 น้ำหนักต่อน้ำหนัก) การที่ค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.85 มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ที่ 0.90 และ 0.95 ที่ระดับ pH เดียวกัน อาจเป็นผลเนื่องมาจากการมีปริมาณน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิสระน้อยทำให้เกิดสภาวะเครียดจากความดันออสโมติก (osmotic stress) ร่วมกับการมีสารยับยั้ง เช่น potassium sorbate ซึ่ง Booth (1998) กล่าวว่า บ่อยครั้งที่มักจะมีการใช้สภาวะที่มีปริมาณน้ำอิสระต่ำอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสภาวะเครียดอื่นในการถนอมอาหารไม่ให้เน่าเสีย หรือป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร Jay และคณะ (2005) กล่าวว่า โดยทั่วไปกรดซอร์บิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดีที่สุดที่ pH ต่ำกว่า 6.0 และจะไม่มีประสิทธิภาพเมื่อ pH สูงกว่า 6.5 สารประกอบของกรดซอร์บิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดีกว่าโซเดียมเบนโซเอตในช่วง pH 4.0-6.0 และที่ pH 3.0 หรือต่ำกว่า เกลือของกรดซอร์เบตจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดีกว่าเกลือแคลเซียมโพรพิโอเนตเพียงเล็กน้อย แต่จะมีประสิทธิภาพเท่ากับโซเดียมเบนโซเอต ค่า pK ของเกลือซอร์เบตเป็น 4.80 และที่ pH 4.0 เกลือซอร์เบตจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวถึงร้อยละ 86 แต่เมื่อระดับ pH เป็น 6.0 เกลือซอร์เบตจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวเพียงร้อยละ 6 เท่านั้น ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในสภาพ pH 5.0 เกลือซอร์เบตจะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวปริมาณมากกว่าเมื่ออยู่ในสภาพ pH 5.5 จึงเป็นผลให้ประสิทธิภาพของซอร์เบตในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ที่ pH 5.0 สูงกว่าที่ pH 5.5 นอกจากนี้ การที่เกลือของกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Jay และคณะ (2005) ได้กล่าวว่า เกลือซอร์เบตและเกลือโพรพิโอเนตเป็นกรดอ่อนที่ชอบไขมัน (weak lipophillic acid) ที่มีกลไกคล้ายกัน หลังจากกรดอ่อนที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไป จะเกิดการแตกตัวและทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ต่ำลง ส่งผลให้เซลล์ทำงานผิดปกติและหยุดการเจริญ

Stopforth และคณะ (2005) กล่าวว่า กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเกลือซอร์เบตได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของเซลล์ ความสมบูรณ์ และหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งการยับยั้งหน้าที่ในการขนส่งสารและกระบวนการเมแทบอลิกในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการตายของจุลินทรีย์ที่เผชิญกับสภาพความเข้มข้นสูงของสารยับยั้งเช่นซอร์เบต เกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ การไปลดการใช้สารประกอบคาร์บอนจากสารตั้งต้นหลายชนิด ได้แก่ กลูโคส อะซิเตท ซัคซิเนต ไพรูเวต แลคเตท ออกซาโลแอซิเตท แอลฟา-คีโตกลูตาเรต เอทานอล และอะซิทัลดีไฮด์ นอกจากนี้ซอร์เบตยังไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งอาจทำให้เกิดการขัดขวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของโพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเบนโซเอต และแคลเซียมโพรพิโอเนตในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus*

Organic acid salts	MIC (mg/ml)			
	A. flavus TISTR 3041	*A. flavus* B3DG	*A. parasiticus* TISTR 3276	*A. parasiticus* C5PD
Potassium sorbate				
a_w 0.85 pH 5.0	1.1	1.1	5	5
pH 5.5	3	3	5	5
a_w 0.90 pH 5.0	3	5	7	7
pH 5.5	7	7	13	9
a_w 0.95 pH 5.0	3	3	5	3
pH 5.5	9	11	13	>20
Sodium benzoate				
a_w 0.85 pH 5.0	5	3	9	5
pH 5.5	9	9	13	11
a_w 0.90 pH 5.0	11	9	11	9
pH 5.5	13	13	18	14
a_w 0.95 pH 5.0	7	7	9	9
pH 5.5	13	13	15	16
Calcium propionate				
a_w 0.85 pH 5.0	13	11	13	9
pH 5.5	14	>20	16	>20
a_w 0.90 pH 5.0	>20	13	>20	13
pH 5.5	>20	>20	>20	18
a_w 0.95 pH 5.0	>20	>20	>20	>20
pH 5.5	>20	>20	>20	>20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการที่สำคัญเกี่ยวกับการขนส่งสาร กระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ การเจริญ และการจำลอง DNA เอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยเกลือซอร์เบต ได้แก่ แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ฟูมาเรส (fumarase) เอโนเลส (enolase) แอสปาเตส (aspartase) แคทตาเลส (catalase) มาเลต (malate) ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) แอลฟา-คีโตกลูตาเรต ดีไฮโดรจีเนส (α-ketoglutarate dehydrogenase) ซัคซินิคดีไฮโดรจีเนส (succinic dehydrogenase) และฟีซิน (ficin) (Stopforth และคณะ, 2005)

4.4 ผลการประยุกต์ใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการยับยั้งการเจริญและการลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในพริกสด

จากการประยุกต์ใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งเจริญและลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในพริกสดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041, *A. flavus* B3DG, *A. parasiticus* TISTR 3276 และ *A. parasiticus* C5PD ในพริกสดมีปริมาณลดลงตามความเข้มข้นของโพแทสเซียมซอร์เบตที่เพิ่มขึ้น การจุ่มพริกสดด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ความเข้มข้น 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ทั้ง 2 สายพันธุ์บนผิวของเมล็ดพริกสดได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถลดการปนเปื้อนลงเหลือร้อยละ 60.86-63.15 เมื่อเปรียบเทียบกับพริกชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตพบการปนเปื้อนของเส้นใยเชื้อราปริมาณมากในเมล็ดพริกทุกเมล็ดปกคลุมผิวของเมล็ดพริก และเมื่อพิจารณาผลของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการสร้างอะฟลาทอกซินโดย *A. flavus* และ *A. parasiticus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในพริกสด ผลปรากฏว่าสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ทุกระดับความเข้มข้นไม่มีผลช่วยลดการสร้างสารอะฟลาทอกซิน โดยเชื้อราทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบมีแนวโน้มการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินสูงขึ้น

การที่เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีบนพริกสดชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต คาดว่าน่าจะเป็นเพราะพริกสดมีค่า a_w เฉลี่ยประมาณ 0.95 ซึ่งเป็นค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ เนื่องจาก Marin และคณะ (2009) รายงานว่าค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. flavus* ที่แยกได้จากพริกแดงป่น มีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อยู่ในช่วง 0.97-0.99 และค่า a_w ต่ำสุดของการเจริญ *A. flavus* อยู่ในช่วง 0.82-0.88 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ ค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. flavus* อยู่ในช่วง 0.980-0.994 Pitt และ Hocking (1977) พบว่า *A. flavus* เจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 32-33 องศาเซลเซียส ส่วนค่า a_w ที่เหมาะสมของเชื้อรา *A. parasiticus* มีค่า a_w 0.98 (Ayerst, 1969) และจากการทดลองนี้ที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ความเข้มข้น 54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการจุ่มพริกสดนั้นเป็นระดับความเข้มข้นเทียบเท่ากับ 6 เท่า และ 9 เท่า ของค่า MIC ของโพแทสเซียมซอร์เบตที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041 ที่ระดับ a_w 0.95 pH 5.5 (ตารางที่ 4.4) ตามลำดับ แม้ว่าระดับความเข้มข้นทั้ง 2 จะใช้ลดการปนเปื้อนของเชื้อราได้บ้างแต่ก็ไม่สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ทั้งหมด โดยที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยังคงพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า *A. parasiticus* ค่อนข้างมีความต้านทานต่อสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตได้ดีกว่า *A. flavus* ดังนั้น ถ้าหากต้องการลดการปนเปื้อนของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ ควรเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ใช้จุ่มพริกให้มีความเข้มข้นสูงกว่า 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนการที่พบว่าปริมาณอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นในพริกสดที่ปนเปื้อนเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ และจุ่มด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นนั้นน่าจะเป็นเพราะระดับ a_w ของพริกสด (0.97) ใกล้เคียงระดับ a_w ที่เหมาะสมต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน Smith และคณะ (1993) รายงานว่า การสร้างอะฟลาทอกซินสูงสุด (3.45 µg/g หรือ 3.35 µg/g) เกิดขึ้นเมื่อเติมสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* 10^3 สปอร์ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ระดับ a_w 0.96 อุณหภูมิเก็บรักษาที่ 25 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีออกซิเจนร้อยละ 10 อย่างไรก็ตามค่า a_w ต่ำสุดและ a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. parasiticus* ในพริกไม่เคยมีรายงานไว้ แต่พบว่ามีรายงานในอาหารชนิดอื่นๆ ได้แก่ ในถั่วเหลือง ซึ่ง Fernández Pinto และคณะ (1991) รายงานว่าค่า a_w ต่ำสุดที่เชื้อรา *A. parasiticus* สร้างอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้มีค่าใกล้เคียง 0.865 และค่า a_w เหมาะสมต่อการสร้างอะฟลาทอกซินในถั่วเหลืองมีค่าเท่ากับ a_w 0.99 นอกจากนี้ Brester และคณะ (1998) ได้รายงานว่า ค่า a_w ต่ำสุดของการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* บนเมล็ดธัญพืช (Amaranth grain) อยู่ที่ระดับ 0.825

Romagnoli และคณะ (2007) ทดสอบว่า อะฟลาทอกซิน บี 1 เป็นสารพิษที่พบบ่อยว่ามีปริมาณสูงในเครื่องเทศและพบว่าปนเปื้อนอยู่ในพริกบ่อยครั้งที่สุด Ardic และคณะ (2008) กล่าวว่าตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พริก deep-red ground pepper ประมาณร้อยละ 15 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 เกินกว่าค่าสูงสุดที่ยอมรับได้ และมี 5 ตัวอย่างที่มีปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 เท่ากับปริมาณที่ยอมรับได้ (24.7 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) Bircan (2005) พบอะฟลาทอกซิน บี 1 ใน 27 ตัวอย่างของ red ground pepper จากทั้งหมด 30 ตัวอย่าง พบว่าอยู่ในช่วง 0.5-116.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบอะฟลาทอกซิน บี 1 ในตัวอย่างพริกป่นทุกตัวอย่างโดยพบอยู่ในช่วง 1.6-80.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม Reddy และคณะ (2001) รายงานว่าตัวอย่างพริกร้อยละ 59 จาก 182 ตัวอย่าง ที่สุ่มมาจากประเทศอินเดียมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน บี 1 ตรวจพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน บี 1 สูงสุดในพริกป่นถึง 3 ตัวอย่างที่ระดับ 969 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

มีหลายงานวิจัยที่ได้ทดลองประยุกต์ใช้โพแทสเซียมซอร์เบตในผลิตผลทางการเกษตรชนิดอื่นๆด้วย เช่น ผลการทดลองของ Smilanick และคณะ (2008) ซึ่งได้ศึกษาผลของโพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับความร้อนและสารฆ่าเชื้อเพื่อควบคุมการเน่าเสียของผลไม้ตระกูลส้มจากเชื้อรา *Penicillum digitatum* และ *Geotrichum citri-aurantii* ซึ่งทำให้เกิด green mold rot พบว่าโพแทสเซียมซอร์เบตสามารถนำไปใช้ร่วมกับสารฆ่าเชื้อ เช่น Imazalil (IMZ), Thiabendazole (TBZ), Pyrimethanit (PYR) และ Fludioxonil (FLUD) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ การปรับปรุงประสิทธิภาพของ IMZ (0.01 mg/l) โดยการเติมโพแทสเซียมซอร์เบตร้อยละ 0.04 ร่วมด้วยเนื่องจากสามารถลดการงอกของคอนิเดียของ *P. digitatum* ได้ และยังพบว่าการนำสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตไปให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ยังสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของโพแทสเซียมซอร์เบตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

นอกจากนี้ Montesinos-Herrero และคณะ (2009) ยังได้ทดลองควบคุมการเจริญของ *P. digitatum* (green mold) หรือ *P. italicum* (blue mold) ในผลส้ม พบว่าการจุ่มผลส้มพันธุ์วาเลนเซียในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที สามารถลด green mold และ blue mold ได้ร้อยละ 96 และร้อยละ 83 ตามลำดับ Samapundo และคณะ (2007) กล่าวว่าเชื้อ *A. parasiticus* และ *A. flavus* ที่แยกมาจากข้าวโพดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเนื่องจากพริกสดมีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 95 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับค่า a_w และ pH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เหมาะสม จึงทำให้พบการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์ปริมาณมาก และตรวจพบสารพิษอะฟลาทอกซินในจานควบคุม

รูปที่ 5 พริกสดชุบด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95

ก ข ค

ง

รูปที่ 6 พริกสดชุบด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่เติมเชื้อ *Aspergillus*

ก. เติมเชื้อ *Aspergillus flavus* บริสุทธิ์

ข. เติมเชื้อ *Aspergillus flavus* B3DG ที่แยกได้จากพริกป่นหยาบ

ค. เติมเชื้อ *Aspergillus parasiticus* บริสุทธิ์

ง. เติมเชื้อ *Aspergillus parasiticus* C5PD ที่แยกได้จากพริกแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของโพแทสเซียมซอร์เบตต่อการลดการปนเปื้อนและการสร้างอะฟลาทอกซินโดย *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ในพริกสด

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	*Aspergillus flavus* TISTR 3041		*Aspergillus flavus* B3DG		*Aspergillus parasiticus* TISTR 3276		*Aspergillus parasiticus* C5PD	
	ปริมาณการเจริญ	สารอะฟลาทอกซิน (ppb)	ปริมาณการเจริญ	สารอะฟลาทอกซิน (ppb)	ปริมาณการเจริญ	สารอะฟลาทอกซิน (ppb)	ปริมาณการเจริญ	สารอะฟลาทอกซิน (ppb)
0	100%	1.3	100%	4.7	100%	2.53	100%	4.02
54	62.5%	4.24	66.66%	10.14	86.95%	1.41	76.92%	7.35
81	62.5%	4.23	63.15%	8.43	60.86%	5.83	60.86%	2.19

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก 6 ชนิด ได้แก่ พริกแห้ง พริกสด พริกป่น หยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงส้ม และน้ำพริกแกงเผ็ด พบว่าพริกสดมีการปนเปื้อนจากเชื้อรามากที่สุดถึงร้อยละ 100 โดยพบเชื้อรา *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. และ *Cladosporium* spp. โดยเชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร DG18 เมื่อวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารละลายทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ โพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเบนโซเอต และแคลเซียมโพรพิโอเนต ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041, *A. flavus* B3DG, *A. parasiticus* TISTR 3276 และ *A. parasiticus* C5PD พบว่าสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้ดีที่สุด สารละลายที่มีประสิทธิภาพรองลงมา ได้แก่ โซเดียมเบนโซเอต ส่วนสารละลายที่มีประสิทธิภาพต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อรา คือ สารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนต การประยุกต์ใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราและการลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041, *A. flavus* B3DG, *A. parasiticus* TISTR 3276 และ *A. parasiticus* C5PD โดยการนำพริกสดทั้งเมล็ดจุ่มลงในสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่มีประสิทธภาพในการยับยั้งการเจริญได้ดี โดยสามารถชะลอการสร้างเส้นใยของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่สร้างโดย *A. flavus* TISTR 3041, *A. flavus* B3DG, *A. parasiticus* TISTR 3276 และ *A. parasiticus* C5PD พบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตเพิ่มขึ้นก็มีการสร้างสารพิษเพิ่มขึ้นด้วย อาจเกิดจากการปรับตัวของเชื้อราในการทนต่อสารละลายที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น จึงทำให้ผลิตสารอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นเพื่อต้านทานฤทธิ์ของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต

จากการทดลองทำให้ทราบว่าสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งและชะลอการเจริญของเชื้อรา แต่ไม่สามารถลดปริมาณการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ จากการประยุกต์ใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตในพริกสด เราสามารถนำไปใช้ได้จริงกับพริกและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำไปใช้กับผลผลิตชนิดอื่น เช่น ผลไม้อบแห้งและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรอบแห้งชนิดต่างๆ โดยนำมาจุ่มสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตก่อนนำไปอบแห้งก็จะช่วยในการลดปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา ซึ่งสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตเป็นส่วนผสมของสารกันบูดที่ได้รับอนุญาตให้มีในอาหารได้และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกายเมื่ออยู่ในปริมาณที่กำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

เกศรินทร์ รามณี. (2552). การยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลา นครินทร์, (บทที่1).

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. (2524). จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์เกษตร. วิทยาศาสตร์การอาหาร. กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, (บทที่ 5).

พิทยา สรวมศิริ. (2551). อุตสาหกรรมพืชเครื่องเทศ. (พิมพ์ครั้งที่ 3). เชียงใหม่: วนิดาเพลส, (บทที่ 16).

วิไล สนธิเพิ่มพูน. (2551). บทบาทของวอเตอร์แอกติวิตี้ (water activity : a_w) ในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารเกษตรนเรศวร. พิษณุโลก: รัตนสุวรรณการพิมพ์, (หน้า 16-18).

ศิวาพร ศิวเวชช. (2546). วัตถุเจือปนอาหาร. (พิมพ์ครั้งที่ 1). นครปฐม: โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, (บทที่ 5).

Abdel-Hafez, A. I. I., Moharram, A. M. M., & Abdelmallek, A. Y. (1989). Thermophilic and thermotolerant fungi associated with seeds of five members of the Umbelliferae from Egypt. *CI3'ptogamie mycology, 8*, 315-320.

Ardic, M. Y., Karakaya, Y., Atasever. M., & Durmaz, H. (2008). Determination of aflatoxin B1 levels in deep-red ground pepper (isot) using immunoaffinity column combined with ELISA. *Food and Chemical Toxicology, 46*, 1596–1599.

Aydin, A., Erkan, M. E., BaŞkaya, R., & Ciftcioglu, G. (2007). Determination of aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. *Food Control, 18,* 1015-1018.

Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research, 5*, 669-687.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bircan, C. (2005). The determination of aflatoxins in spices by immunoaffinity column extraction using HPLC. *International Journal of Food Science and Technology, 40,* 929–934.

Bothast, R. J. & Fennell, D. I. (1974). A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycologia, 66,* 365-369.

Booth, I. R. (1998). Bacterial response to osmotic stress: diverse mechanisms to achieve a common goal. In D.S.Reid (Ed.), *The properties of water in food ISOPOW6* (pp. 456-485). London, Great Britain: Blackie Academic & Professional.

Fernández Pinto, V. F., Vaamonde, G., & Montani, M. L. (1991). Influence of water activity, temperature and incubation time on the accumulation of aflatoxin B1 in soybean. *Food Microbiology, 8,* 195-201.

Gowda, N. K. S., Malathi, V., & Suganthi, R. U. (2004). Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. *Animal Feed Science and Technology, 116,* 281–291.

Guynot, M. E., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2005). Study of benzoate, propionate and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5-5.5). *International Journal of Food Microbiology, 101,* 161-168.

Huang, Y., Wilson, M., Chapman, B., & Hocking, A. D. (2010). Evaluation of the efficacy of four weak acid as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food system. *Food Microbiology, 27,* 33-36.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology*. (7th ed.). New York: Springer Science + Business Media. (Chapter 13).

Kiran, D. R., Narayana, K. J. P., & Vijayalakshmi, M. (2005). Aflatoxin B1 production in chillies (*Capsicum annuum* L.) kept in cold stores. *African Journal of Biotechnology, 4,* 791-795.

Kothari, S. L., Joshi, A., Kachhwaha, S., & Ochoa-Alejo, N. (2010). Chilli pepper-a review on tissue culture and trangenesis. *Biotechnology, 28,* 35-48.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

López-Malo, A., Alzamora, S. M., & Palou, E. (2005). *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *International Journal of Food Microbiology, 99,* 119-128.

Mandeel, Q. A. (2005). Fungal contamination of some imported spices. *Mycopathologia, 159,* 291-298.

McKee, L. H. (1995). Microbial contamination of spices and herbs: A review. *Lebensmittel-und-Wissenschaft Technologie, 28,* 1-11.

Mecteau, R. M., Arul, J., & Tweddell, R. J. (2002). Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of *Fusarium sambucinum,* a causal agent of potato dry rot. *Mycological Reseach, 106,* 688-696.

Mills, A. A. S., Platt, H. W., & Hurta, R. A. R. (2004). Effect of salt compounds on mycelia growth, sporulation and spore germination of various potato pathogens. *Postharvest Biology and Technology, 34,* 341-350.

Montesionos-Herrero, C., Del Rio, M. Á., Pastor, C., Brunetti, O., & Palou, L. (2009). Evaluation of brief potassium sorbate dips to control pastharvest *Penicillium* decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biology and Technology, 52,* 117-125.

Nguefack, J., Dongmo, J. B. L., Dakole, C. D., Leth, V., Vismer, H. F., Torp, J., Guemdjom, E. F. N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Zollo, P. H. A. & Nkengfack, A. E. (2009). Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *International Journal of Food Microbiology, 131,* 151-156.

Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., & Gasaluck, P. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *Food Science and Technology International, 39,* 1214-1220.

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (1977). Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relation of some xerophilic fungi. *Journal of General Microbiology, 101*, 35-40.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reddy, K. R. N., Reddy, C. S., & Muralidharan, K. (2009). Efficacy of certain agrochemicals on *Aspergillus* spp. and subsequent aflatoxin production in rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology, 93,* 53-57.

Romagnoli, B., Menna, V., Gruppioni, N., & Bergamini, C. (2007). Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control*, 18 , 697–701.

Samapundo, S., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Geeraerd, A. H., Van Impe, J. F., & Debevere, J. M. (2005). Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticilliodes* and *F. proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology, 105*, 35–52.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Lund, F., Filtenborg, O., & Frisvad, J. C. (2004). Methods for the detection, isolation and characterization of food-borne fungi. In R. A. Samson, E.S. Hoekstra, F. Lund, O. Filtenborg, & J. C. Frisvad, (Eds.), *Introduction to food and airborne fungi.* (pp. 283-297). Netherland: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Lund, F., Filtenborg, O., & Frisvad, J. C. (2004). Identification of the common food-borne fungi. In R. A. Samson, E. S. Hoekstra, F. Lund, O. Filtenborg, & J. C. Frisvad, (Eds.), *Introduction to food and airborne fungi.* (pp. 64-97). Netherland: Centraalbureau voor Schimmelcultures

Santos, L., Marin, S., & Ramos, A. J. (2008). *Capsicum* and mycotoxin contamination: state of the art in a global context. *Food Science and Technology International, 14*, 5-20.

Silva, F., Ferreira, S., Duarte, A., Mendonça, D. I., & Domingues, F. C. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine, 19,* 42-47.

Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Gabler, F. M., & Sorenson, D. (2008). Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology, 47,* 226-238.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shiva, K. N., Prasath. D., & Parthasarathy, V. A. (2008). Chilli and paprika. In V. A. Parthasarathy, K. Kandiannan, & V. Srinivasan (Eds.), *Organic spices* (pp. 477-522). New Delhi: New India Publishing Agency.

Stopforth, J. D., Sofos, J. N., & Busta, F. F. (2005). Sorbic acid and sorbates. In P.M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branenc (Eds.), *Antimicrobials in food* (pp. 49-90). Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Groups.

Suhr, K. I., & Nielsen, P. V. (2004). Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values. *International Journal of Food Microbiology, 95,* 67–78.

Tournas, V., Stack, M. E.,Mislivec, P. B., Koch, H. A., & Bandler, R. (2011). Yeasts, mold, and mycotoxins. In Bacteriological Analytical Manual (BAM). Avialable from : www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBA M/ucm071435.htm

Valencia-Chamorro, S. A., Pérez-Gago, M. B., Del Río, M. A., & Palou, L. (2010). Effect of antifungal hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible composite coatings on *Penicillium* decay development and postharvest quality of cold-stored "Ortanique" mandarins. *Journal of Food Science, 75,* 1750-3841.

[Online]. Available: http://www.ezythaicooking.com/red_curry_paste_th.html. (สืบค้นวันที่ 20/5/55)

[Online]. Available: http://www.ezythaicooking.com/hot_and_sour_curry_paste_th.html. (สืบค้นวันที่ 20/5/55)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีเตรียมอาหารพริกจำลอง

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆไม่ต้องปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักมันฝรั่ง 200 กรัม และหั่นพริกขี้หนูสดเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักพริกขี้หนู 60 กรัมใส่ภาชนะ เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้ม 30 นาที กรองผ่านผ้าขาวบาง นำน้ำที่กรองได้ไปเติมวุ้น 20 กรัมและ dextrose 20 กรัมลงไป ต้มจนวุ้นละลาย จากนั้นบรรจุขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ ก.1 ปริมาณการเติม glycerol และกรด tartaric ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CMA (Chilli Model agar)

Treatment	เติม Glycerol /อาหาร 100 ml.	10% tartaric acid/อาหาร 100 ml.
a_w 0.85 pH 5.0	36 ml	100 µl
a_w 0.85 pH 5.5	36 ml	-
a_w 0.90 pH 5.0	20 ml	100 µl
a_w 0.90 pH 5.5	20 ml	-
a_w 0.95 pH 5.0	4 ml	100 µl
a_w 0.95 pH 5.5	4 ml	-

หมายเหตุ: อาหารเลี้ยงเชื้อ Chilli Model Agar หลังจากเตรียมเสร็จ จะมีค่า pH เป็น 5.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกแห้งและพริกสดทั้งเมล็ดโดยวิธี Direct plating

ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่มา	pH (25°C)	a_w (25°C)	จำนวนพริกที่พบเชื้อรา (เมล็ด)		ปริมาณการปนเปื้อน (ร้อยละ)		จำนวนไอโซเลต ของเชื้อราที่แยก	
				DG18	âPDA	DG18	âPDA	DG18	âPDA
พริกแห้ง									
C1	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 1	4.51	0.688	52	74	52	74	2	2
C2	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 2	5.03	0.671	60	76	60	76	4	2
C3	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 3	5.18	0.534	52	86	52	86	2	1
C4	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 4	4.20	0.538	34	68	34	68	2	2
C5	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 5	4.97	0.537	16	34	16	34	2	1
C6	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 1	5.10	0.602	100	100	100	100	1	2
C7	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 2	4.68	0.557	54	82	54	82	2	2
C8	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 3	5.11	0.627	100	100	100	100	2	2
C9	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 4	4.71	0.581	79	79	79	79	1	2
C10	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 5	4.97	0.569	100	100	100	100	1	2

ตารางที่ ข.1 ผลการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกแห้งและพริกสดทั้งเมล็ดโดยวิธี Direct plating (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่มา	pH (25°c)	a_w (25°c)	จำนวนพริกที่พบเชื้อรา (เมล็ด)		ปริมาณการปนเปื้อน (ร้อยละ)		จำนวนไอโซเลต ของเชื้อราที่แยก	
				DRBC	âPDA	DRBC	âPDA	DRBC	âPDA
พริกสด									
D1	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 1	5.89	0.968	100	100	100	100	2	1
D2	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 2	5.54	0.964	100	100	100	100	4	2
D3	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 3	5.96	0.968	84	84	84	84	1	2
D4	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 4	5.54	0.962	60	96	60	96	3	3
D5	ท็อปส์	6.14	0.966	90	88	90	88	3	1
D6	บิ๊กซี	5.59	0.914	96	96	96	96	2	1
D7	ท็อปซ์	5.21	0.958	100	100	100	100	1	2
D8	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 1	5.37	0.961	100	100	100	100	1	2
D9	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 2	5.38	0.960	77	52	77	52	4	1
D10	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 3	5.09	0.963	89	93	89	93	4	2

ตารางที่ ข.2 เชื้อที่แยกได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

แหล่งที่มาของเชื้อราที่แยกได้	ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา (จำนวนไอโซเลต)	
	DG18	âPDA
พริกแห้ง		
C1	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (2)
C2	*Aspergillus* (3)	*Aspergillus* (1)
	Alternaria (1)	*Alternaria* (1)
C3	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (1)
	Penicillium (1)	
C4	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (2)
C5	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (1)
C6	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (2)
C7	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (2)
C8	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (2)
C9	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (2)
C10	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (2)
พริกสด		
D1	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (1)
D2	*Aspergillus* (4)	*Aspergillus* (1)
		Penicillium (1)
D3	*Alternaria* (1)	*Aspergillus* (1)
		Alternaria (1)
D4	*Aspergillus* (3)	*Aspergillus* (2)
		Penicillium (1)
D5	*Aspergillus* (2)	*Penicillium* (1)
	Alternaria (1)	
D6	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (1)
D7	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (2)
D8	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (2)
D9	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (1)
	Penicillium (1)	
	Fusarium (1)	
D10	*Aspergillus* (2)	*Penicillium* (1)
	Penicillium (1)	*Fusarium* (1)
	Alternaria (1)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 ผลการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกป่นละเอียด พริกป่นหยาบ น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มโดยวิธี Dilution plating

ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่มา	pH (25°c)	a_w (25°c)	จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด (CFU/g)		จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยก	
				DG18	âPDA	DG18	âPDA
พริกป่นละเอียด							
A1	ไร่ทิพย์	4.18	0.399	<10	<10	0	0
A2	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 1	4.72	0.364	7.0×10^{1}	<10	2	0
A3	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 2	4.48	0.383	5.0×10^{1}	<10	1	0
A4	ตลาดหัวตะเข้ร้าน 3	4.45	0.396	9.0×10^{1}	<10	3	0
A5	ง่วนสูน	5.07	0.424	<10	<10	0	0
A6	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 1	5.70	0.377	SPR	1.0×10^{2}	2	2
A7	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 2	5.03	0.373	1.0×10^{2}	2.0×10^{1}	2	1
A8	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 3	4.93	0.248	7.0×10^{1}	4.0×10^{1}	1	2
A9	พริกป่นป้าพิน	5.46	0.348	3.0×10^{1}	4.0×10^{1}	3	2
A10	ไร่ทิพย์	4.91	0.382	7.0×10^{1}	6.0×10^{1}	2	2
พริกป่นหยาบ							
B1	ไร่ทิพย์	5.03	0.365	2.4×10^{2}	3.7×10^{2}	2	1
B2	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 1	4.75	0.368	2.6×10^{2}	1.0×10^{2}	3	2
B3	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 2	4.80	0.370	4.2×10^{2}	1.3×10^{2}	4	2
B4	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 3	5.71	0.435	2.5×10^{2}	2.9×10^{2}	2	1
B5	ง่วนสูน	5.02	0.427	<10	<10	0	0
B6	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 1	5.53	0.298	2.0×10^{2}	1.5×10^{2}	1	2
B7	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 2	5.03	0.201	4.8×10^{2}	4.7×10^{2}	1	1
B8	ตลาดสุวรรณภูมิร้าน 3	5.03	0.254	4.0×10^{1}	<10	2	0
B9	พริกป่นป้าพิน	6.34	0.287	1.2×10^{2}	<10	1	0
B10	ไร่ทิพย์	4.89	0.229	9.0×10^{1}	3.0×10^{1}	1	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.3 ผลการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกป่นละเอียด พริกป่นหยาบ น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มโดยวิธี Dilution plating (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่มา	pH (25°c)	a_w (25°c)	จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด (CFU/g)		จำนวนไอโซเลต ของเชื้อราที่แยก	
				DRBC	âPDA	DRBC	âPDA
น้ำพริกแกงเผ็ด							
E1	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 1	4.78	0.900	<10	<10	0	O
E2	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 2	4.81	0.936	<10	10	0	O
E3	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 3	4.79	0.925	<10	<10	0	O
E4	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 4	4.86	0.922	<10	<10	0	O
E5	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 5	4.76	0.920	<10	<10	0	O
E6	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 1	5.07	0.891	2.0×10^{1}	<10	2	O
E7	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 2	4.81	0.905	<10	<10	0	O
E8	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 3	4.82	0.890	<10	<10	0	O
E9	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 4	5.05	0.898	1.0×10^{1}	<10	0	O
E10	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 5	4.93	0.842	3.0×10^{1}	<10	0	O
น้ำพริกแกงส้ม							
F1	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 1	4.72	0.885	<10	<10	0	O
F2	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 2	4.81	0.895	<10	<10	0	O
F3	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 3	4.79	0.890	<10	<10	0	O
F4	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 4	4.86	0.893	<10	<10	0	O
F5	ตลาดหัวตะเข้ร้านที่ 5	4.76	0.897	<10	<10	0	O
F6	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 1	4.92	0.838	2.0×10^{2}	1.5×10^{2}	1	O
F7	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 2	4.95	0.863	4.8×10^{2}	4.7×10^{2}	2	O
F8	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 3	4.69	0.827	4.0×10^{1}	<10	1	O
F9	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 4	5.07	0.871	1.2×10^{2}	<10	0	O
F10	ตลาดสุวรรณภูมิร้านที่ 5	4.72	0.885	<10	<10	0	O

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 เชื้อที่แยกได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

แหล่งที่มาของเชื้อราที่แยกได้	ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา(จำนวนไอโซเลต)	
	DG18	**âPDA**
พริกป่นละเอียด		
A1	-	-
A2	*Aspergillus* (2)	-
A3	*Aspergillus* (1)	-
A4	*Aspergillus* (3)	-
A5	-	-
A6	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (2)
A7	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (1)
A8	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (2)
A9	*Aspergillus* (3)	*Aspergillus* (2)
A10	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (2)
พริกป่นหยาบ		
B1	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (1)
B2	*Aspergillus* (2)	*Aspergillus* (1)
	Penicillium (1)	*Penicillium* (1)
B3	*Aspergillus* (3)	*Aspergillus* (2)
	Penicillium (1)	
B4	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (1)
	Cladosporium (1)	
B5	-	-
B6	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (2)
B7	*Aspergillus* (1)	*Aspergillus* (1)
B8	*Aspergillus* (2)	-
B9	*Aspergillus* (1)	-
B10	*Aspergillus* (1)	-

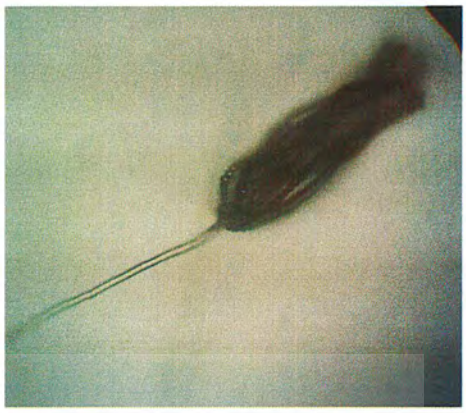
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข.4 เชื้อที่แยกได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก (ต่อ)

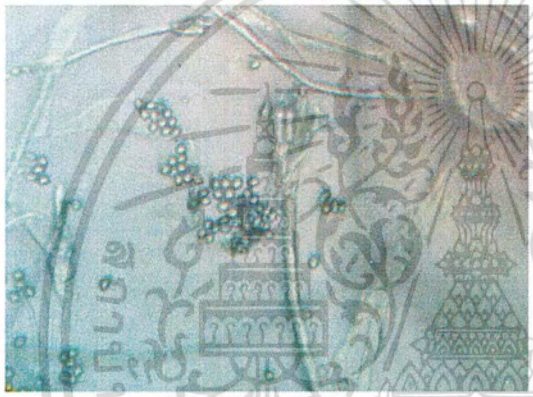
แหล่งที่มาของเชื้อราที่แยกได้	ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา (จำนวนไอโซเลต)	
	DRBC	âPDA
น้ำพริกแกงเผ็ด		
E1	-	-
E2	-	-
E3	-	-
E4	-	-
E5	-	-
E6	*Aspergillus* (2)	-
E7	-	-
E8	-	-
E9	-	-
E10	-	-
น้ำพริกแกงส้ม		
F1	-	-
F2	-	-
F3	-	-
F4	-	-
F5	-	-
F6	*Aspergillus* (1)	-
F7	*Penicillium (1)* *Cladosporium (1)*	-
F8	*Penicillium (1)*	-
F9	-	-
F10	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

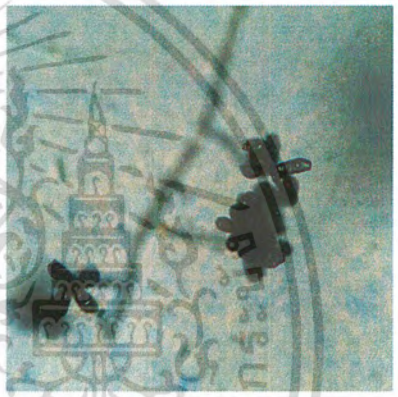
ก



ข



ค



ง

รูปที่ ข.1 เชื้อราที่แยกได้จากพริกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ก *Cladosporium* sp.

ข *Aspergillus* sp.

ค *Penicillium* sp.

ง *Alternaria* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค.1 ค่า pH และ a_w ที่วัดได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

ชนิดของตัวอย่าง	pH	°C	a_w	°C
พริกป่นละเอียด				
A1	4.18	28.3	0.399	25.4
A2	4.72	28.9	0.364	25.2
A3	4.48	28.5	0.383	25.1
A4	4.45	29.2	0.396	25.0
A5	5.07	29.5	0.424	25.0
A6	5.70	28.2	0.377	25.0
A7	5.03	28.6	0.373	25.0
A8	4.93	28.0	0.248	24.9
A9	5.46	30.6	0.348	24.9
A10	4.91	31.6	0.382	25.0
พริกป่นหยาบ				
B1	5.03	27.5	0.365	25.1
B2	4.75	26.4	0.368	25.1
B3	4.80	26.0	0.370	25.0
B4	5.71	26.1	0.435	25.1
B5	5.02	26.1	0.427	25.0
B6	5.53	32.4	0.298	24.9
B7	5.03	32.7	0.201	25.0
B8	5.03	32.1	0.254	24.9
B9	6.34	32.9	0.287	25.0
B10	4.89	32.5	0.229	25.1
พริกแห้ง				
C1	4.51	23.2	0.688	25.1
C2	5.03	23.5	0.671	25.1
C3	5.18	24.1	0.534	25.1
C4	4.20	23.6	0.538	25.1
C5	4.97	24.6	0.537	25.1
C6	5.10	29.8	0.602	25.1
C7	4.68	29.3	0.557	25.0
C8	5.11	28.8	0.627	25.0
C9	4.71	27.5	0.581	25.0
C10	4.97	27.6	0.569	25.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 ค่า pH และ a_w ที่วัดได้จากพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	pH	°C	a_w	°C
พริกสด				
D1	5.89	25.2	0.968	24.9
D2	5.54	25.0	0.964	24.8
D3	5.96	24.5	0.968	24.6
D4	5.54	24.6	0.962	24.6
D5	6.14	25.6	0.966	24.8
D6	5.59	26.2	0.914	25.4
D7	5.21	26.4	0.958	25.1
D8	5.37	25.5	0.961	25.2
D9	5.38	25.5	0.960	25.3
D10	5.09	26.1	0.963	25.2
น้ำพริกแกงผ็ด				
E1	4.78	24.9	0.900	24.5
E2	4.81	25.1	0.936	25.0
E3	4.79	25.5	0.925	24.9
E4	4.86	26.3	0.922	24.7
E5	4.76	25.2	0.920	24.8
E6	5.07	26.5	0.891	25.3
E7	4.81	26.2	0.905	25.3
E8	4.82	26.4	0.890	25.3
E9	5.05	26.1	0.898	25.3
E10	4.93	25.9	0.842	25.2
น้ำพริกแกงส้ม				
F1	4.72	24.9	0.885	25.1
F2	4.81	25.1	0.895	25.2
F3	4.79	25.5	0.890	25.0
F4	4.86	26.3	0.893	25.0
F5	4.76	25.2	0.897	25.0
F6	4.92	25.9	0.838	25.2
F7	4.95	25.7	0.863	25.2
F8	4.69	25.8	0.827	25.2
F9	5.07	25.9	0.871	25.3
F10	5.02	25.8	0.908	25.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อโดยวิธีการ Direct plating

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนพริกที่พบเชื้อรา(เมล็ด)		ปริมาณการปนเปื้อน (ร้อยละ)		จำนวนไอโซเลต ของเชื้อราที่แยก	
	DG18	âPDA	DG18	âPDA	DG18	âPDA
พริกแห้ง						
C1	52	74	52	74	5	4
C2	60	76	60	76	4	4
C3	52	86	52	86	3	2
C4	34	68	34	68	2	2
C5	16	34	16	34	2	2
C6	100	100	100	100	3	2
C7	54	82	54	82	2	2
C8	100	100	100	100	3	2
C9	33	79	33	79	3	2
C10	100	100	100	100	3	2
พริกสด	**DRBC**	**âPDA**	**DRBC**	**âPDA**	**DRBC**	**âPDA**
D1	100	100	100	100	4	2
D2	100	100	100	100	4	2
D3	84	84	84	84	3	3
D4	60	96	60	96	5	4
D5	90	88	90	88	5	2
D6	96	96	96	96	2	2
D7	100	100	100	100	2	2
D8	100	100	100	100	2	2
D9	77	52	77	52	5	5
D10	89	93	89	93	4	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดโดยวิธี Dilution plating

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}		จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด (cfu/g)		จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยก	
พริกป่นละเอียด	DG18	âPDA	DG18	âPDA	DG18	âPDA
A1	0	0	<10	<10	0	0
A2	7	0	7.0×10^{1}	<10	2	0
A3	5	0	5.0×10^{1}	<10	2	0
A4	9	0	9.0×10^{1}	<10	4	0
A5	0	0	<10	<10	0	0
A6	SPR	10	SPR	1.0×10^{2}	3	3
A7	10	2	1.0×10^{2}	2.0×10^{1}	2	2
A8	7	4	7.0×10^{1}	4.0×10^{1}	1	2
A9	3	4	3.0×10^{1}	4.0×10^{1}	3	3
A10	7	6	7.0×10^{1}	6.0×10^{1}	2	2
พริกป่นหยาบ						
B1	24	37	2.4×10^{2}	3.7×10^{2}	3	2
B2	26	10	2.6×10^{2}	1.0×10^{2}	4	5
B3	42	13	4.2×10^{2}	1.3×10^{2}	5	2
B4	25	29	2.5×10^{2}	2.9×10^{2}	2	2
B5	0	0	<10	<10	0	0
B6	20	15	2.0×10^{2}	1.5×10^{2}	3	4
B7	48	47	4.8×10^{2}	4.7×10^{2}	2	2
B8	4	0	4.0×10^{1}	<10	3	0
B9	12	0	1.2×10^{2}	<10	5	0
B10	9	3	90	30	1	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดโดยวิธี Dilution plating (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนโคโลนีที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}		จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด (cfu/g)		จำนวนไอโซเลต ของเชื้อราที่แยก	
น้ำพริกแกงเผ็ด	DRBC	âPDA	DRBC	âPDA	DRBC	âPDA
E1	0	0	<10	<10	0	0
E2	0	1	<10	10	0	1
E3	0	0	<10	<10	0	0
E4	0	0	<10	<10	0	0
E5	0	0	<10	<10	0	0
E6	2	0	2.0×10^{1}	<10	1	0
E7	0	0	<10	<10	0	0
E8	0	0	<10	<10	0	0
E9	1	0	1.0×10^{1}	<10	1	0
E10	3	0	3.0×10^{1}	<10	1	0
น้ำพริกแกงส้ม						
F1	0	0	<10	<10	0	0
F2	0	0	<10	<10	0	0
F3	0	0	<10	<10	0	0
F4	0	0	<10	<10	0	0
F5	1	0	1.0×10^{1}	<10	1	0
F6	1	0	1.0×10^{1}	<10	1	0
F7	7	0	7.0×10^{1}	<10	2	0
F8	6	0	6.0×10^{1}	<10	2	0
F9	2	0	2.0×10^{1}	<10	2	0
F10	5	0	5.0×10^{1}	<10	1	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลาย sodium hypochlorite ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

ใช้ปิเปตดูด sodium hypochlorite ปริมาณ 12.5 มิลลิลิตร ใส่ในบิ๊กเกอร์แก้ว แล้วเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ potassium sorbate

- ความเข้มข้น 9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่ง potassium sorbate ปริมาณ 2.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- ความเข้มข้น 18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่ง potassium sorbate ปริมาณ 4.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร
- ความเข้มข้น 27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่ง potassium sorbate ปริมาณ 6.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร

3. การเตรียม Glycerol water

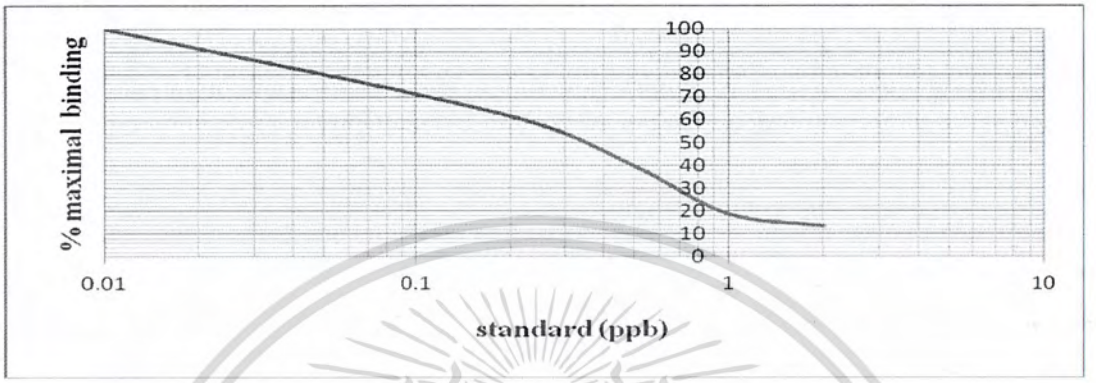
นำ glycerol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทส่งในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากันเพื่อนำไปใช้ในการปรับความชื้นสัมพัทธ์ ที่ a_w 0.95

4. การเตรียม Tween 80

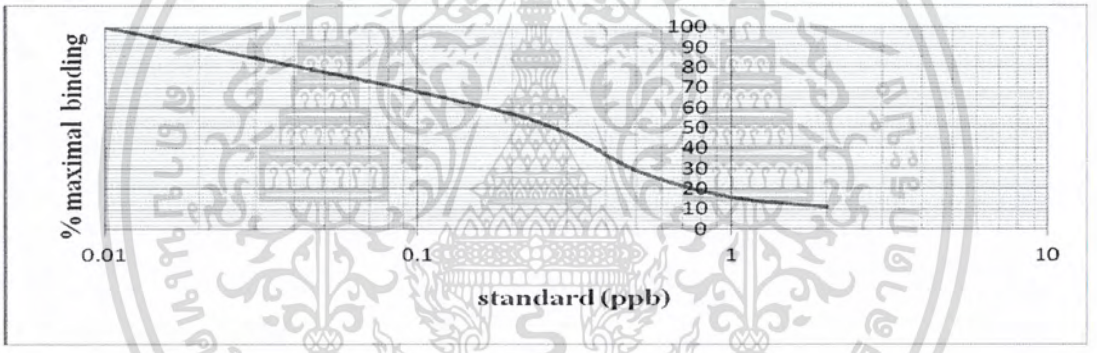
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

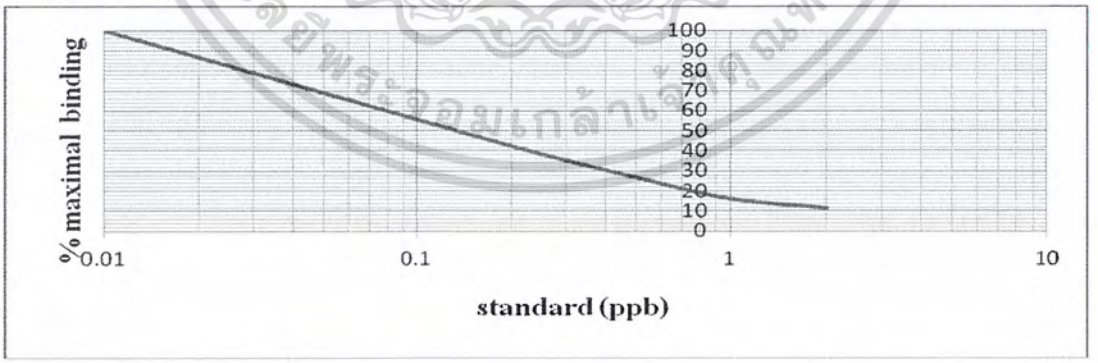
ผลการวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินในพริกสด



(a)



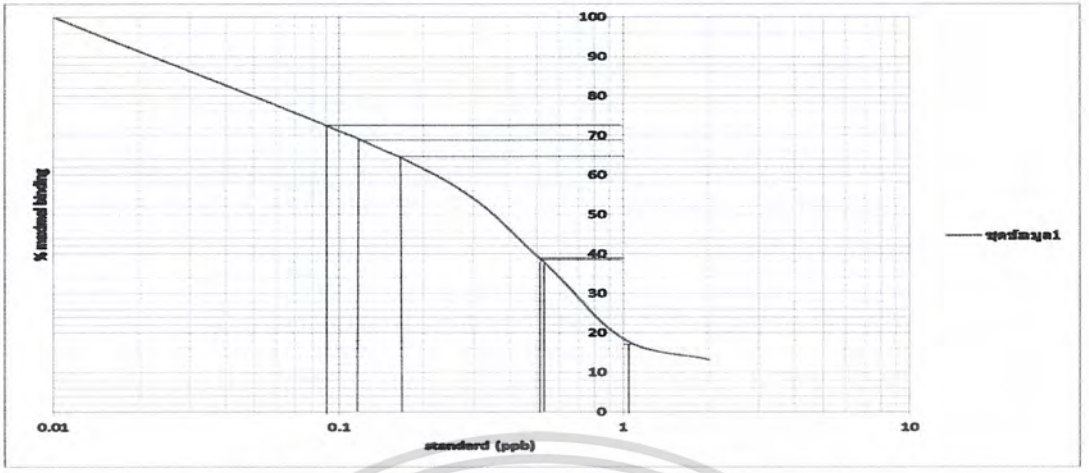
(b)



(c)

รูปที่ จ.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % maximal binding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) รูปที่ จ.1a (ซ้ำที่1) , รูปที่ จ.2b (ซ้ำที่2) และ รูปที่ จ.3c (ซ้ำที่3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.2 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดย *Aspergillus flavus* ในพริกสด (ซ้ำที่ 1)

ตารางที่ จ.1 % maximal binding และค่าปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟของตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus flavus* B3DG และ *Aspergillus flavus* TISTR 3041 (ซ้ำที่ 1)

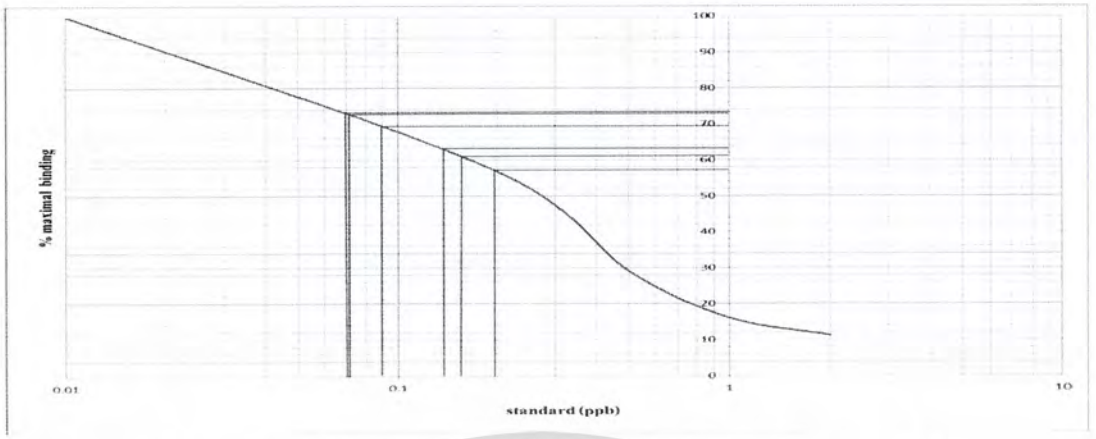
โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	% maximal binding		ปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟ (ppb)	
	A. flavus B3DG	*A. flavus* TISTR 3041	*A. flavus* B3DG	*A. flavus* TISTR 3041
0	39.3040	69.4203	0.51	0.125
54	72.1739	38.3768	0.09	0.525
81	16.8406	64.5504	1.1	0.125

ตารางที่ จ.2 ปริมาณสารพิษที่ได้จากตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus flavus* B3DG และ *Aspergillus flavus* TISTR 3041 (ซ้ำที่ 1)

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	ปริมาณสารพิษในตัวอย่าง (ppb)	
	A. flavus B3DG	*A. flavus* TISTR 3041
0	10.2	2.5
54	1.62	10.5
81	22	2.5

นำค่าที่อ่านได้บนแกน X คูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.3 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดย *Aspergillus flavus* ในพริกสด (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ จ.3 % maximal binding และค่าปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟของตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus flavus* B3DG และ *Aspergillus flavus* TISTR 3041 (ซ้ำที่ 2)

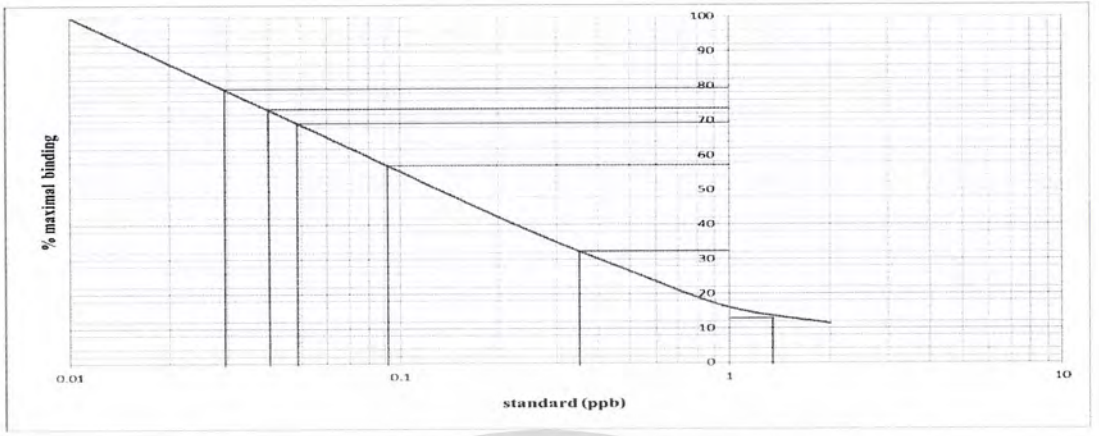
โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	% maximal binding		ปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟ (ppb)	
	A. flavus B3DG	*A. flavus* TISTR 3041	*A. flavus* B3DG	*A. flavus* TISTR 3041
0	60.1334	56.6136	0.165	0.02
54	69.5072	73.0641	0.09	0.07
81	72.4713	63.3184	0.072	0.145

ตารางที่ จ.4 ปริมาณสารพิษที่ได้จากตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus flavus* B3DG และ *Aspergillus flavus* TISTR 3041 (ซ้ำที่ 2)

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	ปริมาณสารพิษในตัวอย่าง (ppb)	
	A. flavus B3DG	*A. flavus* TISTR 3041
0	3.3	0.4
54	1.8	1.4
81	1.44	2.9

นำค่าที่อ่านได้บนแกน X คูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.4 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดย *A. flavus* ในพริกสด (ซ้ำที่ 3)

ตารางที่ จ.5 % maximal binding และค่าปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟของตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus flavus* B3DG และ *Aspergillus flavus* TISTR 3041 (ซ้ำที่ 3)

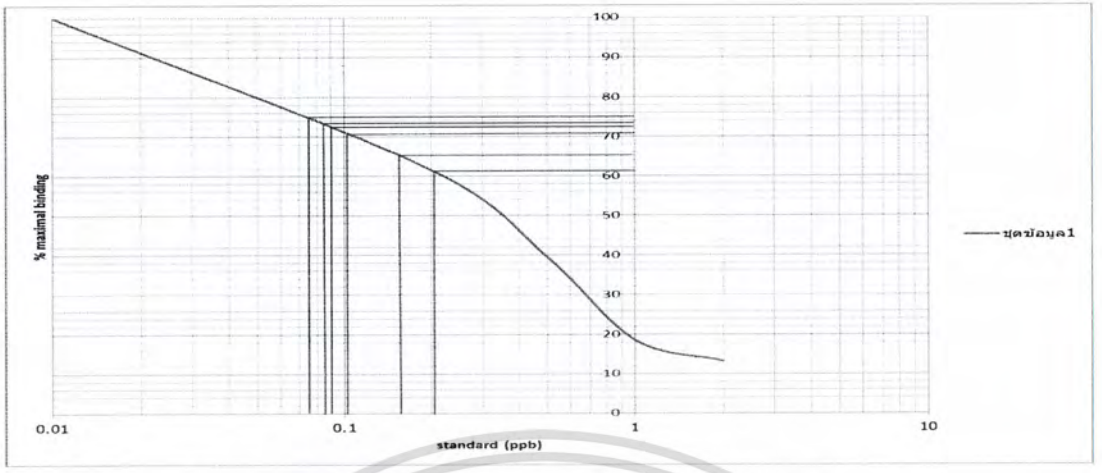
โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	% maximal binding		ปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟ (ppb)	
	A. flavus B3DG	*A. flavus* TISTR 3041	*A. flavus* B3DG	*A. flavus* TISTR 3041
0	78.4996	69.1115	0.03	0.05
54	13.9564	73.763621	1.35	0.041
81	57.2506	32.565	0.092	0.365

ตารางที่ จ.6 ปริมาณสารพิษที่ได้จากตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus flavus* B3DG และ *Aspergillus flavus* TISTR 3041 (ซ้ำที่ 3)

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	ปริมาณสารพิษในตัวอย่าง (ppb)	
	A. flavus B3DG	*A. flavus* TISTR 3041
0	0.6	1
54	27	0.82
81	1.84	7.3

นำค่าที่อ่านได้บนแกน X คูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.5 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดย *A. parasiticus* ในพริกสด (ซ้ำที่ 1)

ตารางที่ จ.7 % maximal binding และค่าปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟของตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus parasiticus* C5PD และ *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 (ซ้ำที่ 1)

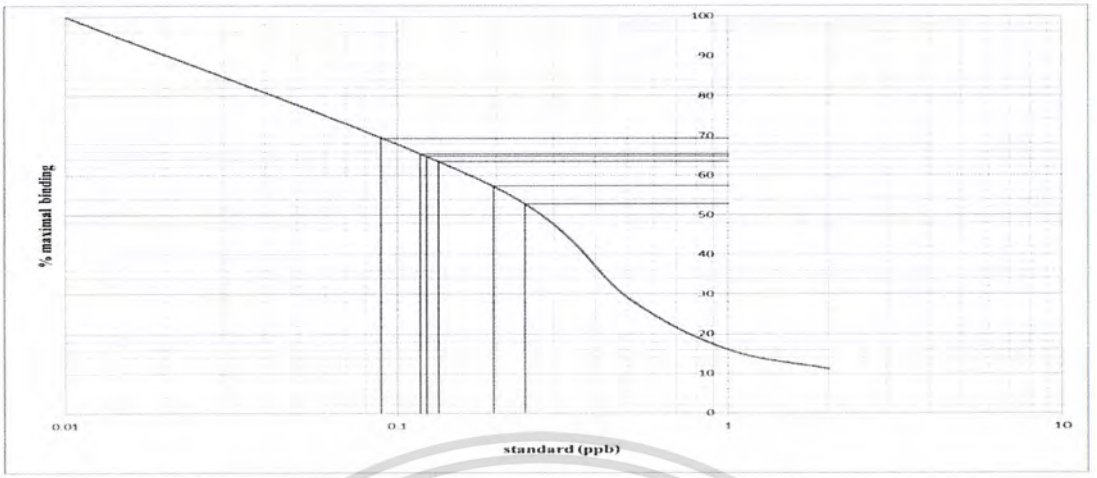
โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	% maximal binding		ปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟ (ppb)	
	A. parasiticus C5PD	*A. parasiticus* TISTR 3276	*A. parasiticus* C5PD	*A. parasiticus* TISTR 3276
0	60.927536	73.884058	0.21	0.088
54	75.014493	72.289855	0.077	0.09
81	65.681159	71.42029	0.16	0.11

ตารางที่ จ.8 ปริมาณสารพิษที่ได้จากตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus parasiticus* C5PD และ *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 (ซ้ำที่ 1)

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	ปริมาณสารพิษในตัวอย่าง (ppb)	
	A. parasiticus C5PD	*A. parasiticus* TISTR 3276
0	4.2	1.76
54	1.54	1.8
81	3.2	2.2

นำค่าที่อ่านได้บนแกน X คูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.6 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดย *A. parasiticus* ในพริกสด (ซ้ำที่ 2)

ตารางที่ จ.9 % maximal binding และค่าปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟของตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus parasiticus* C5PD และ *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 (ซ้ำที่ 2)

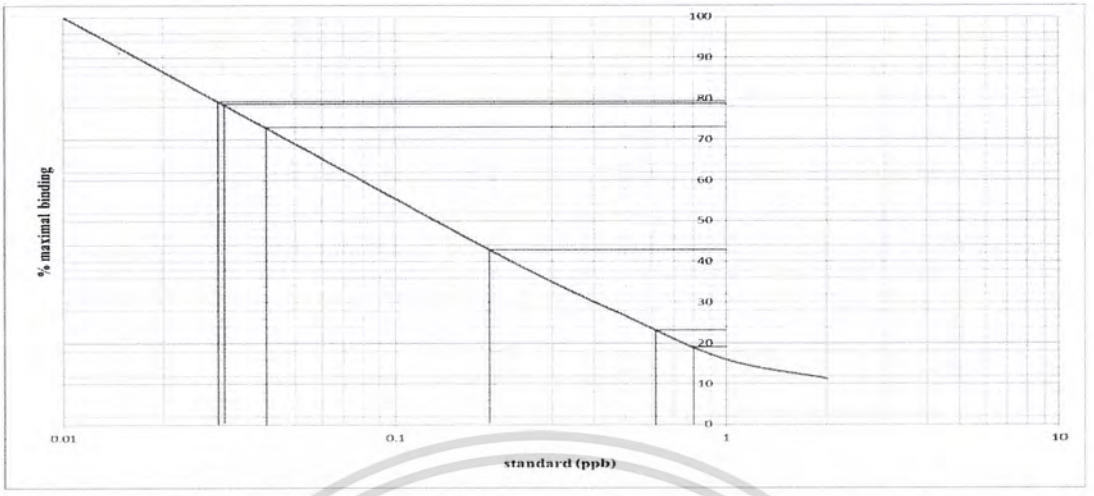
โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	% maximal binding		ปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟ (ppb)	
	A. parasiticus C5PD	*A. parasiticus* TISTR 3276	*A. parasiticus* C5PD	*A. parasiticus* TISTR 3276
0	57.613931	52.982586	0.195	0.25
54	65.802149	69.433123	0.125	0.09
81	65.616895	62.393479	0.140	0.145

ตารางที่ จ.10 ปริมาณสารพิษที่ได้จากตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus parasiticus* C5PD และ *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 (ซ้ำที่ 2)

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	ปริมาณสารพิษในตัวอย่าง (ppb)	
	A. parasiticus C5PD	*A. parasiticus* TISTR 3276
0	3.9	5
54	2.5	1.8
81	2.8	2.9

นำค่าที่อ่านได้บนแกน X คูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.7 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดย *A. parasiticus* ในพริกสด (ซ้ำที่ 3)

ตารางที่ จ.11 % maximal binding และค่าปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟของตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus parasiticus* C5PD และ *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 (ซ้ำที่ 3)

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	% maximal biding		ปริมาณสารพิษที่อ่านได้จากกราฟ (ppb)	
	A. parasiticus C5PD	***A. parasiticus* TISTR 3041**	***A. parasiticus* C5PD**	***A. parasiticus* TISTR 3276**
0	42.414082	72.841576	0.198	0.041
54	19.153395	78.876781	0.9	0.031
81	78.792959	23.805532	0.029	0.62

ตารางที่ จ.12 ปริมาณสารพิษที่ได้จากตัวอย่างในพริกสดที่ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus parasiticus* C5PD และ *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276 (ซ้ำที่ 3)

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	ปริมาณสารพิษในตัวอย่าง (ppb)	
	***A. parasiticus* C5PD**	***A. parasiticus* TISTR 3276**
0	3.96	0.82
54	18	0.62
81	0.58	12.4

นำค่าที่อ่านได้บนแกน X คูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.13 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี1เฉลี่ย ที่ผลิตจาก *Aspergillus flavus* ในตัวอย่างพริกสดที่จุ่มสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต

ชนิดของเชื้อรา	ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี1 ในตัวอย่างพริก (ppb)		
	สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)		
	0	**54**	**81**
A. flavus TISTR 3041	1.3	4.24	4.23
A. flavus B3DG	4.7	10.14	8.43

ตารางที่ จ.14 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี1เฉลี่ย ที่ผลิตจาก *Aspergillus parasiticus* ในตัวอย่างพริกสดที่จุ่มสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต

ชนิดของเชื้อรา	ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี1 ในตัวอย่างพริก (ppb)		
	สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)		
	0	**54**	**81**
A. parasiticus TISTR 3276	2.53	1.41	5.83
A. parasiticus C5PD	4.02	7.35	2.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

DEUTEROMYCETES

ลักษณะโดยทั่วไป

เชื้อราชั้นดิวเทอโรไมซีทีส (Deuteromycetes) หรือเชื้อราที่ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (fungi imperfecti) รวมถึงเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารและอากาศ และเชื้อราหลายชนิด (species) สามารถสร้างสารพิษจากกระบวนการเมตาบอไลต์ เชื้อราในชั้นนี้จะประกอบด้วย "form-genera" และ "form-species" ซึ่งพบเฉพาะในรูป anamorph (ระยะที่พบเพียงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หรือ conidial state) รูปที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งก็คือ ascomycetous teleomorphs หรือ basidiomycetous teleomorphs (ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือ perfect state) สัมพันธ์กับเชื้อราหลายชนิด ดิวเทอโรไมซีทีสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยพื้นฐานของการสร้างสปอร์ (conidium formation)

1. COELOMYCETES : คอนิดิโอฟอร์เกิดขึ้นอยู่ภายในฟรุ๊ตบอดี้ (conidiomata)

- Melanconiales : คอนิดิโอฟอร์อยู่ในอวัยวะรูปร่างคล้ายถ้วยปากกว้าง
- Sphaeropsidales : คอนิดิโอฟอร์อยู่ในอวัยวะที่เกิดจากการอัดตัวกันแน่นของเส้นใยมีลักษณะเป็นรูปคนโท (pycnidia)

2. HYPHOMYCETES หรือ MONILIALES

- คอนิดิโอฟอร์เกิดขึ้นบนเส้นใยปกติ หรือเส้นใยที่รวมตัวกัน (aggregated hypae)

เชื้อรากลุ่มนี้ทุกชนิดที่พิจารณาในที่นี้ได้จัดอยู่ในกลุ่ม Moniliales ยกเว้น *Phoma* (Sphaeropsidales) และ *Epicoccum* (Melanconiales)

หลักเกณฑ์ในการจำแนกดิวเทอโรไมซีทีสอาศัยการพิจารณารูปแบบของการสร้างคอนิเดียม (conidiogenesis) ในที่นี้จะพิจารณาเฉพาะชนิดหลักๆเท่านั้น ในการขยายพันธุ์ของเชื้อราชั้นดิวเทอโรไมซีทีสนี้จะเกิดขึ้นโดยคอนิเดีย (conidia) ซึ่งเป็นโครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและเคลื่อนที่ไม่ได้ โดยไม่ได้เกิดขึ้นแบบเดียวกับการเกิด sporangiospores คอนิเดียมีรูปร่างและสีหลายแบบและอาจเกิดอย่างอิสระเป็นสายโซ่หรือเป็นหัวที่มีลักษณะเหนียว (slimy head) โดยจะเกิดขึ้นบนเซลล์พิเศษที่เรียกว่า คอนิดิโอจีนัสเซลล์ (conidiogenous cells) ซึ่งเซลล์ชนิดนี้สามารถเกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยตรงภายในหรือเกิดจากเส้นใย (vegetative hypha) หรือเกิดบนโครงสร้างที่ช่วยค้ำจุน (stipe และ branches) ระบบของเส้นใยนี้เรียกว่า conidiophore

คอนิเดียสามารถเกิดได้หลายรูปแบบ ดังนี้

1. acropetal chain หมายถึง conidiogenous loci ซึ่งเป็นที่ที่คอนิเดียโผล่ขึ้นจำนวนหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่ง เกิดขึ้นที่ปลายของคอนิเดียแต่ละอัน คอนิเดียที่มีอายุน้อยที่สุดจะอยู่ด้านบนสุด
2. basipetal succession หมายถึง คอนิเดียใหม่จะถูกสร้างที่ฐานล่าง
3. sympodial succession หมายถึง คอนิเดียที่เกิดใหม่แต่ละคอนิเดียจะย้ายไปที่ด้านปลายเพื่อให้ geniculate, elongate หรือ condensed rachis เกิดการพัฒนาขึ้น

รูปที่ ฉ.1 ลักษณะของคอนิดิโอฟอร์, คอนิดิโอจีนัสเซลล์ และการสร้างคอนิเดีย

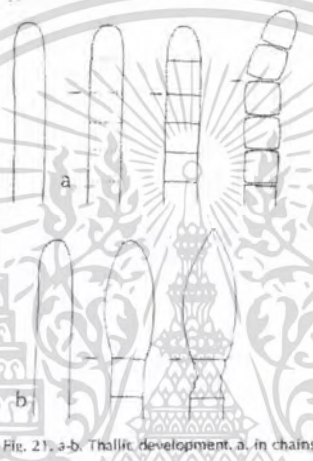
a. ตัวอย่างคอนิดิโอฟอร์ หรือบน aggregated hyphae
b. acervulus
c. pycnidium
d. solitary conidiogenous cells
e. synchronous development
f. สายโซ่ (chain)
g. หัว slimy head
h. การเกิดคอนิเดียแบบ acropetal suceession
i. การเกิดคอนิเดียแบบ basipetal succession
j. การเกิดคอนิเดียแบบ sympodial succession

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปแบบสำคัญที่พบได้มากของ conidiogenesis

1. การพัฒนาธัลลิค (Thallic development)

คอนิเดียจะถูกสร้างขึ้นในรูปแบบโดดเดี่ยวหรือเป็นสายโซ่ (arthroconidia) จากส่วนของเส้นใยรา เซลล์จะถูกแยกออกจากกันโดยการสร้างผนังกั้น (septation) เปลี่ยนไปเป็นคอนิเดีย ตัวอย่างเช่น *Geotrichum* เป็นต้น ในเชื้อราบางจำพวกเช่น *Moniliella* จะเกิดทั้งธัลลิคคอนิเดีย (thallic conidia) และบลาสติคคอนิเดีย (blastic conidia)



รูปที่ ฉ.2 การพัฒนาของธัลลิค a. ในสายโซ่ b. แบบโดดเดี่ยว

2. การพัฒนาบลาสติค (Blastic development)

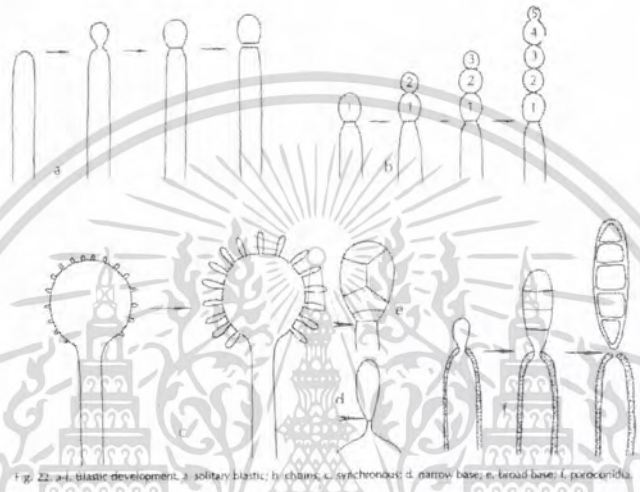
ผนังของ conidiogenous cell จะเริ่มมีความยืดหยุ่นและนูนออกไปเพื่อให้เกิดการสร้างผนังของคอนิเดีย คอนิเดียจะสามารถผลิตขึ้นเดี่ยวๆหรือผลิตพร้อมๆกัน (เช่น *Botrytis*, *Aureobasidium*) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (aeropetal chains เช่น *Cladosporium*) บางจำพวกอาจจะมีฐานแคบ (*Botrytis*) หรือ ฐานกว้าง (*Epicoccum*)

เชื้อในบางสกุลสามารถจำแนกได้โดยอาศัยลักษณะของ poroconidia หรือการพัฒนาของทรีทิค (tretic development) รูปแบบของการเกิดคอนิเดีย (conidiogenesis) จะคล้ายกับบลาสติค แต่จะแตกต่างกันตรงที่ conidiogenous cell จะเข้มมากกว่า และมีผนังของเม็ดสีที่แข็งและเข้มกว่าเมื่อเจาะผ่านคอนิเดียม เมื่อคอนิเดียแตกออก เราจะสามารถพบรูพรุนได้ (เช่น *Alternaria*, *Ulocladium*)

PHIALIDIC CONIDIOGENESIS (รูป ฉ.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอนิเดียจะถูกผลิตขึ้นภายใน basipetal succession จากการเปิดของเซลล์พิเศษที่เรียกว่า Phialide ซึ่งอาจจะมีรูปทรงคล้ายสว่าน คล้ายฟลาสก์ หรือรูปทรงอื่น บางครั้งแสดง collarette (โครงสร้างรูปถ้วยบริเวณ apex) คอนิเดียจะถูกผลิตขึ้นในสายโซ่ (ตัวอย่างเช่น *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*) หรือรวมกันอยู่ในส่วนหัวที่มีความเหนียวหรือมีความชื้น (ตัวอย่างเช่น *Trichoderma*, *Phialophora*, *Stachybotrys*, *Acremonium*, *Verticillium*)



รูปที่ ฉ.3 การพัฒนาบลาสติค a. บลาสติกแบบโดดเดี่ยว b. แบบโซ่ c. แบบ synchronous d. แบบฐานแคบ e. แบบฐานกว้าง f. Poroconidia

Annellidic conidiogenesis (รูปที่ ฉ.5)

คอนิเดีย (cornidia) ถูกสร้างขึ้นจากชุดของ percurrent proliferations หรือ annellation บนเซลล์ที่ให้กำเนิดคอนิเดียที่เรียกว่า annellide การสังเกต annellide ค่อนข้างยากถ้าใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแต่จะเห็นความแตกต่างได้เด่นชัดเมื่อมีความยาวของ conidiogenous apex เพิ่มขึ้น คือบริเวณระหว่าง annellated ภายหลังการสร้างสปอร์ ลักษณะทาง microscopic ที่ดีจะต้องมีพื้นฐานส่วนยอดของคอนิเดียที่กว้างด้วยเช่นกัน เช่น *Scopulariopsis*

การเพาะเลี้ยงเพื่อจำแนกชนิด

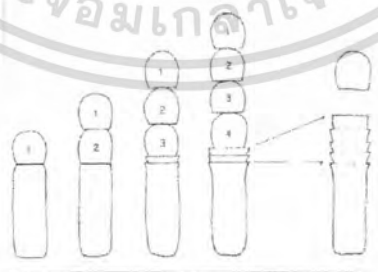
Deuteromycetes ส่วนมากจะสร้างสปอร์ได้ดีบน MEA ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ OA agar สำหรับเชื้อราบางสกุล เช่น *Fusarium* การใช้อาหาร SNA บนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ ส่วน *Penicillium* และ *Aspergillus* ต้อง Czapek หรือ Czapek yeast agar เพื่อจะจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้องโดยดูร่วมกับคำอธิบายวิธีการเพาะเลี้ยงของแต่ละชนิด

การเตรียมสไลด์ (microscopic mounts) ที่ดีนั้นจำเป็นสำหรับการตรวจสอบการสร้างคอนิเดีย (conidiogenesis) ซึ่งส่วนใหญ่จะเตรียมสไลด์โดยหยดกรดแลคติกผสมกับสีย้อม aniline blue หรือ cotton blue อาจใช้น้ำก็ได้ สำหรับโครงสร้างที่เปราะบางของ *Botrytis* และ *Clodosporium* การเตรียมสไลด์โดยใช้เทปกาวชิ้นเล็กๆช่วย จะเป็นประโยชน์ในการเตรียมสไลด์หรืออาจตัดชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่โปร่งใสวางบนสไลด์ก็ได้ การสร้างคอนิเดีย หรือ slimy head สังเกตได้ดีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายต่ำ อย่างไรก็ตามควรหลีกเลี่ยงการสูดดมสารระเหยที่สร้างโดยเชื้อราและคอนิเดีย

รูปที่ ฉ.4 การพัฒนาของ Phialidic, รูป a.สายโซ่คอนิเดีย, รูป b. ส่วนหัวของคอนิเดีย, รูป c. รูปร่างแบบขวาน, รูป d. รูปร่างแบบฟลาสก์, รูป e. Phialide ที่มี Phialide typical

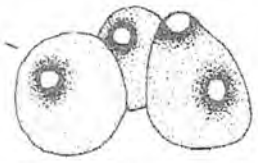


รูปที่ ฉ.5 การพัฒนาของ Annellidic, แสดงโครงสร้างส่วนยอดของคอนิเดีย (truncate conidia) และส่วนที่ยืดออกของเซลล์คอนิดิโอจีเนียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Key สำหรับการจำแนกชนิดเชื้อรา Deuteromycetes ที่พบได้บ่อยในอาหารและอากาศ

1a. คอนิเดียเกิดใน pycnidia.....*Phoma*



1b. คอนิเดียไม่เกิดใน pycnidia แต่เกิดบนเส้นใย, conidiophores, sporodochia หรือ synnemata.....2

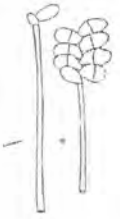
2a. คอนิเดียที่สร้างมาจากเซลล์พิเศษที่ให้กำเนิดคอนิเดีย (connidiogenous cell) เช่น phialides, annellides เป็นต้น คอนิเดียที่เกิดขึ้นมีลักษณะต่อกันเป็นสาย (chain) หรือเกิดในหัว (head) หรือใน basipetal.....3

2b. คอนิเดียไม่ได้สร้างจากเซลล์คอนิดิโอจีเนียส แต่สร้างจาก acropetally หรือจากการแตกหักของเส้นใยที่สมบูรณ์ที่เชื่อมกันหรือเซลล์เดี่ยวๆ.....14

3a. คอนิเดียที่เกิดขึ้นมีลักษณะต่อกันเป็นสาย (dry chain).....4

3b. คอนิเดียเกิดขึ้นใน moist head หรือ slimy head.....10

4a. คอนิเดียมักเกิดขึ้นในลักษณะ 2 เซลล์โดยเกิดบนเซลล์คอนิดิโอจีเนียสซึ่งอยู่ในเส้นใย คอนิเดียมีลักษณะเฉียงแทรกมากหรือน้อยจัดเรียงตัวเหมือนหนาม โคโลนีมีสีชมพูเข้ม.....*Trichothedtium*



4b. คอนิเดียที่เกิดขึ้นเป็นเซลล์เดี่ยวโดยเกิดขึ้นบนเซลล์คอนิดิโอจีเนียสที่มีลักษณะคล้ายฟลาสก์หรือรูป ทรงกระบอก คอนิเดียเกิดต่อกันเป็นสายตรง โคโลนีมีหลายสี.....5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5a. โคโลนีมีสีน้ำตาลแดง ค่อนข้างจะจำกัดมาก คอนิเดียเกิดขึ้นในลักษณะเป็นกลุ่มๆละ 4 เซลล์โดยเกิดขึ้นจากการแบ่งของเส้นใยที่สมบูรณ์ซึ่งมีลักษณะรูปทรงกระบอก ได้เป็นโคโลนีรูปร่างรี (sub-globose) และชอบความแห้ง (Xerophillc).....*Wallemia*

5b. โคโลนีไม่จำกัด (ยกเว้น *Aspergillus* สปีชี่ส์ที่ทนความแห้งแล้งได้) คอนิเดียไม่ได้เกิดขึ้นหลังจากการแบ่งของเส้นใย.....6

6a. ก้านชูอับสปอร์ (conidiospores) มีลักษณะปลายบวม (a typical apical swelling).....
.....*Aspergillus*

6b. ก้านชูอับสปอร์ไม่มีส่วนขอดเป็นลักษณะพองๆ.....7

7a. conidiogenous cells annellidic คอนิเดียมีส่วนฐานกว้าง.....*Scopulariopsis*

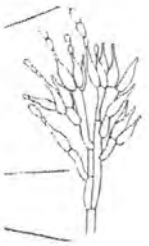
7b. connidiogenous cells phialidic คอนิเดียไม่มีส่วนฐานกว้าง.....8

8a. โคโลนีมีสีเทาเข้มไปจนถึงดำ มี phialides ที่มีลักษณะกว้าง ด้านบนสุดและคอนิเดียสีดำ
..... *Memnoniella*

8b. โคโลนีไม่มีสีเทาเข้มไปจนถึงดำ มี phialides ที่มีลักษณะคล้ายฟลาสก์หรือ lanceolate มีฐานที่กว้างที่สุด.....9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9a. โคโลนีสีเหลืองไปจนถึงน้ำตาล มี phialides ที่มีส่วนคอยาว.....*Paecilomyces*



9b. โคโลนีมักจะมีสีเขียว บางสปีชี่ส์มีสีขาว มี phialides ที่มีส่วนคอสั้น.....*Penicillium*

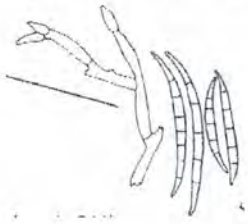
10a. มี phialides ยาวมีรูปร่างคล้ายขวานและไม่มี polyphialides.....*Acremonium*

10b. มี phialides เป็นจำนวนมากหรือน้อย มีลักษณะแบบคล้ายฟลาสก์และ/หรือมี polyphialides หรือ มี phialide ลดลง.....11

11a. โคโลนีค่อนข้างเป็นสีเขียว เมื่อเจริญในที่ๆมีแสงสว่าง.....*Trichoderma*

11b. โคโลนีมีสีขาว เหลือง ม่วง ชมพู น้ำตาล หรือสีน้ำตาลดำ.....12

12a. โคโลนีมีสีขาว ค่อนข้างเหลือง ค่อนข้างชมพู ค่อนข้างแดง ม่วง บางทีมีสีเขียว มักจะมีคอนิเดียที่มีร่างร่างคล้ายรูปกล้วย มีผนังกั้น.....*Fusarium*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12b. โคโลนีมีสีดำบางครั้งค่อนข้างชมพู คอนิเดียไม่มีผนังกั้น.....13

13a. phialide อยู่แบบเดี่ยวๆหรืออยู่รวมกันหลายๆอันแบบก้นหอยรูปร่างคล้ายฟลาสก์ .....*Phialophora/Lecythophora*

13b. phialide อยู่เป็นกลุ่มหนาแน่น.....*Stachybotrys*

14a. โคโลนีเจริญเร็วมาก โดยสามารถเจริญปกคลุมจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ภายในไม่กี่วัน โคโลนีมีสีส้ม.....*Chrysonilia*

14b. โคโลนีไม่มีสีส้มและเจริญโดยจะไปปกคลุมจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ภายในไม่กี่วัน.....15

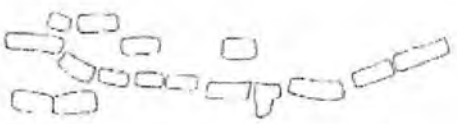
15a. คอนิเดียมีเฉพาะ arthric.....16

15b. คอนิเดียมีทั้งประเภท arthric และ blastic หรือเฉพาะ blastic 18

16a. คอนิดิโอฟอร์สไตฟ์ (conidiophores stipe) มีเม็ดสี.....*Oidiodendron*

16b. คอนิดิโอฟอร์ไฮอะไล (conidiophore hyaline) ใสไม่มีสีหรือไม่มีเลย.....17

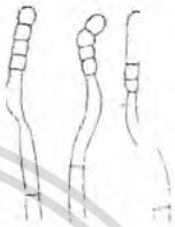
17a. คอนิเดียใส ผนังเรียบ ค่อนข้างเป็นรูปทรงกระบอก ไม่มี Intercalary conidia .....*Geotichum*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

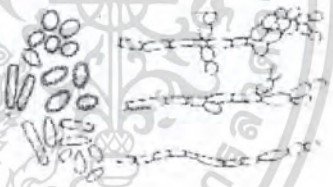
17b. conidia (sub) hyaline ค่อนข้างใสถึงมีสีซีดๆ เมื่อมีอายุมากขึ้นผนังจะเริ่มหยาบ มี intercalary conidia.....*Geomyces*

18a. คอนิเดียถูกสร้างขึ้นในลักษณะเกาะกัน 4 เซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นจากการแบ่งเส้นใยรูปร่างทรงกระบอก.....*Wallemia*



18b. คอนิเดียไม่อยู่ในลักษณะเกาะกัน 4 เซลล์.....19

19a. โครงสร้างที่ให้กำเนิดคอนิเดียประกอบด้วย arthroconidia และ blastoconidia (เปรียบเทียบกับ *Trichosporon* ในยีสต์และในเซลล์เส้นใยที่คล้ายกับ arthroconidia สีน้ำตาลที่มีผนังหนาของ *Aureobasidium*) .....*Monillella*



19b. โครงสร้างที่ให้กำเนิดคอนิเดียประกอบด้วย blastoconidia.....20

20a. blastoconidia จะเกิดพร้อมกันบนเส้นใย หรือเซลล์ที่บวมขึ้นหรือตรงกิ่งแตกแขนง.....21

20b. blastoconidia ไม่เกิดพร้อมกันบนเส้นใยหรือเซลล์ที่บวมขึ้นหรือที่กิ่งแตกแขนง.....22

21a. คอนิเดียเกิดจาก denticles บน conidiogenous cells ด้านปลายซึ่งบวมก้านชูอัปสปอร์ตั้งตรงแตกแขนง (ลักษณะคล้ายต้นไม้) โคโลนีบาง มีสีน้ำตาลอมเทา.....*Botrytis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21b. คอนิเดียเกิดขึ้นบนเส้นใยหรือเกิดบนเส้นใยส่วนที่แตกแขนง โคโลนีมีลักษณะคล้ายโคโลนีของยีสต์สีค่อนข้างเหลืองครีมถึงน้ำตาลอ่อน สีส้มอมชมพูหรือเขียวอมดำ.....*Aureobasidium*

22a. คอนิเดียเกิดขึ้นเดี่ยวๆบนก้านชูอับสปอร์ที่มีไม่ค่อยชัดเจน อยู่รวมตัวกันเป็นกลุ่มมองเห็นเป็นตุ่มสีดำ.....*Epicoccum*

22b. คอนิเดียอยู่เดี่ยว หรืออยู่ในลักษณะต่อเป็นสายมีก้านชูคอนิเดียชัดเจน ไม่รวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน.....23

23a. คอนิเดียมีลักษณะต่อกันเป็นสาย ผนังเรียบ โคโลนีมีสีครีมในระยะแรก สีจะเข้มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น.....*Moniliella*

23b. คอนิเดียมีลักษณะต่อกันเป็นสายหรืออยู่เดี่ยวๆ ผนังเรียบหรือหยาบ โคโลนีมีสีดำออกเขียวหรือน้ำตาลออกเขียว.....24

24a. คอนิเดียมีผนังค่อนข้างบาง ส่วนมากมีเซลล์เดียว ฐานของโคโลนีพบว่ามี 2 เซลล์ ซึ่งกั้นด้วยผนังตามขวาง .....*Cladosporium*

24b. คอนิเดียถูกกั้นด้วยผนังตามขวางและตามยาวหรือมีเพียงผนังตามขวาง.....25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25a. คอนิเดียมีหนังเรียบ มีผนังกั้นตามขวาง ค่อนข้างโค้งเซลล์อยู่ด้านปลายมากกว่าอยู่ตรงกลาง.....*Curbularia*

25b. คอนิเดียมีผนังหยาบ มีทั้งผนังกั้นตามขวางและตามยาว (muriform).....25

26a. คอนิเดียที่มีอายุน้อยมีลักษณะโค้งมนที่ฐาน ส่วนคอนิเดียที่โตเต็มที่ caternuate และ/หรือ rostrate.....*Alternaria*

26b. คอนิเดียที่มีอายุน้อยมีลักษณะซึ่งไม่พบได้บ่อยคือ ยาวและบางอยู่ที่ฐาน [illegible]ที่อยู่เดี่ยวหรืออยู่ในลักษณะต่อกันเป็นสายสั้น.....*Ulocladium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้