บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ยีสต์มีความสำคัญด้านอาหารทั้งในแง่ประโยชน์ และโทษ โดยยีสต์มีบทบาทสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท เช่น ขนมปัง ไวน์ เบียร์ เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ น้ำส้มสายชูหมักและอาหารหมักพื้นเมือง ขณะเดียวกันยีสต์ทำให้อาหารต่างๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม น้ำผึ้ง แยม ผักดอง และอาหารอื่นๆ เกิดการเน่าเสีย (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

การเน่าเสียที่เกิดขึ้นได้บ่อยเมื่อเก็บน้ำผลไม้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยยีสต์จะหมักน้ำตาลในน้ำผลไม้ได้เป็นแอลกอฮอล์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) ส่วนในผักดอง เช่น แตงกวาดองและผักกาดดองจะเกิดฟิล์มยีสต์ขึ้นบนอาหารซึ่งเกิดโดยยีสต์ในจีนัส *Pichia Hansenula Debaryomyces Candida* และ *Trichosporon* ที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารที่มีความเป็นกรด (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

ในการถนอมอาหารไม่ให้เสียโดยทั่วไปนิยมใช้สารต้านจุลินทรีย์ เช่น ซอร์เบท และเบนโซเอท ซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งอาจไม่มีความปลอดภัยหากใช้ในปริมาณที่มากเกินไป (ศิวาพร ศิวเวช, 2529) ปัจจุปันผู้บริโภคไม่นิยมบริโภคอาหารที่มีการเติมสารต้านจุลินทรีย์ที่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ แต่ต้องการบริโภคอาหารที่ใช้วิธีการถนอมอาหารแบบธรรมชาติมากขึ้น เช่น การลดความชื้นของอาหาร โดยการเติมน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครส และการทำให้อาหารมีพีเอชต่ำลงโดยการเติมกรดซิตริกหรือกรดฟอสฟอริก รวมทั้งการสนใจที่จะนำเครื่องเทศ หรือสารสกัดจากพืชมาใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร สารสกัดดังกล่าวนอกจากจะใช้เพื่อการแต่งกลิ่นและรสแล้วยังมีประโยชน์ในทางการแพทย์ และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระอีกด้วยทั้งยังมีความปลอดภัยในการที่จะนำมาใช้ในการถนอมอาหารและเครื่องดื่มได้ (Lopez-Malo *et al*., 1997)

Conner และ Beuchat (1984) พบว่าน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด ได้แก่ อัลสไปส์(Allspice) อบเชย กานพลู กระเทียม หอม ออริกาโน (Oregano) ซาวอรี (Savory) และไทม์ (Thyme) สามารถยับยั้งยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 13 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

Roller (1995) นำกรดซินนามิค ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิค ที่พบในเครื่องเทศหลายชนิด รวมทั้งอบเชย มาใช้แช่หรือสเปรย์ผลไม้ทั้งผลหรือผลไม้ที่หั่นชิ้น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น พบว่ากรดซินนามิคสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลไม้ได้หลายชนิด Cerrutti และ Alzamora (1996) รายงานการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ ของน้ำมันหอมระเหยสามารถทำได้โดยการใช้ร่วมกับปัจจัยกดดันอื่นๆ เช่น พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือปริมาณน้ำตาล ซึ่งวิธีการดังกล่าวได้รับความนิยมมากในหลายประเทศที่พัฒนาแล้วในการนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์ผลไม้ที่ผ่านกระบวนการเพียงเล็กน้อย

ดังนั้นโครงการทำวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ จึงศึกษาถึงสายพันธุ์ของยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำส้มเกล็ดหิมะและผักกาดดอง คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์หลักที่แยกได้ 2-3 สายพันธุ์ และศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพรที่สกัดด้วยด้วยน้ำและเอทานอลต่อการเจริญของยีสต์ และคัดเลือกสารสกัดพืชสมุนไพรที่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ดีที่สุด 1-2 ชนิดแล้วนำไปศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดพืชสมุนไพรเมื่ออยู่ในน้ำส้มเกล็ดหิมะที่มีพีเอชและปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างกัน และเมื่ออยู่ในน้ำผักกาดดองที่มีพีเอชและปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกันต่อการยับยั้งยีสต์ในแต่ละสายพันธุ์

จากผลการทดลองที่ได้จะช่วยในการประเมินความเป็นไปได้ที่จะนำสารสกัดพืชสมุนไพรดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป เช่น การทำสารสกัดให้บริสุทธิ์มากขึ้น การลดสี และกลิ่นของสารสกัด เพื่อให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1 ยีสต์

ยีสต์เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีรูปร่างหลายแบบ คือ กลม (round) รี (oval) สามเหลี่ยม (triangular) ยาวปลายด้านหนึ่งแหลม (ogival, boat) รูปแบบเหมือนมะนาวฝรั่ง (apiculated) คนโท (flask) ยาว (elongate) และเป็นสาย (filamentous) ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยเทียม (psuedomycelium) และเส้นใยแท้ (true mycelium) วิธีการสืบพันธุ์ของยีสต์มีทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศและมีเพศ วิธีการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศ ได้แก่ การแตกหน่อ (budding) การแตกหน่อแบบมีฐานกว้าง (bud - fission) การแบ่งเซลล์โดยการขยายขนาดของเซลล์แล้วสร้างผนังกั้นแบ่งเซลล์เป็นสองส่วน (fission) ยีสต์บางชนิดอาจมีการสร้างคอนิเดีย (conidia) ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมี 2 พวก คือพวกที่สร้างแอสโค

สปอร์ (ascosporogenous yeast) และพวกที่สร้างเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore yeast) ซึ่งสปอร์ทั้งสองชนิดนี้เกิดขึ้นจากการรวมตัวของนิวเคลียสและตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอสีส (meiosis) (ศศิธร จินดามรกฎ, 2543)

1.2.1.1 ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกประเภท (classification) ของยีสต์

ลักษณะที่สำคัญที่ใช้การจำแนกประเภทของยีสต์ ตามหลักการของ numerical taxonomy ที่รวบรวมโดย Kurtzman และ Fell (1998) ประกอบด้วย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเพิ่มจำนวนแบบไม่มีเพศ

- รูปร่างของเซลล์
- การเจริญบนอาหารแข็งและอาหารเหลว
- การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม
- การสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศภายในเซลล์ (asexual endospore)
- การสร้างคลามัยโดสปอร์ (chlamydospore)
- การสร้างบอลิสโตสปอร์ (ballistospore)

การเพิ่มจำนวนแบบมีเพศ

- การสร้างแอสโคสปอร์
- การสร้างเบสิดิโอสปอร์
- การตรวจหา mating type

ลักษณะทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

- การหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรท
- การใช้สารประกอบคาร์บอน
- การใช้สารประกอบไนโตรเจน
- การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน
- การเจริญในอาหารที่มีกลูโคส 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และอาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์
- การเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิอื่นๆ
- การสร้างกรดจากการใช้กลูโคส
- การสร้างสารประกอบอมัยลอยด์ (amyloid)
- การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease)
- การทนต่อกรดอะซิตริกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

- การทดสอบปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue B)

ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกประเภทตามหลักการของ chemotaxonomy นั้น ตามที่ Kurztman และ Fell (1998) ได้รวบรวมไว้คือ

- ชนิดของโคเอนไซด์คิว (coenzyme Q)
- องค์ประกอบของผนังเซลล์
- DNA-DNA hybridization
- DNA-base composition
- G+C contents

ดังนั้นในการพิสูจน์ความเหมือนเพื่อระบุชื่อตามอนุกรมวิธานของยีสต์จำเป็นต้องศึกษาลักษณะต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นของเชื้อบริสุทธิ์ แล้วนำไปเทียบกับคีย์สำหรับอนุกรมวิธาน (taxonomic key) (ศศิธร จินดามรกฏ, 2543)

ยีสต์มีความสำคัญในอาหาร ทั้งในแง่ประโยชน์และทำให้เกิดความเสียหายแก่อาหาร โดยยีสต์มีบทบาทสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ขนมปัง ไวน์ เบียร์ เครื่องแอลกอฮอล์อื่นๆ น้ำส้มสายชูหมัก อาหารหมักพื้นเมือง นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ กรดอินทรีย์และเป็นอาหารโปรตีนโดยตรง ขณะเดียวกันยีสต์ทำให้อาหารต่างๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม น้ำผึ้ง แยม ผักดอง ไวน์ เบียร์ เนื้อสัตว์ และอาหารอื่นๆ เกิดการเน่าเสียได้เช่นกัน (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

1.2 .1.2 ยีสต์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย

Loureiro และ Ferreira (2003) รายงานว่า ปัจจุบันสามารถจำแนกยีสต์ ตามอนุกรมวิธานได้ 761 สปีชีส์ หนึ่งในสี่ แยกได้จากอาหารแต่ไม่ทั้งหมดที่ทำให้อาหารและเครื่องดื่มเน่าเสีย ซึ่งยีสต์ที่พบมีการปนเปื้อนและทำให้อาหารเน่าเสีย โดยสายพันธุ์ที่พบบ่อยๆ แสดงในตารางที่ 1

1.2.1.3 ลักษณะของอาหารที่เน่าเสียโดยยีสต์

ลักษณะของอาหารที่เน่าเสีย ที่เกิดจากการปนเปื้อนของยีสต์ จะมีลักษณะ สี กลิ่นของอาหารเปลี่ยนไปหรืออาจมีแก๊สและฟิล์มเกิดขึ้นในอาหาร ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร ดังตารางที่ 2 (Loureiro and Querol, 1999)

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ของยีสต์ที่มีการปนเปื้อนที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารและเครื่องดื่ม

Table 1 Contamination and spoilage yeasts recoverved from foods and beverages

Most Frequent contaminanats (Deck and Beuchat, 1996)	Spoilage species (Pitt and Hocking ,1985)	Additional spoilage species (Tudor and Board, 1993)
Saccharomyces cerevisiae	*Brettanomyces intermeditus*	*Candida dattila*
Debaryomyces hansenii	*Candida holmii*	*Candida globosa*
Pichia anomala	*Candida krusei*	*Candida humicola*
Pichia membranifaciens	*Debaryomyces hansenii*	*Candida lactis-condensi*
Rhodotorula glutinis	*Kloeckera apiculata*	*Candida lipolytica*
Rhodotorula mucilaginosa	*Pichia membranifaciens*	*Candida parapsilosis*
Toruaspola delbrueckii	*Saccharomyces cerevisiae*	*Candida sake*
Kluyveromyces marxianus	*Schizosaccharomyces pombe*	*Candida versatilis*
Issatchenkia orientalis	*Zygosaccharomyces bailii*	*Candida zeylanoides*
Zygosaccharomyces bailii	*Zygosaccharomyces bisporus*	Cryptococcus *spp.*
Candida parapsilosis	*Zygosaccharomyces rouxii*	*Hunsenula anomala*
Zygosaccharomyces rouxii		*Hunsenula subpelliculoxa*
Candida guilliermondii		*Kluyveromyces marxianus*
Candida albidus		*Pichia burlonii*
Candida tropicalis		*Pichia fermentans*
Saccharomyces exiguous		*Sporobolomyces roseus*
Pichia fermentans		*Toruaspola delbrueckii*
Trichosporon pullutans		*Trichosporon cultaneum*
Hanseniapola uvarum		*Trycosporum pullnulans*
Candida zeylanoides		

ที่มา : Loureiro และ Ferreira (2003)

ตารางที่ 2 ชนิดและลักษณะของอาหารที่เกิดการเน่าเสียโดยยีสต์

Table 2 Principal spoilage effects caused by yeast activity in foods

Type of food	Spoilage effect						
	Surface Growth	Discolouration	Gas production	Haze/ Cloudiness	Films	Off - Flavours	Texture changes
Fresh vegetables	X	X				X	X
Brined vegetables	X	X	X		X	X	X
"Ready-to-eat" Vegetables	X		X			X	
Fresh Fruits		X	X			X	X
Fruit juices			X	X		X	
"Ready-to-eat" Fruits	X		X			X	
Mayonnaise		X	X		X	X	X
Wine, Beer			X	X	X	X	
Soft drinks			X	X		X	
Confectionery,Jams	X	X	X	X	X	X	X
Syrups,honey, fruit concentrates			X	X	X	X	
Butter , cream		X				X	
Cheese		X	X			X	
Yoghurts			X		X	X	
Sliced bread	X	X				X	
Unbaked bread Dough	X	X				X	
Sausage	X	X	X			X	

ที่มา : Loureiro และ Querol (1999)

1.2.1.4 ยีสต์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เน่าเสีย

น้ำผลไม้มีปริมาณน้ำตาลแตกต่างกัน ตั้งแต่ 2 เปอร์เซนต์ (น้ำมะนาว) จนถึง 17 เปอร์เซ็นต์ (น้ำองุ่น) ส่วนพีเอชแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของผลไม้ เช่น น้ำมะนาวพีเอช 2.4 น้ำส้มคั้นพีเอช 3.82 น้ำสับปะรดพีเอช 4.35 น้ำผลไม้อาจได้จากการคั้นน้ำจากผลไม้โดยตรง หรือในกรณีที่ผลไม้มีน้ำน้อยอาจเติมน้ำเพื่อคั้นเอาน้ำผลไม้ออกมา น้ำผลไม้อาจบริโภคโดยตรง หรือนำไปทำเป็นน้ำผลไม้เข้มข้นโดยการระเหยน้ำออกไปหรือการแช่แข็งและอาจเก็บรักษาไว้โดยการบรรจุกระป๋อง แช่แข็งหรือทำแห้ง

แหล่งของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำผลไม้ ส่วนใหญ่มาจากตัวผลไม้เอง ชนิดของจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ยีสต์ที่พบในน้ำผลไม้แต่ละชนิดอาจแตกต่างกันบ้าง ราจะพบในน้ำผลไม้น้อยกว่ายีสต์ ส่วนแบคทีเรียชนิดที่พบมากในน้ำผลไม้ คือ แบคทีเรียแลกติก และการเน่าเสียที่เกิดขึ้นได้บ่อยเมื่อเก็บน้ำผลไม้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก็คือยีสต์จะหมักน้ำตาลในน้ำผลไม้ได้เป็นแอลกอฮอล์ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* หลังจากนั้นถ้าหากผิวหน้าน้ำผลไม้สัมผัสอากาศ ฟิล์มยีสต์และราสามารถเติบโตบริเวณผิวหน้าน้ำผลไม้ออกซิไดส์แอลกอฮอล์และกรดในน้ำผลไม้ต่อไป หรือถ้าในน้ำผลไม้มีแบคทีเรียแลกติก จะออกซิไดส์แอลกอฮอล์เป็นกรดแอซิติกต่อไป (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

น้ำมะนาวเป็นเครื่องดื่มที่มีลักษณะเป็นกรด มีพีเอชประมาณ 3.0 ถึง 4.0 มีส่วนประกอบของน้ำตาลประมาณ 15 องศาบริกซ์ จากลักษณะดังกล่าวของเครื่องดื่ม พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ ได้แก่ แบคทีเรียที่ทนกรด (acidolactic bacteria) เชื้อราและยีสต์ ซึ่งแบคทีเรียแลคติกจะเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในตอนเริ่มแรกในเครื่องดื่มผลไม้ แต่ปริมาณของเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังการพาสเจอร์ไรด์ ซึ่งทำให้เครื่องดื่มมีลักษณะที่เข้มข้นมากขึ้น รวมทั้งการเก็บเครื่องดื่มไว้ที่อุณหภูมิต่ำด้วย ในขณะที่เชื้อราและยีสต์สามารถทนต่อสภาวะที่มีแรงดันออสโมซีสสูงและพีเอชต่ำ รวมทั้งสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำ จึงทำให้เชื้อราและยีสต์เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารพวกเครื่องดื่ม (Arias *et al.*, 2002)

Efiuvwevwere และ Oyelude (1991 อ้างโดย Techango *et al.*, 1997) พบว่าสายพันธุ์ของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำส้มคั้นในประเทศไนจีเรีย คือ *Candida* sp. *Saccharomyces* sp. และ *Pichia* sp.

Techango และคณะ (1997) ศึกษาสายพันธุ์ของยีสต์ที่ทนความร้อนที่แยกได้จากน้ำผลไม้หลายชนิด คือ น้ำสับปะรด น้ำฝรั่ง และ passion fruit nectars ในประเทศ แคมเมอรูน พบเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida pelliculosa* และ *Kloeckera apis*

Hatcher และคณะ (2000 อ้างโดย Arias *et al.*, 2002) ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำมะนาว เชื้อยีสต์ที่พบคือ *Candida parapsilosis Candida stella Saccharomyces cerevisae Torulaspora delbrueckii Zygosaccharomyces Rhodotorula* และ *Pichia*

Arias และคณะ (2002) ศึกษาถึงสายพันธุ์ของยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำผลไม้ชนิดน้ำส้มคั้น น้ำองุ่น และน้ำแอปเปิล พบว่า ยีสต์สายพันธุ์หลักที่พบในน้ำส้มคั้นที่ผ่านการพาสเจอร์ไรด์ คือ *Candida intermedic* และ *Candida parapsilosis* ส่วนยีสต์สายพันธุ์หลักที่พบในน้ำส้มคั้นสด คือ *Hanseniaspora uvarum Hanseniaspora occidentalis* ส่วนสายพันธุ์ของยีสต์ที่พบในน้ำองุ่น คือ *Sacchaomyces uvarum* และ *Rhodotorula mucilaginosa* และสายพันธุ์ที่พบในน้ำแอปเปิล คือ *Sacchaomyces uvarum.*

1.2.1.5 ยีสต์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ผักดองเน่าเสีย

ผลิตภัณฑ์ผักดองแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ประเภทที่หนึ่งคือผลิตภัณฑ์ผักดอง ที่ไม่ได้เกิดจากการหมักของจุลินทรีย์ ผักดองประเภทนี้ได้จากการปรุงแต่งรสชาดด้วยเกลือ น้ำตาล น้ำส้มสายชู และเครื่องเทศ เช่น กระเทียมดอง ซีเซ็กจ่าย แตงกวาสามรส เป็นต้น ส่วนประเภทที่สองเป็นผลิตภัณฑ์ผักดองที่เกิดจากการหมักของจุลินทรีย์ ผักดองประเภทนี้ได้จากการเติมเกลือลงไปในผัก โดยเติมลงไปในปริมาณที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการให้มีบทบาทในการหมัก ในขณะเดียวกันเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักดองผัก ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก สำหรับผลิตภัณฑ์ผักดองที่ผลิตกันมากในต่างประเทศและผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้แก่ กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดองและผักดองอื่นๆ ส่วนผลิตภัณฑ์ผักดองที่ผลิตและจำหน่ายกันมากในประเทศไทย ได้แก่ ผักกาดดองส่วนผักอื่นๆที่นำมาใช้ดองได้แก่ หน่อไม้ หน่อถั่วลิสง ผักบุ้ง หอมแดง ผักเสี้ยน และสะตอ เป็นต้น (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

การหมักโดยธรรมชาตินั้น ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในการหมัก ได้แก่ ความเข้มข้นของเกลือ อุณหภูมิของน้ำเกลือ ชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ตั้งต้น ในระยะแรกของการหมักจะพบจุลินทรีย์จำพวก *Pseudomonas Flavorbacterium Bacillus* รา และยีสต์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นพวกที่ไม่ต้องการ ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกที่ต้องการจะพบจำนวนน้อยกว่า แต่แบคทีเรียแลกติก แบคทีเรียสร้างกรด และยีสต์ จะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการลดจำนวนลงและอาจหายไปเมื่อปริมาณกรดเพิ่มขึ้น หลังจากการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติก เสร็จสิ้นอาจมีพวกยีสต์เจริญเติบโตต่อไป ซึ่งยีสต์ที่พบมีทั้ง 2 กลุ่มคือ ฟิล์มยีสต์ ซึ่งจะเจริญเติบโตที่ผิวหน้าของน้ำเกลือและใช้กรดแลกติกที่เกิดขึ้นโดยการออกซิเดชัน ทำให้ปริมาณกรดลดลง ฟิล์มยีสต์ที่พบได้แก่ *Debarymyces Endomycopsis* และ *Candida* สำหรับ

วิธีการกำจัดยีสต์เหล่านี้ออกไปในระหว่างการหมักทำได้โดย การกวนผิวหน้าทุกวัน หรือการเติมกรดซอร์บิก ร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนยีสต์อีกพวกคือเฟอร์เมนเททีฟ ได้แก่ *Torulopsis Brettanomyces Zygosaccharomyces Hansennula* และ*Kloeckera* ซึ่งจะเจริญเติบโตในน้ำเกลือ โดยจะหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ยีสต์สายพันธุ์ *Pichia Hansenula Debarymyces Candida* และ *Trichosporon* สามารถเจริญบนผิวหน้าของอาหารที่มีความเป็นกรด เช่น แตงกวาดอง และ ผักกาดดอง และทำให้เกิดฝ้าขาวบนผิวหน้าของอาหารดังกล่าว ซึ่งยีสต์เหล่านี้จะออกซิไซด์กรดอินทรีย์ทำให้เกิดความเป็นกรดลดลง ส่งผลให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทนกรดได้น้อยกว่าสามารถเจริญทำให้เกิดการเน่าเสียต่อไป (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) และยีสต์แต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญและทำให้เกิดฝ้าบนผิวหน้าของอาหารได้แตกต่างกันขึ้นกับความเข้มข้นของเกลือในอาหารแต่ละชนิด เช่น *C. mycoderma* และ *P. membranefaciens* จะทำให้เกิดฝ้าบนผิวหน้าของผักดองที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำกว่าร้อยละ10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในขณะที่ *D. hansenii* เป็นพวกทนเกลือและสามารถเจริญเติบโตในสารละลายที่มีเกลือร้อยละ 15-20 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังนั้นมักพบยีสต์พวกนี้ในอาหารที่มีเกลือหรือน้ำเกลือ ทำให้เกิดฝ้าขาวในผักดองเช่นแตงกวาดอง (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537)

Savard และคณะ (2002) ศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในผักดอง พบว่า สายพันธุ์หลักของยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย คือ *S. bayanus* และ *S. unisporus* รองลงมา คือ *H. anomala* และ *Debarymyces* sp.

1.2.2 พืชสมุนไพร

พืชสมุนไพร หมายถึง พืชที่ใช้ส่วนใดส่วนหนึ่งหรือหลายส่วน เช่น ราก ลำต้น ใบ ดอก และผล เพื่อบำบัดรักษาอาการเจ็บป่วย หรือเพื่อการบำรุงรักษาสุขภาพ นอกจาก นี้ พืชสมุนไพรบางชนิดใช้ประโยชน์ทางการเกษตร เช่น เป็นยาฆ่าแมลง ยาเบื่อปลา ยาเบื่อสุนัข รวมทั้งพืชที่เป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยง (วิฑูรย์ พลาวิฑฒ์, 2539)

1.2.2.1 การสกัดสารสำคัญจากพืช

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ตัวทำละลายที่ดีควรมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ละลายสารที่ต้องการสกัดได้ดีพอ ไม่ระเหยง่ายหรือยากเกินไป ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด ไม่เป็นพิษ และราคาไม่แพง ตัวทำลายอาจจะจัดเรียงตามลำดับความมีขั้วจากน้อยไปหามากได้ ดังนี้ ไซโครเฮกเซน คาร์บอนเตตระคลอไรด์ เบนซีน อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม อะซิโตน เอทิลอะซิเตต เอทานอล เมทานอล น้ำ กรดและด่าง ตัวทำละลายที่ใช้มาก

ได้แก่ คลอโรฟอร์ม อีเธอร์ เฮกเซน และแอลกอฮอล์ แอลกอฮอล์ ที่ใช้มาก คือ เมทานอล และเอทานอล เนื่องจากมีความสามารถในการละลายกว้างมากและยังใช้ทำลายเอนไซม์ในพืชด้วย (วันดี กฤษณพันธ์, 2539) นอกจากนี้ตัวทำละลายต่างชนิดกัน มีความสามารถในการสกัดสารออกมาได้เหมือนหรือแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารประกอบต่างๆ

Table 3 Solvents used for active component extraction

Water	Ethanol	Methanol	Chloroform	Dichloro methanol	Ether	Acetone
Anthocyanins	Tannins	Anthocyanins	Terpeniods	Terpeniods	Alkaloids	Flavonoid
Starches	Polyphenols	Terpeniods	Flavonoids		Terpeniods	
Tannins	Polyacetylenes	Saponins			Coumarins	
Saponins	Flavinol	Tannins			Fatty acids	
Terpenoids	Terpeniods	Polyphenols				
Polypeptides	Sterols	Xanthoxyllin				
Lectins	Alkaliods	Totarol				
	Propolis	Quassiniods				
		Lactones				
		Flavonones				
		Phenones				

ที่มา : Cowan (1999)

Okeke และคณะ (2001) พบว่าการใช้ตัวทำลายชนิดเอทานอล น้ำเย็นและน้ำร้อน ในการสกัดสารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่างๆในรากพืช *Landolphia owerrience* แต่ละส่วนสารประกอบที่ถูกสกัดออกมาเป็นสารชนิดเดียวกัน แต่ปริมาณความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในตัวทำละลายแต่ละชนิดและแต่ละส่วนของพืช ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกันเนื่องจากสารประกอบต่างๆ จากพืช เช่น อัลคาลอย (alkaloid) แทนนิน (tannin) ซาโปนิน (saponin) สเตรียรอยดัล (steroidal) ไกลโคน (glycon) คาร์ดิแอค (cardiac) และไซนากิเนติก ไกลโคไซด์ (cynagenetic glycosides) มีความสัมพันธ์กันในการยับยั้งจุลินทรีย์

1.2.2.2 สารสำคัญในพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์

พืชเกือบทั้งหมดมีความสามารถจำกัดในการผลิตสารอะโรมาติก (aromatic) และสารอะโรมาติกที่พืชผลิตขึ้นทั้งหมดเป็น ฟีนอล (phenol) หรือ ออกซิเจนซับสติติท เดอริเวทีพ (oxygen-substituted derivatives) ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิพบมากถึง 12,000 ชนิด โดยพืชสร้างสารดังกล่าวเพื่อเป็นกลไกในการป้องกันตัวเองจากการทำลายของจุลินทรีย์ แมลง และ พวกสัตว์กินพืช กลุ่มสารสำคัญในพืชที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ ฟีนอลิค (phenolic) และโพลีฟีนอล (polyphenols) ซิมเปิลฟีนอลิค (Simple phenolics) ฟีนอลิคแอซิด (Phenolic acid) ควิโนน (Quinones) ฟลาโวน (Flavones) ฟลาโวนอย (Flavonoids) ฟลาโวโนน (Flavonols) แทนนิน (Tannins) คูมาริน (Coumarins) อัลคาลอย (alkaloids) เลคติน (lectins) และโพลีเปปไทด์ (polypeptides) กลไกการทำงานในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสำคัญแต่ละชนิดจะแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 4

Cerrutti (1996) รายงานว่า สารประกอบฟีนอลิคเป็นสารหลักที่มีประสิทธิภาพในยับยั้งจุลินทรีย์ ซึ่งสารประกอบฟีนอลิคมักพบได้ในเครื่องเทศและน้ำมันหอมระเหย เช่น ไทมอลจากไทม์ และออริกาโน ซิลนามิคอัลดีไฮด์จากอบเชย ยูจีนอลจากกานพลู อบเชยและเครื่องเทศอื่นๆ คาร์วาคอลจากออริกาโน และวาลินินจากถั่ววานิลา ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายยูจีนอล กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ไม่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานสารประกอบฟีนอลิคจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase บนไซโตพลาสมิกเมมเบรนของ *S. aureus* ซึ่งจะรบกวนการส่งผ่านสารอาหาร ส่วนน้ำมันหอมระเหยจะทำลายเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์องค์ประกอบโครงสร้างของเซลล์ยีสต์และการสร้างพลังงาน นอกจากนั้นน้ำมันหอมระเหยยังขัดขวางการซ่อมแซมเมตาบอลิซึมของเซลล์ยีสต์ที่บาดเจ็บหรือโครงสร้างถูกทำลายโดยความร้อน

ตารางที่ 4 กลุ่มสารประกอบจากพืชที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

Table 4 Major classes of antimicrobial compounds from plants

Class	Subclass	Example(s)	Mechanism
Phenolics	Simple phenols	Catechol	Substrate deprivation
		Epicatechin	Membrane disruption
	Phenolic acids	Cinnamic acid	
	Quinones	Hyperricin	Bind to adhesins,complex with cell wall,inactivate enzymes
	Flavoniods	Chrysin	Bind to adhesins complex with cell wall Inactivate enzymes
	Flavones	Abssinone	
	Tannin	Ellagitannin	Bind to proteins Bind to adhesins Enzyme inhibition Substrate deprivation Complex with cell wall Membrane disruption
Terpeniods,	Coumarins	Warfarin	Interaction with eucaryotic DNA
Essential oils		Capsaicin	Membrane disruption
Alkaliods		Berberine	Intercalate into cell wall and/or DNA
		Piperine	

ที่มา : Cowan (1999)

1.2.2.3 การยับยั้งยีสต์ของสารสกัดพืชสมุนไพร

กระเทียม (Garlic) เป็นพืชในตระกูล Amaryillidaceae ซึ่งแต่เดิมจัดอยู่ในตระกูล Lilliacea**e** ชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Allium sativium* Linn.

กระเทียมมีน้ำมันหอมระเหยประมาณร้อยละ 0.1 ซึ่งประกอบด้วย สารที่มีกำมะถัน เป็นองค์ประกอบหลายชนิด คือ ไดอัลลีล ไดซัลไฟด์ (diallyl disulphide) 60 เปอร์เซนต์ ไดอัลลีลไตรซัลไฟด์ (diallyl trisulphide) ร้อยละ 29 ไดอัลลีล เตตระซัลไฟด์ (diallyl tetrasuulphide) ร้อยละ 10 อัลลีลโปรปิลซัลไฟด์ (allyl propylsolphide) ร้อยละ 0.6 และไดเอธิล ไดซัลไฟด์ (diethyl disulphide) เล็กน้อย ในสารดังกล่าวนี้พบว่า ไดอัลลีลซัลไฟด์เป็นสารสำคัญในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ตามปกติในเซลล์ของกระเทียมจะไม่มีสารดังกล่าวนี้ แต่จะมีอัลลิอิน (alliin) หรือ เอส – อัลลีล – แอล – ซิสเตอีน – เอส – ออกไซด์ (S – allyl – L – systeine – S – oxide) เท่านั้น เมื่อเซลล์ของกระเทียมแตกหรือฉีกขาด อัลลิอินจะเปลี่ยนเป็นอัลลิซิน กรดไพรูวิค และแอมโมเนีย โดยเอนไซม์อัลลิอินเนส ต่อมาพบว่าอัลลิซินเป็นสารไม่คงตัวคือเปลี่ยนไปเป็นไดอัลลีนไดซัลไฟด์และซัลไฟด์อื่นๆ ดังกล่าวมาแล้ว (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2527)

อบเชย (Cinnamon) เป็นพืชในตระกูล Lauraceae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Cinnamomum zeylanicum Breyn*

อบเชยมีน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 0.7-1.8 ซึ่งประกอบด้วย ซินนามิคอัลดีไฮด์มากที่สุดประมาณร้อยละ 65-70 รองลงมาได้แก่ยูจินอลร้อยละ 10-12 สารเคมีที่พบจะแตกต่างกันไปในส่วนต่างๆ ของอบเชย กล่าวคือ น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากใบประมาณร้อยละ 0.9-1.5 มียูจินอลมากที่สุด โดยไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 ส่วนในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกอบเชยจะมีซินนามิคอัลซีไฮด์ร้อยละ 75-90 และมียูจินอลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยของอบเชยในใบและรากจะแตกต่างกันไปขึ้นกับอายุของพืช

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ของอบเชย ขึ้นอยู่กับซินนามิคอัลดีไฮด์และยูจินอลเป็นสำคัญ โดยยูจินอลจะทำลายโปรตีนในเซลล์และทำให้เกิดการบาดเจ็บที่เซลล์เมมเบรนเป็นผลให้สารต่างๆภายในเซลล์ไหลออกสู่ภายนอกเซลล์ เซลล์จึงตายได้ แต่กลไกในการยับยั้งการเจริญของซินนามิคอัลดีไฮด์และสารอื่นๆ ดังกล่าวนี้ยังไม่ทราบชัด (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2527)

กานพลู (Clove) เป็นพืชในตระกูล Myrtaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Eugenia aromatica* Baill หรือ *Eugenia caryophyllata* Thunb หรือ Syzygium aromaticum

กานพลู มีองค์ประกอบที่เป็นน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ ยูจีนอล (eugenol) ร้อยละ 80.87 เบตา-คารีโอฟิลลีน (B-caryophyllene) ร้อยละ 9.12 และ อะซีตีล ยูจีนอล (acetyl eugenol) ร้อยละ 7.33 สำหรับปริมาณสารต่างๆ ที่พบในน้ำมันหอมระเหยนี้พบว่ายูจีนอลจะมีปริมาณแตกต่างกันไปตามส่วนที่นำมาสกัด เช่น น้ำมันหอมระเหยจากส่วนของลำต้นและตาจะมียูจีนอลประมาณร้อยละ 80-92 ส่วนที่ใบจะมีน้อยกว่านี้เป็นต้น

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ของกานพลูขึ้นอยู่กับยูจีนอล ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟีนอล สารนี้จะไปขัดขวางขบวนการละลายของไขมันที่เซลล์เมมเบรน เป็นผลให้บทบาททางด้านออสโมติคแบร์ริเออร์ (osmotic barrier) ลดลง และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2527)

Conner และ Beuchat (1984) ได้ศึกษาผลของ น้ำมันหอมระเหย จากพืช 32 ชนิด ต่อการเจริญของยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 13 สายพันธุ์ *B. anomalus C. lipolytica D. hansenii G. candidum H. anomala Kl. apiculata K. fragili P. membranaefacien M. polcherrima S. cerevisae L. elongisporus R. rubra* และ *T. glabrata* จากการศึกษาขั้นต้น โดยการวัดการเกิดวงใส (clear zone) พบน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด ได้แก่ อัลสไปส์ (Allspice) อบเชย กานพลู กระเทียม หอม ออริกาโน (Oregano) ซาวอรี (Savory) และ ไทม์ (Thyme) สามารถยับยั้งยีสต์ได้ทั้ง 13 สายพันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และน้ำมันหอมระเหย กระเทียมให้ผลในการยับยั้งได้ดีที่สุด แม้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถยับยั้งได้ นอกจากนั้น ออริกาโน และไทม์ สามารถยับยั้งได้ดี และจากการศึกษาผลของ น้ำมันหอมระเหย ทั้ง 8 ชนิดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ในขั้นต้น ที่ระดับความเข้มข้น 0 25 50 100 และ 200 ppm ต่อการผลิตน้ำหนักชีวมวลของยีสต์ 8 ชนิด พบว่า น้ำมันหอมระเหย กระเทียม และหอมให้ผลในการยับยั้งยีสต์ทั้ง 8 ชนิดได้ดีที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้น 25 ppm ก็สามารถยับยั้งการผลิตน้ำหนักชีวมวลของยีสต์ได้ ซึ่งการยับยั้งน่าจะเกิดจากสาร อัลลิอินและซัลไฟด์ที่อยู่ในน้ำมันหอมระเหยของกระเทียมและหอม นอกจากนี้มีรายงาน 0.5 ไมโครโมลของอัลลิอินสามารถยับยั้ง Sulphydryl metabolic enzyme และสามารถยับยั้ง non- Sulphydryl metabolic enzyme ได้เล็กน้อย และพบว่า การยับยั้ง Sulphydryl metabolic enzyme สัมพันธ์กับการมีหมู่ –SO-S –S-S or –S- และมีรายงานอัลลิซินทำลายเมตาบอลิซึมของเซลล์โดยการจับกับหมู่ –SH ของโปรตีน การยับยั้งยีสต์ของสารสกัดสมุนไพรขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ ชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยของสารสกัดพืชสมุนไพร

กะเพรา (Holy basil) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum tenuiflorum* Linn. วงศ์ Lamiaceae ในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ กะเพราแดง กะเพราขาว และกะเพราลูกผสมระหว่างกะเพราแดงและกะเพราขาว กะเพราเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นและใบมีขนอ่อน ใบมีกลิ่นหอมฉุน ดอกเป็นดอกช่อ ใบและกิ่งก้านกะเพราขาวสีเขียวอ่อน ส่วนใบและกิ่งก้านกะเพราแดงสีเขียวแกมม่วงแดง

ใบกะเพรามีน้ำมันหอมระเหยประมาณร้อยละ0.35 ประกอบด้วยสารสำคัญ คือ camphor cined eugenol limonene pinene sabinene terpineol ocimol linalool และกรดอินทรีย์หลายชนิด (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2541)

ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ของกะเพราขึ้นอยู่กับยูจีนอลซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฟีนอล สารนี้จะไปขัดขวางขบวนการละลายของไขมันที่เซลเมมเบรน เป็นผลให้บทบาททางด้านออสโมติคแบร์ริเออร์ (osmotic barrier) ลดลง ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โดยทำให้เอนไซม์และโปรตีนอื่นๆ เสียสภาพไป เซลล์จะถูกทำลาย ส่วนกลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของบอร์นีออลและลินาลูลไม่ทราบแน่ชัด (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2527)

Araujo และ คณะ (2003) ศึกษาผลจาก น้ำมันหอมระเหยของพืชตระกูลกะเพรา (Mediteranean Lamiaceae species) ได้แก่ *Melissa officianlialis Lavanduda angustifolia Salvia officinalis* และ *Mentha piperita* ต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ 5 สายพันธุ์ ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย คือ *T. delbrueckii Z. bailii P. membranifaciens D. anomal* และ *Y. lipolytica* ในการศึกษาขั้นต้น ใช้วิธี disc diffusion พบว่า น้ำมันหอมระเหยของกะเพราสายพันธุ์ *M. officinalis* สามารถยับยั้งยีสต์ทั้ง 5 ชนิดได้ดีที่สุด และที่ค่าความเข้มต่ำสุดที่ยับยั้ง (MIC) เท่ากับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งยีสต์ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อศึกษาผลขององค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดของพืชทั้ง 4 ชนิด *M. officianlialis* (isomer neral and geranial 58.3%) *L. angustifolia* (linalool 48.27% 4-terpinineol 8.27% และ camphor 8.1%) *S. officinalis* (α-thujone 1,8-cineole borneol และ β-piene) *M. piperitactran*s (menthol 41.33% menthone 22.90%) ต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่เป็นองค์ประกอบหลัก ของกะเพราสายพันธุ์ *M. officianlialis* สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด ดังนั้นประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ของพืชตระกูลกะเพราขึ้นกับชนิดของน้ำมันหอมระเหยที่มีอยู่ในพืชแต่ละชนิดที่สามารถยับยั้งยีสต์ได้

กะหล่ำปลี (Cabbage) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Brassica oleracea* ในกระหล่ำปลีมีสารประกอบซัลเฟอร์หลายชนิดได้แก่ sinigin allyl isothiocyanate (AITC) S-methyl-L-cysteine (SMCSO) dimethyl disulfide (DMDS) dimethyl trisufide (DMTS) methyl methanethiosulfonate ($MMTSO_2$) dimethyl sulfide (DMS) และ methyl methanethiosulfinate (DMTSO)

Kyung และ Fleming (1997) ศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบซัลเฟอร์ที่พบในกะหล่ำปลีและผลิตภัณฑ์จากการหมัก โดยการศึกษาสารประกอบ ซัลเฟอร์ 8 ชนิด คือ sinigin allyl isothiocyanate (AITC) S-methyl-L-cysteine (SMCSO) dimethyl disulfide (DMDS) dimethyl trisufide (DMTS) methyl methanethiosulfonate ($MMTSO_2$) dimethyl sulfide(DMS) และ methyl methanethiosulfinate (DMTSO) กับการยับยั้งแบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งยีสต์ที่ศึกษามี 4 สายพันธุ์ *S. cerevisae* Y6 *T. etchellsii* Y6651 *P. membranefaciens* *H. mrakii* Y27 และ สารประกอบ SMCSO พบในกะหล่ำปลีประมาณ 185-2218 ppm สารประกอบ DMTSO เป็นสารตัวแรกที่ได้จากการแตกตัวของสาร SMCSO รวมทั้ง $MMTSO_2$ DMDS และ DMTS สารประกอบ DMTSO ประกอบด้วย Thiosufinate เหมือนกับในอัลลิซินซึ่งเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบในกระเทียม DMTSO จะพบในน้ำกะหล่ำปลีที่ไม่ผ่านความร้อน และ $MMTSO_2$ จะพบในน้ำกะหล่ำปลีที่ผ่านความร้อน isothiocyanate สร้างจาก glucosinolates โดยใช้ thioglucosidase sinigrin มีอยู่ในกะหล่ำปลี ประมาณ 145-148 ppm จากการศึกษาพบว่า AITC สามารถยับยั้งยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ด้ดีที่สุด ซึ่งสามารถยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4 ppm รองลงมาคือ MMTSO DMTS และ $MMTSO_2$ ซึ่งมีค่าความเข้มข้นต่ำสุด ประมาณ 10 20 และ ช่วง 50-500 ppm ตามลำดับ เนื่องจากสารประกอบ MMTSO มีสูตรโครงสร้างเหมือนกับในสารอัลลิซินจึงทำให้สามารถยับยั้งยีสต์ได้ดี

กระชาย (Boesenbergia **)** ชื่อวิทยาศาสตร์ *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr. กระชายมีรสเผ็ดร้อน ขม แก้ปวดมวนในท้อง แก้ชัก แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ และบำรุงกำลัง เหง้าของกระชายมีน้ำมันหอมระเหยประมาณร้อยละ 0.08 ในน้ำมันหอมระเหยมีสารหลายชนิด เช่น 1,5-cineol Boesenbergin A และ di-pinostrobin corphor เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสาร flavonoid และ chromene โดยสารจากเหง้ากระชายมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเช่น *Bacillus subtilis* และแบคทีเรียในลำไส้ (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน,2541)

กล้วยน้ำว้า (Banana) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Musa sapientum* Linn. ผลดิบของกล้วยน้ำว้าใช้แก้ท้องเสีย และช่วยป้องกันและรักษาโรคกระเพาะได้ ส่วนผลสุกใช้แก้ท้องผูก (วันดี กฤษณพันธ์, 2539) ในผลกล้วยพบสารประกอบคือ alcohols carotene cyaniding biphenyl และ

barium ผลกล้วยดิบยังมีสารแทนนินซึ่งช่วยรักษาโรคท้องร่วงที่ไม่รุนแรง และไม่ได้เกิดจากการติดเชื้อ ส่วนผลสุกมีสารเปคติน และกล้วยน้ำว้ายังพบ ascorbate oxidase catecholamines sterol niacin oxalic acid และวิตามินต่างๆ เป็นต้น และสารสกัดจากเนื้อและเปลือกของกล้วยน้ำว้าสุกมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้ง *E. coli S. aureus S. marcescens M. phlei B. subtilis S. lutea R. roseus* และ *X. translucens* (วันดี กฤษณพันธ์, 2539 ; Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

Lewis และคณะ (1999) แยกชนิดของสารสกัดจากกล้วยน้ำว้าดิบ โดยวิธีโครมาโตกราฟฟี และ โครมาโตกราฟฟีชนิดเหลวประสิทธิภาพสูง พบว่าเป็นสาร flavoniod leucocyanidin

ข่า (Galanga) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia nigra* (Gaertn.) B.L.Burlt เหง้าข่ารสเผ็ดปร่า ขับลม แก้บวม ฟกช้ำ เหง้าข่าประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย ร้อยละ 0.04 ในน้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารหลายชนิด เช่น methylcinnamate ร้อยละ 48 gineol ร้อยละ 20-30 eugenol camphor และ pinenes เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยจากเหง้าข่ามีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และฆ่าเชื้อรา โดยสาร mono-acetoxycavicol acetate เป็นสารออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อรา (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2541)

Athamaprasanga และคณะ (1994) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันข่าลิง พบว่า ประกอบด้วยสารประกอบ 12 ชนิด และสารประกอบหลักคือ chavicol acetate

บัวบก (Asia pennywort) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* (Linn.) Urban สารสำคัญที่สกัดได้จากบัวบกคือ madecassic acid asiatic acid asiaticoside madecassoside เป็นต้น สารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการสมานแผล ทำให้แผลหายเร็ว มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดหนอง ฆ่าเชื้อรา และลดการอักเสบได้ (สำนักงานคณะกรรมการสาธารณสุขมูลฐาน, 2541) สารสกัดจาก ใบ ราก ลำต้น ของบัวบก มีสารประกอบฟีนอลิคสูงถึง 3.23 – 11.7 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม (Zoinol *et al*., 2003) นอกจากนี้ยังพบสารพวก alkaloids D-arabinose brahminoside brahmoside carbohydrates pectins และ resins เป็นต้น นอกจากนี้สารสกัดด้วยน้ำร้อนของบัวบกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *B. subtilis* แต่ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* และสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกมีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* β-streptococcus กลุ่ม A และ *P. aeroginosa* (Farnsworth and Bunyapraphatsara, 1992)

ฝรั่ง (Guava) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Psidium guajava* Linn. ฝรั่งเป็นผลไม้ที่มีวิตามินซีสูงกว่าในส้ม 4-10 เท่า โดยเฉพาะในผลดิบและยังมีวิตามินต่างๆ และแร่ธาตุอื่นๆ ในใบมีสารจำพวกแทนนินและน้ำมันหอมระเหย ผลมีกากและเส้นใยมาก สารแทนนินในใบฝรั่งและผลดิบ ใช้เป็นยาแก้ท้องร่วงชนิดที่ไม่รุนแรงและไม่ได้เกิดจากเชื้ออหิวาตกโรค ในใบฝรั่งมีน้ำมันหอม

ระเหย (วันดี กฤษณพันธ์, 2539) และพบสารพวก alcohols aldehydes cadalene calcium carbohydrate carotene triterpenoids และ limonene ในดอกฝรั่งและผลฝรั่งพบสารพวก guaijaverin leucocyanidin oleanolic acid และ quercertin เป็นต้น นอกจากสารดังกล่าวแล้วในใบฝรั่งยังพบสารประกอบ Terpenoids และ น้ำมันหอมระเหย (Abdelrahim *et al.*, 2002)

อภิราม ส่งศรี และมณฑล เลิศคณาวนิชกุล (2545) ศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและทำลาย *Candida albicans* และ *Cryptococcus neoformans* ของสารสกัดด้วยน้ำหรือเอธานอล ของสมุนไพร 5 ชนิด ได้แก่ ข่าเล็ก กระชาย ใบฝรั่ง บัวบก และกล้วยน้ำว้าดิบ ด้วยวิธี Broth microdilution method พบว่าสารสกัดสมุนไพรทุกชนิดที่สกัดด้วย เอทานอล 95 % มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อทั้ง 2 ชนิด ได้ดีกว่าสารสกัดสมุนไพรที่สกัดด้วยน้ำโดยที่สารสกัดจากข่าเล็กมีฤทธิ์ทำลายเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีที่สุด รองลงมาคือกระชาย ส่วนบัวบก ใบฝรั่ง และกล้วยน้ำว้ามีฤทธิ์ทำลายเชื้อ *C. albicans* ได้เท่ากัน แต่สำหรับเชื้อรา *C. neoformans* บัวบกมีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อได้ดีกว่าใบฝรั่งและกล้วยน้ำว้าดิบแต่มีฤทธิ์ต่ำกว่า Amphotercin B

1.2.3 สารต้านจุลินทรีย์

สารต้านจุลินทรีย์ หมายถึง สารเคมีที่เติมลงในอาหารเพื่อป้องกันหรือชะลอการเสื่อมเสียของอาหาร อันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเป็น ยีสต์ รา หรือแบคทีเรีย คุณสมบัติของสารต้านจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในอาหารนั้น ต้องเป็นสารที่ให้ผลดีในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี มีความคงตัวในอาหารและไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ที่เติมลงไป หรือองค์ประกอบของอาหารไม่ก่อให้เกิดสี กลิ่น รส ที่ไม่ต้องการ นอกจากนี้ต้องไม่เป็นสารที่ทำให้เกิดพิษต่อร่างกายด้วย การใช้สารต้านจุลินทรีย์ในอาหารต้องใช้ในปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดเท่านั้น ซึ่งประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นและองค์ประกอบทางเคมีและความเป็นกรด-เบสของอาหาร (สุมาลี, 2537)

1.2.3.1 กรดและเกลือของกรดซอร์บิก

กรดซอร์บิกและกรดเกลือ ซึ่งมักจะใช้ในรูปของเกลือแคลเซียม โซเดียม และโพแตสเซียม เป็นสารกันเสียที่นิยมใช้กันมากในการถนอมอาหารพวกเนยแข็ง ผลิตภัณฑ์เนยต่างๆ เบเกอรี เครื่องดื่ม น้ำหวาน น้ำผลไม้ เยลลี แยม อาหารแห้ง แตงกวาดอง และมาร์การีน โดยการเติมลงไปในอาหารโดยตรง หรือโดยการพ่น ชุบ หรือเคลือบภาชนะบรรจุอาหาร ปริมาณที่นิยมให้ใช้สูงสุดไม่เกินร้อยละ 0.2

กลไกในการทำงานของสารประกอบนี้เช่นเดียวกับโซเดียมเบนโซเอต คือจะให้ผลในการป้องกันได้ดีในอาหารที่เป็นกรดซึ่งมีพีเอชต่ำกว่า 6 และให้ผลในการป้องกันที่พีเอชระหว่าง 4-6 ได้ดีกว่าโซเดียมเบนโซเอต และที่พีเอชต่ำกว่า 3 ได้ดีกว่าเกลือโปรปิโอเนต

สารประกอบนี้ที่พีเอช 4 จะมีกรดชนิดไม่แตกตัวอยู่ร้อยละ 86 ในขณะที่พีเอช 6 กรดซอร์บิกสามารถใส่ในเค้กในปริมาณที่มากกว่าโปรปิโอเนต โดยไม่ทำให้กลิ่นรสของเค้กเปลี่ยนไป (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

โมเลกุลที่ไม่แตกตัวของกรดจะป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการยับยั้งการใช้สารต่างๆ เช่น กรดอะมิโน ฟอสเฟต กรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น กรดซอร์บิกจะไปรบกวนการทำงานของระบบเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสของรา เกลือซอร์เบทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* spp. *S. faecalis* และ *Staphylococcus* spp. แต่ไม่ยับยั้งการเจริญของ *Clostridium* spp. เกลือซอร์เบทไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่พีเอชมากกว่า 4.5 ราและยีสต์จะถูกยับยั้งการเจริญได้หมดเมื่อพีเอชต่ำกว่า 4.5 ในขณะที่พีเอชต่ำกว่า 3.5 แบคทีเรียถูกยับยั้งได้หมด (สุมาลี, 2537)

1.2.3.2 น้ำตาลและเกลือแกงหรือโซเดียมคลอไรด์

สารประกอบเหล่านี้มักเป็นตัวดูดความชื้นซึ่งมักจะทำให้มีผลต่อเนื่องต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เราจะใช้เกลือเมื่อต้องการทำให้อาหารมีรสเค็มโดยใส่ในอาหารโดยตรงหรือทำเป็นสารละลายก็ได้ การเติมเกลือนั้นอาจเติมลงไปในอาหารในปริมาณที่เพียงพอต่อการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ หรือใส่ลงไปในปริมาณที่เพียงพอต่อการเกิดกระบวนการหมักเท่านั้น ผลที่เกิดจากการเติมเกลือนั้นได้แก่ เกิดแรงดันออสโมซีสสูง ดังนั้น ทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซีส (plasmolysis) ปริมาณเกลือที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญ หรือทำลายเซลล์นั้นแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ ทำให้อาหารแห้งซึ่งมีผลให้เซลล์จุลินทรีย์ในอาหารแห้งไปด้วย การแตกตัวของเกลือทำให้เกิดไอออนของคลอรีนซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ เกลือจะไปทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจนลดลง ทำให้เซลล์ได้รับการกระตุ้นจากคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น รบกวนการทำงานของเอนไซม์โปรติโอไลทิก ผลที่เกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์จะแตกต่างกันไปตามความเข้มข้นและอุณหภูมิ ปกติเกลือความเข้มข้นร้อยละ 20 สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ทั่วๆ ไปได้ ในขณะเดียวกัน น้ำตาล เช่น กลูโคสหรือซูโครส สามารถถนอมอาหาร โดยการเปลี่ยนให้น้ำที่มีอยู่ในอาหารนั้นกลายเป็นน้ำที่จุลินทรีย์นำไปใช้ไม่ได้ และทำให้เกิดแรงดันออสโมซีสสูง อาหารที่ถนอมโดยการใช้น้ำตาลเข้มข้น ได้แก่ นมข้นหวาน ผลไม้เชื่อม เยลลี และลูกกวาด (สุมาลี, 2537)

Praphailong และ Fleet (1997) ศึกษาผลของพีเอช ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ น้ำตาลซูโครส ซอร์เบท และ เบนโซเอท ต่อการเจริญของยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย 30 สายพันธุ์ ได้แก่ *D. hansenii Y. lipolytica Kl. Apiculata Z. bailii Z. rouxii K. maxianus P. membranaefaciens P. anomala* และ *S. cerevisiae* โดยพบว่า *Z. bailii* ไม่เจริญที่ พีเอช 7.0 และ

Z. rouxii *Kl. apicullata* และ *P. membranaefaciens* ไม่เจริญที่ พีเอช 8.0 มีเพียง *Kl. apicullata* ที่เจริญได้ที่พีเอช 1.5-2.0 สายพันธุ์อื่นๆ เจริญได้ที่พีเอช 2.5-8.0 ยีสต์ทั้ง 30 สายพันธุ์ ไม่สามารถเจริญได้ที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 20 แต่ *D. hansenii* *Z. rouxii* และ *P. anomala* เจริญได้ที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 15 *S. cerevisiae* และ *K. maxianus* ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ได้น้อยที่สุด คือไม่เจริญที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7.5 และ 10 ตามลำดับ และพีเอชจะมีผลต่อการเจริญของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ในโซเดียมคลอไรด์ พบว่า *Y. lipolytica,* *D. hansenii* และ *S. cerevisae* ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.0-7.0 *Kl. Apiculata* *P. membranaefaciensc* และ *Z. bailii* ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ ได้ดีที่สุดที่พีเอช 3.0 ยีสต์ทั้ง 30 สายพันธุ์ เจริญได้ที่ซูโครสร้อยละ 50 และ *Z. rouxii* *P. anomala* และ *D. hansenii* เจริญได้ที่ซูโครสร้อยละ 60-70 และที่พีเอช 2.0 -7.0 จะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเจริญของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ในน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นสูง และพบว่า *Z. bailii* และ *Y. lipolytica* เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อซอร์เบทและเบนโซเอทได้ดีที่สุด คือ ทนได้ที่ระดับความเข้มข้น 750- 1200 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่พีเอช 5.0

1.2.4 การประยุกต์ใช้สารสกัดพืชสมุนไพรเป็นสารต้านจุลินทรีย์

ในอดีตมีการรายงานเป็นจำนวนมากถึงข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ เกี่ยวกับคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบจากพืชและเครื่องเทศ ผลไม้และผัก และจุลินทรีย์ แต่มีการรายงานน้อยมากถึงการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารจนกระทั่งในปี 1991 มีการศึกษาวิจัย เพื่อการบ่งชี้และการประเมินระบบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยธรรมชาติ และขยายรวมถึงความปลอดภัยและคุณภาพของอาหาร การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของพืช สัตว์และจุลินทรีย์ โดยการนำมาสกัดทำให้บริสุทธิ์และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์และนำไปใช้ร่วมกับ การถนอมอาหารโดยวิธีดั้งเดิมเพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหารและสารพิษจากสิ่งมีชีวิต (Roller, 1995)

Roller (1995) รายงานการนำกรดซินนามิค ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิค ที่พบในเครื่องเทศหลายชนิด รวมทั้งอบเชย มาใช้ในการควบคุมความปลอดภัยของอาหาร และนำมาใช้เป็นสารให้กลิ่นในอาหารหลายชนิด จากการศึกษาทางห้องปฏิบัติการกรดซินนามิค จะละลายในเอทานอลและไม่ละลายในน้ำ เมื่อนำกรดซินนามิคที่ความเข้มข้นต่างๆ มาใช้ แช่หรือสเปรย์ผลไม้ทั้งผลหรือผลไม้ที่หั่นชิ้น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่ากรดซินนามิคสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลไม้ได้หลายชนิด เช่น สามารถยืดอายุของมะเขือเทศหั่นที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสจาก 42 วัน เป็น 70 วัน และเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส จาก 21 วัน เป็น 42 วัน

Hsieh และคณะ (2001) ศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรผสมระหว่าง corni fructus cinnamon และ Chinese chive พบว่าที่อัตราส่วน 8:1:1 สารสกัดสมุนไพรผสมสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่เป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษได้ และสาร

สกัดดังกล่าวมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที และมีประสิทธิภาพการยับยั้งดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง และจะลดลงเมื่อมีความเป็นกรดต่ำ และมีการประยุกต์ใช้สารสกัดสมุนไพรผสมดังกล่าว ในเครื่องดื่มน้ำฝรั่งและชาเขียวหรือชาดำ พบว่าน้ำฝรั่งที่ไม่มีการเติมสารสกัดดังกล่าวเมื่อให้สัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะเกิดการเน่าเสีย และตรวจพบปริมาณเชื้อ 3.1 x 10^3 CFU/ml ในขณะที่น้ำฝรั่งที่มีการเติมสารสกัดสมุนไพรผสมร้อยละ 0.2 สามารถสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ได้นานถึง 96 ชั่วโมง จึงจะมีปริมาณเชื้อ 2.1 x 10^3 CFU/ml สำหรับในน้ำชาเขียวหรือชาดำ ที่เติมสารสกัดสมุนไพรผสมร้อยละ 0.1 และ 0.2 เมื่อสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจพบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ 3x10^3 และ 4x10^2 CFU/ml ตามลำดับ

Mau และคณะ (2001) ศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดผสมระหว่าง Chinese chive Cinnamon และ Corni fructus ในปริมาณที่เท่ากัน พบว่า สารสกัดผสมสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิดและสามารถทนต่อความร้อน พีเอช และอุณหภูมิการเก็บรักษาได้ดี และสารสกัดสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีกว่าโพแตสเซียมซอร์เบท ที่ระดับความเข้มข้น 2-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. membranaefaciens* ได้ที่ระดับความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำสารสกัดผสมไปประยุกต์ใช้ในน้ำส้มคั้น เนื้อหมู และนม พบว่า น้ำส้มคั้นที่เติมสารสกัดผสมร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะมีเชื้อจุลินทรีย์เจริญเพียงเล็กน้อยหลังจากเก็บไว้นาน 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่น้ำส้มคั้นที่ไม่เติมสารสกัดผสมจะเน่าเสียเมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 2 วัน และสารสกัดผสมร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์รวมที่ปนเปื้อนเนื้อหมู และ เชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในนมได้ดีกว่าโพแตสเซียมซอร์เบทที่ระดับความเข้มข้นเท่ากัน

Memon และคณะ (2001) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยกานพลูต่อการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ในเนื้อและเนยแข็ง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.0 สามารถจำกัดการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ในเนื้อและเนยแข็งได้ ทั้ง 2 อุณหภูมิที่เก็บรักษา และ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพในการทำให้ปริมาณของเชื้อ *L. monocytogenes* ลดลง 10^1-10^3 CFU/g เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในระหว่างการเก็บรักษา

Valero และSalmeron (2003) ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ INRAL 2104 ของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 11 ชนิด ได้แก่ nutmeng mint clove oregano cinnamon sassafras sage thyme หรือ rosemary พบว่าน้ำมันหอมระเหยของ cinnamon มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุดรองลงมา คือ oregano thyme clove sage rosemary และ sassafras และเมื่อเติม 5 ไมโครลิตร

น้ำมันหอมระเหยของอบเชยลงในน้ำแครอทปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการงอกและการเจริญของสปอร์ของ *B. cereus* ได้อย่างน้อย 60 วัน

Yuste และFung (2003) ศึกษาการลดลงของเชื้อ *S. typhimurium* *S . aureus* และ *Y. enterocolitica* ปริมาณ 10^4 CFU/ml ที่เติมลงในน้ำแอปเปิ้ลที่พาสเจอร์ไรด์แล้วพีเอช 3.64 และเติมอบเชยร้อยละ 0 และ 0.3 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่า *S. aureus* จะถูกยับยั้งได้ง่ายกว่า *Y. enterocolitica* และ *S. typhimurium* โดยปริมาณเชื้อ *S. aureus* ในน้ำแอปเปิลที่ไม่เติมอบเชย จะลดลง 1.2 log CFU/ml ภายในเวลา 3 วันและปริมาณเชื้อ *Y. enterocolitica* ลดลง 0.3 log CFU/ml ภายในเวลา 1 วัน ซึ่งเป็นผลของการไวต่อความเป็นกรดของเชื้อทั้ง 2 ชนิดและผลจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อทั้ง 3 ชนิดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยปริมาณเชื้อ *Y. enteroclitica* ลดลงประมาณ 4 log CFU/ml ทั้งในน้ำแอปเปิลที่เติมและไม่เติมอบเชย ภายในเวลา 1 วัน ในขณะที่ปริมาณเชื้อ *S. aureus* จะลดลงเฉพาะในน้ำแอปเปิลที่เติมอบเชยเท่านั้น

Singh และคณะ (2003) ศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อของน้ำมันหอมระเหยของพืชชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ในไส้กรอก พบว่า น้ำมันหอมระเหย ของ ไทม์ กานพลู และปิเมนโต (pimento) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดี ซึ่งน้ำมันหอมระเหยของไทม์ และกานพลู มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในน้ำเปปโตน และน้ำมันหอมระเหยของไทม์ มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตร ในไส้กรอกชนิดที่ไม่มีไขมันและไส้กรอกชนิดที่มีไขมันต่ำแต่ไม่มีประสิทธิภาพในไส้กรอกชนิดที่มีไขมันมาก ส่วนน้ำมันหอมระเหยของกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิลิตรต่อลิตรมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อในไส้กรอกทั้ง 3 ชนิดได้ และมีประสิทธิภาพดีกว่าน้ำมันหอมระเหยของไทม์ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

Kim และ Kyung (2003) ศึกษาการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดจากกระเทียมที่ทำให้เอนไซม์อัลลิเนส ที่มีอยู่ในกระเทียมไม่ทำงาน โดยการนำกระเทียมที่ปลอกเปลือก และตัดเรียบร้อยแล้ว มาลวกในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็น นำไป ปั่นเหวี่ยง เอาส่วนใส ใส่ในหลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที ซึ่งส่วนใสที่ได้ คือ สารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อน (heated garlic extract) ซึ่งสารอัลลิอินในกระเทียม จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอัลลิซินออกไซด์ ซึ่งโครงสร้างคล้ายกับสารเมทิลมีเทนไธโอซัลโฟเนท (methyl methanethiosulfonate) ที่พบในกะหล่ำปลีที่ผ่านความร้อนเหมือนกัน และพบว่าสารดังกล่าวมีความคงตัวในการยับยั้งจุลินทรีย์ และเมื่อนำสารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อน ไปศึกษาการยับยั้งยีสต์ 6 สายพันธุ์ คือ *C. albicans* *C. utilis* *S. cerevisae* *P. membranefaciens* *Z. rouxii* และ *Z. bisporus* โดยการนำไปหาค่าความ

เข้มข้นต่ำสุดและความคงตัวในการยับยั้งยีสต์เปรียบเทียบกับสารสกัดกระเทียมสด น้ำมันหอมระเหยของกระเทียม และสาร allyl isothiocyanate (AITC) พบว่าสารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อน มีค่าเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งยีสต์ได้ดีใกล้เคียงกับสาร AITC แต่จะสูงกว่าสารสกัดกระเทียมสด และมีความคงตัว โดยที่ค่าเข้มข้นต่ำสุดไม่เปลี่ยน เมื่อเก็บไว้เป็นเวลามากกว่า 30 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่ค่าเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดกระเทียมสด และสาร AITC จะสูงขึ้นทุกวัน จากคุณสมบัติของสารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อนที่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ดี มีความคงตัวและที่สำคัญมีกลิ่นน้อยกว่าสารสกัดกระเทียมสดและน้ำมันหอมระเหยของกระเทียม ดังนั้น สารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อนน่าจะเหมาะต่อการนำไปใช้ในการยับยั้งยีสต์ในอาหารได้ จึงได้มีการศึกษาผลของพีเอชต่อการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อน เปรียบเทียบกับโพแตสเซียมซอร์เบท ซึ่งนิยมใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร พบว่าพีเอชมีผลต่อการยับยั้งยีสต์ของโพแตสเซียมซอร์เบทแต่พีเอชไม่มีผลต่อการยับยั้งยีสต์ของสารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อน และเมื่อนำสารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อนไปประยุกต์ใช้ในอาหาร โดยการเติมลงไปในซอสถั่วเหลือง พบว่า สารสกัดกระเทียมความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่ผ่านความร้อนสามารถป้องกันการเกิดฟิล์มยีสต์ที่เกิดจากเชื้อ *Z. rouxii* ss1 ได้ถึง 30 วัน ในขณะที่ซอสถั่วเลืองที่ไม่ได้เติมสารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อนจะเริ่มเกิดฟิล์มยีสต์หลังจากบ่มไว้ 5 วันเท่านั้น ดังนั้น สารสกัดกระเทียมที่ผ่านความร้อน ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งยีสต์ได้ดี มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทนต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชและมีกลิ่นที่ไม่รุนแรง จึงน่าจะเหมาะสมที่จะมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติ ในอาหารที่เกิดการเน่าเสียโดยยีสต์ได้

1.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์

ปัจจุบันมีการรายงานเกี่ยวกับสารต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศในอาหารจากห้องปฏิบัติการและในอาหารทั่วไป ซึ่งชี้ให้เห็นว่าระดับความจำเป็นของการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารเป็นสิ่งสำคัญกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพที่จำเป็นสำหรับการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดการเสียหายต่อรสชาดของอาหารในทางการค้า ซึ่งจากหลายๆ ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับ การเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ ของน้ำมันหอมระเหยสามารถทำได้โดยการใช้ร่วมกับปัจจัยกดดันอื่นๆ ได้แก่ การใช้ร่วมกับปัจจัยเทคโนโลยีในการถนอมอาหารในกระบวนการผลิตผลไม้ซึ่งได้รับความนิยมมากในประเทศที่พัฒนาแล้ว ในการนำไปใช้เพื่อการปรับปรุงคุณภาพของผลไม้ (Cerrutti และ Alzamora, 1996)

ปัจจัยที่มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ ความเข้มข้นของสาร ปริมาณเชื้อ พีเอช อุณหภูมิ และอื่นๆ เช่น ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ นอกจากนี้การนำสารต้านจุลินทรีย์หลายชนิดมาผสมกันจะเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อได้

Wimpenny และ Thomas (1996) ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันของอุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และไนซิน (nisin) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* โดยศึกษาอุณหภูมิที่ 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส พีเอช ในช่วง 3.7 ถึง 7.92 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.1 ถึง 7.0 และความเข้มข้นของไนซิน คือ 0 50 100 250 และ 500 IU/ml พบว่าที่อุณหภูมิต่ำและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงๆ ไนซิน สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ได้ดี นอกจากนั้นที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงๆ ยังทำให้ไนซินสามารถยับยั้ง *L.monocytogenes* ได้ดีด้วย แต่อุณหภูมิไม่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. monocytogenes* ของไนซินและยังพบว่าที่พีเอชต่ำๆ ไนซินจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีขึ้น

Jaquette และ Beuchat (1998) ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานร่วมกันของ พีเอช อุณหภูมิ และไนซินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ Psychotrophic *B. cereus* พบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด TSB พีเอช 7.3 และ BHI พีเอช 7.4 มี 2 สายพันธุ์เจริญที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และมี 5 สายพันธุ์ที่ อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และมี 4 สายพันธุ์เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ในอาหาร BHI พีเอช 6.01 และ 6.57 ที่มี 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของไนซินที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เชื้อ *B. cereus* ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญบเติบโตได้ที่พีเอช 5.53 ถึง 6.57 และมี 3 สายพันธุ์สามารถทนต่อการยับยั้งของไนซินที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่พีเอช 6.57 และมี 3 สายพันธุ์สามารถทนต่อการยับยั้งของไนซินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทนต่อการยับยั้งของไนซินของเชื้อ *B. cereus* จะเพิ่มขึ้น เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 5.53 ถึง 6.01 และต้านการยับยั้งเมื่อพีเอชเท่ากับ 6.57 สำหรับการเจริญของสปอร์จะถูกยับยั้งการเจริญโดยไนซินความเข้มข้น 5 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 8 และ 15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส สปอร์ของ *B. cereus* สามารถเจริญได้ในอาหาร BHI พีเอช 6.52 ที่มี 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของไนซิน ประสิทธิภาพในการยับยั้ง เชื้อ *B. cereus* ของไนซินที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และ เมื่อพีเอชลดลงจะสามารถยับยั้งได้ดี จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการยืนยันการใช้ไนซินในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ Psychotrophic *B. cereus* ในอาหารที่ไม่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น

Parente และคณะ (1998) ศึกษาผลร่วมของแบคเทอริโอซินชนิดไนซิน (1-2100 IU/ml) leucocin F10 (1-2100 IU/ml) พีเอช (4.7 – 6.5) โซเดียมคลอไรด์ (0.7-4.5 % w/v) และ EDTA (0.08 – 4.72 มิลลิโมลต่อลิตร) ต่อการเหลือรอดของเชื้อ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลว พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของไนซินลดค่าของพีเอชเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และ EDTA จะลดการอยู่รอดของเชื้อ *L. monocytogenes* ในขณะที่ leucocin F10 มีผลอย่างไม่มี

นัยสำคัญ ไนซินเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. monocytogenes* และพีเอชต่ำมีผลต่อการลดการอยู่รอดของเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์และ EDTA มีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อ *L. monocytogenes* เพียงเล็กน้อย

Ejechi (1999) รายงานว่า กรดฟีนอลิคและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจาก Pepperfruit (*Dennetia tripetala*) สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ *S. cerevisae Saccharomyces* sp. *C. tropicalis Candida* sp. และ *Cryptococcus sp*. ซึ่งแยกได้จากมะเขือเทศที่เน่าและเลี้ยงบนอาหารวุ้นได้ที่ระดับความเข้มข้น 2.5-6.5 และ 1.5-3.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อผสมระหว่างฟีนอลิคกับน้ำมันหอมระเหย พบว่าระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นดังกล่าวข้างต้น สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ในมะเขือเทศสดปั่นและตรวจไม่พบเชื้อยีสต์ในมะเขือเทศปั่นที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 1 นาทีที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 มิลลิกรัมต่อกรัม และเติมฟีนอลิคและน้ำมันหอมระเหยหลังจากเก็บนาน 1 เดือน ส่วนในมะเขือเทศปั่นที่มีการเติมฟีนอลิคและน้ำมันหอมระเหย และโซเดียมคลอไรด์ แต่ไม่ผ่านความร้อน หลังจากเก็บไว้นาน 3 เดือน พบว่าปริมาณเชื้อยีสต์จะลดลงอย่างสม่ำเสมอจนกระทั่งตรวจไม่พบเชื้อยีสต์

Periago และMoezelaar (2001) ศึกษาผลของสารผสมไนซินและ carvacrol ที่พีเอช และอุณหภูมิต่างๆต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ต่างๆ พบ carvacrol 0.3 มิลลิโมลต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *B. cereus* ที่ทุกอุณหภูมิและพีเอช แต่เมื่อผสม carvacrol 0.3 มิลลิโมลต่อลิตรกับไนซิน 0.15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ดีกว่าการใช้ไนซินเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าไนซินและ carvacrol มีการทำงานร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่พีเอช 5.75 ได้ดีกว่าพีเอช 6.30 และ 7.0 ที่อุณหภูมิ 8 และ 30 องศาเซลเซียส

Battery และคณะ (2002) ศึกษารูปแบบเพื่อใช้ในการทำนายการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ *S. serevisae Z. bailii* และ *C. lipolytica* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเครื่องดื่มพร้อมบริโภคทันทีชนิดแช่เย็น ที่ทำให้มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน โดยการออกแบบการทดลองจะเป็นการศึกษาถึงปัจจัย 5 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ คือ พีเอช (2.8 3.3 และ 3.8) ความเป็นกรด (ร้อยละ 0.20 0.40 และ 0.60) ปริมาณน้ำตาล (8.0 12.0 และ 16 องศาบริกซ์) โซเดียมเบนโซเอท (100 225 และ 350 หนึ่งส่วนในล้านส่วน) และโพแตสเซียมซอร์เบท (100 225 และ 350 หนึ่งส่วนในล้านส่วน) พีเอช โซเดียมเบนโซเอทและโพแตสเซียมซอร์เบท เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลในการควบคุมการเจริญของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับปัจจัยความเป็นกรดและปริมาณน้ำตาลของเครื่องดื่มไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสายพันธุ์ของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดองและน้ำส้มคั้น
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเจริญของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดองและน้ำส้มคั้น
3. เพื่อศึกษาผลของพีเอช เกลือโซเดียมคลอไรด์หรือน้ำตาลซูโครส และสารสกัดพืชสมุนไพรต่อการเจริญของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดองและน้ำส้มคั้น