การลดการเน่าเสียจากเชื้อราในพริกหลังการเก็บเกี่ยวโดยใช้เกลือของกรดอินทรีย์

Decreasing of Postharvest Fungal Rotting in Chilli by Organic Acid Salts

สุรีย์ นานาสมบัติ[1*] เนตรชนก อดิศรเกษม[2] พรศิริ ธรรมจิต[3] และ ศุภชัย แจ้งกระจ่าง[4]

Suree Nanasombat[1*] Netchanok Adisornkasem[2] Pornsiri Thammajit[3] and Supachai Cheangkrajang[4]

[1-4]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพ 10520

บทคัดย่อ

ในการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริกจำนวน 6 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ พริกสด พริกแห้ง พริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มพบว่าพริกสดมีการปนเปื้อนเชื้อรามากถึงร้อยละ 90.9 และพริกแห้งมีการปนเปื้อนเชื้อราร้อยละ 79.9 ส่วนในพริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้ม พบการปนเปื้อนน้อย (น้อยกว่า 10 ถึง 4.8×10^2 CFU ต่อกรัม) และได้แยกเชื้อราจำนวน 135 ไอโซเลต มาทำการจำแนกชนิด เชื้อราที่พบมีหลายสกุลได้แก่ *Aspergillus, Alternaria, Penicillium, Fusarium* และ *Cladosporium* เชื้อราที่พบมากที่สุดคือ *Aspergillus* โดยพบมากถึงร้อยละ 84.4 ของจำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด การหาค่าความเข้มข้นในการยับยั้งต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ของเกลือของกรดอินทรีย์ได้แก่ โพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเบนโซเอตและแคลเซียมโพรพิโอเนตต่อการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus Flavus* TISTR 3041, *Aspergillus Flavus* B3DG ที่แยกได้จากพริกป่นหยาบ *Aspergillus Parasiticus* TISTR 3276 และ *Aspergillus Parasiticus* C5PD ที่แยกได้จากพริกแห้งในอาหารพริกจำลองที่ระดับ Water Activity (a_w) 0.85, 0.90 และ 0.95 และระดับ pH 5.0 และ 5.5 พบว่าที่สภาวะ a_w และ pH เดียวกัน โพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาคือ โซเดียมเบนโซเอตและแคลเซียมโพรพิโอเนต และยังพบว่า *A.Parasiticus* มีความต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยเกลือของกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่า *A. Flavus* และเมื่อพิจารณาผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์โดยเกลือของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดพบว่า ที่ระดับ pH เดียวกันค่า MIC ที่ a_w 0.85 มีค่าน้อยกว่าค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.90 และ 0.95 ส่วนในสภาวะ aw เดียวกันพบว่าค่า MIC ที่ pH 5.0 มีค่าน้อยกว่าค่า MIC ที่ pH 5.5 จากนั้นจึงได้ศึกษาผลของโพแทสเซียมซอร์เบต (54 และ 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์บนพริกสดที่เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 พบว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของโพแทสเซียมซอร์เบตซึ่งใช้จุ่มพริกสดทำให้การเจริญของ *A.Flavus* และ *A.Parasiticus* ลดลงบนพริกหลังเก็บไว้ 7 วัน ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือที่ระดับความเข้มข้น 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถลดการเจริญของเชื้อราบนพริกลงเหลือร้อยละ 60.86-63.15

คำสำคัญ : *Aspergillus Flavus / Aspergillus Parasiticus* / พริก / โพแทสเซียมซอร์เบต

ABSTRACT

Chilli and chilli products (10 samples each) including whole fresh chilli fruits, whole dried chilli fruits, coarse ground chilli, fine ground chilli, hot chilli paste and sour chilli paste were collected for fungal contamination analysis. Whole fresh chilli fruit 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 less than 10 to 4.8×10^2 CFU/g. Some molds isolated from these samples (135 isolates) were identified. They were found to be *Aspergillus, Alternaria, Penicillium, Fusarium* and *Cladosporium*. The most predominant mold was *Aspergillus* (84.4% of total isolates). Minimum inhibitory concentration (MIC) 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 a_w 0.85, 0.90 and 0.95, and at pH 5.0 and 5.5 were determined. At the same aw 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 these organic acid salts than *A.Flavus.* Considering the effect of each organic acid salt to inhibit growth of 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. Then, effect of potassium sorbate (54 and 81 mg/ml) on growth inhibition of these four mold strains on fresh chilli fruits stored at 30°C and 95% relative humidity was studied. Increasing the concentration of potassium sorbate used for chilli dip resulted in decreasing growth of both mold strains *(A.Flavus and A.Parasiticus)* on chilli fruits after 7-day storage. The most effective concentration of potassium sorbate to decrease the growth of all mold species tested was 81 mg/ml which was able to reduce fungal growth down to 60.86-63.15%.

Keywords : *Aspergillus Flavus* / *Aspergillus Parasiticus* / Chilli / Potassium Sorbate

บทนำ

พริกเป็นหนึ่งในเครื่องเทศหลายชนิดที่มัก จะนิยมใช้เติมลงในอาหารเพื่อเพิ่มสี กลิ่นและรสชาติ พริก (Chilli Pepper) เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Solanaceae สกุล *Capsicum* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาเขตร้อน พริกส่วนใหญ่ที่เพาะปลูกเพื่อจำหน่ายเป็นพริกสปีชีส์ *Capsicum Annuum* (Shiva KN. 2008) การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกอาจจะเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนใด ๆ ของกระบวนการผลิตตั้งแต่ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โรคที่เกิดจากเชื้อราในแปลงเพาะปลูกพริก อาจปนเปื้อนไปสู่ผลพริกที่จะเก็บเกี่ยว เชื้อราเหล่านี้ทำให้พริกเน่าเสียซึ่งจะทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจรวมทั้งทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกแดงจากประเทศอเมริกาและอินเดีย โดยพบ Storage Fungi ได้แก่ *Aspergillus Glaucus, Aspergillus Candidus, Aspergillus Flavus และ Aspergillus Ochraceus* เชื้อราที่ปนเปื้อนในพริกแดงจากประเทศอเมริกา 13 ตัวอย่าง มีจำนวนเฉลี่ย 1.6×10^3 CFU/g ส่วนในพริกแดงจากประเทศอินเดีย 6 ตัวอย่างมีปริมาณการปนเปื้อนเชื้อราเฉลี่ย 7.9×10^4 CFU/g นอกจากนี้ยังพบสารพิษอะฟลาทอกซิน บี 1 จากเชื้อราในพริกจากประเทศตุรกีอีกด้วย (Aydin A. 2007) ดังนั้นจึงควรหาวิธีควบคุมการเจริญของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

การใช้กรดอ่อนและเกลือของกรดอ่อนเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราในผลิตผลทางการเกษตรหลังเก็บเกี่ยว เกลือของกรดอ่อนที่นิยมนำมาใช้ในอาหารได้แก่ โพแทสเซียมซอร์เบต โซเดียมเบนโซเอต และแคลเซียมโพรพิโอเนต โพแทสเซียมซอร์เบตมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี (Stopforth JD. 2005).ซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ มีรายงานว่าโพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเชื้อราในผลิตผลทางการเกษตร เช่น *Penicillium Digitatum* ในผลไม้ตระกูลส้ม (Smilanick JL. 2008) โซเดียมเบนโซเอตยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่ระดับพีเอชต่ำ และไม่มีประสิทธิภาพที่พีเอชเป็นกลาง (Jay JM. 2005). โซเดียมเบนโซเอตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *P. Digitatum* และ *Penicillium Italicum* (Valencia-Chamorro SA. 2009). กรดโพรพิโอนิกและเกลือของกรดโพรพิโอนิก นิยมใช้เป็นสารต้านการเจริญของเชื้อราในขนมปัง เค้ก เนยแข็งบางชนิดและอาหารชนิดอื่นๆ ค่า pKa ของกรดโพรพิโอนิก เท่ากับ 4.87 และที่ pH 4.0 ร้อยละ 88 ของสารนี้จะอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว ที่ pH 6.0 จะมีสารประกอบนี้เพียงร้อยละ 6.7 ที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว โมเลกุลของกรดในรูปที่ไม่แตกตัวนี้จำเป็นต่อกิจกรรมการต้านจุลินทรีย์

จากรายงานการใช้แคลเซียมโพรพิโอเนตร่วมกับสภาวะ a_w (0.94-0.97) และ pH (4.4-4.8) ระดับต่างๆ การใช้โพรพิโอเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ที่ทุกสภาวะยกเว้นที่ระดับ a_w 0.97 และ pH 4.8 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเช่น *Penicillium Roqueforti, Penicillium Commune*

และ *Eurotium Rubrum* ในขนมปังจากข้าวไรน์ (Rye Bread) (Suhr KI. 2004). ดังนั้นการทดลองนี้จึงน่าสนใจที่จะศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อราโดยเกลือของกรดอินทรีย์ทั้งสามชนิดดังกล่าวในสภาวะ a_w และ pH ต่างกันเพื่อจะได้นำมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนพริกสดหลังการเก็บเกี่ยวต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

ในการทดลองนี้ได้สุ่มตัวอย่าง พริกสดและพริกแห้งทั้งเมล็ด พริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ดและน้ำพริกแกงส้มชนิดละ 10 ตัวอย่าง นำมาวัดค่าปริมาณน้ำอิสระโดยใช้เครื่องวัด a_w (AquaLab รุ่น 3 TE บริษัท Decagon Device ประเทศสหรัฐอเมริกา) และวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (Testo รุ่น 205 ประเทศเยอรมัน) ทำการวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในพริกป่นหยาบ พริกป่นละเอียด น้ำพริกแกงเผ็ด และน้ำพริกแกงส้มด้วยวิธี Dilution plating ส่วนตัวอย่างพริกแห้งทั้งเมล็ดและพริกสดทั้งเมล็ดวิเคราะห์โดยใช้วิธี Direct Plating ซึ่งทำตามวิธีของ Tournas และคณะ (Tournas V. 2011) ตัวอย่างที่มี a_w สูง (เช่น น้ำพริกแกงและพริกสดทั้งเมล็ด) ใช้อาหาร Acidified PDA และ Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC) ส่วนตัวอย่างที่มี a_w ต่ำ (เช่น พริกป่นและพริกแห้งทั้งเมล็ด) ใช้อาหาร Acidified PDA และ Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18) จากนั้นแยกเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีและสีต่างกันให้บริสุทธิ์และนำมาจำแนกชนิดตามวิธีการของ Samson และคณะ (Samson RA. 2004).

การศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับพีเอชและปริมาณน้ำอิสระในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus Flavus* และ *Aspergillus Parasiticus*

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราจำนวน 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Aspergillus Flavus* TISTR 3041, *Aspergillus Parasiticus* TISTR 3276 ซึ่งได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย *Aspergillus Flavus* B3DG ที่แยกได้จากพริกป่นหยาบและ *Aspergillus Parasiticus* C5PD ที่แยกได้จากพริกแห้งในอาหาร PDA โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวสปอร์โดยเติมสารละลายทวีน 80 (Tween 80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงใน หลอดอาหารที่มีเชื้อราแต่ละชนิดเจริญอยู่ จากนั้นใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดสปอร์ และปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10 (Valencia-Chamorro SA, et al. 2009) สปอร์ต่อมิลลิลิตรด้วยอุปกรณ์ที่ใช้เพื่อการนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์คือ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของโซเดียมเบนโซเอต โพแทสเซียมซอร์เบต และแคลเซียมโพรพิโอเนตในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus Flavus* และ *Aspergillus Parasiticus*

ทำการออกแบบสภาวะเพื่อศึกษาผลของปริมาณน้ำอิสระ (a_w 0.85, 0.90 และ 0.95) ค่าพีเอช (pH 5.0 และ 5.5) และเกลือของกรดอินทรีย์ (โซเดียมเบนโซเอต โพแทสเซียมซอร์เบต และแคลเซียมโพรพิโอเนต) ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A.Flavus* และ *A.Parasiticus* ในอาหารพริกจำลอง (Chilli Model Agar) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การเตรียมอาหารพริกจำลองทำได้โดยนำมันฝรั่งหั่นหยาบ 200 กรัมกับพริกขี้หนู 20 กรัมไปต้มในน้ำกลั่น 1 ลิตรเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมากรอง นำน้ำที่กรองได้มาเติม Dextrose 20 กรัม และวุ้น 20 กรัม ต้มจนวุ้นละลายแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที (ปรับค่าพีเอชโดยใช้สารละลายกรดทาร์ทาริกความเข้มข้นร้อยละ 10)

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A.Flavus* และ *A.Parasiticus* ในอาหารพริกจำลองในสภาวะต่างๆ ดังกล่าวทำโดยวิธี Agar Dilution ตามวิธีการของ Collin และคณะ (Collin CH. 2001) ขั้นแรกเตรียม Stock Solution ของเกลือของกรดอินทรีย์แต่ละชนิด จากนั้นเตรียมอาหารพริกจำลองเพื่อนำมาผสมกับสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ กัน (1.0-20.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยจะเติมสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์จาก Stock Solution ที่เตรียมไว้ผสมกับน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (รวมกันได้ 1 มิลลิลิตร) ในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเทอาหารพริกจำลองที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงไปปริมาตร 19 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี แล้ววางทิ้งไว้จนกระทั่งอาหารแข็งตัวและมีผิวหน้าแห้งแล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่ใช้ทดสอบลงไปตรงกลางของจานเพาะเชื้อปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ประเมินผลโดยตรวจดูการเจริญของเชื้อราเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) คัดเลือกสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพื่อนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การประยุกต์ใช้เกลือของกรดอินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus Flavus* และ *Aspergillus Parasiticus*

บนพริกสด

การเตรียมพริกสดทำการเตรียมพริกสดทำตามวิธีการของ Mecteau และคณะ (Mecteau RM. 2002) ซึ่งทำได้โดยเด็ดขั้วพริกสดพันธุ์แดงจินดาแล้ว นำไปล้างน้ำ จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที แล้วจึงนำไปชะล้างด้วยสารละลาย Sodium Hypochlorite ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จากนั้นนำมาผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 45 นาที

การเตรียมสปอร์เชื้อรา

ทำการเตรียมสปอร์เชื้อราจำนวน 4 สายพันธุ์ดังกล่าวตามวิธีการเช่นเดียวกับข้างต้น ปรับความเข้มข้นของสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10 (Valencia-Chamorro SA. 2009) สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การประยุกต์ใช้เกลือของกรดอินทรีย์

การประยุกต์ใช้เกลือของกรดอินทรีย์ในพริกสดทำตามวิธีการของ Gowda และคณะ (Gowda NKS. 2004) ซึ่งทำได้โดยนำพริกสดที่เตรียมไว้มาจุ่มในสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ (ชนิดที่ได้คัดเลือก) ที่ระดับความเข้มข้น 54 และ 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบ เทียบกับพริกสดชุดควบคุม (Control) ที่จุ่มในน้ำกลั่น หลังจากจุ่มพริกสดในสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ที่แต่ละระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 20 วินาที แล้วนำไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำมาคลุกสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ (*A.Flavus* TISTR 3041, *A.Flavus* B3DG, *A.Parasiticus* TISTR 3276 และ *A.Parasiticus* C5PD) เพื่อให้มีการปนเปื้อนของเชื้อราเป็นร้อยละ 100 บนผิวของพริกสด นำพริกที่คลุกสปอร์ของเชื้อราแล้วมาจัดเรียงใส่จานเพาะเชื้อโดยเรียงเป็นแถวเดียว (ปริมาณ 20 กรัมต่อจาน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 95 เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญของเชื้อรา และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณการปนเปื้อนด้วยวิธี Direct Plating ตามวิธีการของ Tournas และคณะ ซึ่งใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ DRBC ในการวิเคราะห์

ผลการศึกษา

การปนเปื้อนของเชื้อราในพริกและผลิตภัณฑ์จากพริก

พริกสดทั้งเมล็ด (pH เฉลี่ย 5.5, a_w (25°C) เฉลี่ย 0.95) และพริกแห้งทั้งเมล็ด (pH เฉลี่ย 4.8, a_w (25°C) 0.59) มีการปนเปื้อนเชื้อรามากถึงร้อยละ 90.9 และ 79.9 ตามลำดับ ส่วนในพริกป่นหยาบ (pH 5.2, a_w 0.32) พริกป่นละเอียด (pH 4.9, a_w 0.37) น้ำพริกแกงเผ็ด (pH 4.9, a_w 0.90) และน้ำพริกแกงส้ม (pH 4.8, a_w 0.87) พบการปนเปื้อนเชื้อราน้อย (น้อยกว่า 10 ถึง 4.8×10^2 CFU ต่อกรัม) และได้แยกเชื้อราจำนวน 135 ไอโซเลต มาทำการจำแนกชนิด เชื้อราจากพริกแห้งที่เจริญบนอาหาร DG18 ที่ตรวจพบได้แก่ *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. และ *Penicillium* spp. แต่บนอาหาร Acidified PDA พบเชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Alternaria* spp. เชื้อราจากพริกสดที่เจริญบนอาหาร Acidified PDA พบว่าเป็น *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. และ *Fusarium* spp. แต่เชื้อราที่ตรวจพบบนอาหาร DRBC ได้แก่ *Aspergillus* spp. และ *Alternaria* spp. ส่วนในตัวอย่างพริกป่นหยาบและน้ำพริกแกงส้มพบเชื้อราได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. และ *Cladosporium* spp. สำหรับตัวอย่างน้ำพริกแกงเผ็ดพบเพียง *Aspergillus* spp.

เชื้อราไอโซเลต C5PD ที่แยกได้จากพริกแห้งพบว่าเป็นเชื้อรา *A. Parasiticus* ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 2.5-3.5 เซนติเมตร บนอาหาร Acidified PDA เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีก้านชูอับสปอร์สีเขียวทึบ ส่วนหัวคอนิเดีย (Conidial Head) มีสีเขียวและแผ่รัศมีออกจากจุดศูนย์กลาง (Radiate) คอนิเดียทรงกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5-5.5 ไมโครเมตรมีผนังหุ้มที่มีลักษณะขรุขระชัดเจน และมี Phialide เกิดขึ้นโดยตรงบนเวสสิเคิล (Uniseriate Radiate Conidial Head)

เชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างพริกป่นหยาบ (ไอโซเลต B3DG) พบว่าเป็นเชื้อรา *A.Flavus* ซึ่งมีลักษณะดังนี้ โคโลนีของ *A.Flavus* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 เซนติเมตร เมื่อนำเลี้ยงบนอาหาร Acidified PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก้านชูอับสปอร์ (Conidiophore)

จะเป็นสีเขียวอมเหลืองค่อนข้างหนา ลักษณะของหัวคอนิเดียแผ่ออกจากศูนย์กลาง หลังจากนั้นจะแตกออกเป็นหลายคอลัมน์หลวมๆ

ผลของกรดอินทรีย์ร่วมกับพีเอชและปริมาณน้ำอิสระในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus Flavus* และ *Aspergillus Parasiticus*

จากการทดลองพบว่าในสภาวะที่มีค่า a_w และ pH ระดับเดียวกัน โพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบได้ดีกว่าเกลือของกรดอินทรีย์อีก 2 ชนิด (Table 1) ซึ่งจะเห็นได้จากค่า MIC ของโพแทสเซียมซอร์เบตที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดมีค่าต่ำที่สุด ส่วนโซเดียมเบนโซเอตมีประสิทธิภาพรองลงมา แคลเซียมโพรพิโอเนตมีประสิทธิภาพต่ำที่สุด นอกจากนี้เกลือของกรดอินทรีย์ทั้ง 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 ของเกลือของกรดอินทรีย์แต่ละชนิดที่ระดับ pH เดียวกัน ค่า MIC ที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดที่ระดับ a_w 0.85 มีค่าน้อยกว่าค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.90 และ 0.95 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่า MIC ของเกลือของกรดแต่ละชนิดที่ระดับ aw เดียวกันพบว่าค่า MIC ที่ pH 5.0 มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ที่ pH 5.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เกลือของกรดอินทรีย์จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามากขึ้นเมื่อระดับ a_w และ pH ต่ำลง

Table 1 Minimum inhibitory concentration of potassium sorbate, sodium benzoate and calcium propionate against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on chilli model agar

เกลือของกรดอินทรีย์	ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC, mg/ml)			
	A. flavus TISTR 3041	*A. flavus* B3DG	*A.parasiticus* TISTR 3276	*A. parasiticus* C5PD
		โพแทสเซียมซอร์เบต		
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
		โซเดียมเบนโซเอต		
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
		แคลเซียมโพรพิโอเนต		
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

ผลการใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตในการยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus Flavus* และ *Aspergillus Parasiticus* บนพริกสด

การเจริญของเชื้อรา *A.Flavus* TISTR 3041, *A.Flavus* B3DG, *A.Parasiticus* TISTR 3276 และ *A.Parasiticus* C5PD บนพริกสดลดลงตามความเข้มข้นของโพแทสเซียมซอร์เบตที่เพิ่มขึ้น (Table 2) การจุ่มพริกสดด้วยสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ความเข้มข้น 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดการปนเปื้อนของเชื้อรา *A.Flavus* และ *A.Parasiticus* ทั้ง 2 สายพันธุ์บนผิวของเมล็ดพริกสดได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถลดการปนเปื้อนลงเหลือร้อยละ 60.86-63.15 เมื่อเปรียบเทียบกับพริกสดชุดควบคุมที่ไม่ได้จุ่มสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต

ซึ่งพบการเจริญของเส้นใยเชื้อราปริมาณมากปกคลุมผิวของเมล็ดพริกทุกเมล็ด

Table 2 Effect of potassium sorbate on growth inhibition of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on fresh chilli fruits

โพแทสเซียมซอร์เบต (mg/ml)	ปริมาณการปนเปื้อนด้วยเชื้อรา (ร้อยละ)			
	A. flavus TISTR 3041	*A. flavus* B3DG	*A. parasiticus* TISTR 3276	*A. parasiticus* C5PD
0	100.00	100.00	100.00	100.00
54	62.50	66.66	86.95	76.92
81	62.50	63.15	60.86	60.86

วิจารณ์และสรุปผล

เกลือของกรดอินทรีย์ทุกชนิดที่ทดสอบส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A.Flavus* และ *A.Parasiticus* ได้โดยในสภาพ pH 5.0 มีค่า MIC ต่ำกว่าค่า MIC ในสภาพ pH 5.5 ที่สภาวะ aw เท่ากัน และค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.85 มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ที่ aw 0.90 และ 0.95 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Haung และคณะ (Huang Y. 2010). ซึ่งได้หาค่า MIC ของกรดซอร์บิกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A.Flavus* และพบว่าค่า MIC ที่ pH 5.0 ต่ำกว่าค่า MIC ที่ pH 6.0 ในสภาวะ a_w เดียวกัน (เช่นในสภาวะที่มี a_w 0.85 pH 5.0 ค่า MIC ของกรดซอร์บิกเท่ากับร้อยละ 0.01 น้ำหนักโดยน้ำหนัก ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ที่ a_w 0.85 pH 6.0 ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.1 น้ำหนักโดยน้ำหนัก) และได้ค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.85 ต่ำกว่าค่า MIC ที่ a_w 0.90 ในสภาวะ pH เดียวกัน (เช่น ค่า MIC ของกรดซอร์บิกที่ pH 5.0 a_w 0.85 มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.01 น้ำหนักโดยน้ำหนัก ซึ่งต่ำกว่าค่า MIC ที่ pH 5.0 a_w 0.90 ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.05 น้ำหนักโดยน้ำหนัก) การที่ค่า MIC ที่ระดับ a_w 0.85 มีค่าต่ำกว่าค่า MIC ที่ 0.90 และ 0.95 ที่ระดับ pH เดียวกัน อาจเป็นผลเนื่องมาจากการมีปริมาณน้ำอิสระน้อยทำให้เกิดสภาวะเครียดจากความดันออสโมติก (Osmotic Stress) ร่วมกับการมีสารยับยั้ง เช่น Potassium Sorbate ซึ่ง (Booth IR. 1998) กล่าวว่าบ่อยครั้งที่มักจะมีการใช้สภาวะที่มี a_w ต่ำอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสภาวะเครียดอื่นในการถนอมอาหารหรือป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร Jay และคณะได้กล่าวว่า โดยทั่วไปกรดซอร์บิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดที่ระดับ pH ต่ำกว่า 6.0 และจะไม่มีประสิทธิภาพเมื่อระดับ pH สูงกว่า 6.5 เกลือของกรดซอร์บิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดีกว่าโซเดียมเบนโซเอตในช่วง pH 4.0-6.0 ส่วนในสภาพที่มี pH 3.0 หรือต่ำกว่า 3.0 เกลือของกรดซอร์บิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ดีกว่าเกลือแคลเซียมโพรพิโอเนตเพียงเล็กน้อย แต่จะมีประสิทธิภาพเท่ากับโซเดียมเบนโซเอต ค่า pKa ของเกลือซอร์เบตเท่ากับ 4.80 และที่ pH 4.0 เกลือซอร์เบตจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวถึงร้อยละ 86 แต่ที่ระดับ pH 6.0 เกลือซอร์เบตจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวเพียงร้อยละ 6 เท่านั้น ดังนั้นในสภาพ pH 5.0 เกลือซอร์เบตอาจอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวมากกว่าเมื่ออยู่ในสภาพ pH 5.5 จึงเป็นผลให้ประสิทธิภาพของซอร์เบตในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ pH 5.0 สูงกว่าที่ pH 5.5 นอกจากนี้การที่เกลือของกรดอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ Jay และคณะ กล่าวว่า เกลือซอร์เบตและเกลือโพรพิโอเนตเป็นกรดอ่อนที่ชอบไขมันที่มีกลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์คล้ายกัน หลังจากกรดอ่อนในรูปไม่แตกตัวแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปจะเกิดการแตกตัวและทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ลดลงส่งผลให้เซลล์ทำงานผิดปกติและหยุดการเจริญ

Stopforth และคณะ กล่าวว่า กลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเกลือซอร์เบต ได้แก่ การทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ ความสมบูรณ์ และหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ การยับยั้งหน้าที่ในการขนส่งสารและกระบวนการเมแทบอลิกในเซลล์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการตายของจุลินทรีย์ที่เผชิญกับสภาพความเข้มข้นสูงของสารยับยั้ง เช่น ซอร์เบตเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งการไปลดการใช้สารประกอบคาร์บอนหลายชนิด ซอร์เบตยังไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งอาจทำให้เกิดการขัดขวางกระบวนการสำคัญที่เกี่ยวกับการขนส่งสารกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ การเจริญและการจำลอง DNA

พริกสดมีค่า a_w เฉลี่ยประมาณ 0.95 ซึ่งเป็นค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์เชื้อราจึงเจริญได้ดี ค่า a_w ต่ำสุดสำหรับการเจริญของ *A.Flavus* อยู่ในช่วง 0.82-0.88 ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญ ค่า a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A.Flavus* อยู่ในช่วง 0.980-0.994 *A.Flavus* เจริญได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 32-33 องศาเซลเซียส (Pitt JI. 1977) ส่วนค่า a_w ที่เหมาะ

สมต่อการเจริญของของเชื้อรา *A.Parasiticus* เท่ากับ 0.98 (Ayerst G. 1969) และจากการทดลองนี้การที่ใช้ความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ความเข้มข้น 54 และ 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเทียบเท่ากับระดับความเข้มข้น 6 เท่า และ 9 เท่าตามลำดับของค่า MIC ของโพแทสเซียมซอร์เบตที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A.Flavus* TISTR 3041 ที่ a_w 0.95 pH 5.5 (Table 1) *A.Parasiticus* ต้านทานต่อสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตได้ดีกว่า *A.Flavus* ดังนั้น ถ้าหากต้องการขจัดการปนเปื้อนของเชื้อราทั้งหมดบนพริกควรเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ใช้จุ่มพริกให้มากกว่า 81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กล่าวโดยสรุป สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ สารละลายโซเดียมเบนโซเอตและแคลเซียมโพรพิโอเนต ส่วนการประยุกต์ใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อลดการเจริญของเชื้อรา *A.Flavus* TISTR 3041, *A.Flavus* B3DG, *A.Parasiticus* TISTR 3276 และ *A.Parasiticus* C5PD บนพริกสดทั้งเมล็ด ทำให้ทราบว่าโพแทสเซียมซอร์เบตมีประสิทธิภาพในการลดการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดพริกสดได้ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงกับพริกสดเพื่อลดการเน่าเสียโดยเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยว

เอกสารอ้างอิง

Aydin A, Erkan ME, Bakaya R, Ciftcioglu G. (2007). “Determination of aflatoxin B1 levels in powdered red pepper,” **Food Control**. 18 : 1015-18.

Ayerst G. (1969). “The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi,” **J Stored Prod Res.** 5 : 669-87.

Booth IR. (1998). “Bacterial response to osmotic stress: diverse mechanisms to achieve a common goal,” **The properties of water in food ISOPOW6.** London, Great Britain : Blackie Academic & Professional p. 456-485.

Collin CH, Lyne PM, Grange JM. (2001). **Collin and Lyne’s microbiological methods.** New York : Oxford University Press Inc.

Gowda NKS, Malathi V, Suganthi RU. (2004). “Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production,” **Anim Feed Sci Technol.** 116 : 281-91.

Huang Y, Wilson M, Chapman B, Hocking AD. (2010). “Evaluation of the efficacy of four weak acid as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food system,” **Food Microbiol.** 27 : 33-6.

Jay JM, Loessner MJ, Golden D A. (2005). **Modern food microbiology.** 7th ed. New York : Springer Science + Business Media.

Mecteau RM, Arul J, Tweddell RJ. (2002). “Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of *Fusarium sambucinum*, a causal agent of potato dry rot,” **Mycol Res.** 106 : 688-96.

Pitt JI, Hocking AD. (1977). “Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relation of some xerophilic fungi,” **J Gen Microbiol.** 101 : 35-40.

Samson RA, Hoekstra ES, Lund F, Filtenborg O, Frisvad JC. (2004). “Identification of the common food-borne fungi,” **Introduction to food and air-borne fungi.** Netherlands : Centraalbureau voor Schimmelcultures ; p. 64-97.

Shiva KN, Prasath D, Parthasarathy VA. (2008). “Chilli and paprika,” **Organic spices.** New Delhi : New India Publishing Agency. p477-552.

Smilanick JL, Mansour MF, Gabler FM, Sorenson D. (2008). “Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides,” **Postharvest Biol Tec.** 47 : 226-38.

Stopforth JD, Sofos JN, Busta FF. (2005). “Sorbic acid and sorbates,” **Antimicrobials in food.** Boca Raton, Florida : Taylor & Francis Groups. p 49-90.

Suhr KI, Nielsen PV. (2004). “Effect of weak acid preservatives on growth of bakery product spoilage fungi at different water activities and pH values,” **Int J Food Microbiol.** 95 : 67–78.

Tournas V, Stack ME, Mislivec PB, Koch HA, (2011). **Bandler R. Yeasts, mold, and mycotoxins. In Bacteriological Analytical Manual (BAM).** [Online], Available : www.fda.gov/Food/ ScienceResearch/LaboratoryMethods/ BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm 071435.htm. [September 18,2011].

Valencia-Chamorro SA, Pérez-Gago MB, del Río MA, Palou L. (2009). "Effect of antifungal hydroxypropyl methy lcellulose (HPMC)-lipid edible composite coatings on postharvest decay development and quality attributes of cold-stored "Valencia" oranges," **Postharvest Biol Tec.** 54 : 72-79.