รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลร่วมของสารละลายฆ่าเชื้อและความร้อนระดับกลางต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และการยืดอายุการเก็บรักษาโหระพาที่สภาวะต่างๆ

Combined effect of sanitizers and mild heat treatment on microbial load reduction and shelf life extension of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) at different conditions

คณะผู้วิจัย

ดร. ดุสิดา ถิระวัฒน์ หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ที่ปรึกษาโครงการ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก เงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2557

รหัสโครงการ AGR570418S

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ผลร่วมของสารละลายฆ่าเชื้อและความร้อนระดับกลางต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และการยืดอายุการเก็บรักษาโหระพาที่สภาวะต่างๆ

(ภาษาอังกฤษ) Combined effect of sanitizers and mild heat treatment on microbial load reduction and shelf life extension of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) at different conditions

คณะนักวิจัย

หัวหน้าโครงการ : ดร. ดุสิดา ถิระวัฒน์ สัดส่วนรับผิดชอบ 100 %

หน่วยงาน: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ที่ปรึกษาโครงการ : รศ.ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร

หน่วยงาน: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

สารบัญ

เรื่อง	หน้าที่
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
บทคัดย่อ	ช
Abstract	ซ
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	5
สรุป	
- การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายฆ่าเชื้อต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในโหระพา	6
- การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลางต่อการ	11
ลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในโหระพา	
- การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลางต่อการ	14
ลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในโหระพา	
- การศึกษาผลของการใช้สารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับความร้อนระดับกลางต่อการเปลี่ยนแปลง	21
ของโหระพาในระหว่างการเก็บรักษา	
- การศึกษาสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสาร-	30
ละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลาง	
สรุปผลการทดลอง	37
ภาคผนวก	
- สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว	39
- ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ไม่ได้	48
- วิธีการ	48

- ผลการทดลองและวิจารณ์ 52

- เอกสารอ้างอิง 69

- ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ 69

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้าที่
1	Physicochemical properties of treatment solution	8
2	Percentage of falling leaves of sweet basil stored at 12±1˚ C	23
3	Percentage of weight loss of sweet basil stored at 12±1˚ C	23
4	Percentage of browning leaves of sweet basil stored at 12±1˚ C	24
5	The observed scores of sweet basil packed in polyethylene bag at 12.5℃	29
6	Percentage of falling leaves of sweet basil stored at 12˚ C and 15˚ C	31
7	Percentage of weight loss of sweet basil stored at 12˚ C and 15˚ C	32
8	Percentage of browning leaves of sweet basil stored at 12˚ C and 15˚ C	32
9	The observed scores of sweet basil packed in polyethylene bag at 12 and 15℃	36

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้าที่
1	Reduction of indigenous mesophilic bacteria in sweet basil as affected by different sanitizers and contact times	10
2	Reduction of indigenous mesophilic bacteria in sweet basil as affected by LA treated in combination with mild heat at various treatment	13
3	Reduction of inoculated *S.* Typhimurium and *E. coli* in sweet basil as Affected by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C	16
4	Scanning electron micrographs (SEM) of *E. coli* and *S.* Typhimurium cells (in vitro). Non-treated *E. coli* (A) and *S.* Typhimurium (C) ; *E. coli* (B) and *S.* Typhimurium (D) after being treated with 2% LA in combination with mild heat at 50°C	19
5	Scanning electron micrographs (SEM) of sweet basil petiole and leaf. Non-treated sweet basil petiole (A), leaf (C) and stomata (E); Sweet basil petiole (B), leaf (D) and destroyed microorganism (F) after being treated with 2% LA in combination with mild heat at 50°C	20
6	Visible count of indigenous mesophilic bacteria in non-treated and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 ℃ for 8 days.	22
7	Total chlorophyll content in non-treated and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 ℃ for 8 days.	26
8	Respiration rate in non-treated and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 ℃ for 8 days.	26
9	Percentage of electrolyte leakage in non-treated and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 ℃ for 8 days.	27
10	Visible count of indigenous mesophilic bacteria in non-treated and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 and 15 ℃.	30
11	Total chlorophyll content in non-treated and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 and 15 ℃	33
12	Respiration rate in non-treated and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 and 15 ℃	34
13	Percentage of electrolyte leakage in non-treated and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 and 15 ℃	35

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบรูณ์ได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ที่ปรึกษาโครงการ ที่ให้โอกาสเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยให้แก่ข้าพเจ้า อีกทั้งให้ทั้งคำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนช่วยตรวจทานงานวิจัยจนกระทั่งโครงการวิจัยเสร็จสมบรูณ์ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ปุณณาณี สัมภวะผล ในการให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ เครื่องใช้และสิ่งอำนวยความสะดวกมากมายแก่ข้าพเจ้า งานวิจัยชิ้นนี้คงไม่เสร็จสมบรูณ์ถ้าขาดในส่วนของความช่วยเหลือครั้งนี้ นอกจากนี้ขอกราบขอบพระคุณ ศ. ดร. สุทธวัฒน์ เบญจกุล ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการช่วยวิจารณ์และแนะนำเนื้อหางานวิจัย อีกทั้งช่วยสละเวลาตรวจทานความถูกต้องเพื่อให้สามารถตีพิมพ์ทางวารสารวิชาการได้ และที่ลืมไม่ได้ ขอขอบพระคุณ สำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับเงินทุนวิจัยในครั้งนี้

ดร. ดุสิดา ถิระวัฒน์

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

โหระพาเป็นเครื่องปรุงในอาหารที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก แต่อย่างไรก็ตามโหระพาเป็นหนึ่งในแหล่งปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค อาทิเช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. บ่อยครั้ง ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจจะเกิดการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการการเก็บเกี่ยว การทำความสะอาด การบรรจุและการขนส่งได้ จุดประสงค์ของการทดลองนี้คือการศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกและน้ำอิเล็กโทรไลต์ต่อการลดปริมารการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในโหระพา และยิ่งไปกว่านั้นยังมีการศึกษาการใช้ความร้อนระดับกลางร่วมกับสารละลายฆ่าเชื้อเพื่อมเพิ่มประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป *S.* Typhimurium และ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในโหระพาให้มากขึ้นอีกด้วย จากการทดลองพบว่าสารละลายกรดแลกติก 2% มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปได้ดีที่สุด โดยสามารถลดปริมาณเชื้อได้ถึง 3 log CFU/g จากนั้นสารละลายกรดแลกติกจึงได้รับการคัดเลือกไปใช้ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 40 และ 50 °C พบว่าสารละลายกรดแลกติกที่ให้ความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 50 °C สามารถลดปริมารเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ดีที่สุด โดยสามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป *S.* Typhimurium และ *E. coli* ได้ถึง 4.62, 3.80 และ 3.61 log CFU/g ตามลำดับ จากการศึกษาข้างต้นจึงบ่งชี้ได้ว่าสารละลายกรดแลกติก 2% มีประสิทธิภาพมากกว่าน้ำอิเล็กโทรไลต์ และจะมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 50 °C

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงคุณภาพของโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางที่ 50 °C ในระหว่างการเก็บรักษาอีกด้วย โดยอุณหภูมิที่เลือกศึกษาคืออุณหภูมิ 12 และ 15 °C จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างในสภาวะข้างต้นที่อุณหภูมิ 12 °C ยังคงมีคุณภาพที่ดีกว่าการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างในสภาวะข้างต้นที่ 15 °C โดยปัจจัยคุณภาพทั้งทางด้านจุลินทรีย์ กายภาพ เคมี และทาง

ประสาทสัมผัสเกือบทั้งหมดของโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12 ℃ มีค่าที่ดีกว่าโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 ℃ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบกับในชุดควบคุมซึ่งไม่ผ่านการล้างใดๆและเก็บที่อุณหภูมิ 12 ℃ จะพบว่าชุดควบคุมสามารถเก็บรักษาคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมีและประสาทสัมผัสได้ดีที่สุด ดังนั้นแม้สารละลายกรดแลกติก 2% มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนและจะมีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับความร้อนระดับการที่อุณหภูมิ 50 ℃ แต่อย่างไรก็ตามสภาวะการล้างดังกล่าวก็ส่งผลกระทบต่อคุณภาพด้านอื่นของโหระพาในระหว่างการเก็บรักษาเช่นกัน

Abstract

Sweet basil has been used worldwide as an ingredient for several cuisines. However, it can be contaminated with pathogens; especially Escherichia coli and Salmonella spp. are mainly introduced by poor hygiene during harvesting, cleaning, packaging and distribution. This study aimed to study the efficacy of lactic acid (LA) and acidic electrolyzed water (AEW) against mesophilic bacteria on sweet basil. In addition, a combination treatment was also investigated, using mild heat with the selected sanitizer to disinfect sweet basil inoculated with *S.* Typhimurium and *E. coli*. The 2% LA treatment showed high efficiency in microbial decontamination, and mesophilic bacteria were reduced by about 3 log CFU/g. Additionally, the decontamination efficacy of LA increased when combined with mild heat. The use of 2% LA at 50˚C showed the highest microbial reduction in sweet basil, in which mesophilic bacteria, S. Typhimurium, and E. coli were reduced by 4.62, 3.80 and 3.61 log CFU/g, respectively. These findings indicate that LA can be more effective than AEW in disinfection and provides greater efficiency when combined with mild 50˚C heat.

บทสรุปผู้บริหาร

บทนำ

ผักและผลไม้นับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยประเภทหนึ่งที่นำเงินตราเข้าประเทศปีละหลายพันล้านบาททั้งในรูปของผักและผลไม้สด แช่เย็นและแช่แข็ง สามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรและผู้ประกอบการส่งออกของไทยได้เป็นอย่างดี เนื่องด้วยประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมทำให้ประเทศไทยจึงเป็นแหล่งเพาะปลูกผักผลไม้หลากหลายชนิด ซึ่งไม่เพียงแต่มีการบริโภคภายในประเทศเท่านั้น แต่ยังมีการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ อาทิ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา จีน และฮ่องกง อีกด้วย (สิรินาฏ พรศิริประทาน, 2554)

สหภาพยุโรปเป็นตลาดนำเข้าผักผลไม้ของไทยที่ใหญ่ตลาดหนึ่งซึ่งแต่ละปีมีมูลค่าการส่งออกสูง โดยเฉพาะพืชผักสวนครัวซึ่งเป็นที่ต้องการของร้านอาหารไทยที่กระจายอยู่ทั่วไปในสหภาพยุโรป อีกทั้งผู้บริโภคในสหภาพยุโรปมีกำลังซื้อที่สูง ดังนั้นสหภาพยุโรปจึงเป็นตลาดที่ไทยต้องพยายามรักษาส่วนแบ่งตลาดไว้ เพราะหากผู้ผลิตและผู้ส่งออกไทยสามารถส่งสินค้าเข้าไปประเทศสมาชิกของสหภาพยุโรปประเทศใดประเทศหนึ่งแล้ว นั่นหมายถึง การเข้าถึงกำลังซื้อของผู้บริโภคทั่วทั้งภูมิภาคยุโรป เนื่องจากสินค้าไทยจะถูกส่งต่อไปยังประเทศสมาชิกอื่น ๆ ได้โดยไม่ต้องผ่านด่านตรวจและไม่มีการเก็บภาษีนำเข้าอีก ซึ่งนับเป็นลู่ทางที่ผู้ประกอบการไทยสามารถขยายตลาดได้ อย่างไรก็ตามเนื่องจากสหภาพยุโรปมีมาตรการและอุปสรรคทางการค้าที่มิใช่ภาษี (Non-Tariff Measures and Non-Tariff Barriers: NTMs และ NTBs) ในรูปแบบต่างๆ โดยเฉพาะในด้านสุขอนามัยและความปลอดภัยของสินค้าอาหารสด จำพวกเนื้อสัตว์ ผักและผลไม้สด ซึ่งที่ผ่านมาสหภาพยุโรปเข้มงวดกวดขันกับการตรวจสอบสินค้าผักผลไม้สดจากไทยที่จะส่งออกไปยังตลาดสหภาพยุโรปมาก โดยเน้นเรื่องการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และปริมาณสารพิษหรือยาฆ่าแมลง

ตกค้างในผักผลไม้เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค และเน้นการตรวจโรคพืชและแมลงศัตรูพืชที่อาจติดมากับผักและผลไม้ไทยเพื่อป้องกันการแพร่ขยายพันธุ์ในสหภาพยุโรป ซึ่งสหภาพยุโรปให้ความสำคัญในทุก ๆ ขั้นตอนตลอดห่วงโซ่อาหาร (สำนักงานส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ ณ นครแฟรงก์เฟิร์ต, 2553) และในช่วงหลายปีที่ผ่านมาประเทศไทยถูกสหภาพยุโรปแจ้งเตือนเกี่ยวกับปัญหาด้านสุขอนามัยบ่อยครั้ง โดยเมื่อปี พ.ศ. 2554 กรมวิชาการเกษตรได้มีมาตรการสั่งระงับการส่งออกพืชผัก 5 กลุ่ม 16 ชนิด อันได้แก่ พืชสกุล Ocimum ได้แก่ กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หร่า พืชสกุล Capsicum ได้แก่ พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกขี้หนู พืชสกุล Momordica charantia ได้แก่ มะระจีน มะระขี้นก พืชสกุล Solanum ได้แก่ มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น และพืชสกุล Eryngium คือ ผักชีฝรั่ง ไปยังสหภาพยุโรป เป็นการชั่วคราวจนกว่าจะสามารถปรับปรุงแก้ไขปัญหานี้ได้ โดยมีผลบังคับใช้ในวันที่ 1 กุมภาพันธ์ปี พ.ศ. 2554 โดยมีสาเหตุเกิดจากการตรวจพบเชื้อจุลินทรีย์ สารเคมีตกค้างและศัตรูพืชกักกันในพืชผักเหล่านั้นอย่างต่อเนื่อง(ชุติมา ศิริชุมแสง, 2554; Voice, 2554) จากสถิติตั้งแต่ปีพ.ศ. 2551 ถึง พ.ศ.2555 มีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อน *Salmonella* spp.บ่อยครั้งโดยเฉพาะในปี 2551 ซึ่งตรวจพบมากเกินกำหนดถึง 6 ครั้ง และผักสดที่ตรวจพบ *Salmonella* spp. ปนเปื้อนมากที่สุดคือโหระพา (สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและสำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช, 2554; กลุ่มพัฒนาระบบความปลอดภัยสินค้าพืช, 2556) ปัจจุบันสหภาพยุโรปได้กำหนดให้ตรวจสอบการปนเปื้อนทางด้านจุลินทรีย์ในผักสดที่นำเข้าจากไทยโดยการสุ่มตรวจเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของอาหารจากอุจจาระ (Fecal indicators) (EC, 2007) และเชื้อ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อให้เกิดโรคที่ระดับ 10 % จากเดิมที่ระดับ 5% ในพืชกลุ่มโหระพา กะเพราและผักชี (EC, 2012) จากปัญหาข้างต้นบ่งชี้ถึงวิกฤตปัญหาด้านความปลอดภัยของอาหารที่ผลิตขึ้นในไทย ซึ่งก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของ

ประชากรภายในประเทศเองและผลกระทบต่อเศรษฐกิจการส่งออกผักผลไม้ของไทย อีกทั้งยังส่งผลต่อความเชื่อมั่นของประเทศผู้นำเข้าอื่นๆ เช่นสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่นอีกด้วย สำหรับแนวทางการแก้ปัญหาในเรื่องนี้ กรมวิชาการเกษตรร่วมมือกับกรมส่งเสริมการเกษตรได้ทำการรณรงค์ให้เกษตรกรทำการผลิตให้ได้ตามมาตรฐาน GAP (Good Agricultural Practice) (สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรและสำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช, 2554) แต่เนื่องจากสภาวะภูมิอากาศของประเทศไทย ปัญหาเรื่องการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของเชื้อจุลินทรีย์ แมลงศัตรูพืชและการใช้ยาฆ่าแมลงยังคงเป็นปัญหาที่ยากต่อการแก้ไข อีกหนึ่งวิธีการที่จะช่วยลดความเสี่ยงต่ออันตรายจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและยาฆ่าแมลงหลังการเก็บเกี่ยวในผลิตผลทางการเกษตรได้นั้นคือ การทำความสะอาดด้วยการล้างก่อนนำไปบริโภคเพื่อขจัดเศษดินและเชื้อจุลินทรีย์ออกไป แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการใช้น้ำประปาเพียงอย่างเดียวในการล้างทำให้จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ลดลงไม่แตกต่างกับผักที่ไม่ได้ล้าง (Ruiz-Cruz et al., 2007) ดังนั้นการใช้สารฆ่าเชื้อชนิดต่างๆร่วมกับการล้างจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดได้

สารละลายคลอรีน (ปริมาณคลอรีนอิสระ 50-200 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งมักเตรียมจากสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (Sodium hypochlorite) เป็นสารฆ่าเชื้อที่ใช้ชำระล้างผลิตผลสดที่ได้รับความนิยมอย่างมากในวงการอุตสาหกรรมผักผลไม้เนื่องจากมีราคาถูก มีความคงตัวทางเคมี หาซื้อและใช้งานได้ง่าย อีกทั้งยังมีการอนุญาตให้ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารได้ในหลายประเทศ (FDA, 2004; Fukuzaki et al., 2007; Keskinen et al., 2009; Issa-Zacharia et al., 2011) แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน ในยุคที่ประชากรโลกหันมาให้ความสนใจต่อสุขภาพมากยิ่งขึ้น ทำให้เกิดความต้องการที่จะลดปริมาณการใช้สารเคมีในอุตสาหกรรมอาหารลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารละลายคลอรีนซึ่งมีรายงานว่า อนุพันธ์บางชนิดจากคลอรีน เช่น

chloramines และ trihalomethanes อาจมีบทบาทเป็นสารก่อมะเร็ง ทำให้ขณะนี้หลายประเทศโดยเฉพาะในแถบยุโรป อาทิเช่น เยอรมัน เนเธอร์แลนด์ สวิตเซอร์แลนด์และเบลเยี่ยม สั่งห้ามการใช้สารละลายคลอรีนในกระบวนการชำระล้างในอุตสาหกรรมผักผลไม้สดตัดแต่ง (Fawell, 2000; Selma et al., 2007; Alegria et al., 2009) ซึ่งจากสาเหตุข้างต้นทำให้นักวิจัยจากทั่วโลกหันมาค้นคว้าหาวิธีการชำระล้างแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่าหรือสูงกว่าวิธีแบบเก่า

ในปัจจุบันมีการศึกษาสารฆ่าเชื้อที่ปลอดภัยต่อทั้งผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมที่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวของผลิตผลสดได้ดีเทียบเท่าหรือสูงกว่าการใช้สารละลายคลอรีนหลายชนิด เช่น น้ำอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyzed water) และกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก (Lactic acid) เป็นต้น น้ำ EO จะมีค่า pH ประมาณ 2-3 มีปริมาณคลอรีนอิสระต่ำคือน้อยกว่า 60 มิลลิกรัมต่อลิตร (Cao et al., 2009) และในสารละลายยังเต็มไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical) (Hua et al., 2012) ซึ่งมีสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด ส่วนกรดแลกติกซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ได้รับการจัดให้เป็นสารในกลุ่ม Generally recognized as safe (GRAS) ปัจจุบันได้รับการรับรองให้ใช้ได้อย่างถูกกฎหมาย (FDA, 2011) กรดแลกติกซึ่งเป็นกรดอ่อนจะเกิดการแตกตัวไม่รุนแรงเท่ากับกรดแก่ ทำให้สามารถแทรกซึมผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ จึงทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ลดต่ำลงอย่างรวดเร็วและส่งผลกระทบทำให้การเกิดเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ผิดปกติและทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Neal et al., 1965; Krebs et al., 1983; Pilkington and Rose, 1988; Plumridge, 2005) นอกจากนี้อิทธิพลของอุณหภูมิก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวและคุณภาพของผัก โดยมีรายงานว่าการใช้ความร้อนระดับกลาง (Mild heat) ที่อุณหภูมิประมาณ 40-50 °C นอกจากจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวของผลิตผลสดแล้วนั้น ยัง

สามารถช่วยรักษาคุณภาพของผักใบหลายชนิดอีกด้วย โดยมีรายงานว่าการใช้ความร้อนระดับกลางในสารละลายฆ่าเชื้อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสในการเก็บรักษาผักกาดหอมตัดแต่ง (Venkitanarayanan et al., 1999b; Delaquis et al., 2002) ช่วยลดการเกิดสีน้ำตาล และช่วยรักษาคุณภาพของผักกาดหอมและผักโขมได้ดีกว่าสารละลายฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (Delaquis et al., 1999; Murata et al., 2004; Gomez et al., 2008; Roura et al., 2008)

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาผลของสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับความร้อนระดับกลางต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในชำระล้างการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวของผลผลิตทางการเกษตรภายหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อแก้ปัญหาเรื่องความปลอดภัยของอาหารต่อผู้บริโภค อีกทั้งการใช้อุณหภูมิระดับกลางที่พอเหมาะจะช่วยรักษาคุณลักษณะผลผลิตทางการเกษตรและยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลดังกล่าวได้อีกด้วย ซึ่งส่งผลให้ผู้ประกอบการแปรรูปผักผลไม้หรือผู้ส่งออกผักผลไม้มีแนวทางปฏิบัติใหม่เพื่อให้ได้ผลิตผลทางการเกษตรเป็นที่ยอมรับของประเทศผู้นำเข้าและเพิ่มรายได้ให้เกษตรกรเพิ่มขึ้น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับความร้อนระดับกลางต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปและเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (*Escherichia coli* และ *Salmonella* spp.) ในโหระพาปนเปื้อน เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในชำระล้างการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บนพื้นผิวของผลผลิตทางการเกษตรภายหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อแก้ปัญหาเรื่องความปลอดภัยของอาหารต่อผู้บริโภค และการใช้อุณหภูมิระดับกลางที่พอเหมาะจะช่วยรักษาคุณลักษณะผลผลิตทางการเกษตรและยังช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลดังกล่าวได้ อีกทั้งยัง

ศึกษาสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนในระดับกลางข้างต้นเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในวงการอุตสาหกรรม

สรุป

ตอนที่ 1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายฆ่าเชื้อต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในโหระพา

1.1 คุณภาพทางเคมีและกายภาพของน้ำอิเล็กโทรไลต์ สารละลายกรดแลกติก สารละลายคลอรีนและน้ำประปา

คุณภาพทางเคมีและกายภาพ (pH, the oxidation-reduction potential (ORP)) และ ความเข้มข้นของปริมาณคลอรีนที่หลงเหลือ (available chlorine concentration (ACC)) ของสารละลายฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิดและน้ำประปา แสดงดังตารางที่ 1 สารละลาย NaClO มีค่า pH 12.44 ในขณะที่สารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์และสารละลายกรดแลกติก 2% มีค่า pH อยู่ในช่วง pH 2.3-2.6 ระหว่างสารละลายฆ่าเชื้อทั้งหมด สารละลาย NaClO มีค่า ORP สูงที่สุดคือ 1562 mV ในขณะที่ค่า ORP ของสารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์มีค่า 1144 mV ค่า ORP ของสารละลายจะบ่งบอกถึงความสามารถในการออกซิไดซ์หรือรีดิวส์ของสารประกอบที่มีอยู่ ดังนั้นค่า ORP ของสารละลายจึงขึ้นอยู่กับค่าความเข้มข้นของไอออนของสารนั้นๆ (Emerson process management, 2008) เมื่อค่า ORP เพิ่มขึ้นความแรงในการออกซิไดซ์ก็จะแรงขึ้นด้วย (Al-Holy & Rasco, 2015) ค่า ORP ที่ +200 ถึง +800 mV เป็นค่าที่สมเหมาะสำหรับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใช้อากาศ (aerobic) มากที่สุด ในขณะที่ค่า ORP ที่ -30 ถึง -550 mV จะเหมาะกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดไม่ใช้อากาศ (anaerobic) ส่วนจุลินทรีย์ชนิดอาศัยได้ทั้งมีอากาศและไม่มีอากาศนั้น (facultative anaerobes) สามารถเจริญได้ดีที่ค่า ORP +200 ถึง -250 mV (Jay et al., 2005) จากผลของการวัดค่า ORP ของ

สารละลายฆ่าเชื้อทั้ง 3 ชนิด คือ สารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์ สารละลายกรดแลกติก และ สารละลาย NaClO พบว่าสารละลายทั้งสามชนิดไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอาศัยได้ทั้งอาศัยอากาศและไม่อาศัยอากาศ (facultative anaerobes) เช่น *E. coli* และ *S.* Typhimurium Hati et al., (2012) กล่าวว่าค่า ORP ของน้ำอิเล็กโทรไลต์อาจจะเป็นปัจจัยเริ่มต้นที่มีผลต่อกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ แต่ค่า ORP ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ Hati และคณะรายงานว่าค่า ACC โดยเฉพาะของกรดไฮโปคลอรัส (HOCl) มีบทบาทสำคัญต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ ในสารละลายฆ่าเชื้อทั้งหมดที่นำมาใช้ในการทดลอง พบว่า ACC ของ NaClO มีค่าสูงสุดคือ 5709 mg/L ในขณะที่ค่า ACC ของสารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์มีอยู่เพียง 32.4 mg/L อย่างไรก็ตามสารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์ที่มีค่า ORP ดังกล่าวยังมีความสามารถในการออกซิไดซ์และสามารถฆ่าเชื้อได้ดี ยิ่งไปกว่านั้นน้ำอิเล็กโทรไลต์มี pH อยู่ระหว่าง 2.3-2.5 ซึ่งค่า pH ดังกล่าวมาจากกรดไฮโปคลอรัส (HOCl;85%) และก๊าซคลอรีน (Cl_2; 15%) (Hati et al., 2012) การที่สารละลายดังกล่าวมีค่า pH ที่ต่ำ มีค่า ORP ที่สูงและมีปริมาณความเข้มข้นของคลอรีน (ACC) พอประมาณ ทำให้สารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์เป็นหนึ่งในสารละลายฆ่าเชื้อที่ถูกคาดหวังว่าจะสามารถช่วยยับยั้งกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ได้

Table 1 Physicochemical properties of treatment solution

Solution	pH	ORP (mV)	ACC (mg/L)
Tap water	7.16	217±0.00	0.05±0.00
NaOCl (6%)	12.44	1562±0.03	5709±152.43
Lactic acid (2%)	2.28	625±0.06	0.05±0.00
AEW	2.58	1144±0.02	32.4±2.79

Values are mean ± standard deviation (SD) n=3.

ACC: Available chlorine concentration; NaClO: Sodium hypochlorite; AEW: Acidic electrolyzed water.

1.2 ผลของสารละลายฆ่าเชื้อต่อจุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic ในใบโหระพา

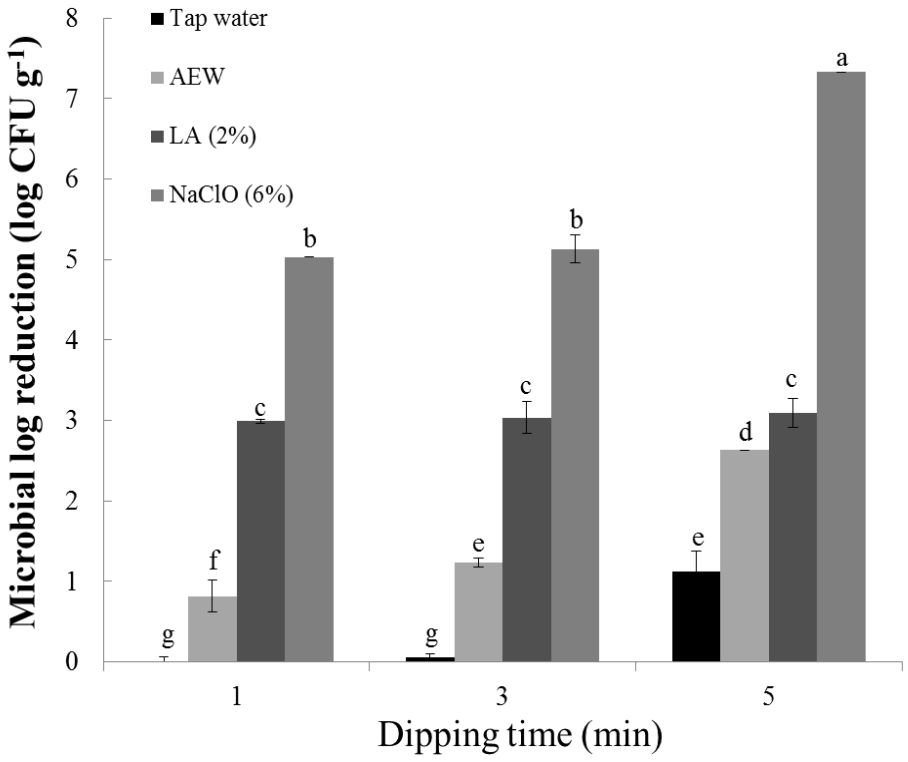
ประสิทธิภาพของสารละลายฆ่าเชื้อ 3 ชนิด คือ สารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์ สารละลายกรดแลกติก และสารละลาย NaClO ต่อจุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic บนใบโหระพา แสดงดังรูปที่ 1 เชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์กลุ่ม mesophilic บนใบโหระพาที่ยังไม่ผ่านการล้างอยู่ที่ 7.33±0.31 log CFU/g โหระพามีลักษณะเหมือนผักชี และผักโขม ที่มีเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในปริมาณที่สูง เพราะเป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตใกล้กับพื้นดิน (Babic & Watada, 1996; Wang et al., 2004) พืชดังกล่าวจึงมีพื้นที่ที่สัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากดินเป็นจำนวนมาก ขั้นตอนการล้างจึงสามารถช่วยพัฒนาทางด้านคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ได้ (Allende et al., 2009)

จากการทดลองพบว่าการล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที สามารถช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ลงได้ 1.13 log units แสดงว่าการล้างช่วยขจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกจากใบโหระพาได้ และเมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกเข้มข้น 2% พบว่าสามารลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ 3 log units อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของระยะเวลา

ที่ใช้ในการล้างระหว่าง 1-5 นาที ($p > 0.05$) กรดอ่อน เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดเบนโซอิก สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Arroyo-López et al., 2008; Bell & De lacy, 1987; Stratford et al., 2008; Wang et al., 2015) โดยกรดเหล่านี้สามารถเข้าไปในเซลล์แล้วแตกตัวได้ดีภายในเซลล์ ส่งผลให้ไซโทพาสซึมมีสภาวะเป็นกรด (Cheng & Piper, 1994).

การแช่ใบโหระพาในสารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์ที่ 1, 3 และ 5 นาที แสดงให้เห็นว่าสามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้ 0.82, 1.23 และ 2.63 log units ตามลำดับ การแช่ผักชีด้วยสารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์เป็นเวลา 5 นาที สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปได้ 0.66 log units (Wang et al., 2004) จากการศึกษาของ Rahman et al. (2010) รายงานว่าการใช้สารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์ (pH 2.54-0.3, ORP 1130±20 mV, free chlorine 50-2.2 mg/L, 3 นาที) ช่วยลดจุลินทรีย์ทั้งหมดในผักโขมสดตัดแต่งได้ 1.94 log units กลไกการฆ่าเชื้อของสารละลายน้ำอิเล็กโทรไลต์ มีปัจจัยที่ช่วยในการฆ่าเชื้อที่เกี่ยวข้อง 3 ปัจจัย ได้แก่ ค่า pH, ค่า ACC และค่า ORP โดยค่า ORP เป็นปัจจัยเริ่มต้นในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Kim et al., 2000) ค่า pH ที่ต่ำอาจมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ และมีผลให้ $HOCl^-$ เข้าสู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ (Mcpherson, 1993) ค่า ACC เป็นปัจจัยหลัก ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ (Abadias et al., 2008; Hao et al., 2012; Xiong et al., 2010) การแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite) เป็นระยะเวลา 1, 3 และ 5 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปได้ดีที่สุด โดยลดลงถึง 5-6 log units แต่อย่างไรก็ตามสารละลาย NaClO เป็นที่ทราบกันว่าเป็นอนุพันธ์บางตัวของสารประกอบคลอรีน เมื่อทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ภายในน้ำบางชนิด อาจจะก่อเกิดเป็นสารก่อมะเร็งได้ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อผู้บริโภค นักวิทยาศาสตร์จึงพยายามหาสารชนิดอื่นมาใช้ทดแทนสารละลายคลอรีนในขั้นตอนการ

ล้าง (Neo et al., 2013; Rodger et al., 2004) ดังนั้นสารละลายกรดแลกติก 2% ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุดรองลงมาจึงถูกเลือกมาใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในใบโหระพาในขั้นตอนถัดไป



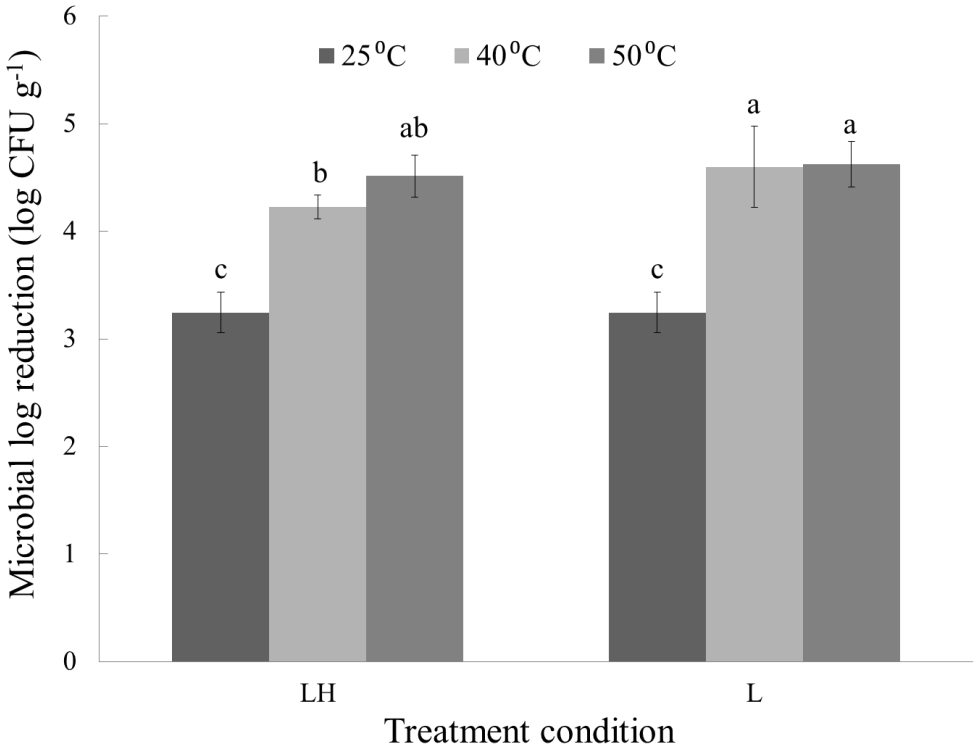
รูปที่ 1 Reduction of indigenous mesophilic bacteria in sweet basil as affected by different sanitizers and contact times. AEW: Acidic electrolyzed water; NaClO: Sodium hypochlorite. Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=6). Different letters on the bars represent significant differences at $p < 0.05$

ตอนที่ 2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลางต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในโหระพา

2.1 ประสิทธิภาพของกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางต่อการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในใบโหระพา

ภาพที่ 2 แสดงผลของสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในใบโหระพา ความร้อนระดับกลางมีผลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านกายภาพในผลิตภัณฑ์สดได้ (Koseki et al., 2004) การล้างด้วยสารละลายกรดแลกติก 2% ที่อุณหภูมิห้อง (25˚C) 1 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในใบโหระพาได้ 3 log units แต่เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง (40° C หรือ 50° C) สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปได้ถึง 4.23-4.62 log units ($p < 0.05$) การศึกษาในปัจจุบันการใช้สารละลายกรดแลกติก 2% นาน 1 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นที่ 40° C และ 50° C นาน 2 นาที สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป ได้ 4.23 and 4.51 log ตามลำดับ เมื่อใช้สารละลายกรดแลกติก 2% ที่อุณหภูมิ 40° C และ 50° C นาน 1 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปถูกลดได้ 4.60 และ 4.62 log units ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ความร้อนระดับกลางสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลกติกได้ จากการศึกษาการทำความสะอาดแครอทสดตัดแต่ง โดยล้างด้วยน้ำคลอรีน (200 mg/L, 50° C) พบว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ชอบอากาศ (aerobic bacteria) ได้ 2.3 log CFU/g (Klaiber et al., 2005) ส่วนในการแช่ผักกาดแก้วตัดแต่งด้วยน้ำคลอรีน อุณหภูมิ 47° C เป็นเวลา 3 นาที สามารถลดจุลินทรีย์ที่ชอบอากาศ (aerobic bacterial count) ได้ประมาณ 3 log CFU/g (Delaquis et al., 1999) การใช้ความร้อนระดับกลางสามารถทำลายเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากการสูญเสียสภาพของโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ อีก

ทั้งยังไปยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์อีกด้วย หรือทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถบางประการที่สำคัญต่อขบวนการเมทาบอลิก (Jay et al., 2005; Noriega et al., 2013; Wu, 2008) เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกการล้างด้วยสารละลายที่มีอุณหภูมิความร้อนระดับกลาง จะมีความไวหรือง่ายต่อการโดนทำลายด้วยสารฆ่าเชื้อเพิ่มมากขึ้น (Li et al., 2012) จากการศึกษาในการทดลองนี้พบว่าประสิทธิภาพการลดเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป ในใบโหระพาที่อุณหภูมิ 40° C และ 50° C ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางที่ 40° C แสดงประสิทธิผลในการยับยั้งโคลิฟอร์มได้น้อยกว่าการใช้อุณหภูมิ 50° C ด้วยเหตุนี้การใช้สารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 50° C จึงถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาขั้นถัดไปต่อไป



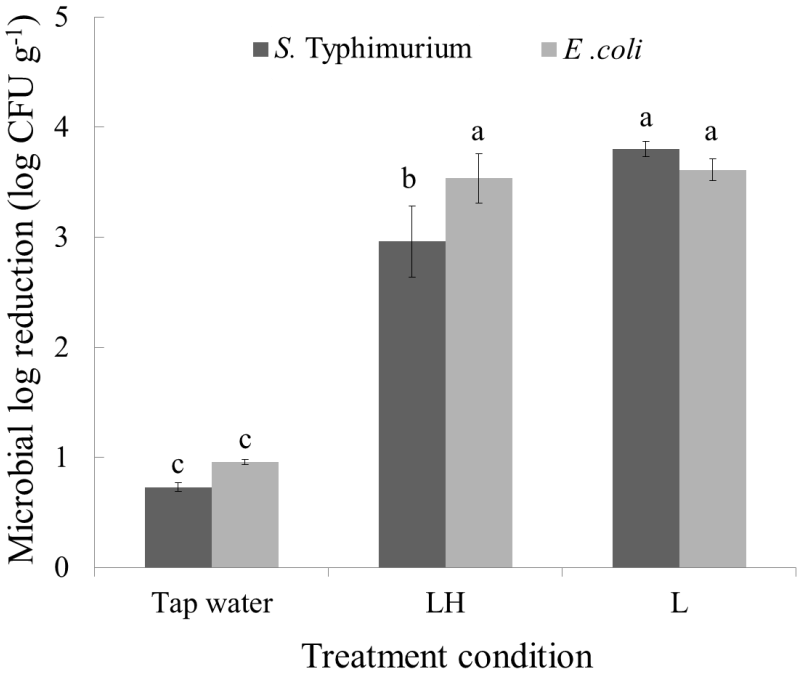
ภาพที่ 2 Reduction of indigenous mesophilic bacteria in sweet basil as affected by LA treated in combination with mild heat at various treatment. LH: washing with LA (25 ˚C) for 1 min followed by washing with water (25, 40 or 50 ˚C) for 2 min; L: washing with LA (25, 40 or 50 ˚C) for 1 min followed by washing with water (25 ˚C) for 2 min. Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=6). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพของสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลางต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในโหระพา

3.1 ประสิทธิภาพของการใช้สารละลายกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 50° C ต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในใบโหระพา

ประสิทธิภาพของสารละลายกรดแลคติก 2% ร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลางที่ 50° C ต่อการยับยั้ง เชื้อ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ที่อยู่ในใบโหระพา ดังแสดงในรูปที่ 3 เชื้อ *E. coli* เริ่มต้นในใบโหระพาอยู่ที่ 8.36 log CFU/g ส่วนเชื้อ *S.* Typhimurium เริ่มต้นอยู่ที่ 7.62 log CFU/g การล้างโดยใช้น้ำประปา ระยะเวลา 3 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ได้น้อยมาก คือ ลดได้ 0.96 และ 0.73 log CFU/g ใน *E. coli* และ *S.* Typhimurium ตามลำดับ และเมื่อแช่ใบโหระพาด้วยสารละลายกรดแลกติก 2% นาน 1 นาที แล้วแช่ด้วยน้ำกลั่นอุณหภูมิ 50° C นาน 2 นาที พบว่าสามารถลดเชื้อ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ได้ 2.96 และ 3.54 log CFU/g ตามลำดับ แต่เมื่อมาลำดับการล้างใหม่เป็นล้างใบโหระพาด้วยสารละลายกรดแลกติก 2% ที่อุณหภูมิ 50° C นาน 1 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่นอุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที สามารถลดเชื้อ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ได้มากถึง 3.57 และ 3.78 log units ตามลำดับ สำหรับการกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อ *S.* Typhimurium ด้วยการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติก 2% 50° C แล้วแช่ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องแสดงให้เห็นว่าสามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงกว่าการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกที่อุณหภูมิห้องอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Wang et al. (2013a) ซึ่งรายงานว่า การแช่ถั่วงอกด้วยสารละลายกรดแลกติก 2% นาน 10 นาที สามารถลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ *S.* Typhimurium ได้ 2 log orders และมีการรายงานว่าการล้างต้นอ่อนผักโขมด้วยกรดแลกติก 2% ที่ 50° C นาน 2 นาที สามารถลดปริมาณ *E. coli* O157:H7 ได้

2.0±0.3 log units (Huang & Chen, 2011) จากการศึกษาของ Lin et al. (2002) พบว่าการแช่ผักกาดแก้วด้วยสารละลายกรดแลกติก 1.5% ผสมกับ H_2O_2 1.5% ที่ 40° C นาน 15 นาที สามารถลดเชื้อ *E. coli* O157:H7 และ เชื้อ *S. enterica* serotype Enteritidis ได้มากกว่า 4 log units และ 3 log units ตามลำดับ สารละลายกรดแลกติกได้รับการยอมรับว่ามีศักยภาพในลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในอาหาร โดยมีผลกระทบต่อชั้นลิโพโพลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide layer) ของเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรีย และจะทำให้เกิดการไวต่อการทำลายหรือฆ่าเชื้อของสารฆ่าเชื้อ (Alakomi et al., 2000; Wang et al., 2013b) การลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยกรดอินทรีย์ร่วมกับการให้ความร้อนระดับกลาง สามารถเพิ่มจำนวนการแตกตัวของอิออนในสารละลายกรดได้ โดยเฉพาะกรดอ่อนเช่นกรดแลคติก ซึ่งจะมีการแตกตัวมากกว่าสองครั้งเนื่องจากกรดอ่อนจะไม่แตกตัวหมดภายในครั้งเดียว (Barron et al., 2006) การเพิ่มขึ้นของอิออนเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นอาจเป็นการขัดขวางกิจกรรมการเคลื่อนที่ของโปรตอนของเยื่อหุ้มเซลล์ภายนอก และโมเลกุลของกรดอ่อนที่ไม่มีการไม่แตกตัวทันทีจึงสามารถแทรกซึมเข้าสู่เยื่อหุ้มไซโทพลาสมิกได้ ส่งผลให้ค่า pH ภายในเซลล์ลดต่ำลง ซึ่งมีผลให้เซลล์ตาย

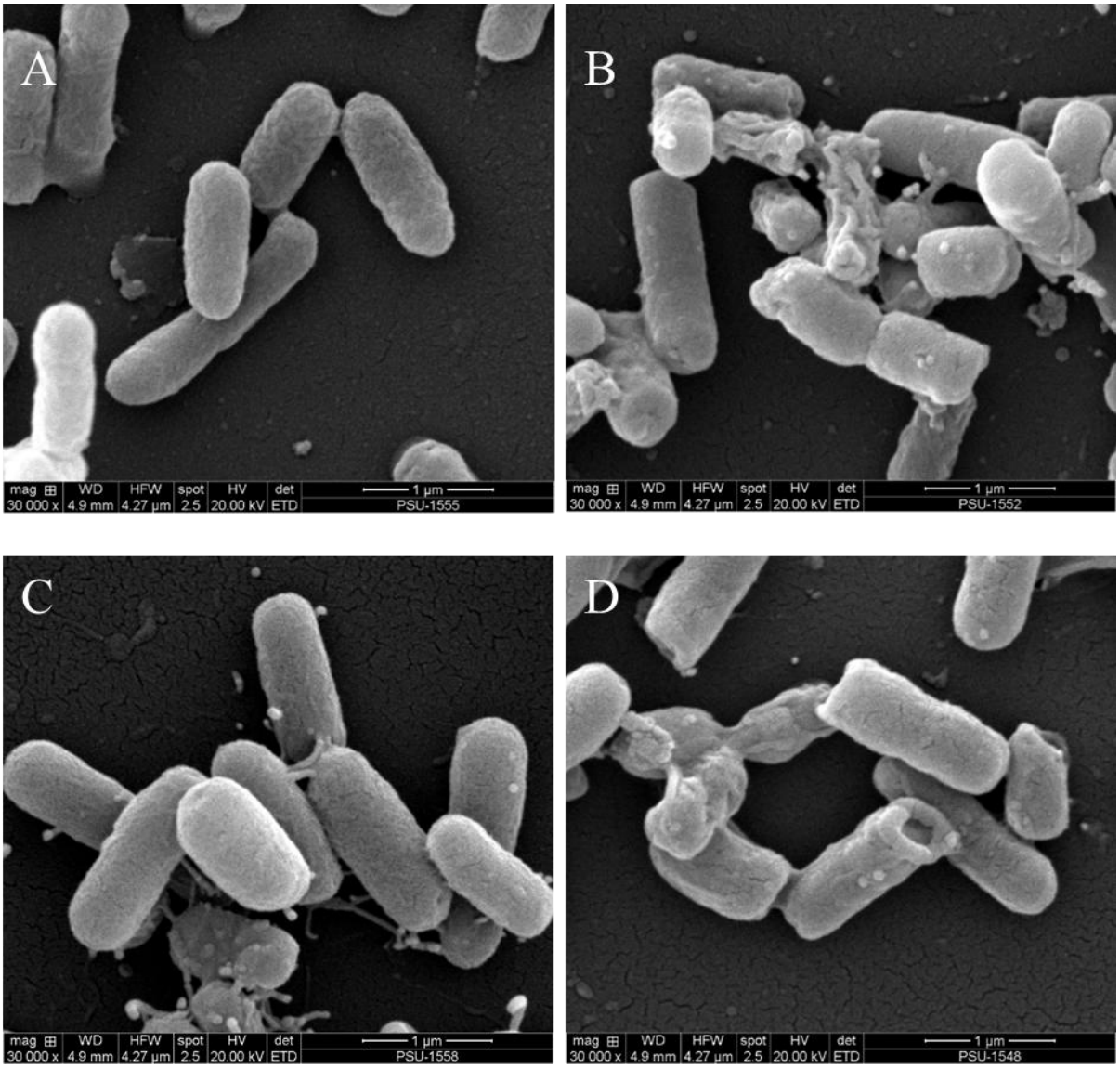


ภาพที่ 3 Reduction of inoculated *S.* Typhimurium and *E. coli* in sweet basil as affected by LA in combination with mild heat treatment at 50 ˚C. LH: washing with LA (25 ˚C) for 1 min followed by washing with water (25, 40 or 50 ˚C) for 2 min; L: washing with LA (25, 40 or 50 ˚C) for 1 min followed by washing with water (25 ˚C) for 2 min. Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=6). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

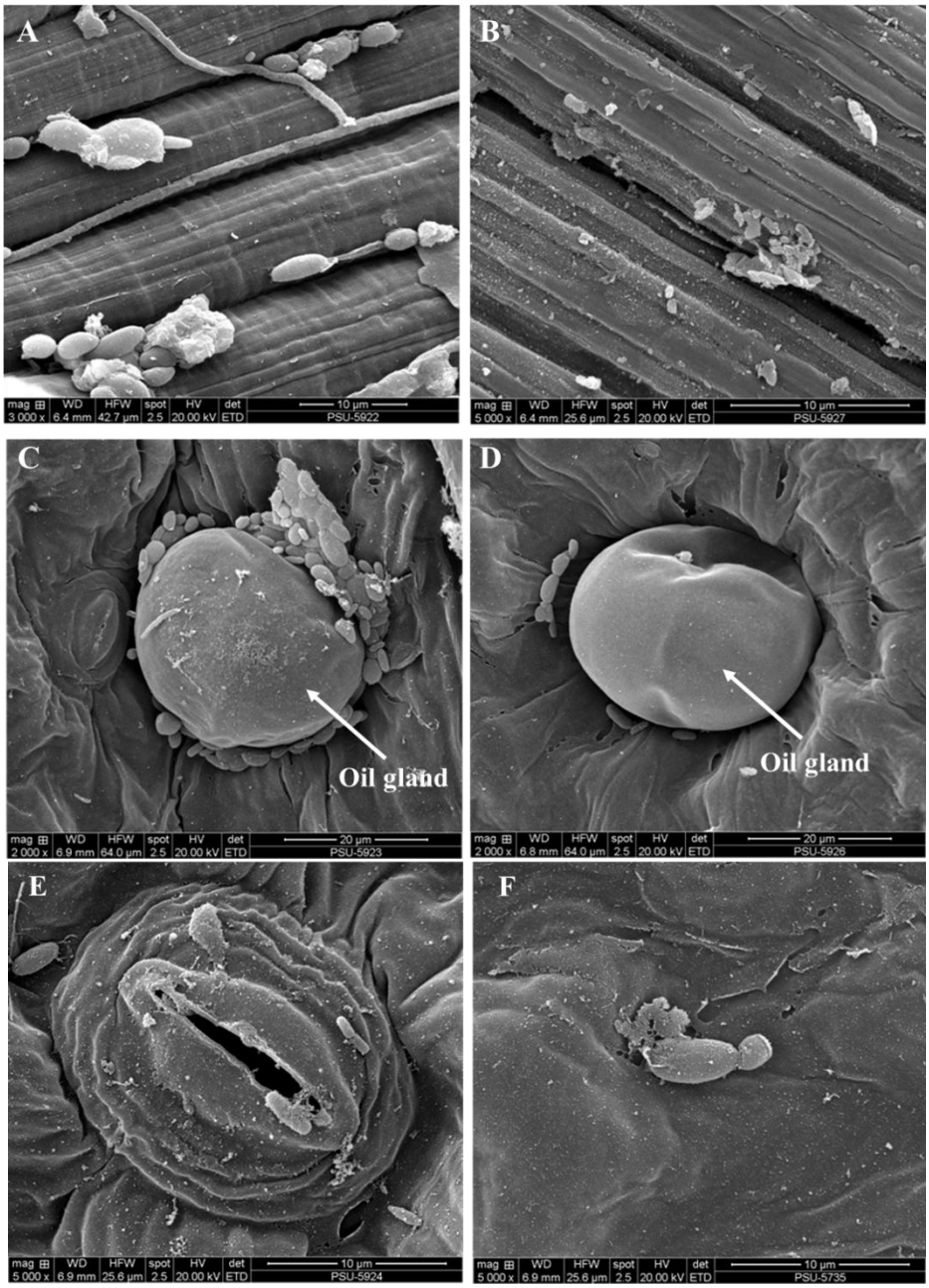
3.2 โครงสร้างจุลภาคของ *E. coli* และ *S.* Typhimurium บนใบโหระพา

โครงสร้างจุลภาคของ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ดังแสดงในรูปที่ 4 หลังจากแช่ด้วยกรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่ 50° C เปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้แช่ เซลล์ของชุดที่ไม่ได้แช่จะมีลักษณะเป็นแท่งปกติ ไม่มีการฉีกขาดของพื้นผิวเซลล์ (รูปที่ 4A และ รูปที่ 4C) ในขณะที่พื้นผิวเซลล์ของชุดที่แช่มีความเสียหายที่เห็นได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 4B และรูปที่ 4D) การใช้กรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางส่งผลให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของเชื้อ *E. coli* ซึ่งมีผลนำไปสู่การหดตัวและการเหี่ยวย่นของเซลล์ ส่วนรูขนาดใหญ่ที่เกิดบนเซลล์ของ *S.* Typhimurium มีผลทำให้เซลล์เสียหายเกิดการรั่วไหลของสารที่อยู่ภายในเซลล์ Wang et al. (2015) ได้ศึกษาเกี่ยวกับกลไกการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียของกรดแลกติกในด้านคุณลักษณะด้านกายภาพและจุลภาพในเชื้อ *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* และ *Listeria monocytogenes* พบว่ากรดแลกติกมีผลทำให้เกิดการรั่วไหลของโปรตีนออกจากเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว จากการศึกษาในการทดลองนี้พบว่าการใช้กรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางอาจมีผลทำให้การทำงานการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ภายนอกเปลี่ยนแปลงไป เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของสารอาหารที่อยู่ภายในเซลล์ ดังนั้นการใช้กรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจึงมีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์สดได้ ส่วนใน รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างจุลภาคของก้านและใบของโหระพา ในชุดควบคุม ((ไม่ได้แช่) ในรูปที่ 5A และ 5C) จะเห็นว่าจะมีช่องว่างบนพื้นผิวของก้านใบ และรอบๆ ต่อมน้ำมันของใบ ซึ่งโหระพาจะมีต่อมน้ำมันแพร่กระจายอยู่ทั่วไปบนใบ ช่องว่างระหว่างต่อมน้ำมันและพื้นผิวของใบโดยรอบเป็นที่ยึดเกาะที่ดีสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการผสมกันหลากหลายชนิด เช่น กลุ่มเชื้อ *S.* Typhimurium ที่มีแนวโน้มกระจายตัวโคโลนีบนผนังปากใบของผักกาดหอม (Jahid et al., 2014, 2015; Kroupitski et al., 2011) อย่างไรก็ตาม ในโหระพาเชื้อจุลินทรีย์ดู

จะยึดเกาะรอบๆ บริเวณต่อมน้ำมันมากกว่าบริเวณปากใบ โหระพาเป็นพืชสมุนไพรที่มีอายุสั้น เนื่องจากเป็นพืชที่เสื่อมคุณภาพได้ง่ายจากการสูญเสียปริมาณน้ำภายเซลล์ (Aharoni et al., 2010; Bekhradi et al., 2015) เซลล์คุมบนปากใบ (grade cell) จะปิดหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ (Thomson, 2005) นอกจากนี้แล้ว ส่วนใหญ่ปากใบจะปิดลงเมื่อต้องเผชิญกับเชื้อจุลินทรีย์ (Melotto et al., 2008) เมื่อปากใบปิดลงจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ยึดเกาะได้ยากขึ้น (รูปที่ 5E) ส่วนรูปที่ 5B (ก้านใบ) และ 5D (ใบ) เป็นภาพหลังจากแช่ด้วยกรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่ 50° C รูปที่ 5B จะเห็นว่าเชื้อจุลินทรีย์บนก้านใบถูกกำจัดออกและจุลินทรีย์บางเซลล์ได้รับความเสียหาย (รูปที่ 5F) ดังนั้นการใช้กรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่ 50° C สามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถึงแม้ว่าจะมีช่องว่างเล็กๆ ระหว่างต่อมน้ำมันและพื้นผิวของใบ (รูปที่ 5D) Bermúdez-Aguirre et al. (2013) รายงานว่าหลังจากแช่ผักกาดหอมซึ่งมีพื้นผิวที่มีรูพรุนและหยาบ ด้วยน้ำโอโซน 5 ppm นาน 15 นาที พบว่ายังคงมีเซลล์ของแบคทีเรียลงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อของผักกาดหอม พื้นผิวที่มีความหยาบ เช่น แครอท หรือผักกาดหอม ส่งผลให้แบคทีเรียได้รับการป้องกันจากรอยพับของชั้นเนื้อเยื่อพืชนั้น และเป็นการลดประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการใช้กรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางนาน 1 นาที แสดงให้เห็นว่ามีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้น้ำโอโซน 5 ppm นาน 15 นาที



รูปที่ 4. Scanning electron micrographs (SEM) of E. coli and S. Typhimurium cells (in vitro). Non-treated E. coli (A) and S. Typhimurium (C); E. coli (B) and S. Typhimurium (D) after being treated with 2% LA in combination with mild heat at 50˚C.



รูปที่ 5 Scanning electron micrographs (SEM) of sweet basil petiole and leaf. Non-treated sweet basil petiole (A), leaf (C) and stomata (E); Sweet basil petiole (B), leaf (D) and destroyed microorganism (F) after being treated with 2% LA in combination with mild heat at 50˚C

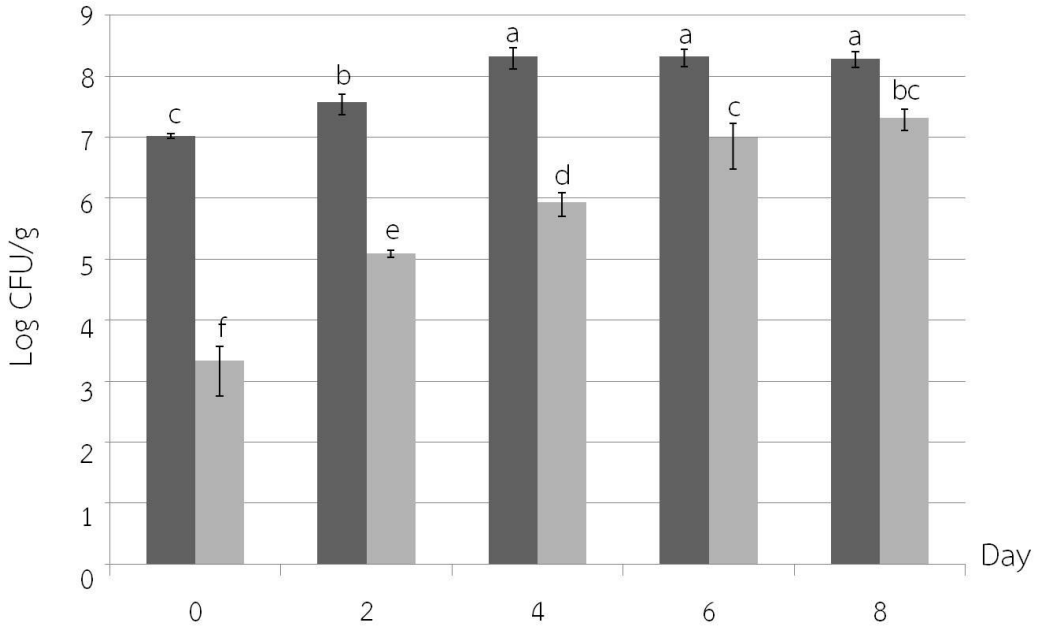
ตอนที่ 4 การศึกษาผลของการใช้สารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับความร้อนระดับกลางต่อการเปลี่ยนแปลงของโหระพาในระหว่างการเก็บรักษา

เมื่อนำเอาตัวอย่างโหระพามาล้างในสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 1 นาที แล้วนำโหระพาที่ผ่านการล้างเบื้องต้นไปเก็บรักษาในถุงโพลีเอทิลีนเจาะรู 4 รู ขนาดบรรจุ 50 กรัม ที่อุณหภูมิ 12.5 °C พบว่า

4.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์

จากภาพที่ 6 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในโหระพาทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการล้างในสารละลายกรดแลก-ติกร่วมกับการใช้อุณหภูมิในระดับกลางที่ 50° C จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แต่จากผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า การล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับการใช้อุณหภูมิในระดับกลางที่ 50° C นั้นสามารถช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในเบื้องต้นได้เยอะถึงประมาณ 3.5 log units ซึ่งทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานั้นยังคงมีปริมาณน้อยกว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในโหระพาที่ยังไม่ได้ผ่านการล้างเมื่อระยะเวลาผ่านไปถึง 8 วัน แต่เมื่อสังเกตุดูอัตราการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ในชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการล้างในสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง จะเห็นได้ว่าอัตราการเพิ่มของเชื้อจุลินทรีย์ในชุดควบคุมจะมีอัตราที่ช้ากว่า ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการใช้ความร้อนระดับกลางในระดับ 50° C อาจจะไม่ส่งผลอย่างชัดเจนต่อเนื้อเยื่อของใบโหระพาในช่วงแรกของการล้าง แต่เมื่อเก็บรักษาในระยะเวลาที่นานขึ้น อาจจะทำให้ผลของการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางปรากฏขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้เชื่อมโยงได้กับอัตราการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาลที่จะพบในอัตราที่สูงในโหระพาที่ผ่านการล้างในสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง อัตราการสูญเสียน้ำหนักมักจะเกิดจากการสูญเสียปริมาณน้ำในตัวอย่าง ซึ่งความชื้นดังกล่าวอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้

ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงขึ้น ในขณะเดียวกัน การเกิดสีน้ำตาลที่สูงขึ้นอาจจะเกี่ยวข้องกับ chilling injury ซึ่งอาจจะมีผลมาจากค่าการเบี่ยงเบนของอุณหภูมิในตู้แช่ที่ต่ำกว่า 12° C หรืออาจจะมีผลมาจากการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลาง ซึ่ง chilling injury มีผลเกี่ยวเนื่องถึงอาการบาดเจ็บของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช (Wongsheree et al., 2009) ซึ่งอาจจะส่งผลให้ปริมาณสารอาหารภายในเซลล์รั่วไหลออกมา จึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่ หรือการการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางอาจจะส่งผลบางอย่างต่อลักษณะของใบโหระพาจึงทำให้เกิดการบาดเจ็บของเยื่อหุ้มเซลล์โหระพาเกิดขึ้น



ภาพที่ 6 Visible count of indigenous mesophilic bacteria in non-treated (■) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C (■) during stored at 12 °C for 8 days. Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=3). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

4.2 คุณภาพทางกายภาพ

คุณภาพทางกายภาพอันได้แก่ ร้อยละการหลุดร่วง ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาล จากการทดลองพบว่าร้อยละการหลุดร่วงของโหระพาที่ผ่านการล้างในสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางจะมีร้อยละการหลุดร่วงของใบน้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p < 0.05$) โดยโหระพาในชุดควบคุมจะเริ่มหลุดร่วงตั้งแต่วันที่ 4 ในขณะที่โหระพาในชุดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางจะเริ่มมีการหลุดร่วงในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา โดยทั่วไปการหลุดร่วงของใบจะเกี่ยวข้องกับปริมาณเอทิลีนที่พืชผลิตขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นอาจจะอนุมานได้ว่าการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางอาจจะส่งผลให้การผลิตหรือการปลดปล่อยเอทิลีนของโหระพามีในปริมาณที่น้อยลง จากที่ตามปกติโหระพาได้รับการรายงานว่าเป็นพืชที่มีการผลิตเอทิลีนในปริมาณที่น้อยมากอยู่แล้ว (USDA, 2016)

ตารางที่ 2 Percentage of falling leaves of sweet basil stored at 12±1° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	0	8.0 ± 0.1^{d}	11.3 ± 0.1^{b}	13.2 ± 0.2^{a}
LA treated	0	0	0	5.0 ± 0.2^{e}	9.4 ± 0.3^{c}

ตารางที่ 3 Percentage of weight loss of sweet basil stored at 12±1° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	1.9 ± 0.1^{c}	1.3 ± 0.1^{d}	0.59 ± 0.1^{e}	5.37 ± 0.1^{a}
LA treated	0	3.2 ± 0.1^{b}	2.8 ± 0.1^{b}	3.1 ± 0.2^{b}	5.1 ± 0.3^{a}

ตารางที่ 4 Percentage of browning leaves of sweet basil stored at 12±1° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	10.0 ± 0.0^{e}	10.0 ± 0.1^{e}	33.3 ± 2.7^{c}	86.7 ± 0.1^{a}
LA treated	0	20.0 ± 0.0^{d}	20.0 ± 0.0^{d}	53.2 ± 5.8^{b}	90.0 ± 5.1^{a}

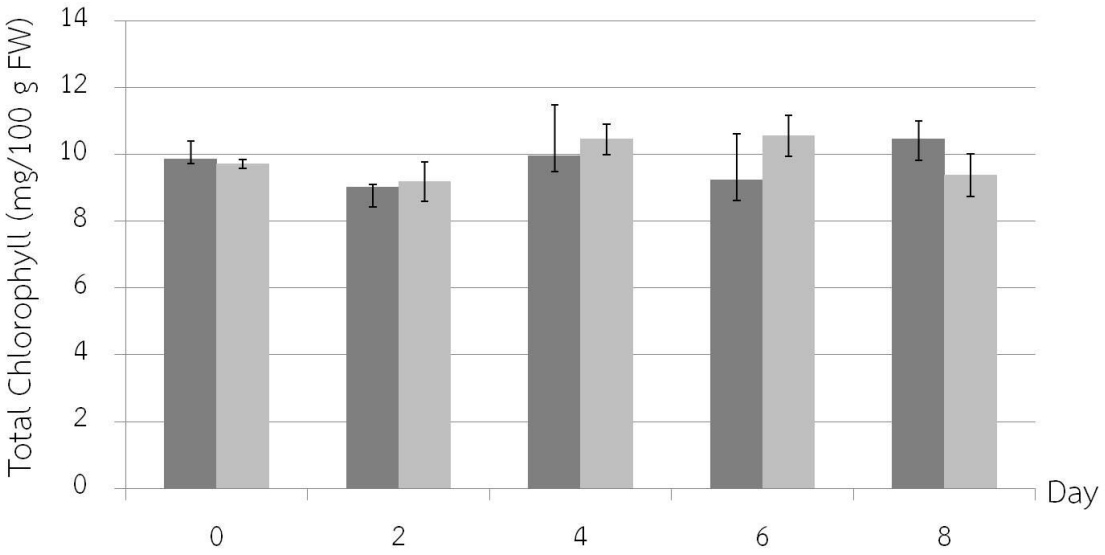
ส่วนผลร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาลในโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12.5 ° C พบว่า โหระพาในชุดควบคุมจะมีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาลที่ต่ำกว่าชุดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p < 0.05$) ตลอดถึงวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ส่วนในวันที่ 8 ของการเก็บรักษานั้นโหระพาทั้งสองชุดการทดลองให้ค่าที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ และเมื่อศึกษาถึงร้อยละการสูญเสียน้ำหนักเพียงอย่างเดียวจะพบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 8 วัน ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักจะเกิดขึ้นเพียงร้อยละ 5 เท่านั้น แต่เมื่อศึกษาถึงผลของการเกิดสีน้ำตาลในโหระพา จะพบว่าโหระพาในชุดควบคุมจะสามารถเก็บรักษาได้จนถึงวันที่ 6 ส่วนโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางนั้น จะสามารถเก็บรักษาได้ถึงวันที่ 4 เท่านั้นเนื่องจากค่าร้อยละการเกิดสีน้ำตาลจะเกิดกว่า 50 % ซึ่งถือว่าไม่เป็นที่ยอมรับ ซึ่งจากรายงานของ Hassan and Mahfouz (2010) พบว่าโหระพาที่เก็บที่อุณหภูมิ 15° C จะมีอายุการเก็บรักษาเพียงแค่ 3 วันเท่านั้น และโหระพาที่ผ่านการรมด้วย 1-MCP 0.2 g/m^3 จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้เป็น 5 วัน ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่า การเก็บโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางนั้น ถึงแม้จะมีอายุการเก็บรักษาสั้นกว่าชุดควบคุมที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่ก็สามารถยืดอายุ

การเก็บรักษาได้มากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C หรืออาจจะมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้ 1-MCP 0.2 g/m^3

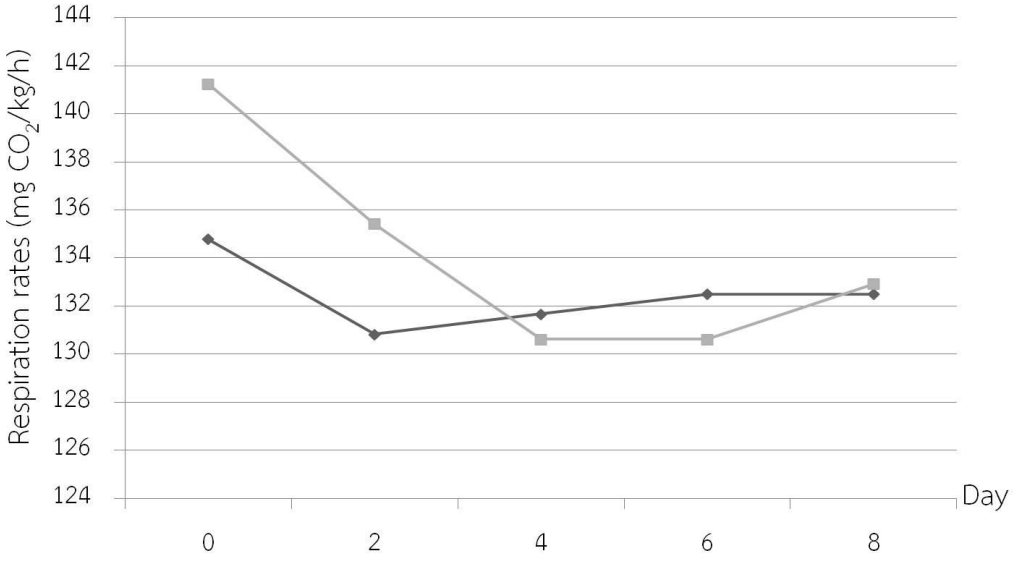
ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักนั้นมักจะเกิดจากการสูญเสียปริมาณน้ำในตัวอย่าง ในขณะเดียวกันการเกิดสีน้ำตาลในโหระพามักจะเกี่ยวข้องกับ chilling injury ซึ่งสาเหตุของการเกิด chilling injury นั้นอาจจะมีผลมาจากค่าการเบี่ยงเบนของอุณหภูมิในตู้แช่ที่ต่ำกว่า 12° C หรืออาจจะเกิดจากการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลาง ซึ่งอาจจะส่งผลต่อเซลล์พืชบางประการ ทำให้เกิดอาการบาดเจ็บของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช ซึ่งอาจจะส่งผลให้ปริมาณสารอาหารผ่านในเซลล์รั่วไหลออกมา รวมถึงปริมาณน้ำในเซลล์ด้วย จากสาเหตุข้างต้นจึงอาจจะเป็นผลให้เกิดร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและการเกิดสีน้ำตาลในอัตราที่สูงกว่าปกติ ซึ่งผลของการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางที่อาจจะส่งผลบางประการต่อลักษณะของใบโหระพานั้น จำเป็นจะต้องมีการศึกษาในเชิงสรีรวิทยาของพืชต่อไป จึงจะสามารถอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้

4.3 คุณภาพทางเคมี

ปัจจัยคุณภาพทางเคมีที่ทำการศึกษาในการทดลองนี้คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม ปริมาณการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ และอัตราการหายใจ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของโหระพาทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 วัน ส่วนอัตราการหายใจนั้นทำการทดลองโดยวัดปริมาณก๊าซ CO_2 ที่เกิดขึ้นภายหลังการนำใบโหระพามาบรรจุในระบบปิดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าในช่วง 2 วันแรกของการเก็บรักษา โหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อน

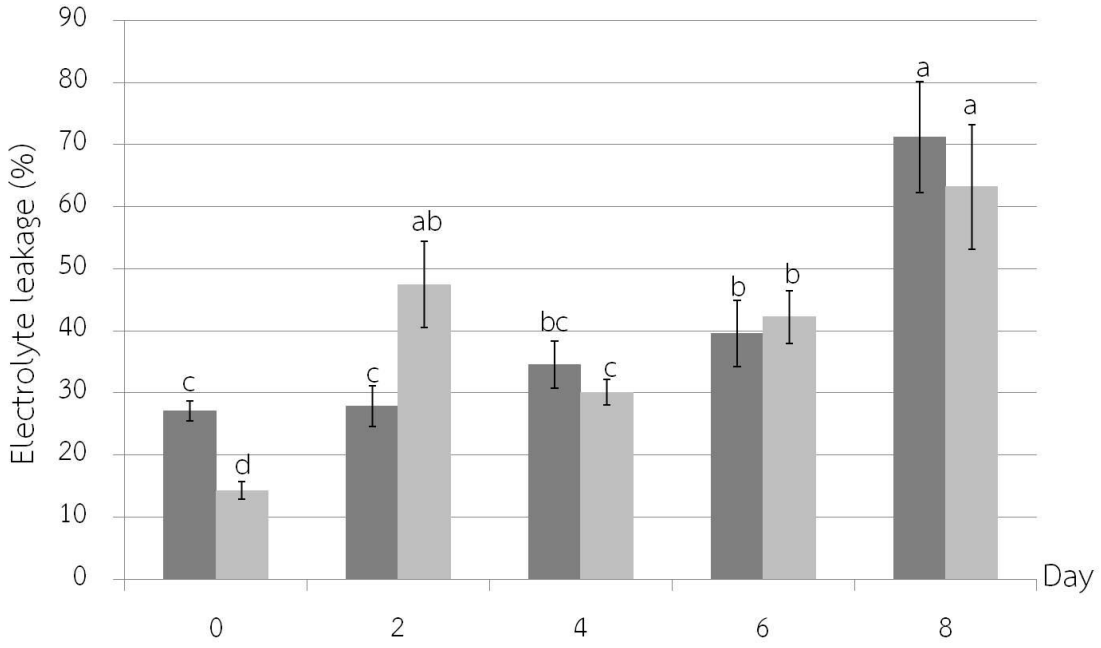


ภาพที่ 7 Total chlorophyll content in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 ˚C (during stored at 12 ℃ for 8 days.



ภาพที่ 8 Respiration rate in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 ˚C (during stored at 12 ℃ for 8 days.

ในระดับกลางจะมีอัตราการหายใจที่สูงกว่าในโหระพาที่ไม่ผ่านการล้างใดเลย และเมื่อวันที่ 4 ของการเก็บรักษาอัตราการหายใจจะลดลงมาในปริมาณที่ใกล้เคียงกับอัตราการหายใจของชุดควบคุม จากการทดลองข้างต้นจึงอาจจะสามารถสันนิษฐานได้ว่า การล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางน่าจะส่งผลบางประการต่อเซลล์ของใบโหระพา ซึ่งอาจจะทำให้ส่งผลมาถึงอัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของเซลล์พืชด้วย



ภาพที่ 9 Percentage of electrolyte leakage in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 ˚C ( ) during stored at 12 ℃ for 8 days. Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=3). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

เมื่อศึกษาผลของร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์พืช ช่วงวันที่ 0 หรือทันทีภายหลังการล้างโหระพาด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางจะพบว่าร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ของโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางจะต่ำกว่าในชุดควบคุม แต่เมื่อเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านสภาวะการล้างดังกล่าวไปเพียง 2 วันจะพบว่าร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นจนมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญ ซึ่งจากผลการทดลองนี้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดที่น้ำตาลที่เพิ่มสูงขึ้น และนอกจากนี้การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ตลอดการเก็บรักษา ซึ่งข้อมูลการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์โหระพานั้นสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองของ Cozzolino et al. (2016) ซึ่งพบว่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์นั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สอดคล้องกับร้อยละการเกิดสีน้ำตาลในใบโหระพา การวัดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์นั้นเป็นการวัดความสมบรูณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ทางอ้อม (Martínez-Sánchez et al., 2011) และยังสามารถใช้เป็นจุดประสงค์ในการวัด chilling injury ของใบผักได้อีกด้วย (Kader, 2013) การเกิด chilling injury มีปัจจัยหลักมาจากการสูญเสียความสมบรูณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วไหลของอิออนและสารเมตาบอไรซ์ภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายและเกิดการเน่าเสียที่เร็วขึ้น (Kays, 1991; Larcher, 2006) อีกทั้งข้อมูลการรั่วไหลการสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ยังสามารถนำมาใช้ในการบ่งบอกความไวต่อการเกิด chilling injury ของโหระพาแต่ละพันธุ์ได้อีกด้วย (Cozzolino et al., 2016)

4.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

Table 5 The observed scores of sweet basil packed in polyethylene bag at 12.5±1 °C (Overall difference from control method)

Storage time Day	Appearance		Color	
	control	LA-treated	control	LA-treated
0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0
2	9.12±1.1	7.82±2.1	8.72±1.1	7.23±0.5
4	8.76±3.1	6.52±2.3	7.91±2.1	6.39±3.1
6	5.41±1.4	2.12±2.7	5.47±2.5	2.74±1.5
8	3.75±2.3	1.23±1.4	2.13±2.1	1.31±1.0

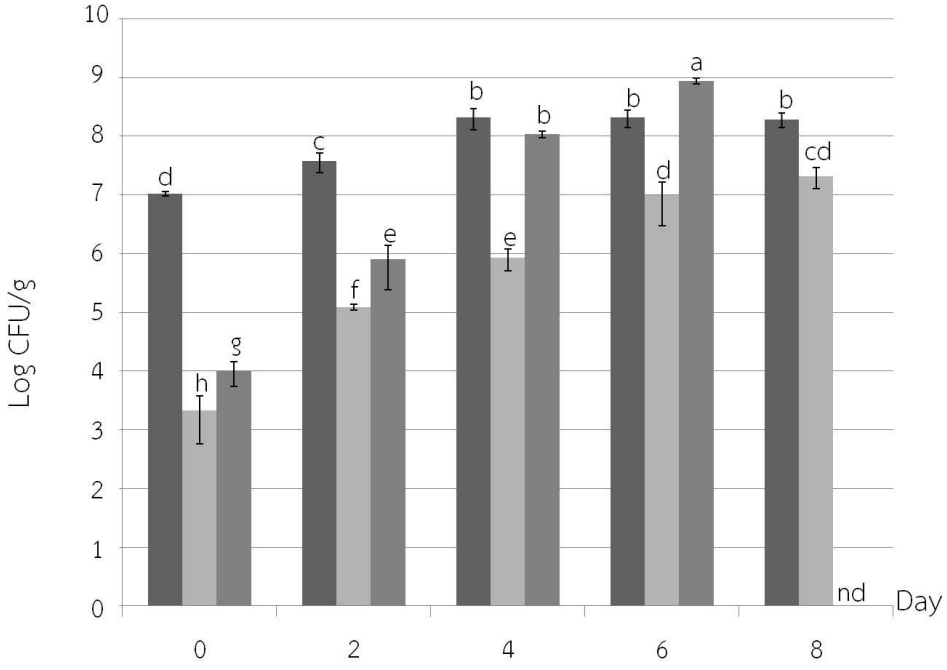
Acceptance score: ≥ 5

จากผลการทดลองพบว่า คะแนนคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางลักษณะปรากฏและสี ในวันแรกของการเก็บรักษา คะแนนของโหระพาชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางจะอยู่ในระดับคะแนนที่เท่ากัน คือไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ระหว่างชุดที่ผ่านและไม่ผ่านการล้าง แต่เมื่อผ่านการเก็บรักษาจะพบว่าคะแนนการยอมรับของผู้ทดสอบจะให้การยอมรับในชุดตัวอย่างชุดควบคุมมากกว่า ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการเกิดสีน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในชุดตัวอย่างที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลาง โดยชุดตัวอย่างควบคุมจะให้การยอมรับถึงวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ในขณะที่โหระพาชุดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางจะได้รับการยอมรับถึงแค่วันที่ 4 เท่านั้น

ตอนที่ 5 การศึกษาสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลาง

นำเอาตัวอย่างโหระพาที่ผ่านล้างในสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 50° C นาน 1 นาที แล้วนำโหระพาที่ได้บรรจุลงในถุงโพลีเอทิลีนเจาะรู 4 รู ขนาดบรรจุ 50 กรัม แล้วนำไปเก็บรักษาเปรียบเทียบระหว่างที่อุณหภูมิ 12° C กับ 15° C พบว่า

5.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์



ภาพที่ 10 Visible count of indigenous mesophilic bacteria in non-treated (■) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 ˚C during stored at 12 ℃ (■) and 15 ℃ (■). Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=3). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

จากภาพที่ 10 พบว่าการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง โดยมีอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 12° C จะให้ผลในการชะลอการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปได้ดีกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15° C โดยในช่วงแรกของการเก็บรักษา (วันที่ 0-2) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในโหระพาที่เก็บรักษาที่ 15° C ยังคงมีปริมาณที่ต่ำกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญ แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 4 จะเห็นว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณเท่ากับในชุดควบคุมและมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเกินกว่าในชุดควบคุมในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา อีกทั้งเมื่อเก็บไว้ที่ 15° C โหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจะมีอายุการเก็บรักษาได้เพียงถึงวันที่ 6 เท่านั้น ในวันที่ 8 โหระพาที่ผ่านการล้างในสภาวะดังกล่าวได้เสื่อมคุณภาพไปแล้ว จึงไม่สามารถตรวจสอบคุณภาพได้

5.2 คุณภาพทางกายภาพ

ตารางที่ 6 Percentage of falling leaves of sweet basil stored at 12° C and 15° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	0	8.0 ± 0.1^{e}	11.3 ± 0.1^{c}	13.2 ± 0.2^{a}
LA treated (12)	0	0	0	5.0 ± 0.2^{g}	9.4 ± 0.3^{d}
LA treated (15)	0	0.3 ± 0.0^{h}	7.7 ± 0.1^{f}	12.3 ± 0.2^{b}	nd

ร้อยละการหลุดร่วงของใบโหระพา จากตารางที่ 6 จะพบว่าโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15° C นั้นจะเริ่มมีการหลุดร่วงของใบตั้งแต่วันที่ 2 ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มหลุดร่วงในวันที่ 4 และชุดที่นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 12° C จะเริ่มหลุดร่วงวันที่ 6 ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 7 และ 8 คือ ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาลควบคู่ไปด้วย จะยิ่งเห็นได้ชัดเจนว่า การเก็บรักษาโหระพาที่อุณหภูมิ 15° C นั้นจะก่อให้เกิด

ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักที่สูงมาก โดยเพียงวันที่ 2 ของการเก็บรักษาก็มีร้อยละการสูญเสียน้ำหนักถึง 8.3 % ในขณะที่การเก็บรักษาโหระพาทั้งที่ผ่านการล้างและไม่ผ่านการล้างสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 12° C มีร้อยละการสูญเสียน้ำหนักเพียง 5 เท่านั้น อีกทั้งเมื่อพิจารณาจากร้อยละการเกิดสีน้ำตาลพบว่า ในช่วงแรกของการเก็บรักษา (0 -2 วัน) การเก็บรักษาโหระพาที่ 15° C จะไม่พบร้อยละการเกิดสีน้ำตาล แต่เมื่อผ่านวันที่ 4 ของการเก็บรักษาไป จะพบว่าร้อยละการเกิดสีน้ำตาลในโหระพาเพิ่มขึ้นสูงมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C จากการเปรียบเทียบอุณหภูมิการเก็บรักษาเบื้องต้น จะพบว่าการเก็บรักษาโหระพาทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการล้างในสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C นั้นจะสามารถรักษาคุณภาพทางกายภาพของโหระพาได้ดีกว่า

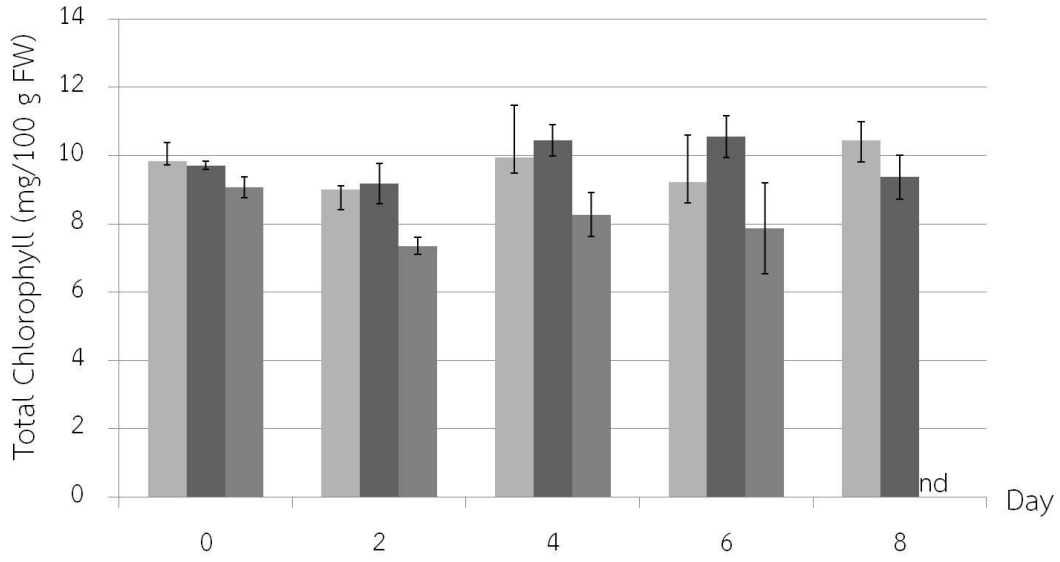
ตารางที่ 7 Percentage of weight loss of sweet basil stored at 12° C and 15° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	1.9 ± 0.1^{g}	1.3 ± 0.1^{h}	0.59 ± 0.1^{i}	5.37 ± 0.1^{d}
LA treated (12)	0	3.2 ± 0.1^{e}	2.8 ± 0.1^{f}	3.1 ± 0.2^{ef}	5.1 ± 0.3^{d}
LA treaded (15)	0	8.3 ± 0.1^{c}	12.1 ± 0.1^{b}	20.8 ± 0.2^{a}	nd

ตารางที่ 8 Percentage of browning leaves of sweet basil stored at 12° C and 15° C

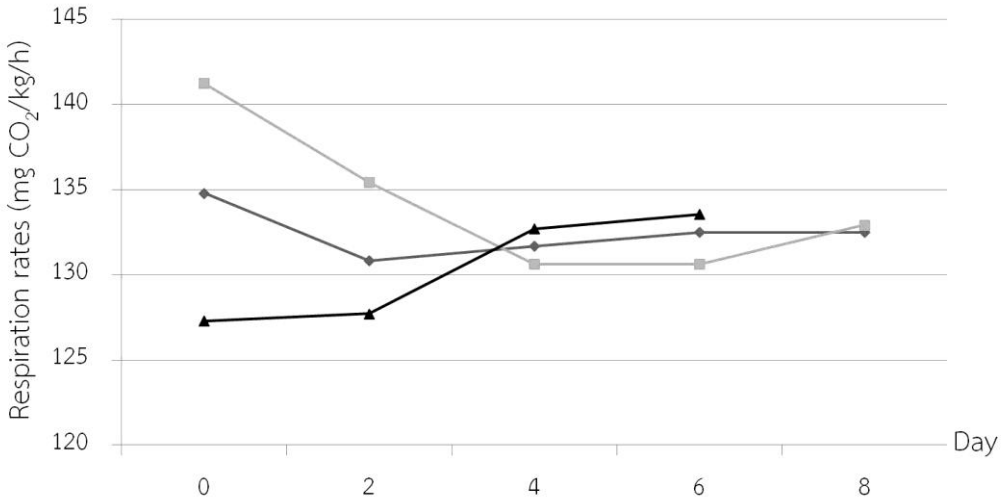
Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	10.0 ± 0.0^{f}	10.0 ± 0.1^{f}	33.3 ± 2.7^{d}	86.7 ± 0.1^{a}
LA treated (12)	0	20.0 ± 0.0^{e}	20.0 ± 0.0^{e}	53.2 ± 5.8^{c}	90.0 ± 5.1^{a}
LA treated (15)	0	0.0 ± 0.0^{g}	30.0 ± 0.0^{d}	80.0 ± 1.2^{b}	nd

5.3 คุณภาพทางเคมี



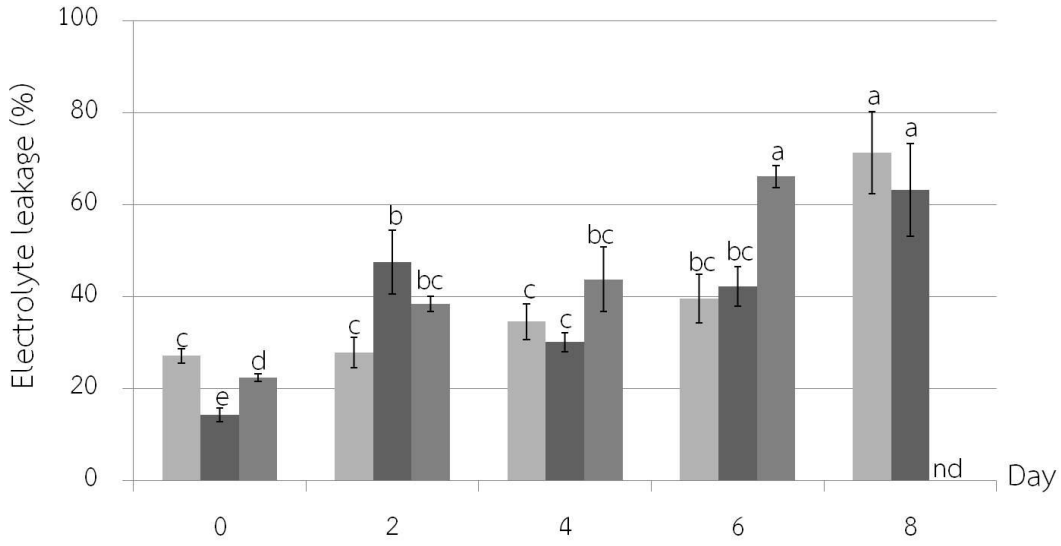
ภาพที่ 11 Total chlorophyll content in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C during stored at 12 °C (and 15 °C ( )

จากภาพที่ 11 ผลของการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของการเก็บรักษาที่ 12 และ 15° C พบว่า วันที่ 0 ถึง 4 ของการเก็บรักษาโหระพา โหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C จะมีผลของคลอโรฟิลล์รวมต่ำกว่าในชุดควบคุมและชุดที่เก็บที่อุณหภูมิ 12° C อย่างมีนัยยะสำคัญ และปริมาณคลอโรฟิลล์รวมก็มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา แต่จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C จะมีแนวโน้มในการลดลงที่ชัดเจนกว่าชุดของโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C โดยทั่วไปการสูญเสียปริมาณคลอโรฟิลล์จะบ่งบอกถึงการชราภาพ การป้องกันการสูญเสียคลอโรฟิลล์สามารถทำได้โดยการลดอุณหภูมิของการเก็บรักษา (จริงแท้ ศิริพานิช, 2542) ซึ่งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C อาจจะเป็นการเร่งให้คลอโรฟิลล์เสื่อมสภาพได้เร็วกว่าที่ 12° C อีกทั้งอุณหภูมิที่สูงกว่าอาจจะทำให้โหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางเข้าสู่ระยะชราภาพได้เร็วกว่าอีกด้วย



ภาพที่ 12 Total chlorophyll content in non-treated (◆) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 ˚C during stored at 12 ℃ (■) and 15 ℃ (▲)

จากภาพที่ 12 จะพบว่าอัตราการหายใจของโหระพาเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C จะต่ำกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C ซึ่ง จริงแท้ ศิริพานิช (2542) กล่าวว่า อัตราการหายใจของพืชเมืองร้อนบางชนิดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิต่ำลง ซึ่งอาการข้างต้นอาจจะมีผลมาจากการเกิด chilling injury ซึ่งโหระพาเป็นหนึ่งในพืชที่เกิดอาการสะท้านหนาวได้ง่าย จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าในช่วงแรกของการเก็บรักษา โหระพาที่เก็บที่อุณหภูมิ 12° C จะเกิดอัตราการหายใจที่เพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น อัตราการหายใจของโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C ก็ยิ่งเพิ่มมากขึ้น โดยในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาจะมีอัตราการหายใจเพิ่มสูงมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C ในขณะที่ โหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C มีอัตราการหายใจลดลง ปรากฏการณ์ข้างต้นอาจจะมีผลมาจากการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางซึ่งอาจจะส่งผลบางประการต่อสรีรวิทยาของใบโหระพา



ภาพที่ 13 Percentage of electrolyte leakage in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50 ˚C during stored at 12 ℃ ( ) and 15 ℃ ( ). Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=3). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

ภาพที่ 13 แสดงร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ พบว่าวันแรกของการเก็บรักษาปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ของโหระพาผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจะมีค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ที่ต่ำกว่าชุดควบคุม แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มมากขึ้น จะพบว่าปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ของโหระพาผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจะมีค่าสูงเกินกว่าชุดควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C จะเพิ่มมากสูงขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ

5.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

Table 9 The observed scores of sweet basil packed in polyethylene bag at 12 and 15℃

Storage time Day	Appearance			Color		
	control	LA-treated (12 ℃)	LA-treated (15 ℃)	control	LA-treated (12 ℃)	LA-treated (15 ℃)
0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0
2	9.12±1.1	7.82±2.1	7.76±2.1	8.72±1.1	7.23±0.5	7.12±1.1
4	8.76±3.1	6.52±2.3	5.52±2.3	7.91±2.1	6.39±3.1	5.37±1.5
6	5.41±1.4	2.12±2.7	1.04±2.7	5.47±2.5	2.74±1.5	1.07±1.8
8	3.75±2.3	1.23±1.4	nd	2.13±2.1	1.31±1.0	nd

nd: not detectable

acceptance score: ≥ 5

จากตารางที่ 9 คุณลักษณะปรากฏและสีของโหระพาทุกชุดการทดลอง ในการเก็บรักษาวันแรกยังได้รับคะแนนการยอมรับในระดับสูง แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น พบว่าการเก็บรักษาโหระพาที่อุณหภูมิ 12° C ให้คุณลักษณะปรากฏและสีในคะแนนการยอมรับที่สูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C แต่ทั้งนี้และทั้งนั้นระดับคะแนนการยอมรับของโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจะมีอายุการเก็บรักษาเพียงแค่ 4 วันเท่านั้น ในขณะที่โหระพาชุดควบคุมจะมีค่าการยอมรับในอายุการเก็บรักษาถึง 6 วัน

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการใช้น้ำเปล่า สารละลายคลอรีน (200 ppm) สารละลายกรดแลกติก 2% และสารละลายน้ำอิเลกโทรไลต์ในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในโหระพา พบว่าสารละลายคลอรีนให้ผลการลดเชื้อที่ดีที่สุด รองลงมาคือสารละลายกรดแลกติก แต่เนื่องจากว่าการใช้สารละลายคลอรีนในการล้างผลิตผลผักผลไม้สด อาจจะก่อให้เกิดอนุพันธ์สารตกค้างที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงมะเร็งได้ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้สารละลายกรดแลกติกในการทดลองถัดไป ซึ่งเป็นการนำสารละลายกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้ร่วมกับความร้อนระดับต่ำ พบว่าการแช่โหระพาในสารละลายกรดแลกติก 50° C เป็นเวลา 1 นาทีแล้วตามด้วยสารแช่ในน้ำกรองที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที สามารถช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไป เชื้อ *E. coli* และ *S.* Typhimurium ได้ 4.62 log cfu/g 3.57 log cfu/g และ 3.78 log cfu/g ตามลำดับ จากนั้นจึงนำโหระพาที่ผ่านการล้างและแช่ในสารละลายกรดแลกติกอุณหภูมิ 50° C เป็นเวลา 1 นาทีแล้วตามด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอีก 2 นาที เก็บรักษาในถุง LDPE เจาะรูเพื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12±1° C เป็นระยะเวลา 8 วัน พบว่าโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยกรดแลกติกอุ่นจะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปอยู่ที่ 3 log cfu/g ในวันแรก และจะเพิ่มจำนวนเป็น 7 log cfu/g ในวันที่ 8 ของการเก็บรักษา ในขณะที่โหระพาที่ไม่ผ่านการล้างใดๆเลยจะเพิ่มจาก 7 log cfu/g เป็น 8 log cfu/g ร้อยละการหลุดร่วงของใบและร้อยละการสูญเสียน้ำหนักพบว่าจะเกิดขึ้นในโหระพาที่ไม่ผ่านการล้างใดๆ เลยมากกว่าโหระพาที่ผ่านการแช่ในกรดอุ่น ในขณะที่จะพบร้อยละการเกิดสีน้ำตาลและอัตราการหายใจที่สูงขึ้นมากกว่าในโหระพาที่ผ่านการแช่ในกรดอุ่น ส่วนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณคลอโรฟิลล์และการรั่วไหลของสารละลายอิเลกโทไลต์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ จากนั้นเมื่อศึกษาเปรียบเทียบอุณหภูมิการเก็บรักษาโหระพาข้างต้นเพื่อหาสภาวะอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ดีที่สุดพบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12±1° C สามารถลดอัตราการ

เจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 15° C ร้อยละการร่วงของใบ ร้อยละการสูญเสียน้ำหนัก รวมไปถึงร้อยละการเกิดสีน้ำตาลก็จะพบที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C มากกว่าด้วย และเมื่อตรวจวัดคุณลักษณะปรากฏและคุณภาพสีโดยผ่านการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าโหระพาที่ไม่ผ่านการล้างใดๆ เลยจะมีอายุการเก็บรักษาได้ประมาณ 6 วัน ในขณะที่ถ้านำโหระพามาแช่ในสภาวะกรดอุ่นตามด้วยการแช่น้ำจะทำให้อายุการเก็บรักษาโหระพาสั้นลงโดยเหลือเพียงประมาท 4 วันเท่านั้น

ดังนั้นการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางในการล้างโหระพานั้น สามารถช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่สภาวะการล้างดังกล่าวส่งผลต่ออายุการเก็บรักษาของโหระพาสด ซึ่งส่งผลต่อคุณลักษณะหลายประการที่ทำให้บ่งชี้ได้ว่าสภาวะการล้างดังกล่าวส่งผลให้อายุการเก็บรักษาของโหระพาสั้นลง และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบถึงอุณหภูมิการเก็บรักษาที่เหมาะสมกับการเก็บรักษาโหระพา พบว่าอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 12° C ให้ผลการเก็บรักษาที่ดีที่สุด

ภาคผนวก

7.1 สำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว

Food Control 64 (2016) 29–36

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Microbial load reduction of sweet basil using acidic electrolyzed water and lactic acid in combination with mild heat

Dusida Tirawat [a, *], Souwalak Phongpaichit [b], Soottawat Benjakul [a], Punnanee Sumpavapol [a]

[a] Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkla 90112, Thailand
[b] Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkla 90112, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 July 2015
Received in revised form
25 November 2015
Accepted 12 December 2015
Available online 17 December 2015

Keywords:
Acidic electrolyzed water
Lactic acid
Mild heat
Sweet basil
Salmonella Typhimurium
Escherichia coli

ABSTRACT

Sweet basil has been used worldwide as an ingredient for several cuisines. However, it can be contaminated with pathogens; especially *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. are mainly introduced by poor hygiene during harvesting, cleaning, packaging and distribution. This study aimed to study the efficacy of lactic acid (LA) and acidic electrolyzed water (AEW) against mesophilic bacteria on sweet basil. In addition, a combination treatment was also investigated, using mild heat with the selected sanitizer to disinfect sweet basil inoculated with *S.* Typhimurium and *E. coli*. The 2% LA treatment showed high efficiency in microbial decontamination, and mesophilic bacteria were reduced by about 3 log CFU/g. Additionally, the decontamination efficacy of LA increased when combined with mild heat. The use of 2% LA at 50 °C showed the highest microbial reduction in sweet basil, in which mesophilic bacteria, *S.* Typhimurium, and *E. coli* were reduced by 4.62, 3.80 and 3.61 log CFU/g, respectively. These findings indicate that LA can be more effective than AEW in disinfection and provides greater efficiency when combined with mild 50 °C heat.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.), a member of the Lamiaceae or Labiatae family, is a leafy green herb widely used as a food ingredient around the world because of its own unique scent. Sweet basil is a good source of vitamin A, vitamin C, minerals, and phenolic compounds associated with antioxidant capacity (Nguyen, Kwee, & Niemeyer, 2010). Commonly, sweet basil can be consumed as raw or added to cooked food as additional ingredient, depending on culinary practices (Elviss et al., 2009). Fresh produce are contaminated by microorganisms on the surfaces from many sources, such as soil, water, wild animals, birds, and insects. Processing by harvesting, washing, cutting, packaging, and shipping could also create additional contamination. Fresh produce that is rich in essential nutrients and water can provide ideal conditions for the growth of microorganisms, including foodborne pathogens and spoilage microorganisms (Tirawat et al., 2010; Trias, Bañeras, Badosa, & Montesinos, 2008). There are great concerns about microbiological hazards in leafy vegetables, as well as in fresh herbs. Leafy vegetables have consistently been associated with outbreaks of gastrointestinal illnesses (FAO/WHO, 2008). *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. are the most frequently found pathogenic microorganisms in sweet basil. *E. coli* can attach well to leafy structures, which makes it difficult to remove these cells from the surfaces (Bermúdez-Aguirre & Barbosa-Cánovas, 2013; López-Gálvez, Allende, Selma, & Gil, 2009). In general, fresh water or fertilizer used in farming can lead to *Salmonella* spp. contamination of fresh produce (Hanning, Nutt, & Ricke, 2009). In 2006 and 2007, two outbreaks in UK, Denmark, the Netherlands and the US were associated with *Salmonella* spp. contaminated fresh sweet basil (Pakalniskiene et al., 2009; Pezzoli et al., 2008). In the European Union, fresh herbs such as sweet basil, holy basil, mint and coriander must be examined for *E. coli* and *Samonella* spp. contamination before being imported (EC, 2012).

Washing is a most important step in postharvest handling since it helps to remove from the fresh produce surface contaminants such as soil, sewage, and feces that are full of microorganisms. Although water may partly remove microorganisms on the surface in a mechanical way, the addition of chemical sanitizers into the washing water is advisable to reduce the microbial load and to

* Corresponding author.
E-mail address: dusida.t@psu.ac.th (D. Tirawat).

http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.12.015
0956-7135/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

extend the shelf-life of freshly cut produce (Rahman, Ding, & Oh, 2010; Vandekinderen, Devlieghere, De Meulenaer, Ragaert, & Van Camp, 2009). Adding chlorine in the washing water is a conventional method for microbial decontamination of food products, and in the processing lines of food industries. However, the use of chlorine has been related with the formation of carcinogenic chlorinated by-products such as chloramines and trihalomethanes (Abreu, Beirão-da-Costa, Gonçalves, Beirão-da-Costa, & Moldão-Martins, 2003). In some European countries, including Germany, the Netherlands, Switzerland and Belgium, its use for washing fresh-cut produce has been banned (Alegria et al., 2009). Therefore, new sanitizers free of carcinogenicity are required in disinfection of fresh produce.

Many food disinfection methods have been tested in recent years, and microbial inactivation effects by organic acids on fresh vegetables have been reported. Lactic acid (LA) (0.2%–2%) has shown effective results against many pathogens such as *E. coli* O157:H7, *S.* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in fresh produce without affecting the sensory properties (Akbas & Olmez, 2007; Huang & Chen, 2011; Sagong et al., 2011; Uyttendaele, Neyts, Vanderswalmen, Notebaert, & Debevere, 2004; Wang et al., 2013a). The disinfection efficacy of an acid depends on its pKa, on antimicrobial activity of its non-dissociated form, and on specific effects of the acid (Velazquez, Barbini, Escudero, Estrada, & de Guzman, 2009). Acidic electrolyzed water (AEW) has been authorized as a food additive, and its direct use in food is allowed in Japan since 2002 (Issa-Zacharia, Kamitani, Miwa, Muhimbula, & Iwasaki, 2011). Recently, AEW has been increasingly used to decontaminate fresh produce (Koide, Shitanda, Note, & Cao, 2011). AEW has been used effectively to inactivate *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in lettuce, alfalfa seed sprouts and tomato (Bari, Sabina, Isobe, Umemura, & Isshiki, 2003; Kim, Hung, Brackett, & Lin, 2003; Park, Hung, Doyle, Ezeike, & Kim, 2001). Moreover, the combination of a mild heat treatment (40–50 °C) with some sanitizers, such as chlorine and alkaline electrolyzed water, exhibits higher efficiency in microbial load reduction than cold water washing (Delaquis, Stewart, Toivonen, & Moyls, 1999; Koseki, Yoshida, Kamitani, Isobe, & Itoh, 2004). The use of combination methods could be a means to reduce microbial load efficiently in sweet basil. The objectives of this study were to investigate the efficacy of LA and AEW in reduction of indigenous aerobic mesophilic bacteria on sweet basil. In addition, the use of mild heat in combination with the selected sanitizer on disinfection of *E. coli* and *S.* Typhimurium inoculated on sweet basil was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Collection and preparation of sweet basil

Sweet basils used in this study were purchased from a local farm in Hat Yai, Songkhla, Thailand. Harvesting was carried out by hand with a knife. The samples were transported within 1 h to the Department of Food Technology, Prince of Songkla University. Upon arrival, the defects such as yellowing decay and/or bruised leaves and flowers were removed before use.

2.2. Preparation of sanitizers

AEW was generated by Electrolyzed Water Generator (Labo-SCI) (Shibata Biotechnology Inc., Tokyo, Japan). Sodium chloride solution (0.1%) was transferred into Electrolyzed Water Generator chamber. The solution passed through electrodes in the chamber (100–115 V, 50 W, treatment duration 10 min) and AEW (pH 2.5, 2 L) was collected from the outlet with buckets. LA (2%) and sodium hypochlorite (NaClO: 6%) solutions were freshly prepared before use. All percentages above are given by weight.

2.3. Analysis of AEW

Oxidation-reduction potential and pH were determined directly with a pH/ORP meter (FEP20, Mettler Toledo, Switzerland). Available chlorine concentration was determined with iodometric titration.

2.4. Reduction of mesophilic microorganisms by the sanitizers

Sweet basils were treated with each sanitizer by immersing 100 g of sweet basil branches into 2 L of the sanitizer solution (AEW, 2% LA, or 6% NaClO) at room temperature (RT: 25 °C). Samples treated with tap water were used as controls. At designated times (1, 3 and 5 min), the samples were agitated manually and removed from the treatment solution. Then the treated samples were immersed into 1 L of distilled water for 2 min at RT. After draining the samples on a screen for 2 min, they were subjected to determination of mesophilic bacteria counts (MBC).

MBC were determined by aerobic plate counts (BAM, 2001), as follows. Ten grams of sweet basil was mixed with 90 mL of sterile 0.1% peptone water in a stomacher bag, and the solids were broken down on a Stomacher (400 Circulator; Seward, England). Serial dilutions of this suspension were made in 0.1% peptone water and then spread-plated onto plate count agar (PCA), which was incubated at 35 ± 2 °C for 24 h to determine the mesophilic bacteria loads.

2.5. Effects of LA with mild heat on mesophilic microorganisms

Sweet basil branches (100 g) were immersed in 2% LA at 40 °C or 50 °C for 1 min and then immersed into 1 L of distilled water at RT for 2 min. In an alternative treatment, sweet basil branches were immersed in 2% LA at the RT for 1 min, and then immersed in distilled water at 40 °C or 50 °C for 2 min. The samples were drained for 2 min on a plastic tray prior to determining MBC as described in 2.4.

2.6. Effects of LA with mild heat on pathogenic bacteria

2.6.1. Pathogenic bacteria preparation

E. coli O157:H7 DMST 4212 and *S.* Typhimurium DMST 562 used in this study were obtained from the Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi, Thailand (DMST). Both *E. coli* and *S.* Typhimurium were sub-cultured twice in nutrient broth (NB) at 37 °C for 24 h immediately before use as inocula.

Cell collection was by centrifugation (10000 g, 10 min, 4 °C), and each pellet was washed twice with sterile 0.85% NaCl solution, and then resuspended in 5 mL of sterile 0.85% NaCl solution. The inocula were suspended into 1 L of sterile 0.85% NaCl solution with the final cell concentration of approximately 7–9 log CFU mL^{-1}.

2.6.2. Challenging pathogenic bacteria

Sweet basil branches (100 g) were dipped in 1 L of inoculum suspension at RT for 5 min, in a safety cabinet, and then excess solution was drained on a plastic tray. The sweet basil was allowed to stand in the safety cabinet at RT for 30 min. Then the inoculated sweet basil was dipped in 2% LA (50 °C) for 1 min, and then immersed into distilled water (at RT) for 2 min. In an alternative tested, the inoculated sweet basil was immersed in 2% LA at RT for 1 min and then immersed in distilled water (50 °C) for 2 min. After treatment the samples were immediately subjected to analysis of

pathogenic bacteria.

2.6.3. Determination of pathogenic bacterial counts

Appropriately diluted sample was spread on Levine-Eosin Methylene Blue (L-EMB) or Bismuth sulfite (BS) agar plates to determine *E. coli* or *S.* Typhimurium, respectively. All plates were incubated at 35 °C for 24–48 h before colony counting.

2.7. Microscopic study of treated sweet basil

Non-treated control samples and samples treated with 2% LA (50 °C), followed by immersing in water were analyzed for microstructure using scanning electron microscopy. The samples were fixed with 2.5% glutaraldehyde in phosphate buffer at RT for 2 h before soaking in methanol series at concentrations of 50, 60, 70, 80, 90 and 100% for 20 min each to completely dehydrate them. The dehydrated samples were dried by critical point drying and attached on aluminium stubs for the multi-sample holder inside the microscope chamber. Imaging was done with the Quanta 400 Environmental Scanning Electron Microscope (FEI, Field Emission Instruments, Hillsboro, OR) at 20 kv.

2.8. Statistical analysis

The experiments were carried out with one replication, and each replicated trial had three samples per treatment. The data are expressed as mean ± standard deviation. Statistical analysis used analysis of variance (ANOVA), and significant differences were determined by Duncan's new multiple range test (DMRT) with significance requiring $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical properties of sanitizers

The physicochemical properties (pH, the oxidation-reduction potential (ORP) and available chlorine concentration (ACC)) of the treatment solutions are shown in Table 1. NaClO had an alkaline pH (12.44), while AEW and 2% LA were strongly acidic with pH in the range 2.3–2.6. Among all the solutions, NaClO had the highest ORP (1562 mV), while the ORP of AEW was 1144 mV. The ORP of a solution indicates its ability to oxidize or reduce substances, and it depends on the concentrations of all substances present (except water). Therefore, the ORP of a solution depends on its ion concentrations (Emerson Process Management, 2008). The ORP value increases with oxidizing strength (Al-Holy & Rasco, 2015). An ORP of +200 to +800 mV is optimal for aerobic microbial growth, while the optimum range for growth of anaerobic microorganisms is from −30 to −550 mV. For most facultative anaerobes, an ORP between +200 and −250 mV is suitable for growth (Jay, Loessner, & Golden, 2005, chap. 7). Based on the ORP results, AEW, LA and NaClO solutions are not suitable for the growth of facultative anaerobes such as *E. coli* and *S.* Typhimurium. Hati et al., (2012) suggested that ORP of EO water might be the start-up factor influencing its bactericidal activity, but the ORP is yet not the main factor of bactericidal effect. They stated that the available chlorine concentration (ACC), mainly hypochlorous acid (HOCl), plays an important role in inactivating microorganisms. Among current treatment solutions, NaClO had the highest 5709 mg/L ACC, while AEW had much lower 32.4 mg/L ACC. However, AEW has high ORP giving it the ability to oxidize and sterilize. Moreover, as the pH of electrolyzed acidic water is 2.3–2.5, the distribution of available chlorine is 85% as hypochlorous acid and 15% as chlorine gas (Hati et al., 2012). Due to its pH, high ORP, and available chlorine concentration, the known strong bactericidal activity of AEW could be expected.

Table 1
Physicochemical properties of treatment solution.

Solution	pH	ORP (mV)	ACC (mg/L)
Tap water	7.16	217 ± 0.00	0.05 ± 0.00
NaOCl (6%)	12.44	1562 ± 0.03	5709 ± 152.43
Lactic acid (2%)	2.28	625 ± 0.06	0.05 ± 0.00
AEW	2.58	1144 ± 0.02	32.4 ± 2.79

Values are mean ± standard deviation (SD) n = 3.
ACC: Available chlorine concentration; NaClO: Sodium hypochlorite; AEW: Acidic electrolyzed water.

3.2. Efficacy of the sanitizers against mesophilic microorganisms on sweet basil

Efficacies of the sanitizers (AEW, LA, NaClO) against total mesophilic bacteria on sweet basil are shown in Fig. 1. The initial amount of mesophilic bacteria on unwashed sweet basil was 7.33 ± 0.31 log CFU g^{-1}. Sweet basil, like cilantro and spinach, has a high initial microbial load because it is a low-growing crop (Babic & Watada, 1996; Wang, Feng, & Luo, 2004). This leafy plant provides a large exposed surface area for microbial attachment and growth. Washing procedures are used to improve the quality and safety of the product (Allende, McEvoy, Tao, & Luo, 2009).

Washing with tap water for 5 min reduced the CFU g^{-1} count of MBC by 1.13 log units, indicating that this washing eluted some microorganisms from the sweet basil surfaces. When 2% LA solution was used, the MBC was reduced by 3 log units. However, no difference in MBC was found among different contact times varied from 1 to 5 min ($p > 0.05$). Weak acids, such as lactic acid, sorbic acid and benzoic acid, inhibit microbial growth (Arroyo-López, Bautista-Gallego, Durán-Quintana, & Garrido-Fernández, 2008; Bell & De Lacy, 1987; Stratford, Plumridge, Nebe-von-Caron, & Archer, 2009; Wang, Chang, Yang, & Cui, 2015). These acids are able to enter the cells in undissociated state and dissociate in the higher pH environment of the cytoplasm, resulting in cytoplasmic

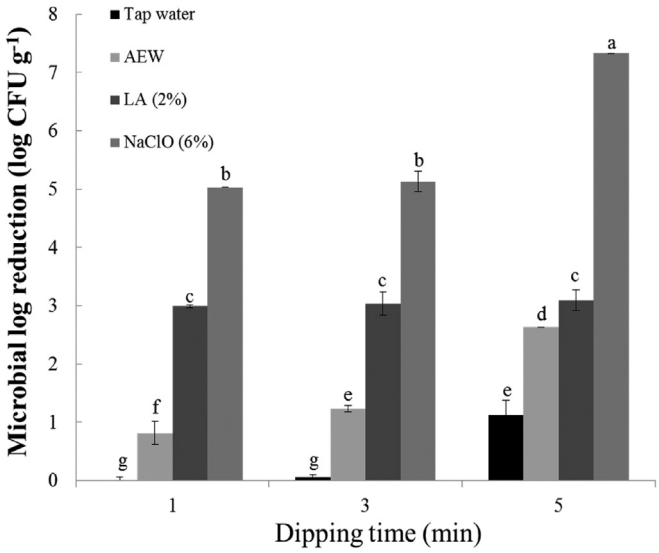


Fig. 1. Reduction of indigenous mesophilic bacteria in sweet basil as affected by different sanitizers and contact times. AEW: Acidic electrolyzed water; NaClO: Sodium hypochlorite. Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n = 6). Different letters on the bars represent significant differences at $p < 0.05$.

acidification (Cheng & Piper, 1994).

Treatments of sweet basil with AEW for 1, 3 and 5 min exhibited bacterial reductions of 0.82, 1.23 and 2.63 log units, respectively. Treatment of cilantro with only AEW for 5 min reduces the total aerobic plate count by 0.66 log units (Wang et al., 2004). Rahman et al., (2010) report that AEW treatment (pH 2.54 ± 0.3, ORP 1130 ± 20 mV, free chlorine 50 ± 2.2 mg/L, 3 min) reduces total bacteria in fresh-cut spinach by 1.94 log units. The sterilization mechanisms of AEW relate to three germicidal factors, namely pH, ACC, and ORP, and the last one is the initial factor in microbial inactivation (Kim, Hung, & Brackett, 2000). Low pH may sensitize the outer membrane of bacterial cells and contribute to the entry of HOCl into bacterial cells (Mcpherson, 1993). The ACC is the major bactericidal potency factor, determining the reduction of microbial load (Abadias, Usall, Oliveira, Alegre, & Vinas, 2008; Hao et al., 2012; Xiong, Liu, Liu, & Li, 2010). Treatment with sodium hypochlorite solution for 1, 3 and 5 min resulted in the greatest reductions in MBC by 5–6 log units. However, NaClO is known to form carcinogenic compounds, so that due to consumer concerns safer washing sanitizers are preferred (Neo et al., 2013; Rodger, Cash, Siddiq, & Ryser, 2004). Thus, LA (2% lactic acid) was selected as the sanitizer for further treatments of sweet basil.

3.3. Efficacy of LA combined with mild heat treatment against mesophilic microorganisms in sweet basil

Fig. 2 shows the effects of 2% LA combined with mild heat on the MBC of sweet basil. Mild heat treatment enhances the bactericidal effects of sanitizers and improves the physiological quality of fresh produce (Koseki et al., 2004). Washing with 2% LA at the room temperature for 1 min, followed by soaking in distilled water for 2 min reduced the MBC of sweet basil by 3 log units. When the LA treatment was combined with mild heat at 40 °C or 50 °C, MBC was reduced by 4.23–4.62 log units ($p < 0.05$). In the present study, treatment with 2% LA for 1 min followed by immersing to warm distilled water at 40 °C and 50 °C for 2 min resulted in the reduction of MBC by 4.23 and 4.51 log orders, respectively. When the treatment with 2% LA was carried out at 40 °C and 50 °C for 1 min, followed by immersion in distilled water at room temperature for 2 min, the MBC was reduced by 4.60 and 4.62 log units, respectively. The results indicate that the use of mild heat significantly increased the efficacy of LA. Similar results have been reported for washing with warm chlorinated water (200 mg/L, 50 °C) that reduced aerobic bacteria in processed carrot by 2.3 log CFU g^{-1} (Klaiber, Baur, Wolf, Hammes, & Carle, 2005). In shredded lettuce, treatment with 47 °C chlorinated water for 3 min reduces the aerobic bacterial count by around 3 log CFU g^{-1} (Delaquis et al., 1999). Treatment with mild heat can injure bacterial cells sublethally due to denaturation of proteins, inactivation of membrane related enzymes, or loss of functional components that are important to metabolic activities (Jay et al., 2005, chap. 7; Noriega, Velliou, Derlinden, Mertens, & Van Impe, 2013; Wu, 2008). These injured microorganisms are more sensitive to further sanitation (Li, Zhao, Wu, Zhang, & Liao, 2012). In the present study, the MBC reduction in sweet basil did not differ significantly between 40 °C and 50 °C ($p > 0.05$). Nevertheless, LA combined with mild heat (40 °C) showed lower effectiveness against presumptive coliform than when combined with the higher 50 °C temperature (data not shown). Therefore, 2% LA in combination with mild heat at 50 °C was chosen for further study.

3.4. Efficacy of LA treatment at 50 °C against challenging pathogenic bacteria on sweet basil

The efficacy of 2% LA in conjunction with mild heat at 50 °C against *E. coli* and *S.* Typhimurium inoculated on sweet basil is shown in Fig 3. The initial population of *E. coli* inoculated on sweet basil was 8.36 log CFU g^{-1}, while the *S.* Typhimurium population was 7.62 log CFU g^{-1}. Washing with tap water for 3 min resulted in slight reductions by 0.96 and 0.73 log CFU g^{-1} for *E. coli* and *S.* Typhimurium, respectively. When sweet basil was treated with 2% LA for 1 min, followed by immersing in warm distilled water at 50 °C for 2 min, *E. coli* and *S.* Typhimurium were reduced by 2.96 and 3.54 log CFU g^{-1}, respectively. Washing sweet basil with 2% LA (50 °C) for 1 min, followed by immersing into distilled water at room temperature for 2 min decreased *E. coli* and *S.* Typhimurium

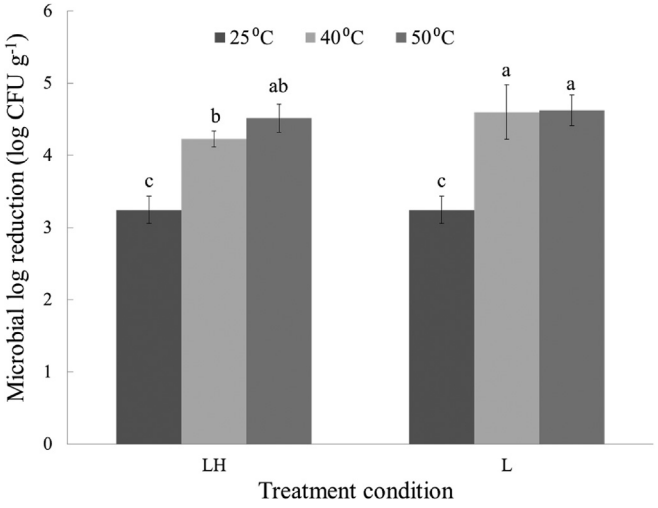


Fig. 2. Reduction of indigenous mesophilic bacteria in sweet basil as affected by LA treated in combination with mild heat at various treatment. LH: washing with LA (25 °C) followed by washing with water (25, 40 or 50 °C); L: washing with LA (25, 40 or 50 °C) followed by washing with water (25 °C). Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n = 6). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

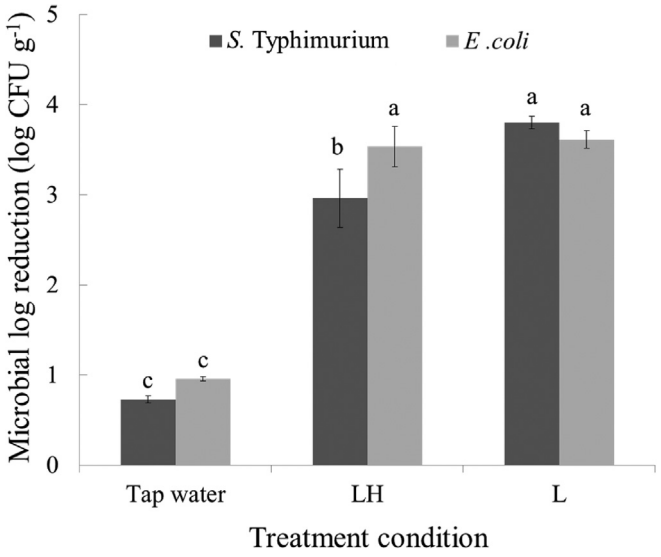


Fig. 3. Reduction of inoculated *S.* Typhimurium and *E. coli* in sweet basil as affected by LA in combination with mild heat treatment at 50 °C. LH: washing with LA (25 °C) followed by washing with water (25, 40 or 50 °C); L: washing with LA (25, 40 or 50 °C) followed by washing with water (25 °C). Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n = 6). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$.

by 3.57 and 3.78 log units, respectively. For decontamination from *S.* Typhimurium, washing with 2% LA (50 °C) followed by immersion in distilled water showed significantly higher reduction than washing with room temperature LA followed by immersion in distilled water ($p < 0.05$). This result agrees with Wang et al., (2013a) who report that treatment with 2% LA for 10 min reduced *E. coli* O157:H7 and *S.* Typhimurium on lotus sprouts by 2 log orders. Washing with 2% LA (50 °C) for 2 min gives a 2.0 ± 0.3 log reduction in *E. coli* O157:H7 on baby spinach (Huang & Chen, 2011). Lin, Moon, Doyle, and McWatters (2002) report over 4 log reduction in *E. coli* O157:H7 and 3 log reduction in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on iceberg lettuce by treatment with 1.5% LA plus 1.5% H_2O_2 at 40 °C for 15 min. LA has been recognized as a potent sanitizer for decontaminating food from pathogenic bacteria; it acts by disrupting the lipopolysaccharide layer of outer bacterial membrane and sensitizes the bacteria to detergents (Alakomi et al., 2000; Wang, Li, Fang, Pradhan, & Li, 2013b). Decontamination from microorganisms by organic acid combined with mild heat may also increase the number of ions in acid solution, due to the dissociation of molecules, especially in the case of a weak acid like LA (Barron, Ashton, & Geary, 2006). The increase in dissociated molecules when temperature is raised might interrupt the proton motive activity of the outer membrane, and the undissociated form of LA could then penetrate the cytoplasmic membrane, resulting in reduced intracellular pH and inducing cell death in part of the cell population.

3.5. Micrographs of untreated and treated sweet basil

The microstructures of *E. coli* and *S.* Typhimurium cells are shown in Fig. 4, after treatment with LA (2%) combined with mild heat (50 °C) as well as without treatment. Untreated cells were regular rod shaped with smooth unbroken surfaces (4A and 4C), while the surface structures of treated cells were obviously damaged (4B and 4D). The combination treatment with LA and mild heat induced several pores on the outer membrane of an *E. coli* cell, which plausibly led to cell shrinkage and wrinkling. Large pores formed on *S.* Typhimurium cells that collapsed, and leakage of intracellular substances occurred. Wang et al., (2015) studied the antibacterial mechanisms of lactic acid via the physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *E. coli* and *L. monocytogenes*. LA treatment caused heavy leakage of proteins from *Salmonella*, *E. coli* and *Listeria* cells. In the present study, LA, particularly when applied with mild heat, may have altered permeability of the outer membrane and cell membrane function, and it caused leakage of intracellular nutrition. Thus, the use of LA combined with mild heat is effective for decontamination of fresh produce from pathogenic bacteria.

Fig. 5 shows the microstructures of sweet basil leaf and petiole. In the untreated control samples (Fig. 5A and C), the microorganisms remained in the gaps on petiole surface and around the oil glands of a leaf. Sweet basil has many oil glands spread around the leaf. The space between an oil gland and surrounding leaf surface provides shelter and good attachment for a microorganism. Microorganisms, especially a mixed culture of *S.* Typhimurium, tend to extensively colonize the wall of stomata in lettuce (Jahid, Han, Srey,

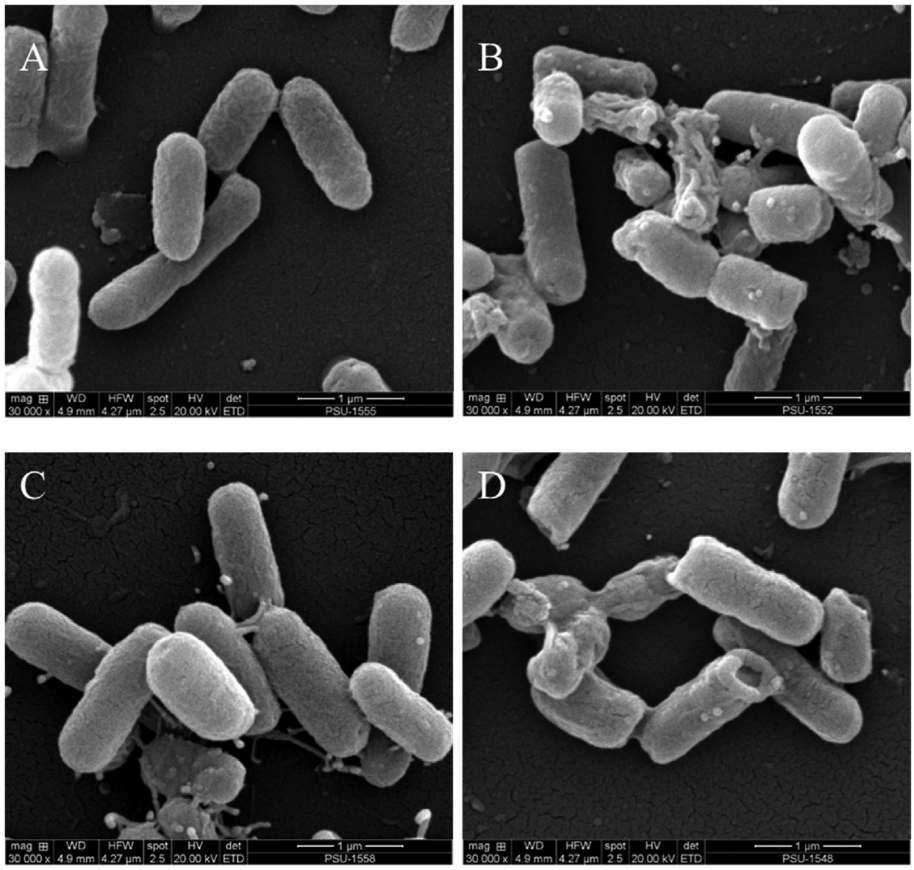


Fig. 4. Scanning electron micrographs (SEM) of *E. coli* and *S.* Typhimurium cells (*in vitro*). Non-treated *E. coli* (A) and *S.* Typhimurium (C); *E. coli* (B) and *S.* Typhimurium (D) after being treated with 2% LA in combination with mild heat at 50 °C.

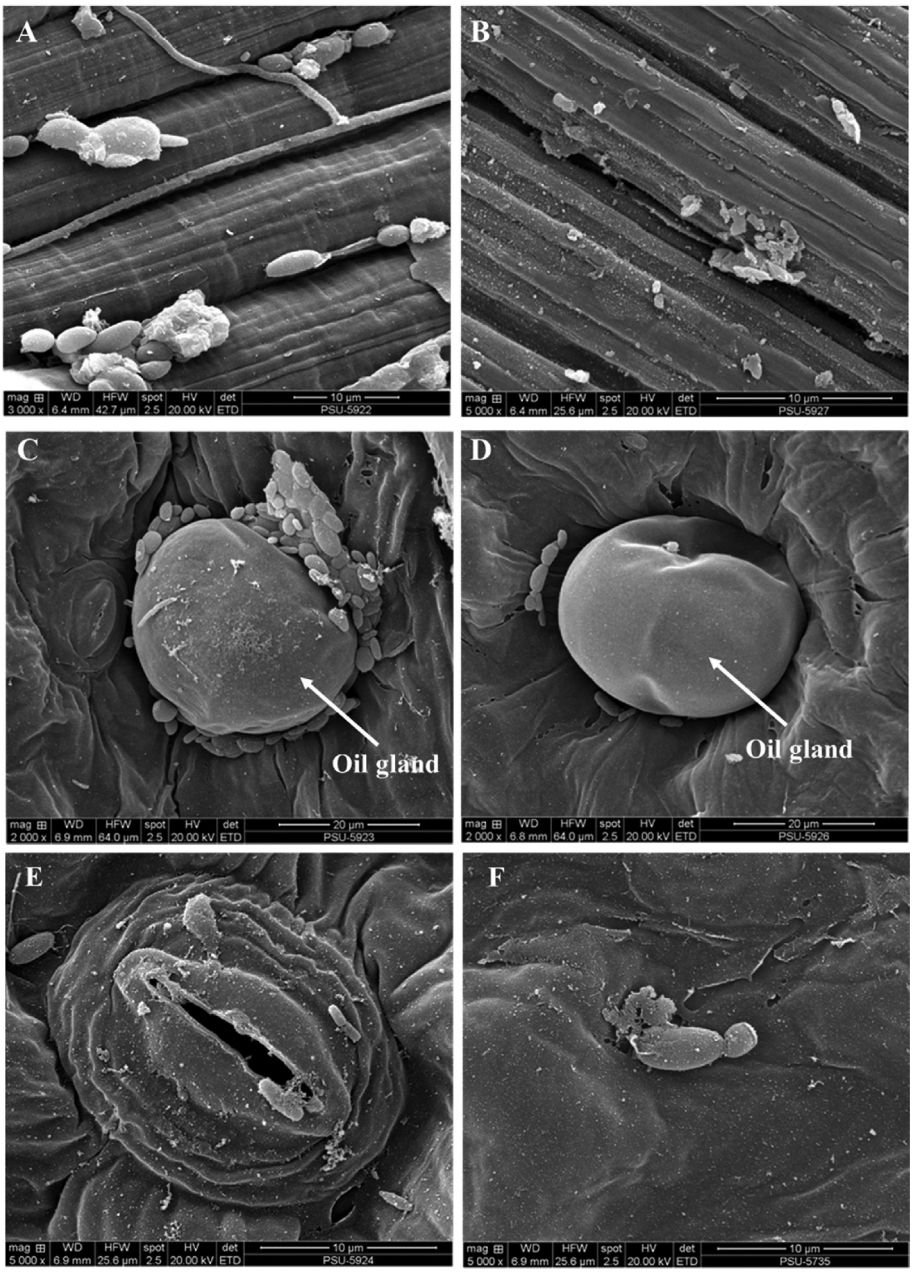


Fig. 5. Scanning electron micrographs (SEM) of sweet basil petiole and leaf. Non-treated sweet basil petiole (A), leaf (C) and stomata (E); Sweet basil petiole (B), leaf (D) and destroyed microorganism (F) after being treated with 2% LA in combination with mild heat at 50 °C.

& Ha, 2014, 2015; Kroupitski, Pinto, Belausov, & Sela, 2011). However, in sweet basil the microorganisms preferred to attach around the oil glands rather than on the stomata wall as they would in lettuce. Sweet basil is a fragile leafy culinary herb that has a short shelf-life, because it is a highly perishable wilting plant (Aharoni et al., 2010; Bekhradi et al., 2015). The guard cells on the stomata close after harvesting to prevent water loss, when water availability is substantially diminished (Thomson, 2005). In addition, most stomatal pores close when confronted with bacteria (Melotto, Underwood, & He, 2008). When the stomata close, it becomes more difficult for microorganisms to attach on them (Fig 5E). Fig 5B (petiole) and 5D (leaf) are images after treatment with 2% LA combined with mild heat at 50 °C. In Fig 5B, the microorganisms on the petiole were inactivated and some microbial cells were damaged (Fig 5F). Thus, 2% LA in combination with mild heat at 50 °C was effective decontamination from microorganisms, even though these were still found in small gaps between oil glands and leaf surface (Fig 5D). Bermúdez-Aguirre and Barbosa-Cánovas (2013) reported that after treating lettuce, which has a porous and rough surface, with 5 ppm ozone for 15 min, bacterial cells still remained on the tissues. The surface roughness, such as in carrots or lettuce, protected bacteria under the folds of the vegetable tissue layers, and decreased the efficacy of disinfection. However, 2% LA combined with mild heat at 50 °C for 1 min showed higher efficacy in decontamination than 5 ppm ozone with 15 min contact time.

4. Conclusions

Lactic acid (LA) at 2%, an organic acid, is a safe solution that is free of carcinogenic risks, and it is an effective sanitizer to

decontaminate sweet basil from indigenous mesophilic bacteria. Additionally, the 2% LA combined with mild heat at 50 °C was more effective than using LA at room temperature. It decontaminated the sweet basil leafy surfaces not only from indigenous mesophilic bacteria, but also from pathogenic bacteria such as *E. coli* and *S.* Typhimurium.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere thanks to Prince of Songkla University for the financial support on contract number AGR570418S. We also would like to take this opportunity to acknowledge the service of research and development office (RDO), Prince of Songkla University and Assoc. Prof. Dr. Seppo Karrila for English writing revision.

References

Abadias, M., Usall, J., Oliveira, M., Alegre, I., & Vinas, I. (2008). Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally processed vegetables. *International Journal of Food Microbiology, 123*, 151–158.

Abreu, M., Beirão-da-Costa, S., Gonçalves, E. M., Beirão-da-Costa, M. L., & Moldão-Martins, M. (2003). Use of mild heat pre-treatments for quality retention of fresh cut 'Rocha' pear. *Postharvest Biology and Technology, 30*, 153–160.

Aharoni, N., Kenigsbuch, D., Chalupowicz, D., Faura-Mlinski, M., Aharon, Z., Maurer, D. … Lers, A. (2010). Reducing chilling injury and decay in stored sweet basil. *Israel Journal of Plant Science, 58*, 167–181.

Akbas, M. Y., & Olmez, H. (2007). Inactivation of Escherichia coli and Listeria monocytogenes on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology, 44*(6), 619–624.

Al-Holy, M. A., & Rasco, B. A. (2015). The bactericidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water against Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, and Listeria monocytogenes on raw fish, chicken and beef surfaces. *Food Control, 54*, 317–321.

Alakomi, H.-L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-sandholm, T., Latva-kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology, 66*(5), 2001–2005.

Alegria, C., Pinheiro, J., Gonçalves, E. M., Fernandes, I., Moldão, M., & Abreu, M. (2009). Quality attributes of shredded carrot (Daucus carota L. cv. Nantes) as affected by alternative decontamination processes to chlorine. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10*, 61–69.

Allende, A., McEvoy, J., Tao, Y., & Luo, Y. (2009). Antimicrobial effect of acidified sodium chlorite, sodium chlorite, sodium hypochlorite, and citric acid on Escherichia coli O157:H7 and natural microflora of fresh-cut cilantro. *Food Control, 20*, 230–234.

Arroyo-López, F. N., Bautista-Gallego, J., Durán-Quintana, M. C., & Garrido-Fernández, A. (2008). Modelling the inhibition of sorbic and benzoic acids on a native yeast cocktail from table olives. *Food Microbiology, 25*, 566–574.

Babic, I., & Watada, A. E. (1996). Microbial populations of fresh-cut spinach leaves affected by controlled atmosphere. *Postharvest Biology and Technology, 9*, 187–193.

BAM. (2001). *Aerobic plate count*. U.S. Department of Health and Human Services (Online). Available http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm (10 October 2015).

Bari, M. L., Sabina, Y., Isobe, S., Umemura, T., & Isshiki, K. (2003). Effectiveness of electrolyzed acidic water in killing Escherichia coli O157:H7, Salmonella enteritidis, and Listeria monocytogenes on the surface of tomatoes. *Journal of Food Protection, 66*, 542–548.

Barron, J. J., Ashton, C., & Geary, L. (2006). *The effects of temperature on pH measurement. The 57th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Edinburgh, 27th August–1st September, 2006*. International Society of Electrochemistry (Online). Available at: http://reagecon.com/pdf/technicalpapers/Effects_of_Temperature_on_pH_v4-_TSP-01-2.pdf (22 April 2015).

Bekhradi, F., Luna, M. C., Delshad, M., Jordan, M. J., Sotomayor, J. A., Martínez-Conesa, C. … Gil, M. I. (2015). Effect of deficit irrigation on the postharvest quality of different genotypes of basil including purple and green Iranian cultivars and a Genovese variety. *Postharvest Biology and Technology, 100*, 127–135.

Bell, R. G., & De Lacy, K. M. (1987). The efficacy of nisin, sorbic acid and monolaurin as preservatives in pasteurized cured meat products. *Food Microbiology, 4*, 277–283.

Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2013). Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control, 29*, 82–90.

Cheng, L., & Piper, P. W. (1994). Weak acid preservatives block the heat shock response and heat-shock-element-directed lacZ expression of low pH Saccharomyces cerevisiae cultures, an inhibitory action partially relieved by respiratory deficiency. *Microbiology, 140*, 1085–1096.

Delaquis, P. J., Stewart, S., Toivonen, P. M. A., & Moyls, A. L. (1999). Effect of warm, chlorinated water on the microbial flora of shredded iceberg lettuce. *Food Research International, 32*, 7–14.

EC (European Commission). (2012). *Commission Implementing Regulation (EU) No 294/2012 amending Annex I to Regulation (EC) No 669/2009 implementing Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the increased level of official controls on imports of certain feed and food of non-animal origin (Online)*. Available: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ: L:2012:098:0007:0012:EN: PDF (19 June 2015).

Elviss, N. C., Little, C. L., Hucklesby, L., Sagoo, S., Surman-Lee, S., de Pinna, E. … Threlfall, E. J. (2009). Microbiological study of fresh herbs from retail premises uncovers an international outbreak of salmonellosis. *International Journal of Food Microbiology, 134*, 83–88.

Emerson Process management. (2008). *Theory and Fundamentals of ORP measurement. ADS 43–014/rev.B*. Rosemount Analytical Inc., USA. (Online). Available: http://www2.emersonprocess.com/siteadmincenter/PM%20Rosemount%20Analytical%20Documents/Liq_ADS_43-014.pdf (22 April 2015).

FAO/WHO. (2008). *Microbiological Risk Assessment Series: Microbiological hazards in fresh fruit and vegetables*. Available at: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA_FruitVeges.pdf (accessed 19.06.15).

Hanning, I. B., Nutt, J. D., & Ricke, S. C. (2009). Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathogens and Disease, 6*(6), 635–648.

Hao, J., Qiu, S., Li, H., Chen, T., Liu, H., & Li, L. (2012). Roles of hydroxyl radicals in electrolyzed oxidizing water (EOW) for the inactivation of Escherichia coli. *International Journal of Food Microbiology, 155*, 99–104.

Hati, S., Mandal, S., Minz, P. S., Vij, S., Khetra, Y., Singh, B. P. … Yadav, D. (2012). Electrolyzed oxidized water (EOW): non-thermal approach for decontamination of food borne microorganisms in food industry. *Food and Nutrition Sciences, 3*, 760–768.

Huang, Y., & Chen, H. (2011). Effect of organic acids, hydrogen peroxide and mild heat on inactivation of Escherichia coli O157:H7 on baby spinach. *Food Control, 22*, 1178–1183.

Issa-Zacharia, A., Kamitani, Y., Miwa, N., Muhimbula, H., & Iwasaki, K. (2011). Application of slightly acidic electrolyzed water as a potential non-thermal food sanitizer for decontamination of fresh ready-to-eat vegetables and sprouts. *Food Control, 22*, 601–607.

Jahid, I. K., Han, N., Srey, S., & Ha, S. D. (2014). Competitive interactions inside mixed species biofilms of Salmonella Typhimurium and cultivable indigenous microorganisms on lettuce enhance microbial resistance of their sessile cells to ultraviolet C (UV-C) irradiation. *Food Research International, 55*, 445–454.

Jahid, I. K., Han, N., Zhang, C. Y., & Ha, S. D. (2015). Mixed culture biofilms of Salmonella Typhimurium and cultivable indigenous microorganisms on lettuce show enhanced resistance of their sessile cells to cold oxygen plasma. *Food Microbiology, 46*, 383–394.

Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology*. New York, NY: Springer (chapter 7).

Kim, C., Hung, Y. C., & Brackett, R. E. (2000). Roles of oxidation-reduction potential in electrolyzed oxidizing and chemically modified water for the inactivation of food related pathogens. *Journal of Food Protection, 63*, 19–24.

Kim, C., Hung, Y. C., Brackett, R. E., & Lin, C. S. (2003). Efficacy of electrolyzed oxidizing water in inactivating Salmonella on alfalfa seeds and sprouts. *Journal of Food Protection, 66*, 208–214.

Klaiber, R. G., Baur, S., Wolf, G., Hammes, W. P., & Carle, R. (2005). Quality of minimally processed carrots as affected by warm water washing and chlorination. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 6*, 351–362.

Koide, S., Shitanda, D., Note, M., & Cao, W. (2011). Effects of mildly heated, slightly acidic electrolyzed water on the disinfection and physicochemical properties of sliced carrot. *Food Control, 22*, 452–456.

Koseki, S., Yoshida, K., Kamitani, Y., Isobe, S., & Itoh, K. (2004). Effect of mild heat pre-treatment with alkaline electrolyzed water on the efficacy of acidic electrolyzed water against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on Lettuce. *Food Microbiology, 21*, 559–566.

Kroupitski, Y., Pinto, R., Belausov, E., & Sela, S. (2011). Distribution of Salmonella Typhimurium in romaine lettuce leaves. *Food Microbiolology, 28*(5), 990–997.

Lin, C. M., Moon, S. S., Doyle, M. P., & McWatters, K. M. (2002). Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica serotype Enteritidis, and Listeria monocytogenes on lettuce by hydrogen peroxide and lactic acid and by hydrogen peroxide with mild heat. *Journal of Food Protection, 65*(8), 1215–1220.

Li, H., Zhao, L., Wu, J., Zhang, Y., & Liao, X. (2012). Inactivation of natural microorganisms in litchi juice by high-pressure carbon dioxide combined with mild heat and nisin. *Food Microbiology, 30*(1), 139–145.

López-Gálvez, F., Allende, A., Selma, M. V., & Gil, M. I. (2009). Prevention of Escherichia coli cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. *International Journal of Food Microbiology, 133*, 167–171.

Mcpherson, L. L. (1993). Understanding ORP's role in the disinfection process. *Water Engineering and Management, 140*, 29–31.

Melotto, M., Underwood, W., & He, S. Y. (2008). Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology, 46*, 101–122.

Neo, S. Y., Lim, P. Y., Phua, L. K., Khoo, G. H., Kim, S.-J., Lee, S.-C. … Yuk, H.-G. (2013). Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora, Escherichia coli O157:H7, Listeria monocyotgenes and Salmonella spp. on mung bean sprouts. *Food Microbiology, 36*, 475–480.

Nguyen, P. M., Kwee, E. M., & Niemeyer, E. D. (2010). Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (Ocimum basilicum L.) leaves. *Food Chemistry, 123*(4), 1235–1241.

Noriega, E., Velliou, E., Derlinden, E. V., Mertens, L., & Van Impe, J. F. M. (2013). Effect of cell immobilization on heat-induced sublethal injury of Escherichia coli, Salmonella Typhimurium and Listeria innocua. *Food Microbiology, 36*(2), 355–364.

Pakalniskiene, J., Falkenhorst, G., Lisby, M., Madsen, S. B., Olsen, K. E., Nielsen, E. M. … Mølbak, K. (2009). A foodborne outbreak of enterotoxigenic E. coli and Salmonella Anatum infection after a high-school dinner in Denmark, November 2006. *Epidemiology and Infection, 137*, 396–401.

Park, C. M., Hung, Y. C., Doyle, M. P., Ezeike, G. O. I., & Kim, C. (2001). Pathogen reduction and quality of lettuce treated with electrolyzed oxidizing and acidified chlorinated water. *Journal of Food Science, 66*, 1368–1372.

Pezzoli, L., Elson, R., Little, C. L., Yip, H., Fisher, I., Yishai, R. … Threlfall, J. (2008). Packed with Salmonella—investigation of an international outbreak of Salmonella Senftenberg infection linked to contamination of prepacked basil in 2007. *Foodborne Pathogens and Disease, 5*, 661–668.

Rahman, S. M. E., Ding, T., & Oh, D. H. (2010). Inactivation effect of newly developed low concentration electrolyzed water and other sanitizers against microorganisms on spinach. *Food Control, 21*, 1383–1387.

Rodger, S. L., Cash, J. N., Siddiq, M., & Ryser, E. T. (2004). A comparison of different chemical sanitizers for inactivating Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in solution and on apples, lettuce, strawberries, and cantaloupe. *Journal of Food Protection, 67*, 721–731.

Sagong, H. G., Lee, S. Y., Chang, P. S., Heu, S., Ryu, S., Choi, Y. J. … Kang, D. H. (2011). Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, and Listeria monocytogenes on organic fresh lettuce. *Postharvest Biology and Technology, 145*, 287–292.

Stratford, M., Plumridge, A., Nebe-von-Caron, G., & Archer, D. B. (2009). Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. *International Journal of Food Microbiology, 136*, 37–43.

Thomson, G. E. (2005). Postharvest handling effects on stomatal aperture of harvested Brassica rapa var. perviridis 'Komatsuna' and B. juncea 'Red Giant' mustard leaves. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 33*, 311–316.

Tirawat, D., Meno, A., Fujiwara, H., Higo, K., Noma, S., Igura, N. … Shimoda, M. (2010). Development of rapid hygrothermal pasteurization using saturated water vapor. *Innovative Food Science and Emerging Technologies, 11*, 458–463.

Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., & Montesinos, E. (2008). Bioprotection of golden delicious apples and iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology, 123*, 50–60.

Uyttendaele, M., Neyts, K., Vanderswalmen, H., Notebaert, E., & Debevere, J. (2004). Control of Aeromonas on minimally processed vegetables by decontamination with lactic acid, chlorinated water, or thyme essential oil solution. *International Journal of Food Microbiology, 90*(3), 263–271.

Vandekinderen, I., Devlieghere, F., De Meulenaer, B., Ragaert, P., & Van Camp, J. (2009). Decontamination strategies for fresh-cut produce. *Stewart Postharvest Review, 5*(4), 1–8.

Velazquez, L. D., Barbini, N. B., Escudero, M., Estrada, C., & de Guzman, A. M. S. (2009). Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing Escherichia coli O157:H7 and Yersinia enterocolitica on fresh vegetables. *Food Control, 20*(3), 262–268.

Wang, C., Chang, T., Yang, H., & Cui, M. (2015). Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of Salmonella Enteritidis, Escherichia coli and Listeria monocytogenes. *Food Control, 47*, 231–236.

Wang, H., Feng, H., & Luo, Y. (2004). Microbial reduction and storage quality of fresh-cut cilantro washed with acidic electrolyzed water and aqueous ozone. *Food Research International, 37*, 949–956.

Wang, W., Li, M., Fang, W., Pradhan, A. K., & Li, Y. (2013b). A predictive model for assessment of decontamination effects of lactic acid and chitosan used in combination on Vibrio parahaemolyticus in shrimps. *International Journal of Food Microbiology, 167*(2), 124–130.

Wang, C., Wang, S., Chang, T., Shi, L., Yang, H., Shao, Y. … Cui, M. (2013a). Efficacy of lactic acid in reducing foodborne pathogens in minimally processed lotus sprouts. *Food Control, 30*, 721–726.

Wu, V. C. H. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology, 25*(6), 735–744.

Xiong, K., Liu, H.-j., Liu, R., & Li, L.-t (2010). Differences in fungicidal efficiency against Aspergillus flavus for neutralized and acidic electrolyzed oxidizing waters. *International Journal of Food Microbiology, 137*, 67–75.

7.2 ผลการวิจัยส่วนที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์หรือตีพิมพ์ไม่ได้

<u>วิธีการทดลอง</u>

16.6 การศึกษาผลของการใช้สารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับความร้อนระดับกลางต่อการเปลี่ยนแปลงของโหระพาในระหว่างการเก็บรักษา

นำตัวอย่างโหระพามาล้างในสภาวะที่คัดเลือกได้จากการทดลองในข้อ 16.5 สะเด็ดน้ำโหระพาโดยใช้เครื่องสะเด็ดน้ำผักนาน 1 นาที นำโหระพาที่ได้บรรจุลงในถุงโพลีเอทิลีนเจาะรู 4 รู ขนาดบรรจุ 50 กรัม (สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, 2554; Lange and Cameron, 1994) จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12.5° C (ชัยพิชิต เชื้อเมืองพาน และ ดนัย บุณยเกียรติ, 2556) จนเสื่อมสภาพ (พิจารณาจากการยอมรับของผู้ทดสอบเป็นหลัก) สุ่มตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์คุณภาพทุกๆ 2 วันตลอดการเก็บรักษาโดยตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ทางกายภาพ ทางเคมีและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการล้างเป็นชุดควบคุม

16.6.1 วิเคราะห์ด้านจุลินทรีย์

สุ่มตัวอย่างโหระพาปริมาณ 25 กรัมใส่ในถุง stomacher ที่มี peptone water 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่อง stomacher ตีผสมด้วยความเร็วปานกลางเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมาเจือจางแล้วตรวจวิเคราะห์หา Aerobic plate count (APC) ตามวิธีการของ BAM (BAM, 2001)

16.6.2 วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

16.6.2.1 ร้อยละการสูญเสียน้ำหนัก โดยคำนวณน้ำหนักที่หายไปเทียบกับน้ำหนักเริ่มต้น

16.6.2.2 ร้อยละการหลุดร่วงของใบ โดยคำนวณเทียบกับประมาณใบในกิ่งทั้งหมด

16.6.2.3 ร้อยละการเกิดน้ำตาลบนใบ โดยคำนวณพื้นที่การเกิดสีน้ำตาลเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด

16.6.3 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

16.6.3.1 การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์ (Electrolyte leakage) (Wongsheree *et al*., 2009)

สุ่มใบโหระพาปริมาณ 0.5 กรัม นำมาใส่ในขวดรูปชมพู่ซึ่งมีน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการนำไฟฟ้าทุกๆ 4 ชั่วโมง ด้วยเครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (conductivity meter) โดยให้ค่าการนำไฟฟ้าเมื่อถูกบ่มในน้ำเดือด 100° C เป็นเวลา 10 นาทีและถูกทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 25° C นาน 1 ชั่วโมง มีค่าการนำไฟฟ้าที่มากที่สุด ข้อมูลจะถูกนำมาคำนวณเทียบกับค่าการนำไฟฟ้าที่มากที่สุด (มีการรั่วไหลของสารอิเล็กโทร-ไลต์สูงสุด) และแสดงออกมาในรูปร้อยละ

16.6.3.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Total chlorophyll) (Toivonen and Sweeney, 1998)

บดใบโหระพา (5 กรัม) จนละเอียดในโกร่ง จากนั้นทำการสกัดด้วย Acetone 80% จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 และ 642.5 นาโนเมตร แล้วคำนวณปริมาณคลอโร-ฟิลล์โดยรวมโดยใช้สมการดังต่อไปนี้ (AOAC, 1990)

$$\text{Total chlorophyll (mg/ml)} = 7.12A_{660} + 16.8A_{642.5}$$

16.6.3.3 อัตราการหายใจ (Kader, 1992; Rinaldi *et al*., 2010; Hassan and Mahfouz, 2012)

วัดในรูปแบบของระบบปิด (close system) โดยบรรจุใบโหระพา (2 กรัม) ในขวดขนาด 50 มิลลิลิตร (ระบบปิด) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12.5° C ความชื้น 70-80% ในที่มืดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บก๊าซ Head space ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดน้ำเกลือ จากนั้นนำก๊าซที่ได้มาวัดปริมาณของก๊าซ CO_2 และก๊าซเอทิลีนโดยใช้เครื่อง Gas chromatography (GC)

16.6.4 ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ทดสอบการยอมรับ (Acceptance test) ลักษณะปรากฏของโหระพาโดยใช้วิธีการทดสอบความแตกต่างโดยรวมจากชุดควบคุม (Overall difference from control method) กำหนดให้โหระพาสดตัดใหม่เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบกับโหระพาที่ไม่ผ่านการล้างและโหระพาที่ล้างด้วยสภาวะที่คัดเลือกจากข้อ 16.5 ที่อยู่ในช่วงระยะเวลาเก็บรักษา โดยใช้จำนวนผู้ทดสอบไม่น้อยกว่า 15 คน

16.7 การศึกษาสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลาง

นำตัวอย่างโหระพาที่คัดเลือกได้จากการทดลองในข้อ 16.5 บรรจุลงในถุงโพลีเอทิลีนเจาะรู 4 รู ขนาดบรรจุ 50 กรัม จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12 และ 15° C เก็บรักษาจนเสื่อมสภาพ (พิจารณาจากการยอมรับของผู้ทดสอบเป็นหลัก) สุ่มตัวอย่างไปตรวจคุณภาพทุกๆ 2 วันตลอดการเก็บรักษาโดยตรวจวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ ทางกายภาพ ทางเคมีและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการล้างเป็นชุดควบคุม

16.7.1 วิเคราะห์ด้านจุลินทรีย์

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธีการในข้อ 16.6.1

16.7.2 วิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

ตามวิธีการในข้อ 16.6.2

16.7.2.1 ร้อยละการสูญเสียน้ำหนัก

16.7.2.2 ร้อยละการหลุดร่วงของใบ

16.7.2.3 ร้อยละการเกิดน้ำตาลบนใบ

16.7.3 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

ตามวิธีการในข้อ 16.6.3

16.7.3.1 การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์จากภายในเซลล์

16.7.3.2 ปริมาณคลอโรฟิลล์ (Total chlorophyll)

16.7.3.3 อัตราการหายใจ

16.7.4 ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ตามวิธีการในข้อ 16.6.4

16.8 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์โดยวัดค่าการทดลองในการวิเคราะห์ด้านกายภาพกระทำ 5 ซ้ำ ส่วนการวิเคราะห์ด้านจุลินทรีย์และด้านเคมีกระทำ 3 ซ้ำโดยใช้ตัวอย่าง 3 ตัวอย่างต่อ 1 ซ้ำ ค่าผลการทดลองรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วย Duncan’s multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลองและวิจารณ์

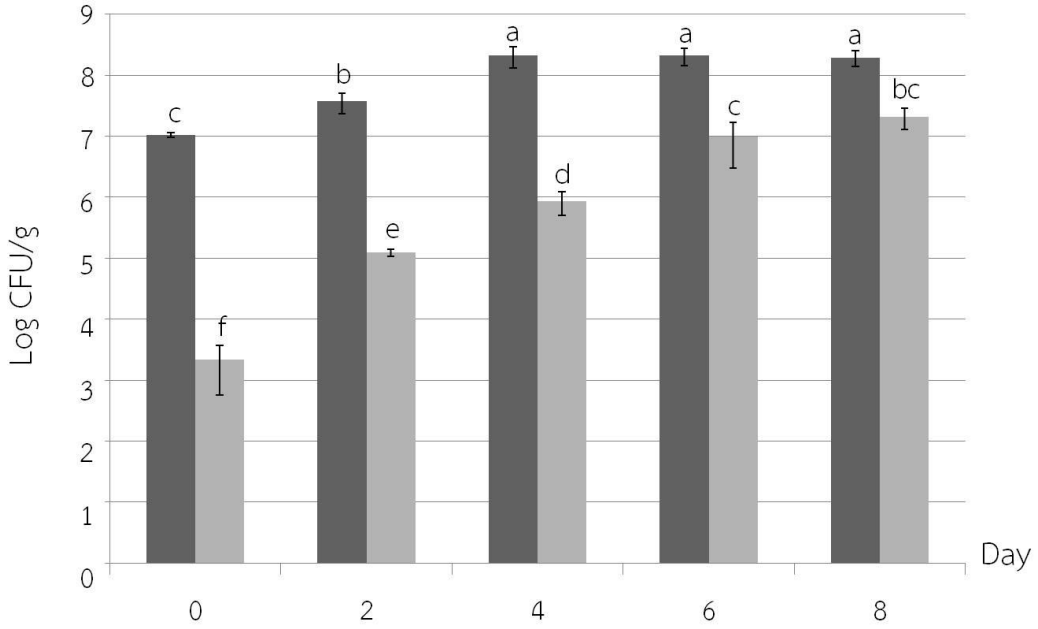
ตอนที่ 4 การศึกษาผลของการใช้สารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับความร้อนระดับกลางต่อการเปลี่ยนแปลงของโหระพาในระหว่างการเก็บรักษา

เมื่อนำเอาตัวอย่างโหระพามาล้างในสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 50° C นาน 1 นาที แล้วนำโหระพาที่ผ่านการล้างเบื้องต้นไปเก็บรักษาในถุงโพลีเอทิลีนเจาะรู 4 รู ขนาดบรรจุ 50 กรัม ที่อุณหภูมิ 12.5° C พบว่า

4.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์

จากภาพที่ 6 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในโหระพาทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการล้างในสารละลายกรดแลก-ติกร่วมกับการใช้อุณหภูมิในระดับกลางที่ 50° C จะเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา แต่จากผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า การล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับการใช้อุณหภูมิในระดับกลางที่ 50° C นั้นสามารถช่วยลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในเบื้องต้นได้เยอะถึงประมาณ 3.5 log units ซึ่งทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษานั้นยังคงมีปริมาณน้อยกว่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปในโหระพาที่ยังไม่ได้ผ่านการล้างเมื่อระยะเวลาผ่านไปถึง 8 วัน แต่เมื่อสังเกตุดูอัตราการเพิ่มขึ้นของเชื้อจุลินทรีย์ในชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการล้างในสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง จะเห็นได้ว่าอัตราการเพิ่มของเชื้อจุลินทรีย์ในชุดควบคุมจะมีอัตราที่ช้ากว่า ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการใช้ความร้อนระดับกลางในระดับ 50° C อาจจะไม่ส่งผลอย่างชัดเจนต่อเนื้อเยื่อของใบโหระพาในช่วงแรกของการล้าง แต่เมื่อเก็บรักษาในระยะเวลาที่นานขึ้น อาจจะทำให้ผลของการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางปรากฏขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้เชื่อมโยงได้กับอัตราการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาลที่จะพบใน

อัตราที่สูงในโหระพาที่ผ่านการล้างในสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง อัตราการสูญเสียน้ำหนักมักจะเกิดจากการสูญเสียปริมาณน้ำในตัวอย่าง ซึ่งความชื้นดังกล่าวอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงขึ้น ในขณะเดียวกัน การเกิดสีน้ำตาลที่สูงขึ้นอาจจะเกี่ยวข้องกับ chilling injury ซึ่งอาจจะมีผลมาจากค่าการเบี่ยงเบนของอุณหภูมิในตู้แช่ที่ต่ำกว่า 12° C หรืออาจจะมีผลมาจากการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลาง ซึ่ง chilling injury มีผลเกี่ยวเนื่องถึงอาการบาดเจ็บของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช (Wongsheree et al., 2009) ซึ่งอาจจะส่งผลให้ปริมาณสารอาหารภายในเซลล์รั่วไหลออกมา จึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่หลงเหลืออยู่ หรือการการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางอาจจะส่งผลบางอย่างต่อลักษณะของใบโหระพาจึงทำให้เกิดการบาดเจ็บของเยื่อหุ้มเซลล์โหระพาเกิดขึ้น



ภาพที่ 6 Visible count of indigenous mesophilic bacteria in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50° C ( ) during stored at 12°

C for 8 days. Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=3). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

4.2 คุณภาพทางกายภาพ

คุณภาพทางกายภาพอันได้แก่ ร้อยละการหลุดร่วง ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาล จากการทดลองพบว่าร้อยละการหลุดร่วงของโหระพาที่ผ่านการล้างในสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางจะมีร้อยละการหลุดร่วงของใบน้อยกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p < 0.05$) โดยโหระพาในชุดควบคุมจะเริ่มหลุดร่วงตั้งแต่วันที่ 4 ในขณะที่โหระพาในชุดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางจะเริ่มมีการหลุดร่วงในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา โดยทั่วไปการหลุดร่วงของใบจะเกี่ยวข้องกับปริมาณเอทิลีนที่พืชผลิตขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองข้างต้นอาจจะอนุมานได้ว่าการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางอาจจะส่งผลให้การผลิตหรือการปลดปล่อยเอทิลีนของโหระพามีในปริมาณที่น้อยลง จากที่ตามปกติโหระพาได้รับการรายงานว่าเป็นพืชที่มีการผลิตเอทิลีนในปริมาณที่น้อยมากอยู่แล้ว (USDA, 2016)

ตารางที่ 2 Percentage of falling leaves of sweet basil stored at 12.5° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	0	8.0 ± 0.1^{d}	11.3 ± 0.1^{b}	13.2 ± 0.2^{a}
LA treated	0	0	0	5.0 ± 0.2^{e}	9.4 ± 0.3^{c}

ตารางที่ 3 Percentage of weight loss of sweet basil stored at 12.5° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	1.9 ± 0.1^{c}	1.3 ± 0.1^{d}	0.59 ± 0.1^{e}	5.37 ± 0.1^{a}
LA treated	0	3.2 ± 0.1^{b}	2.8 ± 0.1^{b}	3.1 ± 0.2^{b}	5.1 ± 0.3^{a}

ตารางที่ 4 Percentage of browning leave of sweet basil stored at 12.5° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	10.0 ± 0.0^{e}	10.0 ± 0.1^{e}	33.3 ± 2.7^{c}	86.7 ± 0.1^{a}
LA treated	0	20.0 ± 0.0^{d}	20.0 ± 0.0^{d}	53.2 ± 5.8^{b}	90.0 ± 5.1^{a}

ส่วนผลร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาลในโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12.5 ° C พบว่า โหระพาในชุดควบคุมจะมีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาลที่ต่ำกว่าชุดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางอย่างมีนัยยะสำคัญ ($p < 0.05$) ตลอดถึงวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ส่วนในวันที่ 8 ของการเก็บรักษานั้นโหระพาทั้งสองชุดการทดลองให้ค่าที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ และเมื่อศึกษาถึงร้อยละการสูญเสียน้ำหนักเพียงอย่างเดียวจะพบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 8 วัน ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักจะเกิดขึ้นเพียงร้อยละ 5 เท่านั้น แต่เมื่อศึกษาถึงผลของการเกิดสีน้ำตาลในโหระพา จะพบว่าโหระพาในชุดควบคุมจะสามารถเก็บรักษาได้จนถึงวันที่ 6 ส่วนโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางนั้น จะสามารถเก็บรักษาได้ถึงวันที่ 4 เท่านั้นเนื่องจากค่าร้อยละการเกิดสีน้ำตาลจะเกิดกว่า 50 % ซึ่งถือว่าไม่เป็นที่ยอมรับ ซึ่งจากรายงานของ Hassan and Mahfouz (2010) พบว่าโหระพาที่เก็บที่อุณหภูมิ 15° C จะมีอายุการเก็บรักษา

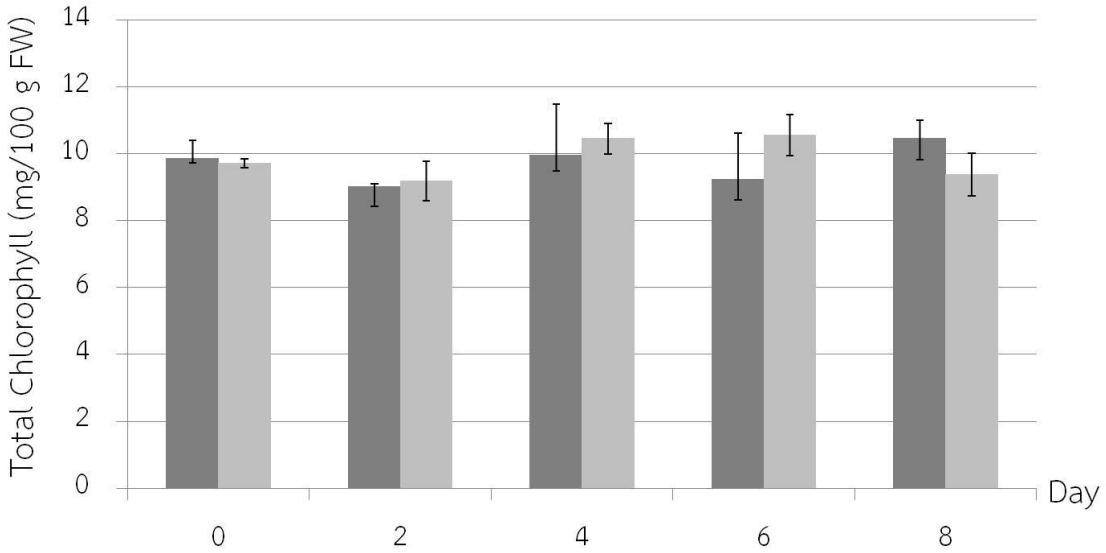
เพียงแค่ 3 วันเท่านั้น และโหระพาที่ผ่านการรมด้วย 1-MCP 0.2 g/m^3 จะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้เป็น 5 วัน ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่า การเก็บโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางนั้น ถึงแม้จะมีอายุการเก็บรักษาสั้นกว่าชุดควบคุมที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่ก็สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้มากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C หรืออาจจะมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้ 1-MCP 0.2 g/m^3

ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักนั้นมักจะเกิดจากการสูญเสียปริมาณน้ำในตัวอย่าง ในขณะเดียวกันการเกิดสีน้ำตาลในโหระพามักจะเกี่ยวข้องกับ chilling injury ซึ่งสาเหตุของการเกิด chilling injury นั้นอาจจะมีผลมาจากค่าการเบี่ยงเบนของอุณหภูมิในตู้แช่ที่ต่ำกว่า 12° C หรืออาจจะเกิดจากการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลาง ซึ่งอาจจะส่งผลต่อเซลล์พืชบางประการ ทำให้เกิดอาการบาดเจ็บของเยื่อหุ้มเซลล์ของพืช ซึ่งอาจจะส่งผลให้ปริมาณสารอาหารผ่านในเซลล์รั่วไหลออกมา รวมถึงปริมาณน้ำในเซลล์ด้วย จากสาเหตุข้างต้นจึงอาจจะเป็นผลให้เกิดร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและการเกิดสีน้ำตาลในอัตราที่สูงกว่าปกติ ซึ่งผลของการใช้สารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางที่อาจจะส่งผลบางประการต่อลักษณะของใบโหระพานั้น จำเป็นจะต้องมีการศึกษาในเชิงสรีรวิทยาของพืชต่อไป จึงจะสามารถอธิบายปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้

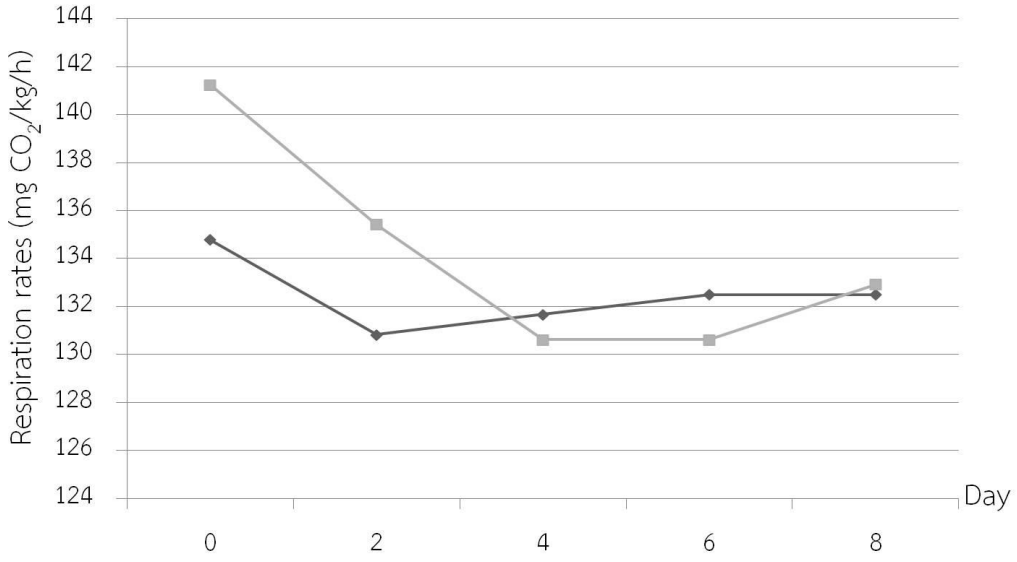
4.3 คุณภาพทางเคมี

ปัจจัยคุณภาพทางเคมีที่ทำการศึกษาในการทดลองนี้คือ ปริมาณคลอโรฟิลล์รวม ปริมาณการรั่วของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ และอัตราการหายใจ ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของโหระพาทั้งที่ไม่ผ่านและผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนในระดับกลางไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาเป็นเวลา 8 วัน ส่วนอัตราการหายใจนั้นทำการ

ทดลองโดยวัดปริมาณก๊าซ CO_2 ที่เกิดขึ้นภายหลังการนำใบโหระพามาบรรจุในระบบปิดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าในช่วง 2 วันแรกของการเก็บรักษา โหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อน

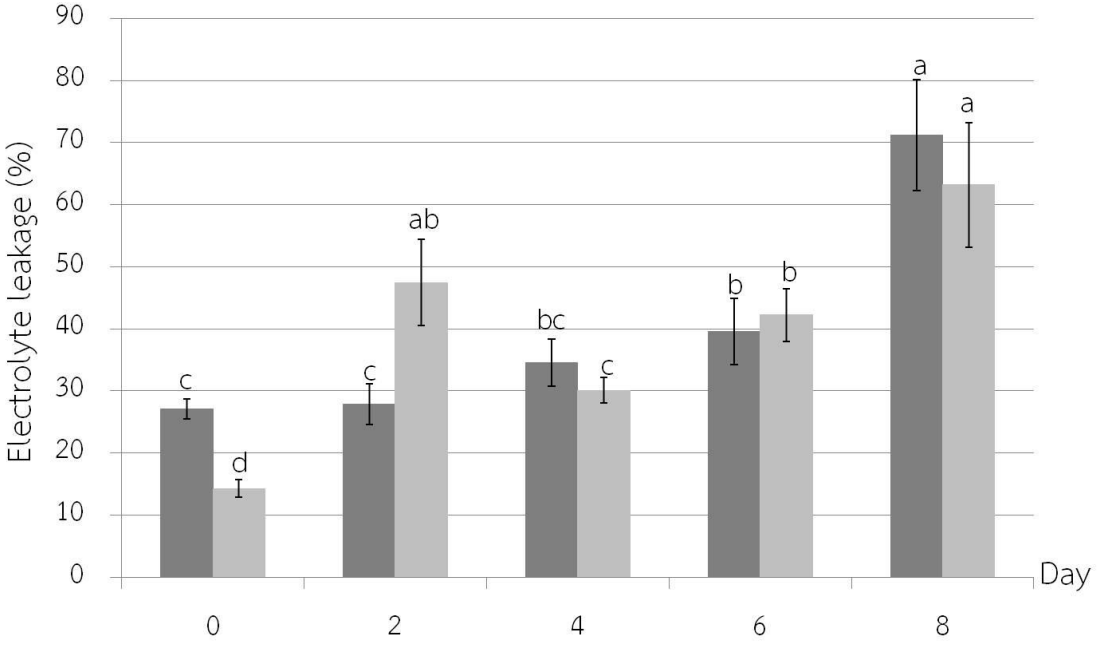


ภาพที่ 7 Total chlorophyll content in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50° C ( ) during stored at 12° C for 8 days.



ภาพที่ 8 Respiration rate in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50° C (during stored at 12° C for 8 days.

ในระดับกลางจะมีอัตราการหายใจที่สูงกว่าในโหระพาที่ไม่ผ่านการล้างใดเลย และเมื่อวันที่ 4 ของการเก็บรักษาอัตราการหายใจจะลดลงมาในปริมาณที่ใกล้เคียงกับอัตราการหายใจของชุดควบคุม จากการทดลองข้างต้นจึงอาจจะสามารถสันนิษฐานได้ว่า การล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางน่าจะส่งผลบางประการต่อเซลล์ของใบโหระพา ซึ่งอาจจะทำให้ส่งผลมาถึงอัตราการหายใจที่เพิ่มขึ้นของเซลล์พืชด้วย



ภาพที่ 9 Percentage of electrolyte leakage in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50° C ( ) during stored at 12° C for 8 days. Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=3). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

เมื่อศึกษาผลของร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์พืช ช่วงวันที่ 0 หรือทันทีภายหลังการล้างโหระพาด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางจะพบว่าร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ของโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางจะต่ำกว่าในชุดควบคุม แต่เมื่อเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านสภาวะการล้างดังกล่าวไปเพียง 2 วันจะพบว่าร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นจนมีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญ ซึ่งจากผลการทดลองนี้มีแนวโน้มไปในทางเดียวกับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดที่น้ำตาลที่เพิ่มสูงขึ้น และนอกจากนี้การรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ยังมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ

ตลอดการเก็บรักษา ซึ่งข้อมูลการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์โหระพานั้นสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันกับการทดลองของ Cozzolino et al. (2016) ซึ่งพบว่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์นั้นจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ สอดคล้องกับร้อยละการเกิดสีน้ำตาลในใบโหระพา การวัดการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์นั้นเป็นการวัดความสมบรูณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ทางอ้อม (Martínez-Sánchez et al., 2011) และยังสามารถใช้เป็นจุดประสงค์ในการวัด chilling injury ของใบผักได้อีกด้วย (Kader, 2013) การเกิด chilling injury มีปัจจัยหลักมาจากการสูญเสียความสมบรูณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วไหลของอิออนและสารเมตาบอไรซ์ภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้เซลล์ตายและเกิดการเน่าเสียที่เร็วขึ้น (Kays, 1991; Larcher, 2006) อีกทั้งข้อมูลการรั่วไหลการสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ยังสามารถนำมาใช้ในการบ่งบอกความไวต่อการเกิด chilling injury ของโหระพาแต่ละพันธุ์ได้อีกด้วย (Cozzolino et al., 2016)

4.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

Table 5 The observed scores of sweet basil packed in polyethylene bag at 12.5±1 ℃ (Overall difference from control method)

Storage time Day	Appearance		Color	
	control	LA-treated	control	LA-treated
0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0
2	9.12±1.1	7.82±2.1	8.72±1.1	7.23±0.5
4	8.76±3.1	6.52±2.3	7.91±2.1	6.39±3.1
6	5.41±1.4	2.12±2.7	5.47±2.5	2.74±1.5
8	3.75±2.3	1.23±1.4	2.13±2.1	1.31±1.0

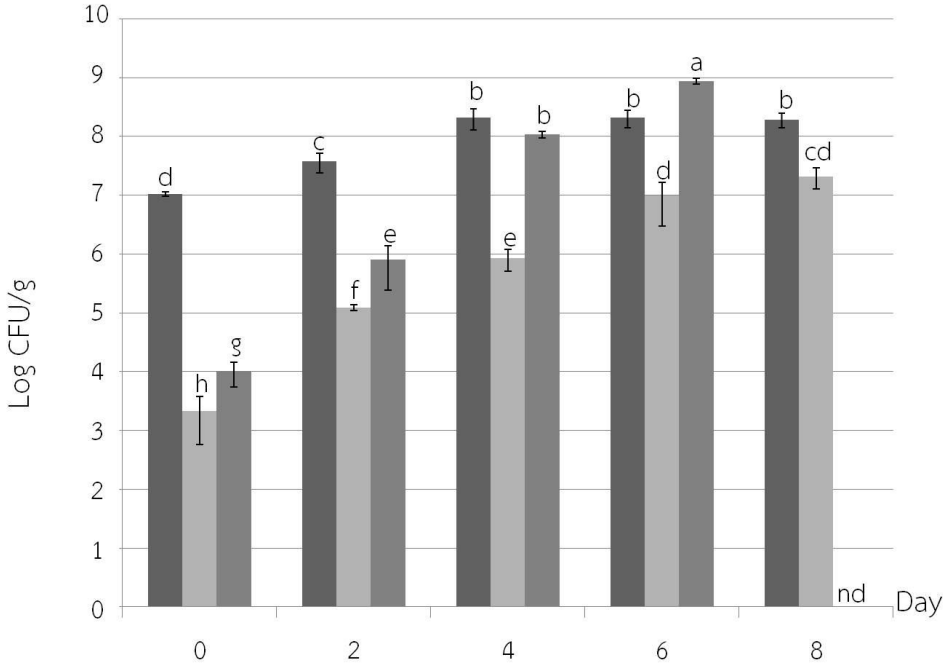
Acceptance score: ≥ 5

จากผลการทดลองพบว่า คะแนนคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางลักษณะปรากฏและสี ในวันแรกของการเก็บรักษา คะแนนของโหระพาชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางจะอยู่ในระดับคะแนนที่เท่ากัน คือไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ระหว่างชุดที่ผ่านและไม่ผ่านการล้าง แต่เมื่อผ่านการเก็บรักษาจะพบว่าคะแนนการยอมรับของผู้ทดสอบจะให้การยอมรับในชุดตัวอย่างชุดควบคุมมากกว่า ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการเกิดสีน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในชุดตัวอย่างที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลาง โดยชุดตัวอย่างควบคุมจะให้การยอมรับถึงวันที่ 6 ของการเก็บรักษา ในขณะที่โหระพาชุดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดอินทรีย์ร่วมกับความร้อนระดับกลางจะได้รับการยอมรับถึงแค่วันที่ 4 เท่านั้น

ตอนที่ 5 การศึกษาสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายฆ่าเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อนระดับกลาง

นำเอาตัวอย่างโหระพาที่ผ่านล้างในสารละลายกรดแลกติก 2% ร่วมกับความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 1 นาที แล้วนำโหระพาที่ได้บรรจุลงในถุงโพลีเอทิลีนเจาะรู 4 รู ขนาดบรรจุ 50 กรัม แล้วนำไปเก็บรักษาเปรียบเทียบระหว่างที่อุณหภูมิ 12° C กับ 15° C พบว่า

5.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์



ภาพที่ 10 Visible count of indigenous mesophilic bacteria in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50° C during stored at 12° C ( ) and 15° C ( ). Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=3). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

จากภาพที่ 10 พบว่าการเก็บรักษาโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง โดยมีอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 12° C จะให้ผลในการชะลอการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั่วไปได้ดีกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15° C โดยในช่วงแรกของการเก็บรักษา (วันที่ 0-2) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในโหระพาที่เก็บรักษาที่ 15° C ยังคงมีปริมาณที่ต่ำกว่าในชุดควบคุมอย่างมีนัยยะสำคัญ แต่เมื่อเข้าสู่วันที่ 4 จะ

เห็นว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณเท่ากับในชุดควบคุมและมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเกินกว่าในชุดควบคุมในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา อีกทั้งเมื่อเก็บไว้ที่ 15° C โหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจะมีอายุการเก็บรักษาได้เพียงถึงวันที่ 6 เท่านั้น ในวันที่ 8 โหระพาที่ผ่านการล้างในสภาวะดังกล่าวได้เสื่อมคุณภาพไปแล้ว จึงไม่สามารถตรวจสอบคุณภาพได้

5.2 คุณภาพทางกายภาพ

ตารางที่ 6 Percentage of falling leaves of sweet basil stored at 12° C and 15° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	0	8.0 ± 0.1^{e}	11.3 ± 0.1^{c}	13.2 ± 0.2^{a}
LA treated (12)	0	0	0	5.0 ± 0.2^{g}	9.4 ± 0.3^{d}
LA treated (15)	0	0.3 ± 0.0^{h}	7.7 ± 0.1^{f}	12.3 ± 0.2^{b}	nd

ร้อยละการหลุดร่วงของใบโหระพา จากตารางที่ 6 จะพบว่าโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลาง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15° C นั้นจะเริ่มมีการหลุดร่วงของใบตั้งแต่วันที่ 2 ในขณะที่ชุดควบคุมจะเริ่มหลุดร่วงในวันที่ 4 และชุดที่นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 12° C จะเริ่มหลุดร่วงวันที่ 6 ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 7 และ 8 คือ ร้อยละการสูญเสียน้ำหนักและร้อยละการเกิดสีน้ำตาลควบคู่ไปด้วย จะยิ่งเห็นได้ชัดเจนว่า การเก็บรักษาโหระพาที่อุณหภูมิ 15° C นั้นจะก่อให้เกิดร้อยละการสูญเสียน้ำหนักที่สูงมาก โดยเพียงวันที่ 2 ของการเก็บรักษาก็มีร้อยละการสูญเสียน้ำหนักถึง 8.3 % ในขณะที่การเก็บรักษาโหระพาทั้งที่ผ่านการล้างและไม่ผ่านการล้างสารละลายกรดแลกติกร่วมกับ ความร้อนระดับกลางที่อุณหภูมิ 12° C มีร้อยละการสูญเสียน้ำหนักเพียง 5 เท่านั้น อีกทั้งเมื่อพิจารณาจากร้อยละการเกิดสีน้ำตาลพบว่า ในช่วงแรกของการเก็บรักษา (0 -2 วัน) การเก็บรักษาโหระพาที่ 15° C จะไม่พบร้อยละ

การเกิดสีน้ำตาล แต่เมื่อผ่านวันที่ 4 ของการเก็บรักษาไป จะพบว่าร้อยละการเกิดสีน้ำตาลในโหระพาเพิ่มขึ้นสูงมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C จากการเปรียบเทียบอุณหภูมิการเก็บรักษาเบื้องต้น จะพบว่าการเก็บรักษาโหระพาทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการล้างในสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C นั้นจะสามารถรักษาคุณภาพทางกายภาพของโหระพาได้ดีกว่า

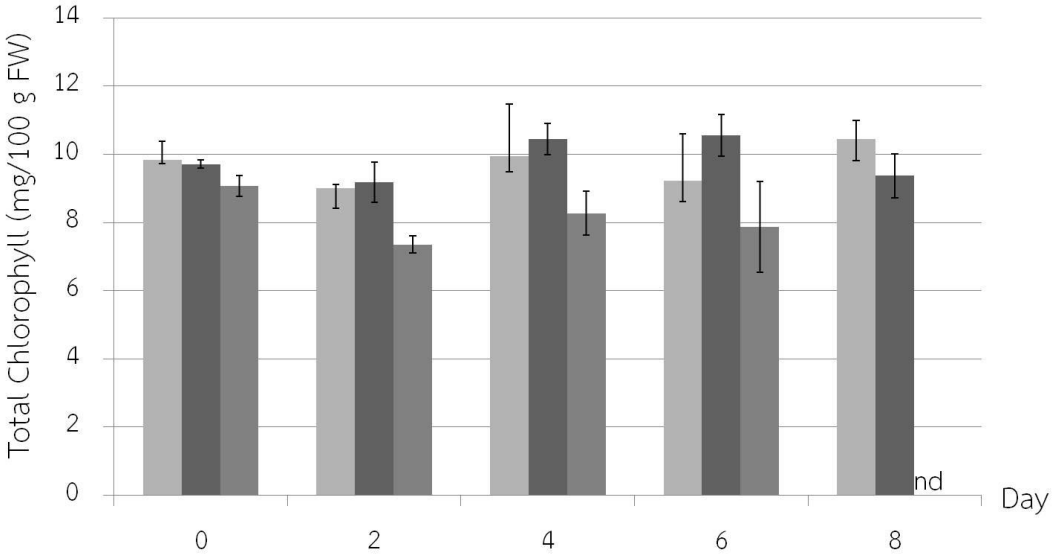
ตารางที่ 7 Percentage of weight loss of sweet basil stored at 12° C and 15° C

Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	1.9 ± 0.1^{g}	1.3 ± 0.1^{h}	0.59 ± 0.1^{i}	5.37 ± 0.1^{d}
LA treated (12)	0	3.2 ± 0.1^{e}	2.8 ± 0.1^{f}	3.1 ± 0.2^{ef}	5.1 ± 0.3^{d}
LA treaded (15)	0	8.3 ± 0.1^{c}	12.1 ± 0.1^{b}	20.8 ± 0.2^{a}	nd

ตารางที่ 8 Percentage of browning leaves of sweet basil stored at 12° C and 15° C

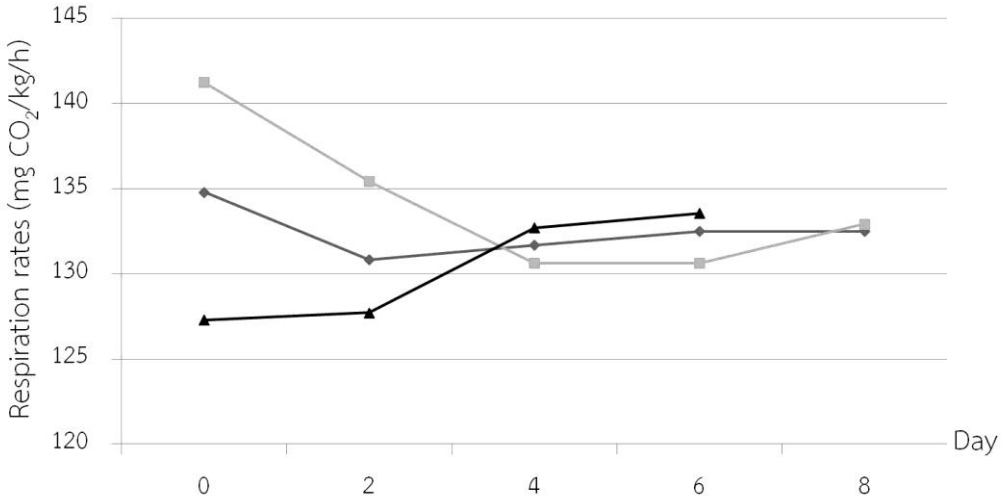
Condition	Day				
	0	2	4	6	8
Control	0	10.0 ± 0.0^{f}	10.0 ± 0.1^{f}	33.3 ± 2.7^{d}	86.7 ± 0.1^{a}
LA treated (12)	0	20.0 ± 0.0^{e}	20.0 ± 0.0^{e}	53.2 ± 5.8^{c}	90.0 ± 5.1^{a}
LA treated (15)	0	0.0 ± 0.0^{g}	30.0 ± 0.0^{d}	80.0 ± 1.2^{b}	nd

5.3 คุณภาพทางเคมี



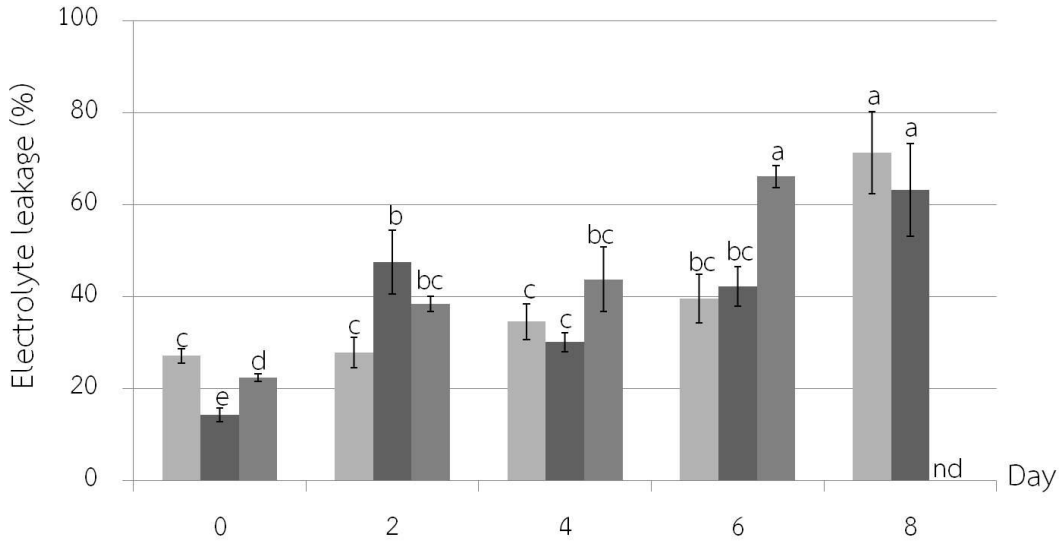
ภาพที่ 11 Total chlorophyll content in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50° C during stored at 12° C (and 15° C ( )

จากภาพที่ 11 ผลของการวัดปริมาณคลอโรฟิลล์รวมของการเก็บรักษาที่ 12 และ 15° C พบว่า วันที่ 0 ถึง 4 ของการเก็บรักษาโหระพา โหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C จะมีผลของคลอโรฟิลล์รวมต่ำกว่าในชุดควบคุมและชุดที่เก็บที่อุณหภูมิ 12° C อย่างมีนัยยะสำคัญ และปริมาณคลอโรฟิลล์รวมก็มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษา แต่จะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C จะมีแนวโน้มในการลดลงที่ชัดเจนกว่าชุดของโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C โดยทั่วไปการสูญเสียปริมาณคลอโรฟิลล์จะบ่งบอกถึงการชราภาพ การป้องกันการสูญเสียคลอโรฟิลล์สามารถทำได้โดยการลดอุณหภูมิของการเก็บรักษา (จริงแท้ ศิริพานิช, 2542) ซึ่งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C อาจจะเป็นการเร่งให้คลอโรฟิลล์เสื่อมสภาพได้เร็วกว่าที่ 12° C อีก ทั้งอุณหภูมิที่สูงกว่าอาจจะทำให้โหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางเข้าสู่ระยะชราภาพได้เร็วกว่าอีกด้วย



ภาพที่ 12 Total chlorophyll content in non-treated (◆) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50° C during stored at 12° C (■) and 15° C (▲).

จากภาพที่ 12 จะพบว่าอัตราการหายใจของโหระพาเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C จะต่ำกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C ซึ่ง จริงแท้ ศิริพานิช (2542) กล่าวว่า อัตราการหายใจของพืชเมืองร้อนบางชนิดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อลดอุณหภูมิต่ำลง ซึ่งอาการข้างต้นอาจจะมีผลมาจากการเกิด chilling injury ซึ่งโหระพาเป็นหนึ่งในพืชที่เกิดอาการสะท้านหนาวได้ง่าย จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าในช่วงแรกของการเก็บรักษา โหระพาที่เก็บที่อุณหภูมิ 12° C จะเกิดอัตราการหายใจที่เพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น อัตราการหายใจของโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C ก็ยิ่งเพิ่มมากขึ้น โดยในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาจะมีอัตราการหายใจเพิ่มสูงมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C ในขณะที่ โหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 12° C มีอัตราการหายใจลดลง ปรากฏการณ์ข้างต้นอาจจะมีผลมาจากการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางซึ่งอาจจะส่งผลบางประการต่อสรีรวิทยาของใบโหระพา



ภาพที่ 13 Percentage of electrolyte leakage in non-treated ( ) and treated sweet basil by LA in combination with mild heat treatment at 50° C during stored at 12° C ( ) and 15° C ( ). Error bars indicate standard deviation of the mean of replicated experiments (n=3). Different letters represent significant differences at $p < 0.05$

ภาพที่ 13 แสดงร้อยละการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ พบว่าวันแรกของการเก็บรักษาปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ของโหระพาผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจะมีค่าการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ที่ต่ำกว่าชุดควบคุม แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มมากขึ้น จะพบว่าปริมาณการรั่วไหลของสารอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ของโหระพาผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจะมีค่าสูงเกินกว่าชุดควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งโหระพาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C จะเพิ่มมากสูงขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ

5.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

Table 9 The observed scores of sweet basil packed in polyethylene bag at 12 and 15°C

Storage time Day	Appearance			Color		
	control	LA-treated (12° C)	LA-treated (15° C)	control	LA-treated (12° C)	LA-treated (15° C)
0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0	10.00±0.0
2	9.12±1.1	7.82±2.1	7.76±2.1	8.72±1.1	7.23±0.5	7.12±1.1
4	8.76±3.1	6.52±2.3	5.52±2.3	7.91±2.1	6.39±3.1	5.37±1.5
6	5.41±1.4	2.12±2.7	1.04±2.7	5.47±2.5	2.74±1.5	1.07±1.8
8	3.75±2.3	1.23±1.4	nd	2.13±2.1	1.31±1.0	nd

nd: not detectable

acceptance score: ≥ 5

จากตารางที่ 9 คุณลักษณะปรากฏและสีของโหระพาทุกชุดการทดลอง ในการเก็บรักษาวันแรกยังได้รับคะแนนการยอมรับในระดับสูง แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น พบว่าการเก็บรักษาโหระพาที่อุณหภูมิ 12° C ให้คุณลักษณะปรากฏและสีในคะแนนการยอมรับที่สูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15° C แต่ทั้งนี้และทั้งนั้นระดับคะแนนการยอมรับของโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายกรดแลกติกร่วมกับความร้อนระดับกลางจะมีอายุการเก็บรักษาเพียงแค่ 4 วันเท่านั้น ในขณะที่โหระพาชุดควบคุมจะมีค่าการยอมรับในอายุการเก็บรักษาถึง 6 วัน

เอกสารอ้างอิง

จริงแท้ ศิริพานิช. 2542. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวผักและผลไม้. พิมพ์ครั้งที่ 3. 396 หน้า. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร

Cozzolino, R., Pace, B., Cefola, M., Martignetti, A., Stocchero, M., Fratianni, F., Nazzaro, F. and De Giulio, B. 2016. Assessment of volatile profile as potential marker of chilling injury of basil leaves during postharvest storage. Food Chemistry. 213: 361-368.

Hassan, F.A.S. and Mahfouz, S.A. 2010. Effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on sweet basil leaf senescence and ethylene production during shelf-life. Postharvest Biology and Technology. 55: 61-65.

Kader, A. A. 2013. Postharvest technology of horticultural crops – An overview from farm to fork. Ethiopian Journal of Science and Technology. 1: 1-8.

Kays, S. J. 1991. Postharvest physiology of perishable plant product. New York: AVI Books.

Larcher, W. 2006. Ecofisiologia Vegetal. São Carlos: RIMA Artes e Textos. 532p.

Martínez-Sánchez, A., Tudela, J. A., Luna, C., Allende, A. and Gil, M. I. 2011. Low oxygen levels and light exposure affect quality of fresh-cut Romaine lettuce. Postharvest Biology and Technology. 59: 34-42.

USDA, 2016. The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks. Agriculture Handbook 66, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, DC. 792p.

Wongsheree, T., Ketsa, S. and Doorn, W.G. 2009. The relationship between chilling injury and membrane damage in lemon basil (Ocimum×citriodourum) leaves. Postharvest Biology and Technology. 51(1): 91-96.

7.3 ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

ไม่มี