DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

การศึกษาฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

สุนีย์ เจริญวุฒิธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาการแพทย์บูรณาการ วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ
มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์
ปีการศึกษา 2564

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

STUDIES ON ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Citrus aurantium* L. AGAINST *Aspergillus* sp. IN FRESH BREAD PRODUCT

SUNEE CHAROENVUTTITHAM

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of College of Integrative Medicine

College of Integrative Medicine, Dhurakij Pundit University

Academic Year 2021

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus sp.*ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium L.* ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด
เสนอโดย	สุนีย์ เจริญวุฒิธรรม
สาขาวิชา	การแพทย์บูรณาการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.พยงค์ วณิเกียรติ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดยคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์แล้ว

.....ประธานกรรมการ

(ดร.เภสัชกรหญิงมณฑกา ธีรชัยสกุล)

..... กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พยงค์ วณิเกียรติ)

.....กรรมการ

(แพทย์หญิงอัมพร กรอบทอง)

วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ รับรองแล้ว

.....คณบดีวิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นายแพทย์พัฒนา เต็งอำนวย)

วันที่ 26 เดือน พ.ย. พ.ศ. 2564

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด
ชื่อผู้เขียน	สุนีย์ เจริญวุฒิธรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.พยงค์ วณิเกียรติ
สาขาวิชา	การแพทย์บูรณาการ
ปีการศึกษา	2564

บทคัดย่อ

น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. (CaEO) เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกเทอร์พีนส์ และฟีนิลโพรพีน ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ และมีความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มาทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด ด้วยวิธี poisoned food technique และ ทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกโดยทดสอบฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH assay) ผลการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 2.50, 5.00 และ 10.00 มคล./มล. แสดงฤทธิ์ต้านการเจริญของโคโลนีรา *Aspergillus* sp. ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 และ 1.63 ± 0.09 ซม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (2.98 ± 0.05 ซม.) และพบว่า ฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 10.00 มคล./มล. ใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต 0.2 % ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีราที่วัดได้ 1.50 ± 0.23 ซม. ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลายน้ำที่เป็นชุดควบคุมเชิงลบ ($p \leq 0.05$) เมื่อนำน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 มคล./มล. เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด ได้ถูกนำมาประเมินทดสอบฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. โดยมีแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดควบคุมเชิงบวก และสารละลายน้ำเป็นส่วนประกอบเป็นชุดควบคุมเชิงลบ พบว่า ขนมปังสดที่เก็บรักษา 1-4 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ และในวันที่ 5 พบจุดสีดำเล็กๆจำนวนน้อยบนผิวขนมปัง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเชิงลบซึ่งมีจำนวนจุดดำมากกว่า ในขณะที่ชุดควบคุมเชิงบวกไม่พบจุลินทรีย์บนผิวหน้าขนมปังสด เมื่อนำขนมปังสดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในจานเพาะเชื้อบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 27 °C ในวันที่ 4 พบว่า น้ำมันหอมระเหยจาก

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

เปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 5.00 มคล./มล. เป็นส่วนประกอบในขนมปังสดมีราเกิดขึ้น 8.20 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g) ในขณะที่จานเพาะเชื้อ ที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 10.00 มคล./มล. และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนต ไม่มีราเกิดขึ้น

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ซึ่งประเมินทดสอบด้วยวิธีการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (DPPH assay) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. แสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ต่ำ โดยมีค่า EC_{50} > 1,000 มคก./มล. เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 มคก./มล. ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 10.00 มคล./มล. มีฤทธิ์ในการต้านรา *Aspergillus* sp. ได้สูงสุด ในระหว่างช่วงการบ่มเพาะ 4 วัน ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต อย่างไรก็ตาม น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่นได้ต่ำ

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย ฤทธิ์ต้านรา การกำจัดอนุมูลอิสระ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Thesis Title	STUDIES ON ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF *Citrus aurantium* L. AGAINST *Aspergillus* sp. IN FRESH BREAD PRODUCT
Author	Sunee Charoenvuttitham
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Payong Wanikiat
Department	Integrative Medicine
Academic Year	2021

ABSTRACT

Citrus aurantium L. essential oil (CaEO) is an organic terpene and phenylpropene compound which possesses anti-microbial activity and is safe when used as food preservatives. The study's aims were to evaluate the antifungal activity against *Aspergillus* sp., the cause of spoilage in fresh bread products, using the poisoned food technique, and to evaluate the antioxidant activity of CaEO by spectrophotometric method using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity assay (DPPH assay). The results showed that CaEO at concentration of 2.50, 5.00 and 10.00 µl/ml exhibited the antifungal activity against *Aspergillus* sp. colony with the diameter of 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 and 1.63 ± 0.09 cm, respectively, when compared with the sterile distilled water used as a negative control (2.98 ± 0.05 cm). The inhibitory effect against *Aspergillus* sp. of CaEO at concentration of 10.00 µl/ml, was comparable to that of calcium propionate 0.2 %, a positive control, with the fungi colony diameter measured at 1.50 ± 0.23 cm which showed a statistically significant difference from that of the sterile distilled water used as a negative control ($p \leq 0.05$). CaEO at concentrations of 5.00 and 10.00 µl/ml was then used as an ingredient in fresh bread products to assess its antifungal activity with calcium propionate as a positive control and sterile distilled water as a negative control. It was found that fresh bread stored for 1-4 days on the shelf showed no changes, and on the 5th day fewer black spots were found on the bread surface compared to that of the negative control. Meanwhile, the positive control showed no microorganisms at all. Fresh bread with CaEO or calcium propionate solution was also cultured in PDA agar on petri dishes, incubated at 27 °C. On the 4th day of incubation period, the culture dish with CaEO at concentration of 5.00 µl/ml was found to have fungal growth of 8.20 colonies per 1 g of sample

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

(CFU/g) while that of both CaEO at a concentration of 10.00 µl/ml and calcium propionate solution showed no fungal growth.

The antioxidant activity of CaEO was assessed by DPPH scavenging assay, and it was found that CaEO exhibited very low antioxidant activity with EC_{50} > 1,000 µl/ml, compared to that of α-tocopherol (Vitamin E), a reference compound that possesses very high radical scavenging with an EC_{50} value of 43.47 µg/ml. It can therefore be concluded that the CaEO at a concentration of 10.00 µl/ml exhibited high antifungal activity against *Aspergillus* sp. during the four days of incubation. The effect was comparable to that of calcium propionate. However, the CaEO was found to possess very low antioxidant activity.

Keyword: essential oil; antifungal activity; free radical scavenging

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พยงค์ วณิเกียรติ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในด้านวิชาการ ให้ความช่วยเหลือคอยแก้ไข ตรวจสอบ ให้คำแนะนำและรวมทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณ กลุ่มลูกค้าด้านผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ที่ผลักดันให้เกิดแรงบันดาลใจในการทำงานวิจัยนี้ขึ้นมา

ขอขอบคุณ บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด กรุงเทพฯ ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำมันหอมระเหย *Citrus aurantium* L. ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ ศูนย์จุลินทรีย์ (TISTR) สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์ รา *Aspergillus* sp. ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

และที่สำคัญอย่างยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ มารดาที่ให้โอกาสทางการศึกษา และครอบครัว ที่คอยสนับสนุนด้านการเงิน การทำงาน และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา ตลอดจนครูบาอาจารย์และผู้ที่มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนในการวางรากฐานการศึกษาให้แก่ผู้วิจัย จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สุนีย์ เจริญวุฒิธรรม

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ฆ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฎ

รายการสัญลักษณ์..... ฐ

ประมวลศัพท์และคำย่อ..... ฑ

บทที่

1. บทนำ..... 1
   - 1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา..... 1
   - 1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 3
   - 1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 3
   - 1.4 สมมติฐานของการศึกษา..... 4
   - 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 4
   - 1.6 ตัวแปรที่ศึกษา..... 4
   - 1.7 คำนิยามศัพท์เฉพาะ..... 4
2. แนวคิด ทฤษฎี และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5
   - 2.1 แนวความคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง 5
   - 2.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่..... 7
   - 2.3 รา (Fungi)..... 11
   - 2.4 วัตถุเจือปนหรือสารธรรมชาติที่ใช้ในการถนอมอาหาร..... 20
   - 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์โดยสารกันเสีย..... 21
   - 2.6 ชนิดของสารที่ใช้ในการถนอมอาหาร..... 22
   - 2.7 น้ำมันหอมระเหย (Essential Oils) 24
   - 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 45
3. วิธีดำเนินการวิจัย..... 54

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย……..	54
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย……..	54
4. ผลการทดลอง……...	58
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ในสภาวะหลอดทดลอง (*in vitro*)……..…..	58
4.2 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด……	59
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) …….....	60
5. สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..…….....…….....…….....	64
5.1 สรุปผลการวิจัย……..……..……..……..…….....	64
5.2 อภิปรายผล……..……..……..……..	64
5.3 ข้อเสนอแนะ……..……..……..……	68
บรรณานุกรม……..……...…	70
ภาคผนวก……..…	80
ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)……...	81
ข. การนับจำนวนจุลินทรีย์ (Enumeration of Microorganism)……..……	83
ค. การหาค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH…..	88
ง. Specification of Essential Oil……..……..…….	91
จ. การเผยแพร่……..…….	93
ประวัติผู้เขียน……..……	104

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ค่า water activity (a_w) ของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ..... 11

2.2 ชื่อพฤกษศาสตร์ของแหล่งน้ำมันหอมระเหยของพืชเพื่อนำมาใช้..... 29

2.3 ชนิดและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชตระกูลส้มที่ใช้ในสุคนธบำบัด และ เครื่องสำอางค์..... 39

4.1 ประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L..... 58

4.2 ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging Activity) ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L..... 61

4.3 ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging Activity) ของสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E)..... 63

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะเส้นใยของรา..... 12

2.2 ผนังเซลล์ของรา..... 13

2.3 ลักษณะการเจริญของรา..... 14

2.4 ลักษณะการสร้าง conidia ที่เกิดบนก้าน sterigma ของรา *Aspergillus* sp.....17

2.5 แบบจำลองทางสัณฐานวิทยาของรา *Aspergillus flavus*..... 17

2.6 ขยายขนต่อมน้ำมันของ

A. สะระแหน่ (Mentha cordifolia Opiz)

B. สะระแหน่ญี่ปุ่น (Mentha arvensis L. var piperascens Malinvaud)

C. งาขี้ม้อน (PerillaFrutescens Britt.)..... 24

2.7 วิธีการแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืช..... 25

2.8 โครงสร้างทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญ..... 26

2.9 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย..... 31

2.10 กลไกและตำแหน่งการออกฤทธิ์บนเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย..... 31

2.11 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งราของน้ำมันหอมระเหย..... 32

2.12 โครงสร้างของพืชผลตระกูลส้ม..... 38

2.13 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (free radical)..... 51

2.14 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (non radical)..... 51

2.15 สมการการเกิดปฏิกิริยาหลังการเติมสารต้านอนุมูล..... 51

4.1 การเจริญของรา *Aspergillus* sp. บนขนมปังในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา..... 60

4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. กับ ค่า % Radical Scavenging Activity โดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) 62

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) กับ ค่า % Radical Scavenging Activity โดยวิธี 2,2-Dipheny1-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)….. 63

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

รายการสัญลักษณ์

CaEO	Essential Oil of *Citrus aurantium* L.
CFU/g	Colony Forming Unit / gram
EC_{50}	50% Effective Concentration
EOs	Essential Oils
µg/ml	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
µl/ml	ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร
cm	เซนติเมตร
°C	องศาเซลเซียส

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ประมวลศัพท์และคำย่อ

Antifungal activity	ฤทธิ์ต้านรา
Aspergillus sp.	ชื่อสกุลของราในกลุ่ม Ascomycetes
Essential Oil	น้ำมันหอมระเหย
Free radical scavenging	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ / การต้านออกซิเดชั่น
in vitro	ในสภาวะหลอดทดลอง
% Radical Scavenging Activity	เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ / ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ
DPPH assay	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay
PDA	Potato Dextrose Agar

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ภูมิอากาศของประเทศไทยเป็นแบบร้อนชื้นมีสภาวะอากาศและสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของรา ซึ่งเป็นผลทำให้ผลผลิตทางการเกษตร วัตถุดิบ และผลิตภัณฑ์อาหาร เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ซึ่งมีผลต่อการเสื่อมคุณภาพของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากนั้นจุลินทรีย์บางชนิดยังก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้โดยจุลินทรีย์จะมีการสร้างสารพิษขึ้นมา

ขนมปังจัดเป็นอาหารหลักที่สำคัญชนิดหนึ่งของมนุษย์มาตั้งแต่ก่อนประวัติศาสตร์จนถึงปัจจุบันในชนชาติบางกลุ่ม และนับวันขนมปังจะมีบทบาทต่อมนุษย์ทุกชนชาติ รวมทั้งคนไทยที่นิยมบริโภคขนมปังกันมากขึ้น ทั้งในรูปของอาหาร มื้อต่าง ๆ โดยเฉพาะมื้อเช้า และในรูปของว่าง ของหวาน (วิภาวัน จุลยา, 2549) ขนมปังเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ขนมอบหรือเบเกอรี่ ที่มีส่วนผสมของแป้งสาลี ยีสต์ หรือผงฟู หรือเบคกิ้ง โซดา น้ำ เกลือ น้ำตาล และไขมัน เป็นหลัก ขนมปังเป็นผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งแห้ง (Intermediate moisture food) ซึ่งมักจะเกิดการเสื่อมเสียได้รวดเร็วเนื่องที่มีความชื้นต่ำ โดยส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ในกลุ่มราที่อยู่ในสกุล *Aspergillus* sp. ราชนิดนี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเปลี่ยนแปลง ทั้งกลิ่น สีและรสชาติ รวมทั้งมีการสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค

สำหรับในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ขนมปัง ผู้ผลิตบางรายใส่สารป้องกันรา เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีอายุยาวนานขึ้น สารที่นิยมใช้เป็นสารกันราในผลิตภัณฑ์ขนมปัง เช่น กรดโปรปิโอเนต เกลือโปรปิโอเนต แคลเซียม**โพรพริโอเนต** เป็นสารกันราในผลิตภัณฑ์ขนมปัง เป็นเกลือของกรด**โพรพริ**โอนิค มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อน มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ไม่มีกลิ่นและสี จึงไม่ส่งผลกระทบต่อกลิ่นและรสชาดของผลิตภัณฑ์ ช่วยต้านการเจริญเติบโตของราได้ดี ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสารปรุงแต่งอาหารที่ปลอดภัยตามประกาศของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา ปี 2547 โดยเติมลงในอาหารได้ในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งหมายถึงปริมาณที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดผลที่ต้องการภายใต้กระบวนการผลิต (GMP) ที่ดี แม้ว่ากฎหมายจะไม่ได้ระบุปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ได้ เนื่องจากกรด**โพรพริ**โอนิค และเกลือ**โพรพริ**โอเนต**ไม่**ทำให้เกิดพิษที่เฉียบพลันหรือรุนแรงหากบริโภคในปริมาณน้อย แต่มีรายงานการวิจัยว่าการบริโภคอาหารที่มีเกลือแคลเซียมโปรปิโอเนตในปริมาณสูงติดต่อกันเป็น

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

เวลานาน จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตในสัตว์ทดลอง และอาจส่งผลให้เกิดพฤติกรรมสมาธิสั้นในเด็ก ในประเทศไทยระบุปริมาณของเกลือแคลเซียมโพรพริโอเนตตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 84 (พ.ศ.2527) และฉบับที่ 119 (พ.ศ.2532) อนุญาตให้ใช้ได้ไม่เกินร้อยละ 0.2 ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพในระยะยาวควรเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ขนมปังสำหรับรับประทานที่เพิ่งทำเสร็จใหม่ๆ โดยเสามารถสัมผัสดูเนื้อของขนมปังจะมีความนุ่ม และหอมกลิ่นของขนมปังที่เพิ่งผ่านการอบมาใหม่ๆ และที่สำคัญควรเลือกผลิตภัณฑ์ที่ระบุข้อมูลที่สำคัญ เช่น เลขที่อนุญาต ผู้ผลิต สถานที่ผลิต วันผลิต และวันหมดอายุด้วย

ในปัจจุบันผู้บริโภคไม่นิยมบริโภคอาหารที่ใช้สารกันเสียสังเคราะห์ เนื่องจากให้ความสนใจเรื่องสุขภาพมากขึ้น ด้วยเหตุนี้ทำให้ทั่วโลกมีแนวคิดที่จะสำรวจทางเลือกใหม่โดยให้ความสำคัญกับวิธีการที่ช่วยลดอัตราการเกิดโรคและหลีกเลี่ยงไม่ให้มีผลกระทบต่อสุขภาพผู้บริโภค ดังนั้นการศึกษาทางเลือกโดยใช้สารธรรมชาติจึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะหรือสารสังเคราะห์ที่ใช้เติมลงไปในอาหาร เช่นสารกันเสียซึ่งเป็นสารที่ช่วยให้อาหารยังคงสภาพ รส กลิ่น ไว้ได้นานผลิตสารประเภทนี้ได้แก่ สารกันหืน สารกันเสียหรือสารป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ได้มีการศึกษาการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยใช้สารสกัดจากธรรมชาติและสมุนไพรเพื่อทดแทนสารเคมีซึ่งเป็นวิธีดั้งเดิมที่ใช้กันมาเป็นเวลานาน ดังนั้นการใช้สารสกัดธรรมชาติเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกใหม่เพื่อเพิ่มความปลอดภัยให้กับผู้บริโภค เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อย ราคาค่อนข้างถูกและเป็นธรรมชาติ อีกทั้งยังช่วยปรุงแต่งสีกลิ่นรสของอาหารให้น่ารับประทานมากยิ่งขึ้น น้ำมันหอมระเหยเป็นรูปแบบหนึ่งที่นำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์นี้ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยมีสรรพคุณต่างๆมากมาย เช่น ต้านจุลินทรีย์ ต้านรา ต้านไวรัส เป็นสารฆ่าแมลงและต้านอนุมูลอิสระ ใช้รักษาโรคมะเร็ง ยืดอายุผลิตภัณฑ์ของอาหาร นอกจากนี้ยังใช้ในอโรมาเธอราปี รวมไปถึงอุตสาหกรรมน้ำหอมอีกด้วย น้ำมันหอมระเหยจะมีประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ดีกว่ารูปที่พบได้โดยทั่วไป (Pranoto *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2008b)

แนวโน้มผู้บริโภคให้ความสำคัญอาหารกับสุขภาพมากยิ่งขึ้น ดังนั้นต้องหันมาให้ความสำคัญกับการใช้สารกันเสียที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้นตามไปด้วย สารกันเสียที่ได้จากธรรมชาตินั้น ส่วนใหญ่มักจะไม่ทนต่อความร้อนหรืออุณหภูมิสูงๆในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ขนมอบได้ จึงได้นำมาซึ่งการพัฒนานำน้ำมันหอมระเหยมาใช้เป็นสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหาร มีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของพืชตระกูลส้ม Fisher and Phillips (2006) พบว่าในน้ำมันหอมระเหยของมะนาว ส้มเขียวหวานและมะกรูด มีสารประกอบของ Linalool และ Citral ซึ่งสาร

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ดังกล่าวมีผลต่อการต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ Yi *et al*. (2008) ได้รายงานว่าในพืชตระกูลส้มมีสารที่สำคัญชื่อว่า Hesperidin ซึ่งพบในเปลือกของพืชตระกูลส้ม Hesperidin สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus aureus*

พืชตระกูลส้ม (Citrus Fruit) เป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เช่น ส้มเขียวหวาน (*Citrus Reticulata Blanco*) ส้มโอ (*Citrus grandis maxima Linn.*) มะกรูด (*Citrus hystrix DC.*) ส้มโชกุน (*Citrus reticulata cv Shogun*) และมะนาว (*Citrus aurantifolia Swingle*) สารสกัดเอทานอล 80 % ของน้ำมันหอมระเหยสามารถต้านราได้และสารประกอบบางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพในการต้านราได้ดี (ธิรภา แสนเสนา และ นภดล กิตติวราฤทธิ์, 2536) Sharma and Tripathi (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก epicarp ของ *C. sinensis* (L) osbeck มีผลต่อการเติบโตและลักษณะรูปร่างของ *Aspergillus niger* (L) van Tiegherm โดยเส้นใย (mycelium) ถูกยับยั้งและตายที่ระดับความเข้มข้นคือ 2.5 และ 3.0 µg/ml ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยยังได้รับการพิจารณาจากองค์การอาหารและยา (FDA) ว่าสามารถใช้เติมลงไปในอาหารได้อย่างปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) (Simas *et al.*, 2017)

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ขนมปังสดของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม โดยพืชตระกูลส้มที่สนใจศึกษานี้ คือ *Citrus aurantium* Dulcis (Orange) Peel Oil ได้มาจากกระบวนการสกัดแบบการบีบเย็นจากเปลือกด้านนอกของผลส้มสุก *Citrus aurantium* L. (*Family of Rutaceae*) โดยทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการต้านรา *Aspergillus* sp. และนำความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถต้านราได้มากที่สุด มาศึกษาฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. ชุดควบคุม ได้แก่ สารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนตและสารละลายน้ำ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

2. ชุดทดสอบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการเติมสารสกัดจากน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

1.4 สมมติฐานของการศึกษา

น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.มีฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. และสามารถช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ขนมปังสดได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

1.6 ตัวแปรที่ศึกษา

1. ตัวแปรต้น คือ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.
2. ตัวแปรตาม คือ ประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp.
3. ตัวแปรควบคุม คือ อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มเชื้อ สูตรมาตรฐานในการเตรียมขนมปัง อุณหภูมิในการอบขนมปัง ระยะเวลาในการหมักแป้งโด เป็นต้น

1.7 คำนิยามศัพท์เฉพาะ

น้ำมันหอมระเหย หมายถึง น้ำมันหอมระเหยที่ได้มาจากกระบวนการสกัดแบบการบีบเย็นจากเปลือกด้านนอกของผลส้มสุก *Citrus aurantium* L.

ประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา หมายถึง ความสามารถของน้ำมันหอมระเหยในการต้านรา *Aspergillus* sp. โดยสังเกตจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยรา *Aspergillus* sp. (cm)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หมายถึง สามารถทำลาย หรือ ยับยั้งอนุมูลอิสระ (Free Radical) ที่เกิดขึ้น

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่มีฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ขนมปัง มีการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับแนวคิดทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อประกอบการวิจัย ในหัวข้อดังนี้

2.1 แนวความคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ขนมปังเป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่ทำมาจากส่วนผสมของแป้งสาลี ยีสต์ หรือผงฟู หรือเบคกิ้ง โซดา น้ำ เกลือ น้ำตาล และไขมันเป็นหลัก แต่สัดส่วนจะเปลี่ยนแปลงไปตามความต้องการให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะอย่างไร เพื่อสนองความต้องการของผู้บริโภค และเพื่อการบริการในโอกาสต่าง ๆ

2.1.1 ชนิดของขนมปัง

ขนมปังสามารถแบ่งตามปริมาณของน้ำตาลและไขมันในสูตร ออกเป็น 4 ประเภท (ดวงฤทัย ธำรงโชติ และคณะ, 2555) คือ

ขนมปังผิวแข็ง (hard bread) จะมีปริมาณน้ำตาลน้อยกว่า 0-2 % และมีไขมัน 0-3 % โดยเนื้อขนมปังที่ได้จะค่อนข้างแห้งมีเปลือกค่อนข้างแข็ง เช่น ขนมปังฝรั่งเศส ขนมปังขาไก่

ขนมปังจืด (loft bread) จะมีปริมาณน้ำตาลตั้งแต่ 3-8 % และมีไขมัน 3-6 % เช่น ขนมปังแซนด์วิช ขนมปังหัวกะโหลก

ขนมปังกึ่งหวาน (soft bun) มีปริมาณน้ำตาล 9-15 % และมีไขมัน 6-12 % ขนมปังที่ได้เนื้อจะนุ่ม นิยมทำเป็นรูปทรงกลมอาจมีหรือไม่มีไส้ก็ได้ ที่นิยมมักเป็นไส้คาว เช่น ขนมปังไส้ไก่ ขนมปังหมูหยอง แฮมเบอเกอร์

ขนมปังหวาน (sweet dough) มีปริมาณน้ำตาลสูง 16-30 % และมีไขมัน 12-14 % จัดเป็นขนมปังค่อนข้างหวาน หรือขนมปังไส้หวานชนิดต่างๆ เช่น ขนมปังผลไม้ ขนมปังมะพร้าว

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

2.1.2 คุณลักษณะของขนมปัง

คุณลักษณะของขนมปังที่ดี สามารถสังเกตได้จากลักษณะภายนอกและภายใน ดังนี้ คือ ลักษณะภายนอกของขนมปัง ควรมีปริมาตร รูปร่างที่เสมอกันทั้ง 2 ด้าน มีความเลื่อมมัน สีของเปลือกการอบที่สม่ำเสมอ การแตกของก้อนขนมปังเมื่ออบ เช่นเดียวกันกับลักษณะภายในของขนมปัง ที่สังเกตได้จาก สี โครงร่าง เนื้อเรียบ มันและเป็นเงา รสและกลิ่น เนื้อในใสและยืดหยุ่น มีความชุ่มชื้น (จิตธนา แจ่มเมฆ และอรอนงค์ นัยวิกุล, 2560)

2.1.2.1 ลักษณะภายนอกของขนมปัง

ปริมาตร ขนมปังที่ดีจะต้องมีปริมาตรที่ดี ไม่ใหญ่เกินไป ไม่เล็กและหนัก ปริมาตรที่ถูกต้องจะได้จากโดที่มีการปรับสภาพของกลูเตนอย่างถูกต้อง จะให้ก๊าซได้ดีในระหว่างการอบ นอกจากนั้นยังมีการพักตัวครั้งสุดท้ายที่เหมาะสม มีอุณหภูมิในการอบและมีความชื้นที่ถูกต้อง

รูปร่างที่เสมอกันทั้ง 2 ด้าน หมายถึง ขนมปังที่อบออกมาแล้ว เมื่อนำมาตัดจะได้ส่วนที่เท่ากันทั้ง 2 ข้าง ซึ่งส่วนใหญ่จะได้มาจากโดที่มีการหมัก การม้วน และการพักตัวครั้งสุดท้ายที่ถูกต้อง ขนมปังที่มีรูปร่างไม่ดี อาจเกิดขึ้นจากการอบขนมปังในพิมพ์ที่มีขนาดเล็กกว่าน้ำหนักของโดที่ใส่ในพิมพ์ เมื่อโดเกิดการขยายตัวจากการหมักโดจะไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงควรใช้พิมพ์ที่ได้ขนาดกับน้ำหนักของโดที่บรรจุ

ความเลื่อมมัน เป็นความมันที่เกิดขึ้นในตัวของขนมปังเองโดยธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นประกายเงา แสดงให้เห็นถึงการหมักที่ดี การใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพดีและผู้อบที่มีฝีมือดี

สีของเปลือกนอก สีของเปลือกนอกของขนมปังเป็นผลจากการอบและจากหลายสาเหตุ เช่น โดที่หมักไม่ได้ที่ สีของเปลือกนอกเมื่อนำเข้าอบจะมีสีน้ำตาลแดง และมีรอยสีเขียวตรงรอยแยก ขณะที่โดที่หมักไว้นานเกินไป จะให้สีที่ไม่ดี หรืออุณหภูมิที่ใช้อบต่ำหรือสูงเกินไป ความชื้นที่ไม่เพียงพอในการหมักครั้งสุดท้าย เป็นต้น

ความสม่ำเสมอของผิวขนมปัง ลักษณะที่ได้ไม่สม่ำเสมอเกิดจากการอบผลิตภัณฑ์ในตู้อบมากเกินไป เช่น วางพิมพ์หรือถาดชิดกันเกินไป ทำให้ความร้อนจากตู้อบกระจายไม่ทั่วถึงทุกด้านของพิมพ์ ทำให้ด้านที่ไม่ได้รับความร้อนเพียงพอ ไม่เกิดสีที่ดี เกิดลักษณะของขนมปังที่ไม่สม่ำเสมอ หรืออบไม่ทั่วถึงกันทั้งก้อน

รอยแตกข้าง ๆ เมื่ออบ ลักษณะนี้เป็นผลจากการขยายตัวภายในของก้อนโดในระหว่างการอบ ถ้าโดหมักได้ที่ มีการพักตัวและมีสภาพการอบที่ถูกต้องแล้ว รอยแตกจะสม่ำเสมอและเรียบ ทั้งนี้เนื่องจากกลูเตนอยู่ในสภาพที่มีความยืดหยุ่นที่ดีพอที่จะให้ก๊าซขยายตัวและมีความคงตัวพอที่จะเก็บก๊าซไว้ได้ ความชื้นในตู้หมักและในตู้อบจะช่วยป้องกันผิวนอกของโดไม่ให้แห้งซึ่งเมื่อเกิดการ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ขยายตัว รอยแตกที่ได้จากการอบก็จะเรียบด้วยเช่นกัน อีกสาเหตุหนึ่งคือ การม้วนโดและการพักโดครั้งสุดท้ายก่อนการอบก็จะช่วยให้การแตกเป็นไปอย่างเรียบเนียนเช่นกัน

2.1.2.2 ลักษณะภายในของขนมปัง

สีภายใน สีของเนื้อขนมปังขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งที่มาใช้ การหมักและการนวดที่ถูกต้อง การใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพดีและสมดุล มีการพักโดและการอบที่ถูกต้อง จะทำให้เนื้อขนมปังเป็นเงา ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดและรูปร่างของเซลล์ก๊าซด้วย

โครงร่าง หมายถึง ขนาดรูปร่างของเซลล์ที่เป็นก้อนขนมปัง โครงร่างจะต้องเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของขนมปัง โครงร่างของเซลล์เนื้อในขนมปังจะต้องกลมเล็กสม่ำเสมอและกระจายกันอยู่อย่างทั่วถึง วัตถุดิบที่มีคุณภาพดี การหมักที่เหมาะสม วิธีการทำที่ถูกต้องและการพักตัวที่ดีก็เป็นปัจจัยสำคัญสำหรับโครงร่างของโดเช่นกัน

ความมันเงาและเนื้อสัมผัส เป็นผลจากการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพดี มีการหมักที่ควบคุมดีและมีการนวดที่ถูกต้อง สำหรับเนื้อสัมผัสที่ดีของขนมปังนั้น จะมีลักษณะอ่อนนุ่มและมีความคงตัว

รสและกลิ่น เป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำขนมปัง เพราะมีผลต่อการบริโภค เป็นผลมาจากวัตถุดิบที่มีคุณภาพดี ผลจากการหมักรวมกับเกลือและสารที่ให้รสอื่นๆ ที่เติมเข้าไป ถ้าหมักนานเกินไปจะมีกลิ่นแรงและมีรสเปรี้ยวที่เกิดจากกรดซึ่งเกิดขึ้นจากการหมักโดนานเกินไป เป็นต้น

เนื้อขนมปังเรียบและมีความยืดหยุ่นดี เป็นลักษณะที่ขนมปังสามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อใช้นิ้วหัวแม่มือกดลงไปเนื้อขนมปังและไม่ทิ้งรอยนิ้วไว้ ความยืดหยุ่นเป็นเครื่องวัดกำลังต้านทานของการดึงของเนื้อขนมปัง เป็นลักษณะที่สำคัญต่อการตัดขนมปังและการทาเนยบนแผ่นขนมปังระยะเวลาการหมักและคุณภาพของวัตถุดิบที่ดีเกี่ยวข้องกับความยืดหยุ่นของเนื้อขนมปังเช่นกัน

ความชื้น ความชื้นในขนมปัง เกี่ยวข้องกับปริมาณของน้ำ เกลือและไขมันที่เติมลงไปในระหว่างกระบวนการหมัก ขนมปังที่ผ่านกระบวนการหมักโดอย่างดี จะชื้นกว่าและเก็บความชื้นได้นานกว่าขนมปังที่ทำโดยใช้เวลาสั้น

2.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

ผู้บริโภคสามารถเลือกซื้อผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ได้ในราคาและคุณภาพที่หลากหลาย ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่หลายชนิดเป็นอาหารที่เสี่ยงต่ออันตรายจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภคอื่นๆ ทั้งนี้หากอาหารนั้นไม่ได้ผ่านกระบวนการผลิตและเก็บรักษาอย่างถูกต้อง เนื่องจากประเทศไทยมีสภาวะที่เอื้อต่อการเจริญเพิ่มจุลินทรีย์ทั้งที่ทำให้อาหารเน่าเสียและที่เป็นเชื้อโรค

2.2.1 แหล่งที่มาและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ มีทั้งชนิดที่เติมลงตามตำรับและชนิดที่ที่ปนเปื้อนในขั้นตอนต่างๆของการผลิต การทำผลิตภัณฑ์เบเกอรี่หลายประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเภทขนมปังต่างๆมีการเติมยีสต์เพื่อหมักให้แป้งขึ้นฟู จุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่มาจากหลายแหล่ง ได้แก่ วัตถุดิบที่ใช้ สิ่งแวดล้อมของสถานที่ผลิตกรรมวิธีการผลิตหลายตำรับต้องมีการสัมผัสด้วยมือค่อนข้างมากทั้งก่อนและหลังการอบ ผู้สัมผัสอาหารและเครื่องมืออุปกรณ์ กระบวนการผลิต การแบ่งบรรจุ การเก็บรักษา การขนส่ง การจัดจำหน่ายยังผู้บริโภค และ การบริโภคของผู้บริโภค สำหรับวัตถุดิบที่นำมาใช้ทำผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ชนิดต่างๆมักเป็นส่วนผสมที่เน่าเสียง่าย หลายชนิดเป็นแหล่งปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น

แป้งสาลี (wheat flour) แป้งที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ทุกชนิด คือ แป้งสาลี ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษแตกต่าง จากแป้งข้าวจ้าวหรือแป้งข้าวเหนียว แป้งสาลีนี้เมื่อผสมกับน้ำและนวดจะได้ก้อนแป้งที่มีลักษณะเหนียว และยืดหยุ่นได้ซึ่งเมื่อล้างเอาแป้งออกจะมีลักษณะเป็นยาง เหนียวและยืดหยุ่นได้เราเรียกว่า กลูเตน (gluten) คุณลักษณะพิเศษนี้ในแป้งอย่างอื่นไม่มี แป้งสาลีจึง เหมาะในการทำ ผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตก๊าซ ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อละเอียด นุ่ม มีรูปร่างที่คงตัว ซึ่งเป็นคุณลักษณะของแป้งสาลีที่ดี แป้งสาลีมักจะเกิดการเสื่อมเสียหรือการปนเปื้อนจากราได้ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะที่ด้อยคุณภาพและมีอายุการเก็บรักษาสั้นลง ราที่ทำให้เมล็ดข้าวสาลีเสื่อมเสียได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus niger*, *Penicillium* และ *Fusarium* ราสกุลนี้สร้างสารพิษได้ ดังนั้นการทำความสะอาดต้องทำก่อนที่จะนำไปโม่หรือบดเป็นแป้ง จะช่วยลดปริมาณของรา แต่ถ้าการผลิตแป้งยังไม่ได้มาตรฐานเพียงพอก็จะทำให้แป้งเสื่อมเสียได้เช่นเดียวกับการเสื่อมเสียของเมล็ดข้าวสาลี แป้งสาลีขาวจะผ่านการถูกฟอกโดยการใช้สารบางอย่าง เช่น ออกไซด์ของไนโตรเจน คลอรีน ไนไทรซิลคลอไรด์ หรือเบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ ซึ่งมีผลทำให้ราลดจำนวนลงได้ และหลังการฟอกแล้วถ้าแป้งมีความชื้นต่ำกว่า 13 % จะป้องกันการเจริญของราได้ดี ถ้าต่ำกว่า 13-15 % ราจะเจริญได้ดี และถ้ามีความชื้น 15-17 % ราและแบคทีเรียจะเจริญได้ดี

น้ำตาล (sugar) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่เป็นผลึกละลายได้ดีในน้ำ มีรสหวาน น้ำตาลจะเป็นอาหารของยีสต์ทำให้การหมักเกิดขึ้นได้เร็ว ช่วยให้ความหวานแก่ผลิตภัณฑ์ ช่วยในการตีครีมและตีไข่ให้มีความคงตัวและขึ้นฟู ทำให้ผิวนอกของผลิตภัณฑ์มีสีสวย ช่วยเก็บความชื้นทำให้เนื้อผลิตภัณฑ์นุ่มอยู่ได้นาน และ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ กลิ่น และรสของผลิตภัณฑ์

แป้งและน้ำตาล ยังเป็นแหล่งปนเปื้อนของสปอร์แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เช่น *Bacillus subtilis* ซึ่งทำให้อาหารเน่าเสีย, *Bacillus cereus* ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร (Banwart, 1989)

นม (milk) ที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์ขนมปัง คือ นมสด, นมข้นจืด (evaporated milk) และนมผง (dry milk products) ที่ช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์มีความน่ารับประทาน ช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์อ่อนนุ่ม นม

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ผง ถ้าเก็บรักษาไม่ดีพอ มีความชื้นเกินร้อยละ 8 อาจจะทำให้เชื้อราที่มีอยู่ทั่วไปเจริญได้ และ นมพาสเจอไรส์ ซึ่งผ่านความร้อนแบบ HTST (High Temperature Short Time) ซึ่งสามารถทำลายยีสต์ รา แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์ม แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ แบคทีเรียที่ผลิตกรดได้เร็ว เช่น *Streptococcus latis* แต่ขนมปังยังอาจเสื่อมเสียได้เนื่องจากยังคงมีแบคทีเรียบางกลุ่มหลงเหลืออยู่ และแบคทีเรียที่หลงเหลืออยู่สามารถเจริญได้ช้าๆที่อุณหภูมิต่ำ

ไขมัน (shottening) ไขมันและน้ำมัน นั้นเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ทำให้ไขมันเข้ากับน้ำหรือของเหลวอื่นได้ดีขึ้นจะช่วยหล่อลื่นกลูเตนและเม็ดแป้ง ทำให้เนื้อขนมนุ่มขึ้น, ช่วยเก็บอากาศในระหว่างการตีเนยที่เกิดขึ้น ทำให้ขนมมีลักษณะเบาฟูเนื้อละเอียด ช่วยให้ขนมมีความมันเนื้อนุ่มและชุ่ม เก็บได้นานขึ้น และ ให้กลิ่นรสที่หอมหวานน่ารับประทาน ชนิดของไขมันและน้ำมันซึ่งที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมเบเกอรี่ ได้แก่ มันหมูแข็ง (lard), เนยสด (butter), ไขมันพืช (hydrogenated vegetable shortening), น้ำมันพืช (vegetable oils), ไขมันผสมหรือมาการีน (compound lard) และโกโก้บัตเตอร์ (cocoa butter) เนยและครีม ที่ใช้เป็นส่วนประกอบอาจเสียได้เนื่องจากแบคทีเรียและราบางชนิด ที่ทำให้กลิ่นและรสชาติที่ไม่พึงประสงค์

ไข่ (egg) เป็นส่วนผสมที่สำคัญมากอย่างหนึ่งในการทำผลิตภัณฑ์ขนมอบ นิยมใช้ไข่ไก่ โดยจะมีความชื้นประมาณ 75 % ไข่ขาว จะมีน้ำอยู่ประมาณ 86 % ไข่แดง จะมีน้ำอยู่ประมาณ 50 % และมีสารไขมันที่เรียกว่า เลซิติน มีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ไข่แดงจะช่วยให้เค้กมีสีเหลือง และเป็นตัวทำให้เกิดการเสื่อมเสียเมื่อเก็บไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูง ไข่นั้นจะช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์ขึ้นฟู ช่วยให้ส่วนผสมมีความมันผสมง่ายขึ้นและให้กลิ่นรสที่ดี เปลือกไข่ที่ไม่สะอาด อาจมีเชื้อราและแบคทีเรียปนเปื้อนได้หลายชนิด บางชนิดอาจทำให้อาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella* (Frazier, 1958) ผลิตภัณฑ์บางประเภทมีการตกแต่งด้วยส่วนผสมที่ทำจากไข่ดิบ ถ้าแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่เจริญได้ก็จะทำให้ผลิตภัณฑ์นั้นเน่าเสียหรือเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

สารเสริมประเภทต่างๆ สารเสริมคุณภาพ (bread improved) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยทุ่นเวลาในการทำขนมปัง (dough method หรือ quick dough) ประกอบด้วย อาหารสำหรับยีสต์ และยังช่วยให้เนื้อขนมปัง นิ่มละเอียด และสีขาวขึ้น เก็บไว้ได้นานกว่าปกติ เช่น ยู 99, เอสพี (ผงฟูแบบฟอสเฟต), เอ็มแพล็ก และ แพ็ตโก้-3

ยีสต์ (yeast) เป็นรากลุ่มหนึ่งที่ดำรงชีวิตอยู่ในสภาพเซลล์เดียวเป็นส่วนใหญ่ มีการขยายพันธุ์โดยการแตกหน่อ มีขนาดเล็กมากมองด้วยตาเปล่าไม่ เห็น ต้องส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ยีสต์นี้มีอยู่ตามธรรมชาติ เป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดการหมัก และยังเป็นอาหารที่มีคุณค่าอีกด้วย เพราะเป็นแหล่งของวิตามินและเอนไซม์ที่สำคัญ ยีสต์จะ ทำหน้าที่ตั้งแต่เริ่มผสมนวดแป้ง จนกระทั่งแป้งที่นวดได้ถูกนำไปอบ และจะหยุดทำหน้าที่เมื่อถูกความร้อนจากตู้อบ เพื่อทำการผลิตแก๊ส

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

คาร์บอนไดออกไซด์ทำให้ผลิตภัณฑ์ขยายตัวและมีปริมาตรเพิ่มขึ้น ทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสเฉพาะตัวของขนมปัง ยีสต์ที่ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์เบเกอรี่มี 3 ชนิด คือ ยีสต์สด (compressed yeast) ยีสต์แห้งชนิดเม็ด (dry yeast) และ ยีสต์แห้งชนิดผง (instant dry yeast)

จุลินทรีย์ต่างๆที่มีในวัตถุดิบอาจจะเข้าปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ได้ง่าย ถ้าผู้ผลิตขาดความระมัดระวังในการดูแลสุขลักษณะของการผลิตเพราะผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ส่วนใหญ่ยังมีกระบวนในการผลิตหลังการอบให้สุกอีกหลายขั้นตอน เช่น การปล่อยทิ้งให้ขนมปังเย็นลงหลังนำเอาออกจากเตาอบ การแกะขนมออกจากพิมพ์หรือถาดการตกแต่งหรือสอดไส้ การจัดลงถาดหรือบรรจุภัณฑ์ การหยิบขนมเพื่อจำหน่าย ขั้นตอนต่างๆเหล่านี้ ทำให้จุลินทรีย์จากทั้งสภาวะแวดล้อมของสถานที่ผลิต ฝุ่นละออง แมลงและสัตว์นำโรคอื่นๆ สุขภาพของคนงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารส่วนที่ใช้แต่งเติม อุปกรณ์ประกอบการแต่งเติมอาหาร รวมทั้งจุลินทรีย์จากมือผู้สัมผัสอาหาร สามารถเข้าปนเปื้อนกับผลิตภัณฑ์ได้

2.2.2 การเสื่อมสภาพเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เป็นผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค มีสารอาหารต่างๆที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ดีผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นสูงจะมีอายุการเก็บรักษาต่ำ ควรเก็บในตู้เย็นหรือห้องที่มีอุณหภูมิต่ำ เพื่อชลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากขั้นตอนต่างๆของกระบวนการผลิต ขนส่งและจัดจำหน่าย ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ ในระหว่างการหมักอาจมีแบคทีเรียปนเปื้อนซึ่งเป็นประเภทที่ผลิตกรดแลคติคเจริญได้ ดังนั้นถ้าหมักนานเกินไปอาจทำให้ขนมปังที่ได้มีรสเปรี้ยวหรือรสชาติที่ไม่พึงประสงค์

การอบผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ชนิดที่มีความชื้นสูงจะทำให้อุณหภูมิภายในผลิตภัณฑ์ต่ำกว่า 100 °C แม้จะตั้งอุณหภูมิของเตาอบไว้สูงก็ตาม สปอร์ของจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่ถูกทำลายจะยังคงเหลืออยู่และเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นระหว่างการเก็บรักษาหรือวางจำหน่าย ทำให้ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่เกิดการเน่าเสียหรือมีลักษณะผิดปรกติ ซึ่งผู้บริโภคไม่ยอมรับ ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่บางตำรับถูกตกแต่งหรือสอดไส้ด้วยอาหารประเภทต่างๆเป็นการเพิ่มชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ให้แก่ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่นั้นๆซึ่งทำให้อายุการเก็บรักษาต่ำลง

การเสื่อมสภาพเน่าเสียของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่เกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การเหม็นหืนของไขมัน การเสียน้ำหรือความชื้นบริเวณผิวทำให้มีลักษณะแข็ง การตกผลึกของน้ำตาล อย่างไรก็ตามสาเหตุหลักของการเน่าเสียของ ขนมปัง ขนมเค้กและผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ ยกเว้น คุกกี้ บิสกิต แครกเกอร์ เกิดจากการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียเนื่องจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีปริมาณน้ำและอาหารเพียงพอที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการขยายพันธุ์ได้ ปริมาณน้ำอิสระซึ่งคิดเป็นค่า water activity (a_w) ในช่วง 0.93-0.98 เหมาะแก่การเจริญของรา เมื่อ ค่า water activity (a_w) ของอาหารลดต่ำลง การเจริญเติบโตของ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

แบคทีเรียจะถูกจำกัด ทำให้พบการเจริญเติบโตของยีสต์และรา ตามตารางที่ 2.1 (ณัฐดนัย หาญการสุจริต, 2559)

ตารางที่ 2.1 ค่า water activity (a_w) ของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ

Water Activity (a_w)	Products	Spoilage Types
0.99	Creams. custards	Bacterial spoilage (e.g.,"rope"mold growth and "chalk molds")
0.90-0.97	Breads, crumpets. part-baked yeasted products	Bacterial spoilage (e.g.,"rope" mold growth and "chalk molds")
0.90-0.95	Moist cakes (e.g., carrot cake)	Mold and yeast. bacterial spoilage (e.g.,"rope")
0.8-0.89	Plain cakes	Molds and yeasts
0.7-0.79	Fruit cakes	Xcrophilic molds and osmophilic yeasts
0.6-0.69	Some dried fruits or fruit cakes	Specialized xerophilic molds and osmophilic yeasts, sugar-tolerant yeasts
< 0.6	Biscuits, chocolate, some dried fruits	No microbial spoilage

ที่มา: Robertson (2013)

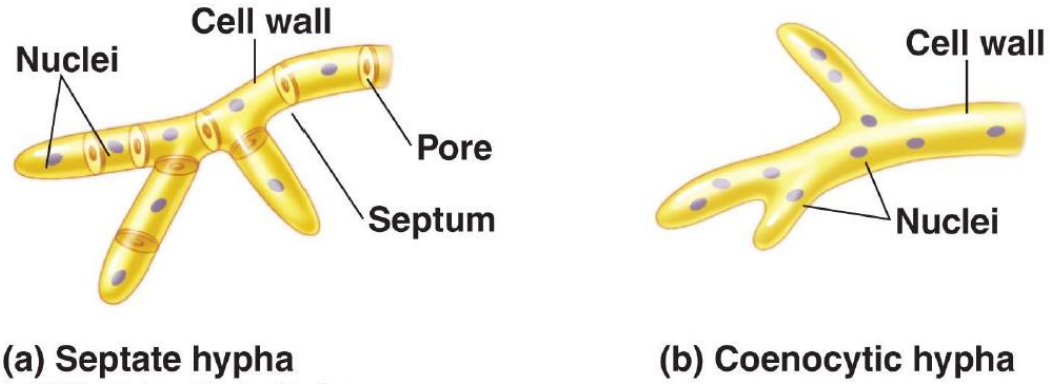
จาก ตารางที่ 2.1 แสดงลักษณะการเจริญของรา ซึ่งมีคุณสมบัติที่สำคัญที่ทนทานต่อ ค่า water activity (a_w) ต่ำได้ดีกว่าจุลินทรีย์ประเภทอื่น ราบางชนิดอาจทนต่อค่า a_w ต่ำถึง 0.65 และทนทานต่อความร้อนต่ำการให้ความร้อนจะทำลายราได้

2.3 รา (Fungi)

รา เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มยูคาริโอต (Eukaryote) เจริญเติบโตโดยใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน และคาร์บอน (Chemoheterotrop) ส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ สืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ซึ่งมีทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ รามีลักษณะคล้ายพืชแต่ไม่มีลำต้น ราก ใบและระบบท่อที่สลับซับซ้อนเหมือนพืชชั้นสูง ราจะเก็บสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปของไกลโคเจนแต่พืชจะเก็บในรูปของแป้ง รามี ทั้งที่เป็นเซลล์เดียวได้แก่ ยีสต์ (Yeast) และหลายเซลล์ ได้แก่ ราสาย (Mold) ไม่มี

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

คลอโรฟิลล์ จึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ดำรงชีวิตเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ที่เน่าเปื่อยหรือเป็นปรสิตทำให้เกิดโรคกับพืช สัตว์ หรือมนุษย์ต้องอาศัยสิ่งมีชีวิตหรือซากสิ่งมีชีวิตอื่นๆมีรูปร่างแบบ Filament มีทั้งเซลล์เดี่ยวและเป็นเส้นใยเล็ก เรียกว่า เส้นใยไฮฟา(Hypha) ลักษณะของเส้นใยแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ เส้นใยที่มีผนังกั้น (septate hypha) และเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น (Nonseptate hypha or Coencytic hypha) ดังภาพที่ 2.1



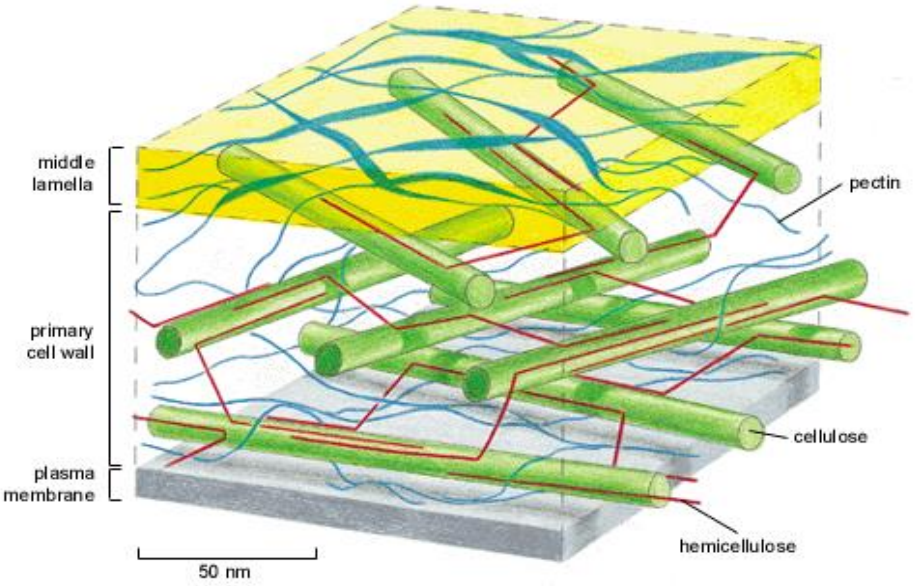
ภาพที่ 2.1 ลักษณะเส้นใยของรา

ที่มา: http://www.rogers.k12.ar.us/users/ehutches/hypha1.gif

กลุ่มของเส้นใยเรียกว่าไมซีเลียม (Mycelium) นิวเคลียสมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Eukaryotic nucleus) มีผนังเซลล์ และสืบพันธุ์โดยการสร้างสปอร์ (พรพรรณ ดีระพัฒน์และคณะ, 2548)

ผนังเซลล์ (Cell wall) ของรา มีลักษณะเป็นเส้นบางๆ ส่วนใหญ่ประกอบด้วย Polysaccharide 80-90 % อาจจะเป็นสารไคติน (true fungi) หรือเซลลูโลส (pseudofungi), Protein, Lipid อาจจะมีรงควัตถุ polyphosphate และ Inorganic ion ต่างๆ ดังภาพที่ 2.2

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์



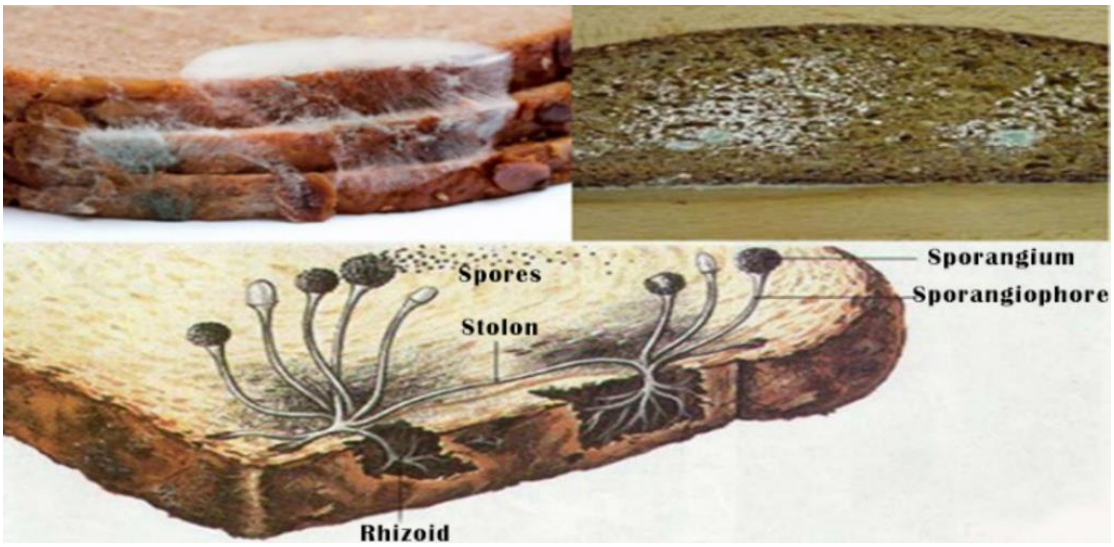
ภาพที่ 2.2 ผนังเซลล์ของรา

ที่มา: http://biology-pictures.blogspot.com/2011/11/septate-and-coenocytic-hypha.html

การเสื่อมเสียเนื่องจากราหลังการทำผลิตภัณฑ์ พบมากที่สุดในขนมปังและผลิตภัณฑ์ขนมอบอื่นๆ ซึ่งจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน เนื่องจากเกิดไมซีเลียมขึ้นปกคลุมที่ผิวนอกของผลิตภัณฑ์ มีลักษณะคล้ายๆ เส้นไหม อาจอยู่เป็นหย่อมๆ หรือแผ่เป็นวงกว้างก็ได้ แต่ละผลิตภัณฑ์จะมีสีของราที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของรา โดยปกติราที่ปนเปื้อนมาจะถูกทำลายได้ในช่วงของการอบให้สุก ดังนั้นผลิตภัณฑ์ขนมอบที่เกิดราขึ้นจึงเกิดจากการปนเปื้อนภายหลังจากการอบให้สุกแล้ว เช่น การปนเปื้อนของสปอร์ราในอากาศ จากมีดหั่นขนมปัง การหั่นขนมปังทำให้มีอากาศแทรกเข้าไปในขนมปังมากขึ้น การห่อขนมในขณะที่ยังอุ่นอยู่ และการเก็บขนมไว้ในที่มีอากาศอบอุ่นและมีความชื้นสูง เป็นต้น การขึ้นราของขนมปังจะเกิดจากผิวด้านนอกหรือจากรอยหั่นระหว่างแผ่น ตัวอย่างเช่น การเสื่อมเสียของขนมปังจากรา ราที่พบมีหลายชนิดเรียกรวมว่า ราขนมปัง ราเหล่านี้มีเส้นใยสีขาวและสปอร์สีดำ เขียว ชมพู หรือม่วงน้ำตาล โดยราที่เกี่ยวข้องคือ *Rizopus nigricacs* ซึ่งมีไมซีเลียมเป็นปุยฝ้ายสีขาวและมีสปอร์สีดำ, *Penicillium expansum* หรือ *Penicillium stoloniferm* จะสร้างสปอร์สีเขียว, *Aspergillus niger* จะสร้างสปอร์สีเขียว สีออกม่วงหรือน้ำตาลจนถึงดำ และเมื่อมีการสร้างสีขึ้นแล้ว สีจะซึมเข้าไปในขนมปัง ทำให้ขนมปังมีสีเหลือง และ *Monilia* (Neurospora) *sitophila* จะให้โคนิเดียสี

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ชมพู โดยทั่วไปขนมปังจะมีค่า water activity (a_w) ต่ำ (0.75 - 0.90) และมีค่า pH ประมาณ 5.5 - 6 ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของราส่วนใหญ่และแบคทีเรียบางชนิด ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 ลักษณะการเจริญของรา

ที่มา: ณัฐดนัย หาญการสุจริต (2559)

ราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์หรือสัตว์ที่บริโภคได้ ทั้งยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสื่อมคุณภาพของอาหารและวัตถุดิบอีกด้วย (อนงค์ บิณฑวิหค, 2546) นอกจากนี้ยังพบว่าการปนเปื้อนของรายังเป็นปัญหากับการเก็บรักษาพืชสมุนไพรเพื่อบำรุงสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรคกันมากขึ้น ซึ่งในการนำมาใช้ในรูปสดไม่มีปัญหา และในช่วงระหว่างการเก็บรักษาทำให้มีการปนเปื้อนของรา และหากสภาวะแวดล้อมเหมาะสมก็จะมีการสร้างสารพิษขึ้น ซึ่งอาจทำให้การรักษาโรคด้วยสมุนไพรให้ผลที่ไม่แน่นอน (อัจฉรา พัฒนเดช, 2543) ราที่ได้รับความสนใจที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารที่พบบ่อยๆคือ *Penicillium spp., Fusarium spp.* และ *Aspergillus spp.* ที่พบในเมล็ดธัญพืชและสมุนไพรอบแห้ง (อัมรา ชินภูติ และประวัติ ตันบุญเอก, 2543; อัจฉรา พัฒนเดช , 2543; Pit and Hocking, 1999)

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสภาวะอากาศและสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของรา อาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดโดยเฉพาะ เมล็ดธัญพืช ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ปลายข้าว ถั่วลิสง กากถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย มะพร้าวตากแห้ง ปลาป่น กระดูกป่น นม ไข่ เนยแข็ง น้ำผลไม้ เป็นต้น จึงมีการปนเปื้อนจากราสายพันธุ์ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus*

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

parasitticus (Kurtzman *et al.,* 1987) และมักพบปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบทางการเกษตรที่ใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์และเป็นสาเหตุทำให้วัตถุดิบเสื่อมคุณภาพทางโภชนาการและก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้

2.3.1 ราในอาหาร (Food Fungi)

รา (Mold หรือ Fungi) จัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่ง พบมากกว่า 200,000 สายพันธุ์ทั่วโลก ทั้งในรูปของเส้นใยเจริญในอินทรียวัตถุ และ ปนเปื้อนในบรรยากาศในรูปของสปอร์ ราส่วนใหญ่มีวงจรชีวิตแบบอิสระเป็นตัวย่อยสลายซากพืชที่ตายแล้ว และอาจรวมไปถึงซากสัตว์ด้วย อย่างไรก็ตามมีราจำนวนน้อยไม่กี่สกุลที่ก่ออันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ สำหรับราที่เกี่ยวข้องกับอาหารนั้นโดยทั่วไปจะสนใจรากลุ่มที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและความปลอดภัยต่อผู้บริโภคโดยตรงซึ่งมักจะพบปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ราที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (Food spoilage mold)

ราทุกชนิดสามารถทำให้อาหารเสื่อมเสียได้ เนื่องจากแหล่งอาหารหลักของราคือสารที่มีโครงสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรต แต่ก็มีราหลายชนิดที่ใช้โปรตีนและไขมันเป็นแหล่งอาหารได้เพราะสามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดโดยเฉพาะ amylase, protease และ lipase จึงทำให้อาหารและวัตถุดิบอาหารที่มีราเจริญมีคุณภาพที่ลดลง (Charlie and Watkinson,1994)

ราที่สร้างสารพิษ (Toxin producing mold)

ราทุกชนิดจะสร้างสารเมตาบอไลท์จากกระบวนการเมตตาบอลิซึม และ สารที่ราผลิตออกมานั้นบางครั้งอาจมีพิษต่อมนุษย์และสัตว์ด้วย ราแต่ละชนิดสามารถสร้างพิษได้แตกต่างกัน และยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆด้วยเช่น สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และความชื้น ปัจจุบันพบว่า สารพิษที่สำคัญมาจากราเพียง 5 สกุล เท่านั้น คือ *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Chaetonium* และ *Claviceps* (เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2540)

2.3.2 รา *Aspergillus*

อนุกรมวิธานของ *Aspergillus* sp.

Domain: Eukarya

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Aspergillus*

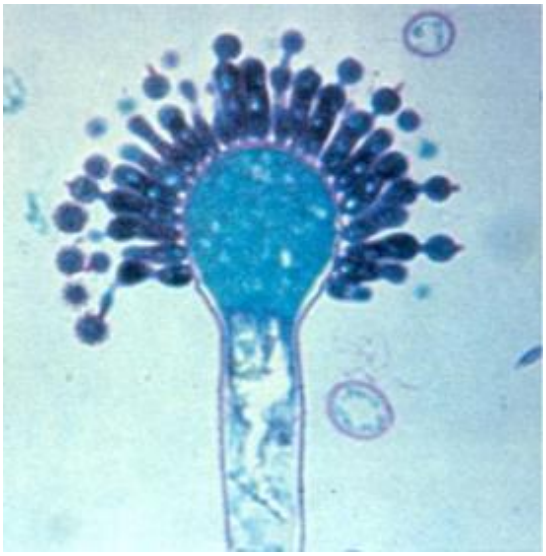
DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Aspergillus เป็นสกุลของรามีสมาชิกประมาณ 200-300 ชนิดในธรรมชาติ พบครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2272 โดย Pier Antonio Micheli ชาวอิตาลีที่ดูราด้วยกล้องจุลทรรศน์ Micheli เห็นว่ารูปร่างของราเหมือนน้ำพุจึงตั้งชื่อตามรูปร่างนั้น ในปัจจุบัน "aspergillum" เป็นชื่อของราที่ผลิตสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ ในขณะที่ 1 ใน 3 ของ สปีชีส์ทั้งหมดมีระยะที่มีเพศ *Aspergillus* เป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการออกซิเจนสูงมาก พบในบริเวณที่มีออกซิเจนมากเกือบทั้งหมดโดยทั่วไปเจริญเป็นเส้นใยราบนผิวของอาหารที่มีคาร์บอนมากเช่น กลูโคส อะไมโลส *Aspergillus* พบปนเปื้อนในอาหารที่มีแป้ง เช่นขนมปังและมันฝรั่ง และเจริญบนต้นไม้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

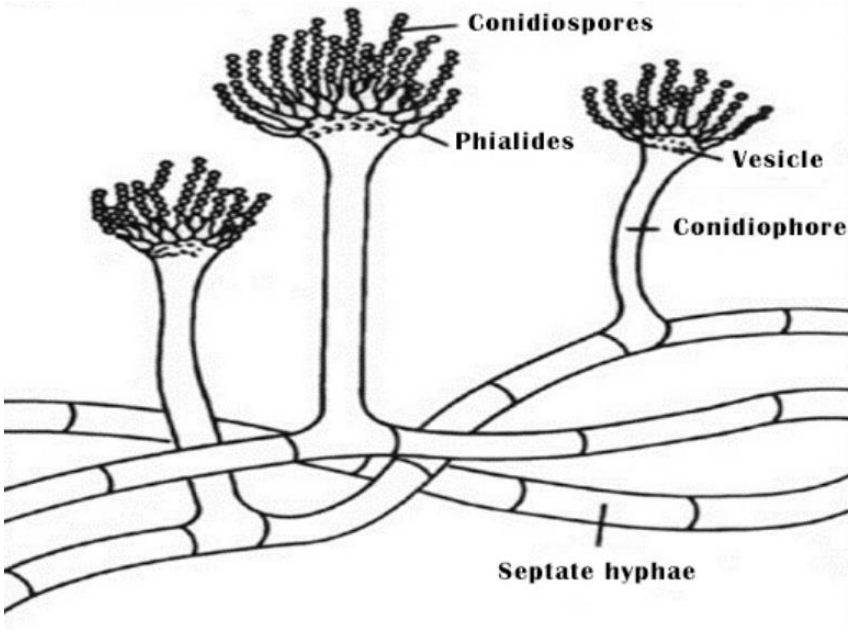
Aspergillus เป็นราที่พบได้ทั้งในรูปของการสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphic) และแบบอาศัยเพศ (teleomorphic) และเป็นราที่พบได้ทั่วไป จัดเป็นราจำพวก mitosporie fungi และ perfect stage อยู่ในไฟลัม Ascomycota เป็นราชนิดที่เป็นเส้นใยแตกแขนง (Filamentous fungi) มีผนังกั้น (Septate hypha) ไม่มีสีหรือสีน้ำตาลอ่อนหรือสีอื่นตามบริเวณที่ขึ้น โคโลนี มีสีต่างกัน มีก้านชู(Conidiophore) งอกจากเส้นใย ตำแหน่งที่ก้านชูงอกจากเส้นใยและมีขอบเขตก้านชูสปอร์นี้อาจมีผนังกั้นหรือไม่มีก็ได้ ก้านชูสปอร์ (conidiophore) ที่เกิดจากฟูตเซลล์ (foot cell) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเส้นใยและมีขอบเขตที่ชัดเจน ปลายของก้านชูพองออกเป็นเวสิเคิล(Vesicle) และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นสเตอริกมา (sterigma) อวัยวะสร้างสปอร์ (phialide) ซึ่งอาจมีชั้นเดียว(Uniseriate) หรือสองชั้น (Biseraite)ก็ได้ อวัยวะสร้างสปอร์เป็นที่เกิดของโคนิเดีย (conidia) ถูกสร้างขึ้นภายในสเตอริกมา โคนิเดียที่สร้างขึ้นภายหลังจะดันโคนิเดียอันแรกๆ ออกมาและยังติดต่อกันอยู่จึงเกิดเป็นสายของโคนิเดีย ซึ่งมีเซลล์เดียวมักมีรูปร่างกลม โคนิเดียอ่อนจะอยู่ที่ปลายอวัยวะสร้างสปอร์เมื่อโคนิเดียมอ่อนเกิดจะดันโคนิเดียมแก่ออกไปจึงปรากฏโคนิเดียมเป็นสาย (Basipetal chain) ผิวของโคนิเดียอาจเรียบหรือขรุขระคล้ายหนาม ซึ่งสามารถนำมาใช้แยกสายพันธุ์รา *Aspergillus* เช่น โดยอาศัยลักษณะโคโลนี รูปของเวสิเคิลที่กลมหรือรูปโดมมีอวัยวะสร้างสปอร์ชั้นเดียวหรือสองชั้น โคนิเดียมผิวเรียบหรือขรุขระเป็นต้น(Raper and Funnell, 1987) ดัง ภาพที่ 2.4 และ ภาพที่ 2.5

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์



ภาพที่ 2.4 ลักษณะการสร้าง conidia ที่เกิดบนก้าน sterigma ของรา *Aspergillus* sp.

ที่มา: http://ww5.stlouisco.com/doh/pollen_site/MoldInfo.html



ภาพที่ 2.5 แบบจำลองทางสัณฐานวิทยาของรา *Aspergillus flavus*

ที่มา: https://www.cartage.org.lb/en/themes/LifeScience/GeneralBiology/Microbiology/Fungi/Classification.html

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Aspergillus niger (*A. niger*) จะสร้างสปอร์สีดำ แพร่กระจายในอากาศได้ดี ร่างกายได้รับเชื้อโดย การหายใจเอาสปอร์เข้าไป แต่บางคนเกิดการติดเชื้อราในหู โดยทั่วไปความต้านทานของร่างกายสามารถที่จะกำจัดเชื้อออกจากร่างกาย หากไม่สามารถกำจัดเชื้อนี้ออกจากร่างกายจะทำให้เกิดการติดเชื้อเกี่ยวกับโรคผิวหนังได้ (สมจิตร อยู่เป็นสุข, 2552) *Aspergillus* บางชนิดก่อให้เกิดโรคที่เป็นปัญหาในคนและสัตว์ ที่เป็นที่รู้จักดีคือ *Aspergillus fumigatus* และ *Aspergillus flavus* ผลิตอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และคงทนในอาหารเช่นถั่ว เชื้อที่ก่อโรคภูมิแพ้ เช่น *Aspergillus fumigatus* สปีชีส์ที่เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญทางการเกษตรเช่น *Aspergillus* sp. ก่อโรคในธัญพืช โดยเฉพาะข้าวโพด และสร้าง mycotoxin รวมทั้งอฟลาทอกซิน *Aspergillus* ซึ่งเป็นราที่พบได้ทั่วไป เช่น ในดิน เศษซากพืช เมล็ดพันธุ์และสามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วโลก (Rippon, 1982)

2.3.3 ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวกับการเจริญของรา *Aspergillus* (พรรณกร อิ่มวิทยา, 2540) ได้แก่

ความชื้น (Moisture) ความชื้นในอากาศถือเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของรา โดยความชื้นที่เหมาะสมจะแปรผันไปตามประเภทของอาหารที่รานั้นขึ้นอยู่ ซึ่ง *Aspergillus* แต่ละชนิดเจริญได้ในความชื้นสัมพัทธ์ที่แตกต่างกัน เช่น *Aspergillus flavus, Aspergillus niger* และ *Aspergillus candidus* ต้องการความชื้นสัมพัทธ์ 80-90 % *Aspergillus glaucus* และ *Aspergillus candidus* จะเริ่มเติบโตที่ความชื้นสัมพัทธ์ 70-75 % ส่วน *Aspergillus echinulatus* และ *Aspergillus restrictus* จะเริ่มเติบโตที่สัมพัทธ์ 65 % เป็นต้น

อุณหภูมิ รา *Aspergillus* แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่ *Aspergillus glaucus* อยู่ระหว่าง 10-12 °C อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อสามารถดำรงอยู่ได้คือ 8 °C *Aspergillus flavus* อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ คือ 6-8 °C ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 36-38 °C เป็นต้น

สารอาหาร โดยทั่วไปราสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเกือบทุกชนิด ไม่ว่าอาหารสดหรืออาหารแห้งตลอดจนอาหารแปรรูปและอาหารสัตว์หลายชนิด สารอาหารที่ราต้องการในการเจริญได้แก่ คาร์โบไฮเดรท โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุบางชนิด

ค่าความเป็นกรดด่าง ในสภาวะกรด ช่วง pH 4-6 จะเป็นสภาวะที่เหมะสมกับการเจริญมากที่สุด

ส่วนประกอบของบรรยากาศ ส่วนประกอบโดยเฉพาะออกซิเจนในอากาศมีผลต่อการเจริญของรา *Aspergillus* และจุลินทรีย์อื่นๆ ระบบสุญญากาศจึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการเก็บรักษาเมล็ดพืช อาหารสัตว์ เมล็ดพืชที่มีความชื้นสูง และการถนอมอาหาร

ราเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีพ การบรรจุในสภาพที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณสูงรวมทั้ง สภาพสุญญากาศจะช่วยยับยั้งการเจริญของราได้เป็นอย่างดี ทำ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ให้อายุการเก็บรักษานานขึ้น อย่างไรก็ดี ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน จึงยังพบการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ในภายหลัง ซึ่งจะเกิดขึ้นช้ากว่าการเจริญและเสื่อมเสียจากรา (ณัฐดนัย หาญการสุจริต, 2559)

การป้องกันขนมปังจากสปอร์ของราทำได้โดย

1. ป้องกันขนมปังจากสปอร์ของรา เช่น การลดปริมาณสปอร์ของราในบริเวณที่ผลิตและเก็บรักษาโดยไม่นำขนมปังที่ขึ้นราแล้วเก็บปะปนกับขนมปังที่ผลิตรุ่นใหม่ หมั่นทำความสะอาดผนังห้องผลิต ป้องกันไม่ให้ฝุ่นละอองของแป้งที่ใช้เป็นวัตถุดิบซึ่งอาจจะมีสปอร์ของราเข้าไปในบริเวณที่วางหรือเก็บขนมปัง โดยใช้เครื่องกรองอากาศ

2. หลังนำก้อนขนมปังออกจากเตาอบควรทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วก่อนที่จะทำการบรรจุซองหรือหีบห่อ เพื่อป้องกันการกลั่นตัวของไอน้ำในภาชนะบรรจุ ซึ่งจะทำให้ขนมปังขึ้นราได้ง่าย

3. ใช้แสงอัลตราไวโอเล็ตฆ่าเชื้อบริเวณผิวของขนมปังและเครื่องหั่น

4. เก็บรักษาขนมปังในตู้เย็นหรือแช่เยือกแข็งเพื่อลดหรือหยุดยั้งการเจริญของรา

5. เติมสารเคมีลงในแป้งหมัก เพื่อยับยั้งการเจริญของรา เช่น โซเดียมโพรพิโอเนต ร้อยละ 0.1 หรือแคลเซียม โพรพิโอเนต ร้อยละ 0.3 ของน้ำหนักแป้ง

นอกจากราแล้วยังมีจุลินทรีย์อื่นๆที่อาจจะเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของขนมปังได้ โดยทั่วไปพบในขนมปังและผลิตภัณฑ์ขนมอบอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการอบนั้นไม่สามารถทำลายสปอร์ของแบคทีเรียได้ ในขนมปังจะเกิดเป็นยางเหนียวเนื่องจาก สปอร์จะงอกและเจริญในขนมปังเมื่อมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การเกิดสภาพยางเหนียวนี้เนื่องจากการสร้างแคปซูลของแบคทีเรียร่วมกับการสลายตัวของโปรตีน (Gluten) ในแป้ง โดยการกระทำของเอ็นไซม์โปรติเนสของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังเกิดการสลายตัวของแป้ง (Starch) โดยเอ็นไซม์อะไมเลส ได้น้ำตาลออกมา บริเวณที่เป็นยางเหนียวจะมีสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล เมื่อจับดูจะเหนียวหนืด บางครั้งสามารถดึงให้ยืดเป็นเส้นสายได้และมีกลิ่นเหม็น นอกจากนี้การเกิดยางเหนียวยังเกิดได้ในเค้กและโดนัทต่างๆ ด้วย เช่น แบคทีเรียชนิด *Serratia marcescens* ที่เจริญในขนมปังจะสร้างสารสีแดง และ แบคทีเรียชนิด *Bacillus subtilis* หรือ *Bacillus licheniformis* ทำให้ขนมปังมีลักษณะเป็นยางยืดเมื่อหั่นเป็นชิ้นบางหรือดึงออกจากกัน

2.3.4 อันตรายที่อาจเกิดจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่เป็นอาหารที่มีส่วนประกอบหลายชนิด ที่ทำจากทั้งพืชและสัตว์ อาหารเหล่านี้เป็นแหล่งปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร โรคอาหารเป็นพิษ กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เบเกอรี่มักต้องมีการสัมผัสโดยตรง ผู้ประกอบอาหารและ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

เครื่องมืออุปกรณ์หลายชนิด ทั้งก่อนและหลังการอบแล้ว อาการของโรคและวิธีการควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่พบได้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เช่น

Salmonellosis เป็นอาการของโรคติดเชื้อที่เกิดจากปฏิกิริยาของ *Salmonella* กับลำไส้ของผู้ป่วย *Salmonella* บางชนิดสามารถสร้างสารพิษได้ด้วย อาการที่เกิดขึ้นหลังบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อดังกล่าว อาจเกิดขึ้นภายใน 1ชั่วโมง ถึง 8 วัน ซึ่งได้แก่คือ ท้องร่วง ปวดท้อง เป็นไข้ คลื่นไส้ วิงเวียน อาเจียน หนาวสั่น ปวดศีรษะร่วมด้วย ความรุนแรงของอาการขึ้นกับจำนวนจุลินทรีย์ที่ร่างกายได้รับ ชนิดของเชื้อและความต้านทานของผู้บริโภค การควบคุม *Salmonella* ในอาหารทำได้โดยการใช้วัตถุดิบที่ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อดังกล่าว อาการป่วยเนื่องด้วยการปนเปื้อนของ *Clostridium perfringens* คือ ท้องร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ปวดหัวร่วมด้วย อาการจะเกิดขึ้นในช่วง 2-29 ชั่วโมง แบคทีเรียนี้สร้างสปอร์ที่ทนความร้อน เจริญได้ดีในที่เกือบไม่มีอากาศและในช่วงอุณหภูมิ 20-50 °C ค่า water activity (a_w) ต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 0.93 อาหารเป็นพิษที่เกิดจากสารพิษจากแบคทีเรียชนิด *Staphylococcus aureus* ซึ่งสร้างขึ้นในอาหารโดยเฉพาะอาหารที่ปนเปื้อนและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน สารพิษนี้ทนต่อความร้อนได้ดี ไม่ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนในกรรมวิธีการผลิตอาหาร มีโอกาสเกิดสารพิษนี้สูงในประเทศร้อนและสุขาภิบาลอาหารไม่ดีพอ เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เกือบไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C หรือสูงกว่า 46 °C ส่วนอุณหภูมิที่จะสร้างสารพิษได้ 10-45 °C ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงอุณหภูมิดังกล่าว (Banwart, 1989)

โรคทางเดินอาหารและโรคอาหารเป็นพิษ ยังคงเป็นปัญหาต่อสุขภาพกันอย่างมาก ในสหรัฐอเมริกาได้ประมาณไว้ว่าในแต่ละปีจะมีผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษ 9.4 ล้านคน ที่เกิดจากพิษของจุลินทรีย์ก่อโรคประมาณ 31 สปีชีส์ (Scallen *et al*., 2011) การควบคุมโรคอาหารเป็นพิษ ต่างใช้หลายๆวิธีการของการถนอมอาหารทั้งการผลิตและการเก็บรักษา นอกจากแนวโน้มของผู้บริโภคสำหรับอาหารที่ต้องการปริมาณเกลือและน้ำตาลต่ำ ยังมีความต้องการสารกันเสียที่คุณภาพที่ถูกนำมาใช้ในการยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหารโดยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Zink, 1997)

อย่างไรก็ตามความนิยมของผู้บริโภคที่เริ่มหันมาสนใจ ค้นหาสารตัวเลือกใหม่ที่ได้จากธรรมชาติในการแก้ไขปัญหานี้แม้ว่าจะต้องมีการปรับเปลี่ยนรสชาติ ดังนั้นน้ำมันหอมระเหยจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการแทนที่สารสังเคราะห์เหล่านั้น

2.4 วัตถุเจือปนหรือสารธรรมชาติที่ใช้ในการถนอมอาหาร

ปัญหาสำคัญของการเสื่อมเสียของขนมปัง เกิดขึ้นได้หลายปัจจัย เช่น การพักขนมปังทิ้งไว้ให้เย็น การสไลด์ขนมปัง การบรรจุและการเก็บรักษา นอกจากจากนี้ยังมาจากสุขลักษณะของสถานที่ที่ใช้ในการผลิตไม่ดีพอ ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่ผู้ผลิตมักเลือกใช้เพื่อยืดอายุให้กับขนมปัง คือ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

การเติมวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) หรือสารกันเสีย (food preservative) ลงในขนมปังอันจะทำให้ลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหาร ส่งผลให้อาหารมีสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้อาหารมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น

วัตถุเจือปนอาหาร หมายถึง สารหรือส่วนประกอบของสารที่ตามปกติไม่ใช้เป็นอาหารหรือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารไม่ว่าสารนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนในอาหารเพื่อประโยชน์ในการผลิต แปรรูป การเก็บรักษา การบรรจุหรือการขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพ หรือมาตรฐานหรือลักษณะของอาหาร สารกันเสีย หรือสารกันบูด เป็นสารเคมีที่ใช้ใส่ในอาหารเพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์ (บุษกร อุตรภิชาติ, 2558) สารที่ใส่ในการถนอมอาหาร แบ่งเป็น 2 กลุ่มตามวัตถุประสงค์ ได้แก่

2.4.1 สารที่ใส่ไปเพื่อป้องกันการเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์ หรือเรียกว่า สารกันเสีย (preservatives) สารเหล่านี้มีผลต่อจุลินทรีย์ คือ รบกวนการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งอาจทำลายหรือเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมของจุลินทรีย์ สารในกลุ่มนี้ ได้แก่ กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เกลือแกง น้ำตาล เกลือไนไตรท์ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และสารปฏิชีวนะต่างๆ

2.4.2 สารที่ใส่ไปเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ได้แก่ สารป้องกันการหืน (antioxidants) ได้แก่ บิวทีเลเตทไฮดรอกซีแอนนิโซล (betylated hydroxyanisole: BHA) และบิวทีเลเตทไฮดรอกซีโทลูอีน (betylated hydroxytoluene: BHT) หรือสารป้องกันการเกิดสีน้ำตาล (antibrowning) ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และเกลือซัลไฟท์ เป็นต้น

นอกจากนี้ระหว่างกระบวนการผลิตอาหาร รวมทั้งในระหว่างการบรรจุหีบห่อ อาจจะพบสารเคมีอื่นๆซึ่งอาจเป็นพิษต่อจุลินทรีย์และผู้บริโภคได้ เช่น ยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าแมลง น้ำยาล้างจาน หรือน้ำยาล้างเครื่องมือต่างๆ ที่อาจตกค้างในอาหาร เป็นต้น

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์โดยสารกันเสีย

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายหรือยับยั้งการเจริญเติบโตและการทำงานของจุลินทรีย์ของสารกันเสีย ได้แก่ ชนิดของสารกันเสีย ระยะเวลาที่สารสัมผัสกับจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของสาร ชนิด อายุ จำนวนของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความชื้น pH อุณหภูมิ ชนิดและปริมาณของตัวถูกละลาย เป็นต้น โดยสารกันเสียที่มีความเข้มข้นสูงจะทำลายแบคทีเรีย แต่เมื่อมีความเข้มข้นต่ำจะส่งผลยับยั้งการเจริญหรืออาจไม่มีผลใดๆ ต่อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียที่สร้างสปอร์มีความทนทานต่อการถูกทำลายมากที่สุด สปอร์ของราทนทานต่อการถูกยับยั้งโดยสารกันเสียมากกว่าเซลล์ปกติ โดยราถูกทำลายได้ง่ายกว่ายีสต์ และเมื่อเชื้อมีปริมาณมากขึ้น ปริมาณสารที่ใช้ในการทำลายเซลล์

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

จะต้องมากขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่กำลังอยู่ในช่วงการเติบโตจะถูกทำลายได้ง่ายกว่าจุลินทรีย์ที่มีอายุมากเพราะจุลินทรีย์ที่มีอายุมากจะทนทานต่อสารกันเสียเพิ่มขึ้นด้วย

2.6 ชนิดของสารที่ใช้ในการถนอมอาหาร

สารที่ใช้ในการถนอมอาหารมีหลายชนิด บางชนิดเป็นสารธรรมชาติ ที่ช่วยป้องกันการเน่าเสียจากแบคทีเรียและรา เช่น เกลือแกง ซึ่งใช้ป้องกันการเน่าเสียของเนื้อสัตว์และปลา หรือน้ำตาลที่ใช้ในการทำแยมและเยลลี นอกจากนี้ยังมีสารกันเสียชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการถนอมอาหาร ได้แก่

2.6.1 กรดเบนโซอิก (benzoic acid) เป็นสารกันบูด หรือที่เรียกทางวิชาการว่า วัตถุกันเสีย เป็นสารเคมีที่ผู้ผลิตอาหารใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร โดยป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ ถูกนำมาใช้เพื่อการเก็บรักษาอาหารหลายชนิด เช่น ขนมหวานที่ทำจากนม (ไอศกรีม โยเกิร์ต ปรุงแต่ง/ผสมผลไม้) ขนมที่ทำจากผลไม้ ผัก ถั่ว แยม เยลลี่ ผักผลไม้กวน-ดอง-ทำไส้ขนม เป็นต้น อย่างไรก็ตามการใช้กรดเบนโซอิกในปริมาณมากเกินไปอาจส่งผลเสียต่อสุขภาพร่างกายได้ ดังรายงานของอุไรวรรณ เต็มแก้ว (มปป.) ที่รายงานถึงการใช้กรดเบนโซอิกเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เยลลี่ พบว่าการได้รับกรดเบนโซอิกในปริมาณสูงอาจเกิดอันตรายต่อระบบทางเดินอาหาร และยังอาจก่อให้เกิดภาวะ pseudo allergy อีกทั้งอาจเกิดอาการแพ้ในกลุ่มคนที่มีความไวต่อการได้รับสารชนิดนี้ด้วย นอกจากนี้กรดและเกลือโซเดียม หรือเกลือโพแทสเซียมของกรดเบนโซอิก ยังเป็นสารกันเสียที่ใช้สำหรับอาหารด้วย เนื่องจากโซเดียมเบนโซเอตเป็นสารที่ละลายได้ง่ายกว่ากรดเบนโซอิก และเพื่อต้องการลดปริมาณโซเดียมในอาหาร จึงนิยมใช้เกลือโพแทสเซียมแทน กรดและเกลือโซเดียมหรือเกลือโพแทสเซียมของกรดเบนโซอิกนี้จัดเป็นสารที่ปลอดภัย Generally recognized as safe (GRAS) ที่ FDA อนุญาตให้ใส่ในอาหาร ในระดับ 0.1 % (บุษกร อุตรภิชาติ, 2558) ดังรายงานของกิตติมา โสนะมิตร์และวันทนีย์ ขำเลิศ (2552) ที่ศึกษาปริมาณโซเดียมเบนโซเอต และสีอินทรีย์สังเคราะห์ในอาหาร พบว่า การใช้โซเดียมเบนโซเอตร่วมกับสีอินทรีย์สังเคราะห์ในอาหารหลายชนิด โดยพบมากกว่าร้อยละ 50 และพบมากที่สุดในกลุ่มผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูป

2.6.2 กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) เป็นวัตถุกันเสียทางชีวภาพ (biopreservatives) ชนิดหนึ่ง เป็นกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Propionibacterium* sp. ที่ละลายน้ำได้ เมื่ออยู่ในรูปองค์ประกอบของของเหลวในร่างกายมนุษย์จะอยู่ในรูปกรดอิสระหรืออยู่ในรูปเกลือ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียบางชนิด เกลือโพรพิโอเนตใช้ในการยับยั้งยีสต์ในสกุล *Candida* sp. และ *Zygosaccharomyces bailii* ที่เป็นสาเหตุให้ผลิตภัณฑ์ประเภทเนยแข็งและโยเกิร์ตเน่าเสีย (สุขใจ ชูจันทร์และพรวิสาข์ ยุ่นประยงค์, 2551) เกลือโพรพิโอเนตจัดเป็นสาร GRAS ที่ใส่ในอาหารเพื่อให้เกิดผลผลิตที่ดี (GMP) โดยใช้ในขนมปัง และขนมอบ ในปริมาณ 0.32 % ของน้ำหนักแป้ง โดยใส่ใน

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ขนมปังโฮลวีท (whole wheat) ในปริมาณไม่เกิน 0.38 % และใช้ใส่ในเนยแข็งในปริมาณไม่เกิน 0.3 % งานวิจัยของ Al Azzam *et al.* (2010) ที่ทำการวิเคราะห์ปริมาณเกลือโพรพิโอเนตและกรดโพรพิโอนิกในผลิตภัณฑ์เบเกอร์รี่ในท้องตลาด จำนวน 112 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิควิธีแก๊สโครมาโทกราฟฟี พบว่าระดับของกรดโพรพิโอนิกที่มีเกลือโพรพิโอเนตในขนมปัง เค้ก โรลเค้ก เบอร์เกอร์ ฮอท ดอก และขนมปังพิตา (pita breads) เท่ากับ 197-1273, 98-1846, 546-1932 และ 479-1680 µg/ml ตามลำดับ โดยตรวจไม่พบเกลือโพรพิโอเนตขนมปังบิสกิตจำนวน 36 ตัวอย่าง

2.6.3 กรดซอร์บิก (sorbic acid) เป็นวัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในรูปของเกลือในผลิตภัณฑ์จากผัก ผลไม้ เนื้อสัตว์ รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากแป้งด้วย โดยกรดซอร์บิกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่แตกตัว หรือในอาหารที่มีค่าพีเอชใกล้เคียงกับค่า pKa กลไกยับยั้งจุลินทรีย์นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางสัณฐานวิทยา องค์ประกอบ และหน้าที่การทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของสารต่างๆ เปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งขัดขวางการดูดซึมธาตุอาหารเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ การแตกตัวของกรดภายในเซลล์ทำให้เอนไซม์ที่สำคัญต่อการอยู่รอดสูญเสียกิจกรรมไป (ปิยวรรณ บูรณะพิมพ์ และวริพัสย์ อารีกุล, 2555)

2.6.4 น้ำมันหอมระเหย (essential oil) เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น มักมีกลิ่นหอมและระเหยได้ง่าย เพื่อดึงดูดแมลงมาผสมเกสรหรือป้องกันตนเองจากศัตรูภายนอกที่จะมาทำลายพืชนั้นๆ เช่น แมลง จุลินทรีย์ที่ก่อโรค เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยสามารถสกัดจากส่วนต่างๆ ของพืชได้ เช่น ใบ ผล ดอก หัว เมล็ด ราก เนื้อไม้ของพืชที่ให้กลิ่น เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยเป็นสารประกอบที่มีส่วนผสมซับซ้อน ในน้ำมันหอมระเหยชนิดหนึ่งประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีจำนวนมาก ตั้งแต่ 50-500 ชนิด องค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็นสารประกอบจำพวกเทอร์พีนส์ (terpenes) และฟีนีลโพรพีน (phenylpropenes) น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติที่หลากหลาย เช่น คุณสมบัติในการยับยั้งไวรัส แบคทีเรีย รา และฆ่าแมลง (Krish, Tserennadmid and Váölgyi, 2011) ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำเอาน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชมาใช้ประโยชน์ในการเป็นวัตถุกันเสียตามธรรมชาติ

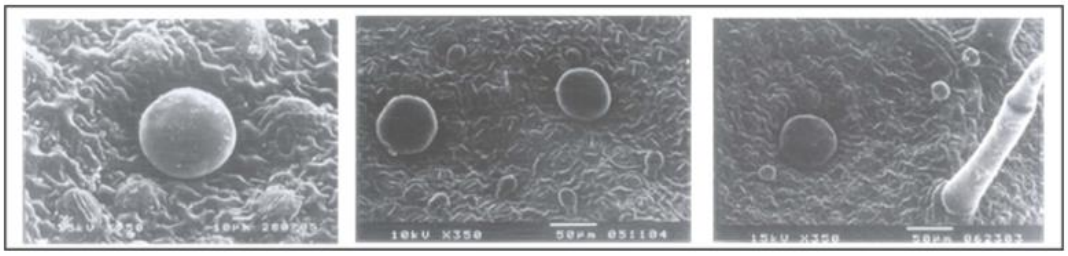
การถนอมอาหารเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยยืดเวลาการเจริญเติบโตและยับยั้งการสร้างสารพิษของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารและวัตถุดิบทางการเกษตร เช่นการเติมวัตถุเจือปนอาหารสังเคราะห์และการใช้สารเคมีบางชนิดซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของจุลินทรีย์ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอต สามารถลดปริมาณสารแอลฟาทอกซินได้เช่นกัน แต่สารเคมีเหล่านี้เมื่อใช้หรือได้รับในระยะเวลานานๆอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคและสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร จึงได้มีการศึกษาและหาแนวทางแก้ไขปัญหาจุลินทรีย์ก่อโรคและหลีกเลี่ยงวัตถุเจือปนสังเคราะห์มาใช้สารจากธรรมชาติแทน สารสกัดจากธรรมชาติจากพืชบางชนิด จึงได้ถูกนำมาใช้

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งด้านการปรุงแต่งกลิ่น รสชาติและสีของอาหาร ด้านยารักษาโรค เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางค์ น้ำหอม และเครื่องดื่ม ดังนั้นสารสกัดธรรมชาติจากพืชจึงเป็นทางอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษของรา

2.7 น้ำมันหอมระเหย (Essential Oils)

น้ำมันหอมระเหย (Essentail Oils) เป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น มักมีกลิ่นหอมและระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง พืชเหล่านี้จะมีต่อมหรือท่อที่สร้างและกักเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ ดังภาพที่ 2.6 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548)



A B C

ภาพที่ 2.6 ขยายขนต่อมน้ำมันของ

A. สะระแหน่ (Mentha cordifolia Opiz)

B. สะระแหน่ญี่ปุ่น (Mentha arvensis L. var piperascens Malinvaud)

C. งาขี้ม้อน (Perilla frutescens Britt.)

ที่มา: รศ. ดร. นิจศิริ เรืองรังษี (2550)

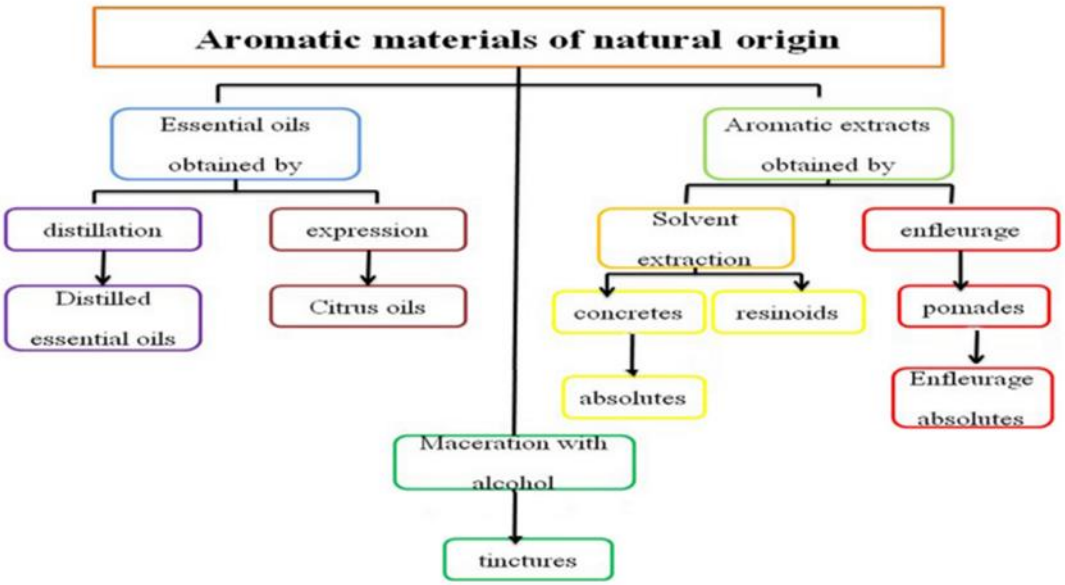
โดยสามารถพบได้ตามส่วนต่างๆ ของพืชหอม ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอกผล เมล็ด เป็นต้น โดยระดับของน้ำมันหอมระเหยที่พบในพืชแต่ละชนิดจะมีตั้งแต่ 0.01 % ถึง 10 % (Prats *et al*., 2005) ประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีกว่า 100 ชนิด นอกจากพืชหอมจะให้กลิ่นหอมแล้ว บางชนิดอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ด้วย เช่น ทำให้เกิดการระคายเคืองหรือเกิดอาการเป็นพิษ (Mcguinness, H., 2003)

2.7.1 วิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหย (Methods of Extraction) (Mcguinness, H., 2003, ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ, 2550, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชธรรมชาติมีหลายวิธีด้วยกัน โดยการเลือกวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจะต้องพิจารณาลักษณะและปัจจัยต่างๆร่วมด้วย เช่น ส่วนของพืชที่นำมาสกัด คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำมันหอมระเหยที่ต้องการ วัตถุประสงค์ของการนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ ฯลฯ

วิธีการแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืช และชื่อเรียกของสารสกัดต่างๆ ที่ได้ในแต่ละขั้นตอนสามารถสรุปได้ดังภาพที่ 2.7



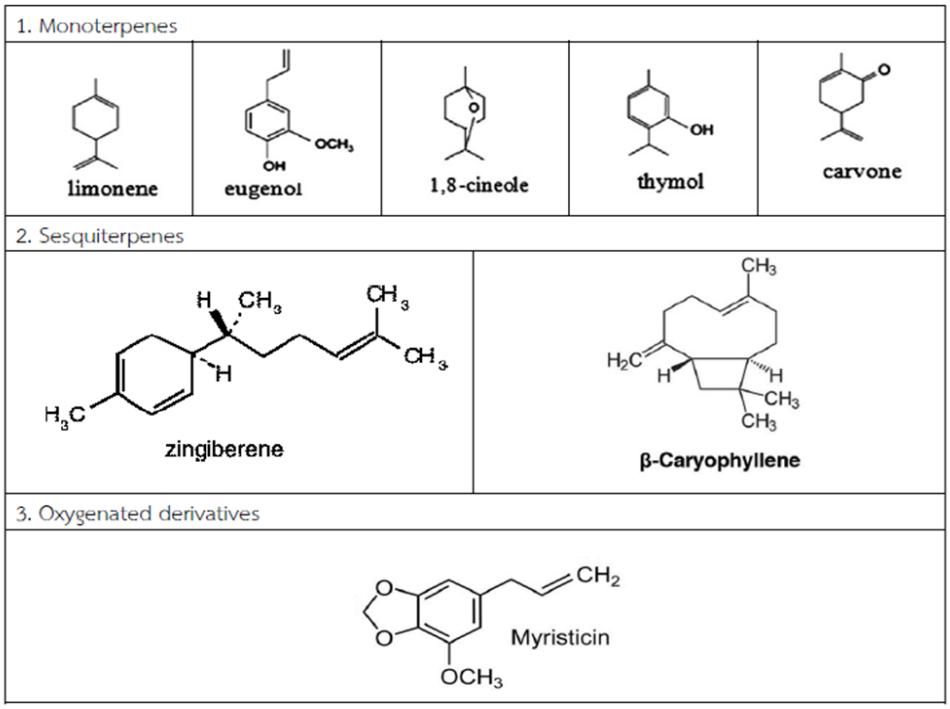
ภาพที่ 2.7 วิธีการแยกน้ำมันหอมระเหยจากพืช

ที่มา: ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ (2550)

น้ำมันหอมระเหยจะสกัดได้จากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ส่วนของดอก ส่วนของต้นและใบที่มีสีเขียว ส่วนของเปลือกไม้ ส่วนของเนื้อไม้ ส่วนของผลทั้งผล ส่วนของเมล็ด หรือเปลือกของเมล็ด หรือส่วนของราก เป็นต้น ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้รวมถึงความเข้มข้นและชนิดของสารที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหยจะขึ้นอยู่กับวิธีในการทำแห้งวัตถุดิบ และ/หรือวิธีที่ใช้ในการสกัด วิธีสกัดน้ำมันหอมระเหยที่นิยมใช้ ได้แก่ การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ (water and steam distillation) และการใช้แรงกลในการบีบสกัด หรือเรียกว่า การบีบอัดแบบเย็น (cold pressing) วิธีหลังจะนิยมใช้ในการสกัดน้ำมันจากผิวของผลจากพืชตระกูลส้ม Fathi และ Sefidkon (2012)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

รายงานผลงานวิจัยว่า วิธีการทำแห้งใบยูคาลิปตัส(eucalyptus) ที่เหมาะสมที่สุดที่จะทำให้สกัดได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยและสาร 1, 8 ซิเนออล (1, 8-cineole) คือ การทำแห้งโดยใช้ลมเป่า หรือการวางผึ่งในที่ร่ม (shade drying) โดยการทดลองเปรียบเทียบผลที่ได้กับวิธีการทำแห้งโดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์และการทำแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 30-50 °C และวิธีการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบยูคาลิปตัสที่เหมาะสมที่สุด คือ การกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ ในประเทศไทยมีการศึกษาวิจัยและผลิตผลิตภัณฑ์น้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรหลายชนิดเพื่อจำหน่ายทางการค้า โดยมูลนิธิโครงการหลวง (พนิดา รัตนปิติกรณ์, 2561) พืชที่มีกลิ่นหอม (aromatic plants) จะมีน้ำมันหอมระเหยซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของสารหอมระเหยหลายชนิดผสมกัน สารหอมระเหยต่างๆ เหล่านั้นจะอยู่ในกลุ่มของไฮโดรคาร์บอนเทอร์ปีน (hydrocarbon terpenes) เสสควิเทอร์ปีน (sesquiterpenes) พอลิเทอร์ปีน (polyterpenes) และ อนุพันธุ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (oxygenated derivatives) สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารเหล่านี้ บางส่วนแสดงในภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยที่สำคัญ

ที่มา: พนิดา รัตนปิติกรณ์ (2561)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ส่วนประกอบอื่นๆในน้ำมันหอมระเหยจะมี แอลกอฮอล์ กรดชนิดต่างๆ เอสเทอร์ (esters) อิพอกไซด์ (epoxides) อัลดีไฮด์ (aldehydes) คีโตน (ketones) เอมีน (amines) และซัลไฟด์ (sulfides) หน่วยย่อยของโครงสร้างทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย คือ ไอโซปีน (isoprene) มีสูตรโครงสร้างเป็น C_5H_8 สารโมโนเทอร์ปีน (monoterpene) มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{10}H_{16}$ซึ่งประกอบด้วยไอโซปีนจำนวน 2 หน่วย สารเสสควิเทอร์ปีนจะประกอบด้วยคาร์บอน 15 อะตอม (C15) ทำให้สารเสสควิเทอร์ปีนจะมีจุดเดือดสูงกว่าสารโมโนเทอร์ปีน โดยมีจุดเดือดสูงถึง 250 °C สารที่ให้กลิ่นหอมในกลุ่มของเทอร์ปีนมักจะเป็นสารพวกโมโนเทอร์ปีน และเสสควิ-เทอร์ปีน และสามารถเกิดเป็นอนุพันธุ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนได้ (oxygenated derivatives) สารโมโนเทอร์ปีนมีหลากหลายชนิด เช่น กลุ่มที่เป็น แอลกอฮอล์จะมีสารซิโทรเนลอล (citronellol) เจอรานิออล (geraniol) และเมนทอล (mentol) กลุ่มที่เป็นสารฟีนอล (phenols) จะมีสารไทมอล (thymol) และยูจีนอล (eugenol) กลุ่มที่เป็นสารออกไซด์จะมีสารซินีออล (cineole) เป็นต้น ทั้งนี้ความสามารถในการระเหยได้ของสารชนิดต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหยจะลดลงถ้าขนาดโมเลกุลของสารเพิ่มขึ้น ดังนั้นสารในกลุ่มเสสควิเทอร์ปีนจะระเหยได้น้อยกว่าสารใน กลุ่มโมโนเทอร์ปีน และสารที่อยู่ในกลุ่มอนุพันธ์ที่ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจะระเหยได้น้อยกว่าสารพวกไฮโดรคาร์บอน ด้วยเหตุผลนี้ ทำให้สารในกลุ่มเสสควิเทอร์ปีนและอนุพันธุ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ที่มีจุดเดือดสูงจึงมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมสารให้กลิ่นรสในอาหาร (food flavoring) ในระหว่างการเคี้ยวอาหารในปาก กลิ่นและรสชาติของอาหารจะผ่านการรับรู้ของร่างกายโดยใช้อวัยวะในการรับรู้ด้านกลิ่น (olfactory organ) เพื่อให้ได้กลิ่นรสที่ชัดเจน อาหารที่มีเครื่องเทศเป็นส่วนผสมมักจะต้องรับประทานขณะร้อนๆ เนื่องจากความร้อนจะทำให้ส่วนผสมของน้ำมันหอมระเหยในอาหารนั้นเกิดการระเหยได้มากขึ้น

ปริมาณสารประกอบในกลุ่มของกลุ่มเสสควิเทอร์ปีนและกลุ่มอนุพันธ์ที่ทำปฏิกิริยากับออกซิเจนใช้เป็นเกณฑ์ในการบ่งชี้คุณภาพของน้ำมันหอมระเหย เช่น การใช้ ปริมาณสารซิงจิเบอรีน (zingiberine) และสารอาร์-คูรูมีน (ar-cureumene) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเสสควิเทอร์ปีนเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากขิง เป็นต้น ส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยบางชนิดต้องถูกกำจัดออกจากน้ำมันหอมระเหย เช่น ลิโมนิน (limonene) เป็นสารโมโนเทอร์ปีนไฮโดรคาร์บอนที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชตระกูลส้ม เมื่อเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนจะเกิดกลิ่นเหม็นของการบูร นอกจากนี้ ถ้ามีในปริมาณมากสารไฮโดรคาร์บอนยังทำให้สารให้กลิ่นรสเจือจางลงและการกระจายตัวได้ในน้ำลดลง (พนิดา รัตนปิติกรณ์, 2561)

2.7.2 ข้อควรพิจารณาในการเลือกใช้น้ำมันหอมระเหย

2.7.2.1 กลิ่นของน้ำมันหอมระเหย

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

กลิ่นของน้ำมันหอมระเหยที่ต่างกันสะท้อนถึงองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกัน ซึ่งจับตัวรับและแปรสัญญาณไปยังสมองได้ต่างกัน พืชต้นเดียวกันจากส่วนที่ต่างกันจะให้น้ำมันหอมระเหยซึ่งมีกลิ่นต่างกันด้วย เช่น ต้นส้ม(Orange Tree) ถ้าสกัดจากดอกส้ม(Orange Blossom) จะได้น้ำมันหอมระเหยที่เรียกว่า Neroli oil ถ้าสกัดสกัดจากกิ่งอ่อน(twigs) ลำต้นหรือผลดิบ จะได้น้ำมันหอมระเหยที่เรียกว่า Petigrain ถ้าสกัดจากเปลือกผลจะได้ Orange oil เป็นต้น

2.7.2.2 สีและความหนืดของน้ำมันหอมระเหย

สีและความหนืดของน้ำมันหอมระเหยขึ้นกับอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยอาจเป็นของเหลวไม่มีสี เช่น Eucalyptus, Lavender, Rosemary

สีเหลืองอมเขียว เช่น Bergamot, geranium, Cypress, Melissa

สีเหลืองอมน้ำตาล เช่น Mandarin, Pathouli, Myrrh

สีน้ำเงิน เช่น Chammomile (German) yarrow เป็นต้น

บางชนิดอาจหนืดปานกลาง เช่น Chammomile, Jasmine, Ylang-ylang และ Cedarwood อาจจะหนืดมาก เช่น Sandalwood, Vetiver, Myrrh เป็นต้น

2.7.2.3 การเจือจาง

น้ำมันหอมระเหยราคาสูงหลายชนิดอาจมีการเจือจางด้วยน้ำมันพืชเพื่อลดต้นทุน เช่น Rose, Hyacinth, Carnation และ Tuberose อาจจะถูกเจือจางด้วย Jojoba oil เป็นต้น หรืออาจเติมน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่นที่มีกลิ่นคล้ายกันแต่ราคาถูกกว่าลงไปเพื่อทำให้ราคาถูกลง

2.7.2.4 คุณภาพ

คุณภาพของน้ำมันหอมระเหย ขึ้นกับหลายๆปัจจัย ได้แก่ พืชพันธุ์ที่นำมาสกัด การเพาะปลูก สภาพดินฟ้าอากาศ ฤดูเก็บเกี่ยว วิธีในการสกัด ในการเลือกซื้อน้ำมันหอมระเหยจำเป็นต้องทราบข้อมูลด้านคุณภาพและมาตรฐานของวัตถุดิบ

น้ำมันหอมระเหยจากพืชที่รับประทานได้ประมาณ 160 ชนิด ได้รับการพิจารณาว่ามีความปลอดภัยให้ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ โดยมีรายชื่อในบัญชีรายชื่อสารที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค หรือ Generally Recognized as Safe (GRAS) ของคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ที่มีการกำหนดไว้ใน Code of Federal Regulations Title 21 Volume 3: 21 CFR 182.20 (Revised as of April 1, 2017) สำหรับประเทศไทยพืชที่มีรายงานการสกัดน้ำมันหอมระเหยเพื่อนำมาใช้ ได้แก่ ตะไคร้หอม (citronella) เปปเปอร์มินท์ (peppermint) โรสแมรี่ (rosemary) ลาเวนเดอร์ (lavender) คาโมมายล์ (chamomile) ไทม์ (thyme) ขิง (ginger) จันทน์เทศ (nutmeg) กานพลู (clove) อบเชย (cinnamon) โป๊ยกั๊ก (star anise) เม็ดยี่หร่า (cumin seeds) ใบโหระพาฝรั่ง (sweet basil) ใบ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

สะระแหน่ (mint) ผิวมะกรูด (bergamot) และเปลือกของพืชตระกูลส้ม (citrus peels) (พนิดา รัตนปิติกรณ์, 2561) ชื่อทางพฤกษศาสตร์ของพืชเหล่านี้ แสดงใน ตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ชื่อพฤกษศาสตร์ของแหล่งน้ำมันหอมระเหยของพืชเพื่อนำมาใช้

Common name	**Botanical name of plant source**
Anise	*Pimpinella anisum* L.
Basil	*Ocimum basilicum* L.
Bergamot (bergamot orange)	*Citrus aurantium* L. subsp. *bergamia Wright et Arn*.
Chamomile flowers, Roman or English	*Anthemis nobilis* L.
Cinnamon bark, Chinese	*Cinnamomum cassia Blume*.
Citronella	*Cymbopogon nardus Rendle*.
Citrus peels	*Citrus* spp.
Clove	*Trifolium* spp.
Cumin	*Cuminum cyminum* L.
Ginger	*Zingiber officinale Rosc*.
Lavender	*Lavandula officinalis Chaix*.
Nutmeg	*Myristica fragrans Houtt*.
Peppermint	*Mentha piperita* L.
Rosemary	*Rosmarinus officinalis* L.
Thyme	*Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* var. *gracilis Boiss*.

ที่มา: พนิดา รัตนปิติกรณ์ (2561)

2.7.3 การใช้ประโยชน์ของน้ำมันหอมระเหย

มีการใช้น้ำมันหอมระเหยในประโยชน์หลายด้าน ได้แก่ เป็นสารให้ความหอม สารปรุงแต่งรสชาติ แต่งกลิ่นและเป็นยา ในปัจจุบันนิยมใช้ในสุคนธบำบัด นอกจากนี้ยังใช้น้ำมันหอมระเหยเป็นแหล่งของสารหลายชนิดที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะลินาลูล (Lilnalool) ซึ่งเป็นสารชนิดหนึ่งที่พบทั่วไปในน้ำมันหอม ถูกใช้เป็นสารสำคัญที่ใช้ในการผลิตวิตามินอี สารซิทรอล (Citral) ที่

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

เป็นองค์ประกอบสำคัญในน้ำมันหอมหลายชนิด มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตวิตามินเอ สำหรับในผลิตภัณฑ์อาหารนั้น น้ำมันหอมระเหยถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง เช่น ผลิตภัณฑ์ลูกอม เครื่องดื่ม นอกจากนั้นแล้วยังมีใช้ในรูปของสารปรุงแต่งกลิ่น (Kettenring and Geeganage, 2010) และมีรายงานอีกว่าน้ำมันหอมระเหยนั้นยังมีคุณสมบัติเป็น antibacterial, antifungal, antiviral, nematicidal, insecticidal และ antioxidant (Turek and Stinzing, 2013) ส่วนใหญ่มักจะนิยมนำไปใช้เป็น antioxidant และสารกันเสียในอาหารมากกว่า (Tiwari *et al.,* 2009) การทำน้ำมันหอมระเหยไปใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ควรทราบข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติต่างๆของน้ำมันหอมระเหย เช่น กลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมาย กลไกการการทำงาน ศักยภาพในการต้านจุลินทรีย์และผลขององค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารต่อคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ (Hyldgaard *et al.,* 2012)

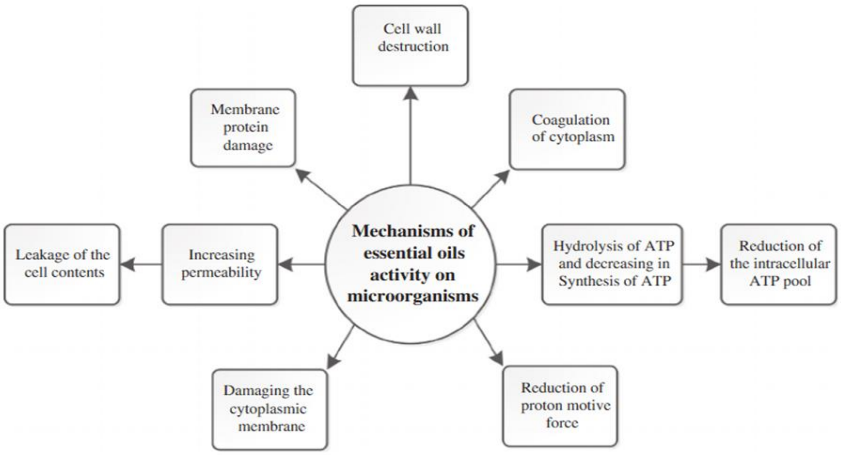
2.7.4 สมบัติในการเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยในผลิตภัณฑ์อาหาร

น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชหลายชนิดจะมีคุณสมบัติทั้งในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์และสมบัติในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนที่เป็นสาเหตุให้เกิดการหืน Goni และคณะ (2009) รายงานว่า เนื่องจากสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของส่วนประกอบในน้ำมันหอมระเหย ทำให้น้ำมันหอมระเหยสามารถแทรกตัวผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีนและไขมันเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้ และออกฤทธิ์ต้านการทำงานของกลไกต่างๆ ภายในเซลล์ และทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์ตายในที่สุด Calo และคณะ (2015) อธิบายกลไกในการต่อต้านแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยว่า เกิดเนื่องจากสมบัติในการไม่ชอบน้ำของน้ำมันหอมระเหยและส่วนประกอบ ทำให้น้ำมันหอมระเหยสามารถแทรกตัวเข้าไปคั่นในส่วนของไขมันที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์แบคทีเรียและไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ทำให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเกิดการซึมผ่านเข้าออกระหว่างสารภายนอกกับภายในเซลล์มากขึ้น และส่งให้เซลล์ตาย ทั้งนี้ น้ำมันหอมระเหยจะออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* เนื่องจากมีโครงสร้างของผนังเซลล์แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมลบจะมีโครงสร้างและส่วนประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (พนิดา รัตนปิติกรณ์, 2561) แบคทีเรียแกรมลบมีส่วนประกอบของไขมันในชั้นเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) มากกว่า และมีความหนาของผนังเซลล์บางกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ทำให้แบคทีเรียแกรมลบมีความทนทานต่อการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและส่วนประกอบได้มากกว่า

น้ำมันหอมระเหยออกฤทธิ์ด้วยหลายกลไก (Atares and Chiralt, 2016) กลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยและส่วนประกอบในการต่อต้านจุลินทรีย์ โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดความไม่คงตัวและเสียหาย ยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายโปรตีนที่เป็น

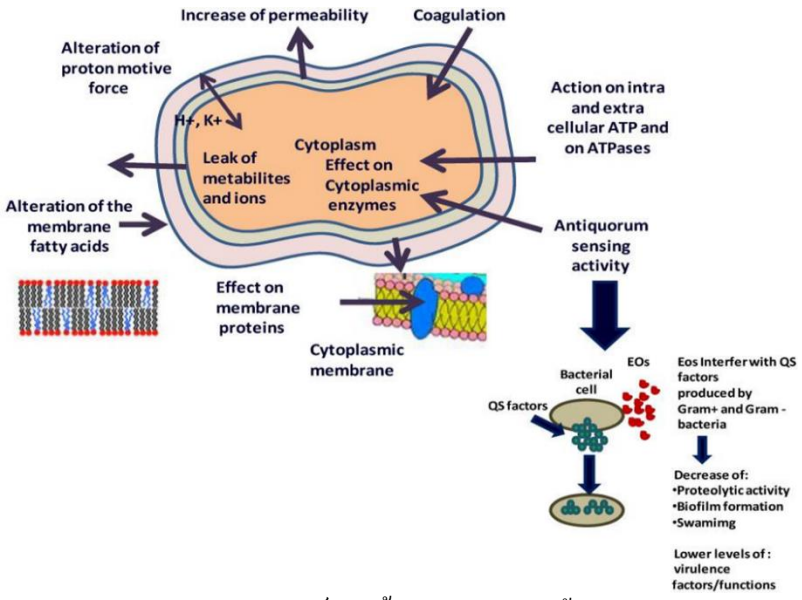
DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ ทำให้แรงในการเคลื่อนที่ของโปรตอนในเซลล์ลดลง และทำให้ส่วนประกอบของไซโทพลาซึมรวมถึงสารเมแทบอไลต์ไอออนเกิดการรั่วไหลออกนอกเซลล์ ซึ่งสาเหตุเหล่านี้ ทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและตายลงในที่สุด มีรายงานวิจัยว่า คุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจะขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำมันหอมระเหย วิธีในการสกัด วิธีในการทดสอบ และความเข้มข้นที่ใช้ เป็นต้น กลไกในการต้านฤทธิ์จุลินทรีย์ ดังภาพที่ 2.9 , 2.10 และ 2.11



ภาพที่ 2.9 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

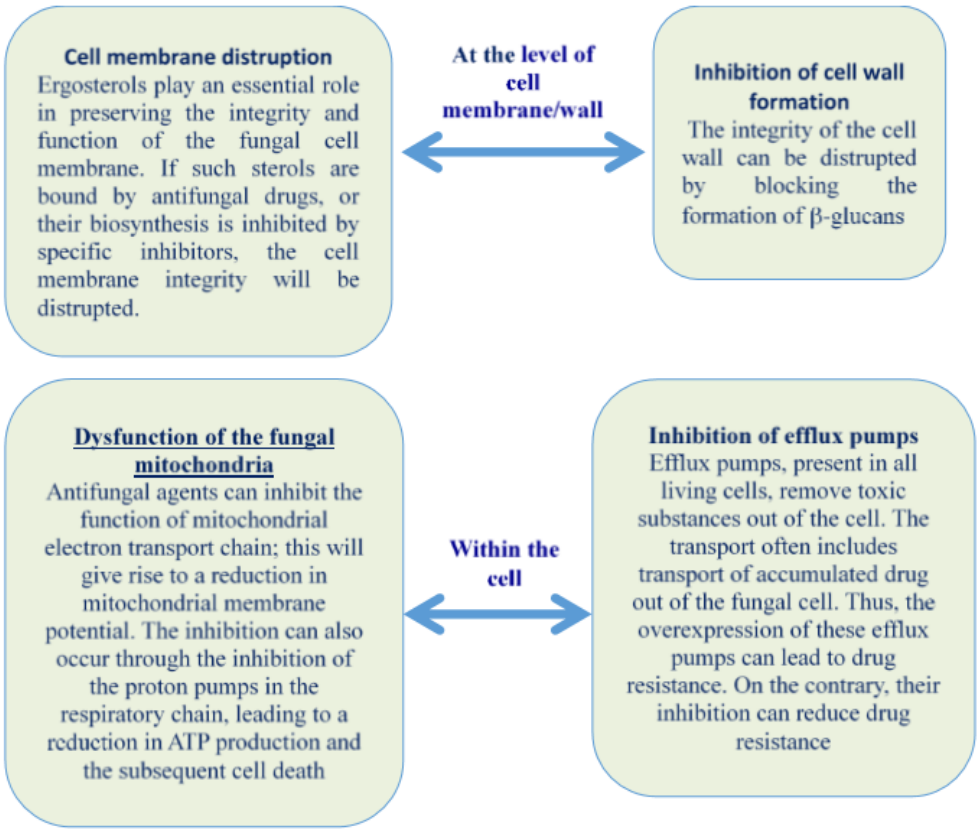
ที่มา: Atares and Chiralt (2016)



ภาพที่ 2.10 กลไกและตำแหน่งการออกฤทธิ์บนเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย

ที่มา: Pauli, A. (2001)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์



ภาพที่ 2.11 กลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งราของน้ำมันหอมระเหย

ที่มา: Macwan, SR.; Dabhi, K.D. and J.B. (2016)

2.7.5 ขีดจำกัดการใช้งานและเทคโนโลยีที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย

ขีดจำกัดในการใช้งานน้ำมันหอมระเหยในผลิตภัณฑ์อาหารคือ ถ้าใช้ชนิดเดี่ยวๆ จะใช้ที่ความเข้มข้นสูงมากๆ จึงจะสามารถออกฤทธิ์ในการทำลายหรือต่อต้านจุลินทรีย์ได้ แต่การใช้น้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นสูงจะเกินขีดระดับการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภค ดังนั้นจึงมีคำแนะนำให้ลดความเข้มข้นลงกว่าระดับที่ออกฤทธิ์ในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ (sublethal concentrations) และใช้ร่วมกับสารอื่น หรือใช้ร่วมกับวิธีอื่นแบบผสมผสาน อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรระวังคือ ผลกระทบที่เกิดจากการปรับตัวของจุลินทรีย์ที่ต่อต้านฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยที่มีการใช้ในปริมาณต่ำกว่าความเข้มข้นที่ให้ผลได้ในออกฤทธิ์ในการต่อต้านจุลินทรีย์ได้ เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีต่อยาปฏิชีวนะทำให้มีฤทธิ์ร้ายแรงขึ้นในการทำให้เกิดผลเสียต่อ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

สุขภาพในร่างกายคน มีรายงานวิจัยศึกษาพบว่า เซลล์ของแบคทีเรียเมื่อเผชิญกับภาวะเครียดที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ แต่ยังไม่ถึงระดับที่สามารถต่อต้าน หรือทำลายเซลล์ได้ เช่น การอยู่ในอุณหภูมิที่ต่ำๆ การสัมผัสกับความร้อน หรือรังสีแกมมา การอยู่ในภาวะที่มีเกลือ หรือกรดอินทรีย์เป็นต้น จะทำให้จุลินทรีย์เกิดการปรับตัวให้ไวต่อภาวะนั้นลดลง เพื่อให้เซลล์เกิดการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (พนิดา รัตนปิติกรณ์, 2561)

จากข้อจำกัดในการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยที่ออกฤทธิ์ได้เพียงระยะสั้นๆ เนื่องจากเกิดการระเหยได้ง่าย และการที่มีกลิ่นเฉพาะที่เข้มข้นหรือฉุน จึงมีการนำเทคโนโลยีของฟิล์มและสารเคลือบบริโภคได้มาใช้โดยการเก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ในชั้นของฟิล์มเคลือบ โดยชั้นฟิล์มหรือสารเคลือบจะทำหน้าที่เป็นตัวกันการระเหยของน้ำมันหอมระเหยและเกิดการปลดปล่อยออกอย่างช้าๆ ทำให้ช่วยควบคุมกลไกการทำงานหรือการออกฤทธิ์ของน้ำมันหอมระเหยได้ การเตรียมฟิล์มเคลือบมักเตรียมในรูปแบบของฟิล์มอิมัลชันร่วมกับสารไฮโดรคอลลอยด์ในกลุ่มของโปรตีน และพอลิแซคคาไรด์ เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีสมบัติไม่ละลายในน้ำ ดังนั้นจะทำให้ฟิล์มเคลือบที่ได้มีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้มากขึ้น ส่งผลต่อสมบัติในด้านการต้านแรงดึงขาดของฟิล์ม ความโปร่งแสงหรือโปร่งใสและโครงสร้างฟิล์ม (Atares, L. and Chiralt, A., 2016) นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึงเทคโนโลยีหนึ่งที่เป็นที่สนใจและมีการศึกษาวิจัยกัน คือ การห่อหุ้มด้วยแคปซูลระดับนาโน (nanoencapsulation) ซึ่งมีหลายวิธีได้แก่ การเตรียมในรูปของนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) การห่อหุ้มด้วยไลโปโซม (liposome) หรือการเตรียมในรูปอนุภาคไขมันระดับนาโนเมตร (solid-lipid nanoemulsion) (พนิดา รัตนปิติกรณ์, 2561)

2.7.6 พืชตระกูลส้ม

พืชตระกูลส้ม จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถปลูกได้ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ จัดเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก หรือไม้ต้นขนาดเล็กในตระกูล Citrus วงศ์ Rutaceae สกุล Citrus มีมากกว่า 1,000 สปีชีส์ เติบโตกระจายอยู่ทั่วโลก (Roy, 1996)

ความหลากหลายของสายพันธุ์พืชตระกูลส้ม

ในความหมายของคำว่า ส้ม (Citrus) ได้กินความหมายครอบคลุมไปนอกเหนือจากสกุลของส้ม (genus Citrus) แต่รวมไปจนถึงพืชอื่น ๆ ที่ใกล้เคียง (citrus relatives) ทั้ง subfamily Aurantioideae ของวงศ์ส้ม Family Ruataceea ทั้งหมดด้วยกัน พืชใกล้เคียงที่พบมากที่สุดในประเทศไทย เช่น ต้นแก้ว (Murraya paniculata) มะไฟจีน (Clausena lansium)มะนาวเทศ (Triphasia trifolia) กระแจะ(Hesperethusa crenulata) มะนาวผี (Atalantia monophylla) มะตูม (Aegle marmalos)มะขวิด (Feronia limonia) และมะสัง (Feroniella lucida) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีส้มในสกุลอื่นๆที่มีบทบาทที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตส้มของโลกอีกด้วย

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ส้มมีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตติดต่อระหว่างพื้นที่ของประเทศจีนตอนใต้ อินเดีย คาบสมุทรมะลายู ซึ่งรวมถึงประเทศไทยทั้งหมดด้วย จากเอกสารรายงานของ มองซิเออร์ เดอลาลูแบร์ (Monsieur De LaLoubere) ที่เขียนไว้ในหนังสือA New Historical Relation With The King of Siam ที่ได้เข้ามาในประเทศไทยในระหว่างวันที่ 27 กันยายน 2230 (ค.ศ.1687) ถึงวันที่ 3 มกราคม 2231 (ค.ศ.1688) หรือมากกว่า 300 ปีที่ผ่านมา ในเอกสารนี้ได้กล่าวถึงพืชหลายชนิดรวมทั้ง ส้มโอ (Soum-O หรือ Pompelmousees) ส้มแก้ว (Soum –Keou) และมะกรูด (Ma-Crout) ส่วนกลุ่มส้มเปลือกล่อน คาดว่าได้มีการนำเข้ามาในประเทศไทยเมื่อกว่า 100 ปี ที่ผ่านมาพร้อมกับชาวจีนที่อพยพและได้มีการปลูกและขยายพันธุ์จนได้เป็น “ส้มเขียวหวาน” ในที่สุด

ชนิดและพันธุ์ส้ม ในสกุลส้ม (Citrus) และพืชที่ใกล้เคียงกับส้ม (Citrus relative) นั้น หากจะจัดแบ่งตามลักษณะความสำคัญทางพืชสวนแล้ว สามารถแบ่งแยกได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่ง ก็มีความสำคัญแตกต่างกันไปตามความต้องการของกลุ่มชนวัฒนธรรม รวมทั้งการใช้ประโยชน์ของส้มชนิดนั้น ๆ ด้วย โดยสามารถสรุปการแบ่งแบบย่อได้ดังนี้

พืชในสกุลส้ม (Citrus) มี 4 กลุ่มย่อย คือ

1. กลุ่มส้มเกลี้ยง (The Orange Group) แบ่งเป็นสองกลุ่มใหญ่ ๆ ด้วยกัน คือ

1.1 Sweet Orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) จัดเป็นส้มกลุ่มที่มีการปลูกเป็นการค้าปริมาณมากที่สุดในโลก ส้มในกลุ่มนี้มีเปลือกค่อนข้างหนาและติดกับเนื้อ (เปลือกไม่ล่อน) เมื่อผลแก่เปลือกมีสีเหลืองถึงส้มสะดุดตา ส้มในประเทศไทยที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ ส้มเกลี้ยง และส้มตรา (หรือส้มเช้ง) ส่วนส้มในกลุ่มนี้ที่แพร่หลายในต่างประเทศได้แก่ ส้มวาเลนเซีย (Valencia) เฮมลิน (Hamlin)

ส้มเลือด (Blood or pigmented orange) เป็น sweet orange ที่กลายพันธุ์โดยธรรมชาติ เนื้อมีสีแดงคล้ายเลือดซึ่งเป็นสีของรงควัตถุแอนโธซายานิน (anthocyanin) เช่น พันธุ์ Maltese, Tarocco

ส้มสะดือ (Navel orange) เป็นส้มที่มีลักษณะผลเป็นเอกลักษณ์คือรูเปิดกว้างที่ก้นผล ซึ่งน่าจะเป็นที่มาของชื่อส้มสะดือ นอกจากยังมีลักษณะเหมือนมีส้มลูกเล็กอีกลูกติดอยู่บริเวณด้านล่างของผล ประเทศไทยมีการนำเข้าส้มสะดือ เช่น พันธุ์ Washington Navel ส้มสะดือพันธุ์อื่นๆ ซึ่งเป็นที่นิยมในต่างประเทศได้แก่ California Navel และCara Cara

1.2 Sour or Bitter Oranges (*Citrus aurantium* L.) *Citrus aurantium* (Seville orange, sour orange, marmalade orange) เป็นลูกผสมธรรมชาติของส้มโอกับส้มเปลือกล่อน เปลือกใช้สกัดน้ำมันหอมระเหย (essential oil) ใช้ทำแยมผิวส้ม (marmalade) ในประเทศไทย ส้มที่อยู่ในกลุ่มนี้คือ ส้มซ่า ซึ่งผลมีขนาดพอๆ กับมะนาว เปลือกหนาไม่เรียบ ผิวและน้ำของส้มซ่าเป็นส่วนผสมสำคัญของ หมี่กรอบ และปลาแนม ในอดีตส้มชนิดนี้ได้มีการนำมาใช้เป็นต้นตอของกลุ่มส้มเกลี้ยง เนื่องจากมีความทนทานต่อโรคยางไหล แลไฟทอฟธอราได้ดี

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

2. กลุ่มส้มเปลือกล่อน (The Mandarins)

ส้มในกลุ่มนี้มีลักษณะผลแป้นกว่าส้มเกลี้ยง เปลือกบางกว่า เปลือกล่อนจึงปอกเปลือกเพื่อรับประทานได้ง่าย กลีบส้มแยกออกจากกันได้ง่าย จัดเป็นส้มที่ปลูกมากที่สุดในทวีปเอเชีย แหล่งที่ผลิตสำคัญได้แก่ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ จีน ไต้หวัน ไทย อินเดีย ออสเตรเลีย และย่านเมดิเตอร์เรเนียน ส้มเปลือกล่อนที่สำคัญในต่างประเทศได้แก่ ส้มซัทซูม่า (Satsuma mandarin) ส้มคลีโอพัตรา (Cleopatra mandarin) ส้มผลเล็กนำเข้าจากจีนมีรสหวานจัด ที่รู้จักกันในชื่อ ส้มซาถัง (Shatang mandarin) จัดอยู่ในกลุ่มส้มเปลือกล่อนเช่นกัน สำหรับในประเทศไทย ส้มเปลือกล่อนที่รู้จักกันดีคือ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุนหรือส้มสายน้ำผึ้ง และส้มแก้ว

3. กลุ่มส้มโอและเกรฟฟรุต (The Pummelos and Grapefrits)

ส้มโอ *(Citrus maxima)* เป็นส้มที่มีขนาดผลใหญ่ที่สุด เชื่อว่ามีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและภูมิภาคใกล้เคียง เปลือกชั้นในหนามีสีขาวลักษณะคล้ายฟองน้ำ มีเยื่อหุ้มกลีบส้มหนา ส้มโออาจแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยตามสีเนื้อ ได้แก่

3.1 ส้มโอเนื้อสีขาว (เหลือง) หรือไม่มีสี ได้แก่ ส้มโอพันธุ์ขาวพวง ขาวแป้น ขาวใหญ่ ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวา

3.2 ส้มโอเนื้อสีแดงหรือเนื้อสีชมพู ได้แก่ ส้มโอพันธุ์ทองดี ท่าข่อย และทับทิมสยาม โดยส้มโอพันธุ์ทองดีเป็นพันธุ์ที่ได้รับความนิยมและเป็นพันธุ์ที่ส่งออกไปจำหน่ายในตลาดต่างประเทศมากที่สุด

เกรฟฟรุต (*Citrus paradise*) เป็นส้มลูกผสมที่เกิดจากส้มโอกับส้มเกลี้ยง ลักษณะผลคล้ายส้มโอแต่มีขนาดเล็กกว่า บางทีเรียกว่า ส้มโอผลเล็ก ในประเทศไทยยังไม่มีการปลูกเป็นการค้า นำเข้าจากต่างประเทศในรูปผลสด และน้ำเกรฟฟรุต เกรฟฟรุตบนต้นมักติดผลเป็นกลุ่มๆ ดูคล้ายพวงองุ่น (grape) จึงเป็นที่มาของชื่อเกรฟฟรุต สีของเนื้อมีตั้งแต่ ขาว ชมพู ไปจนถึงแดง มีทั้งรสหวาน เปรี้ยว

4. กลุ่มส้มที่มีรสเปรี้ยวจัด (The Common Acid Members) ส้มกลุ่มนี้พบว่ามีรสเปรี้ยวจัด ที่เป็นเอกลักษณ์ที่สำคัญ คือ มีส่วนของปลายผล (stylar end) มักพบว่าลักษณะสำคัญนูนขึ้นเรียกว่า areolar mammalian (บางครั้งเรียกว่า nipple) แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย คือ

4.1 ซิตรอน (The Citrons; Citrus medica L.) เป็นส้มผลทรงรี มีเปลือกผลชั้นในหนา และมีเนื้อน้อย ดอกตูมมีสีม่วงแต้ม ในประเทศไทยพบปลูกตามหมู่บ้านชาวเขาทางภาคเหนือ เรียกกันว่า ส้มมะละกอ ซิตรอนที่มีผลลักษณะสะดุดตาคล้ายนิ้วมือ เรียกว่า ส้มมือหรือส้มโอมือ (Buddha's hand citron; Citrus medica var. sarcodactylis) ผลมีแต่เปลือกไม่มีเนื้อ มีกลิ่นหอม ใช้ทำยาดม และปลูกเป็นไม้ประดับ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

4.2 เลมอน (The Lemons; Citrus limon) เรียกกันในภาษาไทยว่า มะนาวฝรั่ง หรือ มะนาวนมยาน ผลเลมอนที่ขายในประเทศไทยส่วนใหญ่นำเข้าจากต่างประเทศ ผลมีสีเหลืองสวย ทรงรี มีรสเปรี้ยวและกลิ่นเฉพาะ ใช้บริโภคเป็นเครื่องดื่ม เสริมรสในอาหาร และเป็นส่วนผสมของน้ำยาทำความสะอาด พันธุ์ที่นิยมแพร่หลายเช่น พันธุ์ยูเรก้า และพันธุ์ลิสบอน

4.3 มะนาว (The Limes) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น

4.3.1 มะนาวผลเล็ก (Small-fruited Acid Limes; *Citrus aurantifolia*) เป็นมะนาวเปลือกบาง น้ำมะนาวมีกลิ่นหอมเฉพาะ เหมาะสำหรับใช้ปรุงอาหารไทย มักอ่อนแอต่อโรคแคงเกอร์ส้ม และโรคไวรัสทริสเตซ่า ได้แก่ มะนาวแป้นต่างๆ มะนาวหนัง มะนาวไข่

4.3.2 มะนาวผลใหญ่ (Large – fruited Acid Limes*; Citrus latifolia* Tan.) ผลมีขนาดใหญ่ และมีความทนโรคมากกว่ามะนาวผลเล็ก ไม่มีเมล็ด เชื่อว่า เป็นลูกผสมโดยธรรมชาติ พันธุ์ที่สำคัญได้แก่ มะนาวตาฮิติ มะนาวด่านเกวียน

พืชในสกุลส้ม (Citrus) ที่มีชื่อเรียกเป็นภาษาอังกฤษว่า lime แต่มีชื่อ species ต่างออกไป ได้แก่ มะกรูด (Kaffir lime; Citrus hystrix) มะนาวนิ้วมือออสเตรเลีย (Australian finger lime; Citrus australasica) เป็นต้น

ส้มอีก 2 กลุ่มที่ไม่ได้อยู่ในสกุล *Citrus* ได้แก่ ส้มกินเปลือกหรือคัมควัท (Kamquats; *Fotunella spp.*) และส้มสามใบ (trifoliate orange; *Poncirus trifoliate*) ส้มสามใบนั้นได้มีการนำมาใช้เป็นต้นตอส้มนานมาแล้ว ในปัจจุบันได้มีการผลิตลูกผสมระหว่างส้มสามใบ และส้มเกลี้ยง (sweet orange) ได้เป็นลูกผสมที่เรียกว่า ซิแตรน (citrange) ขึ้น โดยพันธุ์ที่นำมาใช้เป็นต้นตออย่างกว้างขวางและรู้จักกันอย่างดี คือ Troyer และ Carrizo

การผลิตส้มชนิดหนึ่งชนิดใดนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงตลาดที่จะสามารถรองรับผลผลิตเป็นหลัก โดยเน้นที่การผลิตส้มที่มีคุณภาพมิใช่ปริมาณเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ ยังต้องคำนึงถึงความเหมาะสมของพื้นที่ และภูมิอากาศ ความรู้ความสามารถของเกษตรกร และช่องทางของตลาดด้วย (สามารถ และ คณะ, 2559)

พืชตระกูลส้ม (*Citrus spp.*) สามารถจำแนกตามคุณประโยชน์หลักของพืชเป็น 2 กลุ่ม คือ พืชตระกูลส้มที่ให้ผลสดหรือนำมาทำเป็นผลแห้งเป็นหลัก และพืชตระกูลส้มที่ให้น้ำมันหอมเป็นหลัก อย่างไรก็ตาม พืชตระกูลส้มที่ให้น้ำมันหอมเป็นหลัก สามารถใช้รับประทานเป็นผลสดหรือผลแห้งได้และพืชตระกูลส้มที่ให้ผลสด ก็สามารถให้น้ำมันหอมระเหยได้เช่นกัน

ก. พืชตระกูลส้มที่ให้ผลสดหรือนำมาทำเป็นผลแห้งเป็นหลัก จัดแบ่งโดยใช้หลักเกณฑ์พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

1. พืชที่มีความสำคัญชนิดหลัก

Citrus aurantifolia (Christm. & Panzer) Swingle-lime: มะนาว

Citrus maxima (Burm) Merr-pummelo: ส้มโอ

Citrus medica L. - citron: มะนาวควาย (ใต้) ส้มมะงั่ว (กลาง)

Citrus x paradisi Macf- grapefruit: เกรปฟรุต

Citrus reticulata Blanco- mandarin: ส้มเขียวหวาน

Citrus sinensis (L.) Osbeck-sweet orange: ส้มเกลี้ยง

2. พืชที่มีความสำคัญชนิดรอง

Citrus auranitum L. (sour orange): ส้มซ่า

Citrus hystrix DC. (Mauritius papada): มะกรูด

Citrus limon (L.) Burm. f.(lemon): มะนาวฝรั่ง

Citrus Macroptera Montr. (Malenesian papeda)

ข. พืชตระกูลส้มที่ให้น้ำมันหอมเป็นหลัก

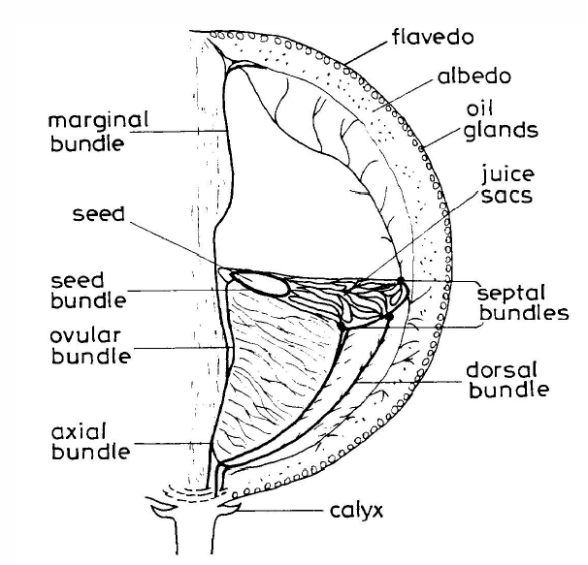
Citrus aurantium L.cv. Group Bouquetier

Citrus begamia Risso & Poitea

ส้มเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคเนื่องจากเป็นผลไม้รสเปรี้ยวหรือหวานตามแต่ชนิด และมักมีแคลเซียม โปแทสเซียม วิตามินเอและวิตามินซี มากเป็นพิเศษ ซึ่งในส่วนที่เหลือทิ้งคือเปลือกนั้นเป็นวัตถุดิบในการเตรียมเป็นน้ำมันหอมระเหยได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นในส่วนใบและดอกก็พบว่ามีน้ำมันหอมระเหย โดยจะสังเกตได้ชัดเมื่อนำผิวของผลหรือใบขึ้นไปส่องแสงแดดจะเห็นเป็นจุดเล็กๆ ซึ่งจุดเหล่านั้นคือต่อมที่เก็บน้ำมันหอมระเหย (oil gland)

ส้มจัดเป็นผลไม้ชนิด hesperidium เจริญมาจาก super ovary แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยาของผลส้มประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนผิวนอกสุดของผลส้มเรียกว่าชั้น epicarp ประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นสีของเปลือกส้มหรือเรียกว่าชั้น flavedo ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมากซึ่งมีคาร์โรทีนอยด์เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ด้านนอกของเซลล์ประกอบด้วยคิวติน (Cutin) และขี้ผึ้ง (wax) เป็นเครื่องป้องกันการสูญเสียน้ำของผลส้มและสามารถพบต่อมน้ำมันได้ในชั้น flavedo ซึ่งเป็นโครงร่างที่เกาะติดกับผิวส้มภายในประกอบด้วยน้ำมัน ซึ่งแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของส้ม ถัดมาเป็นชั้น mesocarp หรือ albedo เป็นชั้นที่อยู่ถัดจาก epicarp เป็นชั้นบางๆสีขาวคล้ายฟองน้ำประกอบด้วยสารพวกเพคตินและเฮมิเซลลูโลสจำนวนมากและส่วนในสุดของผลส้มเป็นส่วนที่รับประทานได้หรือ endocarp ซึ่งประกอบไปด้วยกลีบส้มจำนวนมากภายในกลีบประกอบด้วยเมล็ดเล็กน้อยและเต็มไปด้วยถุงน้ำส้มจำนวนมากที่เชื่อมติดกันกับผนังกลีบส้ม ดังภาพที่ 2.12

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์



ภาพที่ 2.12 โครงสร้างของพืชผลตระกูลส้ม

ที่มา: Roy (1996)

2.7.7 องค์ประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

น้ำมันหอมระเหยจากพืชประกอบด้วยสารเคมีหลายๆกลุ่มรวมกัน การวิแคราะห์หาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยนิยมใช้ Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มพบได้มากในส่วนของ flavedo oil gland และ albedo (Caccioni *et al*., 1998) จัดเป็นไขมันประเภทไม่อิ่มตัวและไม่เสถียร มีส่วนผสมของสารระเหยง่ายและมีสารประกอบพวก monoterpene hydrocarbon เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งถูกทำลายได้ง่ายด้วยแสง ความร้อน การออกซิเดชั่น (oxidation) และไฮเดรชัน (hydration) นอกจากนี้ยังมีสารอนุพันธ์ในกลุ่ม flavonoids คือ hesperidine, narirunin, naringin, diosmin และ eriocitrin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชั่น (Del-Rio *et al*., 2004)

โครงสร้างของสารประกอบที่พบในพืชตระกูลส้ม ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบในกลุ่มเทอร์ปีน (terpenes) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น$(C_5H_8)_n$ มักพบได้ในรูปของ diterpenes (C_{20}) triterpenes (C_{30}) และ sesquiterpenes (C_{15}) เมื่อรวมตัวกับออกซิเจนจะได้สารประกอบในรูปของ terpenoids นอกจากนี้ยังมีสารที่ให้กลิ่นรส เช่น แอลดีไฮด์ (Aldehyde) และ เอสเทอร์ (Ester) เป็นต้น ที่เป็นแหล่ง

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ของน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกันไปที่สามารถทำหน้าที่เป็น antimicrobial และ antioxidant ดังนั้นจึงถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

น้ำมันส้ม เป็นน้ำมันที่มีราคาถูก ใช้สำหรับดูแลผิวพรรณได้ดี ช่วยลดริ้วรอยบนผิวหนัง รวมทั้งมีคุณสมบัติให้ความสดชื่น บำรุงจิตใจให้กระชุ่มกระชวย คลายความวิตกกังวล ซึมเศร้า ท้อแท้ หรือหดหู่ (คมสัน หุตะแพทย์, 2546)

ลักษณะทางกายภาพ	น้ำมันที่ได้จากการบีบจะมีสีเหลืองเข้มหรือสีส้ม ส่วนที่ได้จากการกลั่นจะไม่มีสีหรือสีเหลืองอ่อน
องค์ประกอบทางเคมี	limonene (~ 90 %), docyl, octyl, nonyl, dodecyl aldehydes, citral, acids, ester (Masada, Y, 1976)
ส่วนที่ให้น้ำมัน	ผิวหรือเปลือกของผลส้มสุก (คมสัน หุตะแพทย์, 2546)
วิธีการสกัด	สกัดด้วยวิธีบีบอัดหรือกลั่นด้วยไอน้ำ
องค์ประกอบทางเคมี	ส่วนใหญ่เป็น monoterpenes limonene
ความรุนแรงของกลิ่น	ระดับปานกลาง
คุณสมบัติ	บรรเทาอาการซึมเศร้า ฆ่าเชื้อโรค ช่วยในการย่อย ลดไข้ รักษากระเพาะ บำรุงร่างกายและจิตใจ ฯลฯ

น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีมูลค่าการนำเข้าสูงสุด (ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ, 2550) ส่วนชนิดและองค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชตระกูลส้มนั้นมีแตกต่างกันออกไป ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ชนิดและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากพืชตระกูลส้มที่ใช้ในสุคนธบำบัดและ เครื่องสำอางค์

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	องค์ประกอบที่สำคัญ
Bergamot oil, จากผิวของผล (*Citrus bergamia Risso*)	Limonene, linalyl acetate, linalool β -pinene bergap tene
Grapefruits จากเปลือกผล (*Citrus paradisi*)	Limonene
Lemon oil จากผิวของผลสด (*Citrus limonum* L.)	d- limonene 70% citral, citronellol, sesquiterpene, β -pinene, mycene, α-pinene
Lime จากเปลือกผลสด (*Citrus limetta*)	Limonene, citral
น้ำมันผิวมะกรูดจากเปลือกผล (*Citrus hystrix* DC.)	β -pinene, Limonene sibinene, citronellol

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ตารางที่ 2.3 (ต่อ)

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	องค์ประกอบที่สำคัญ
Neroli bigarade oil, จากดอก (*Citrus aurantium*)	Limonene, linalyl acetate, linalool, methyl anthranilate, nerolidol, gerandol
Petitgrain bigarade oil, จากใบและกิ่ง (*Citrus aurantium*)	linalyl acetate, linalool, citronellol
Bitter orange peel oil จากเปลือก (*Citrus aurantium*)	Limonene, mycene

ที่มา: พิมพร ลีลาพรพิสิฐ (2545, น. 14-34)

พืชตระกูลส้มที่สนใจศึกษา คือ *Citrus aurantium* Dulcis (orange) Peel Oil : น้ำมันหอมระเหยนี้ได้มาจากกระบวนการผลิตแบบการบีบเย็น จากเปลือกด้านนอกของผลส้มสุก *Citrus aurantium* L. (*Family of Rutaceae*) ผลการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์โดยทั่วไปของ *Citrus aurantium* L. (The Plant List., 2013.)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Citrus* × *aurantium* L.
สกุล	*Citrus* L.
สปีชีส์	*aurantium*
Variety	-
Sub Variety	-
Form	-
ชื่อพ้อง / ชื่อดั้งเดิม	*Aurantium* × *acre* Mill.
	Aurantium × *bigarella* Poit. & Turpin
	Aurantium × *corniculatum* Poit. & Turpin
	Aurantium × *corniculatum* Mill.
	Aurantium × *coronatum* Poit. & Turpin
	Aurantium × *distortum* Mill.
	Aurantium × *humile* Mill.
	Aurantium × *myrtifolium* Descourt.
	Aurantium × *orientale* Mill.
	Aurantium × *silvestre* Pritz.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

	Aurantium × *sinense* (L.) Mill.
	Aurantium × *variegatum* Barb.Rodr.
ชื่อไทย	ส้มซ่า
ชื่อท้องถิ่น	เช้ง เซาะกา (จีน)/ ซาฮ้อ เซซุยเฒอ(กะเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน)/ มะเกลี้ยง มะขุน (ภาคเหนือ)
ชื่อสามัญ	Bigarade / Bitter orange / Seville orange / Sour orange
ชื่อวงศ์	RUTACEA
ลักษณะวิสัย	ไม้ยืนต้น ขนาดเล็ก
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	ลำต้น ไม้ยืนต้น สูง 3-10 m ทรงพุ่มกลม มีกิ่งก้านมาก กิ่งอ่อนเป็นเหลี่ยม กิ่งมีหนามแหลมสั้น กิ่งแก่ อาจอวบยาวถึง 8 cm ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ มีจุดต่อมน้ำมันมาก มีกลิ่นหอมเมื่อขยี้ ก้านใบยาว 2-3 cm ครึ่งตอน บนแผ่เป็นปีกแคบ ๆ ถึงกว้าง รูปคล้ายสามเหลี่ยมแกมไข่กว้าง ขนาดกว้างถึง 2.5 cm แผ่นใบรูปไข่กว้างถึงรูปรี ขนาดกว้าง 4-7 cm ยาว 7-12 cm โคนใบสอบหรือมน ปลายมนถึงปลายทู่ ขอบใบเกือบเรียบถึงจักเล็กน้อย ดอก ดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มดอกออกที่ซอกใบ กลีบสีขาว มี 2-3 ดอก มีกลิ่นหอมแรง ปกติเป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบเลี้ยงรูปคล้ายถ้วย ยาว 0.4-0.5 cm มี 3-5 หยัก รูปไข่กว้างคล้ายสามเหลี่ยม เกลี้ยงหรือมีขน กลีบดอก มี 4-5 กลีบ รูปขอบขนาน ขนาดกว้าง 0.4 cm ยาว 1.5 cm เกสรเพศผู้ มี 20-25 อัน แยก 4-5 กลุ่ม ก้านเกสร ยาว 6-10 cm อับเรณู รูปขอบขนาน สีเหลือง เกสรเพศเมีย ก้านเกสรอวบ และยอดเกสรนูนกลม รังไข่ ไม่มีขน ผล ผลแบบส้ม รูปกลม ขนาดส้นผ่าศูนย์กลาง 5-8 cm มี 8-12 ห้อง ตรงกลางกลวง เปลือกหนา ผิวเรียบถึงเป็นตุ่มขรุขระ สีส้มเหลืองมีกลิ่นแรง เนื้อในเป็นกรด มีรสขม เล็กน้อย เมล็ดมีจำนวนมาก
สภาพนิเวศ	กลางแจ้ง
สภาพนิเวศวิทยา	เหมาะสำหรับปลูกในสภาพแวดล้อมที่แสงแดดส่องถึง
ถิ่นกำเนิด	แหล่งกำเนิดอาจเป็นทางตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย และพื้นที่ที่ติดกับพม่าและจีนแล้วแพร่กระจายไปทางตะวันออกเฉียงเหนือยัง

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

	ญี่ปุ่น และทางตะวันตกผ่านอินเดียไปยังตะวันออกกลาง แล้วต่อไปยังยุโรป
การกระจายพันธุ์	เขตเมดิเตอร์เรเนียน
การปลูกและการขยายพันธุ์	ขยายพันธุ์โดยการปักชำ ตอนกิ่ง
ระยะเวลาการติดดอก	-
ระยะเวลาการติดผล	-
ประเภทการใช้ประโยชน์	สมุนไพร เปลือกผล รสปร่าหอมใช้ทำยา หอมแก้ลมวิงเวียนหน้ามืดตาลาย แก้ท้องอืดท้องเฟ้อ น้ำในลูก รสเปรี้ยวอมหวาน กัดฟอก เสมหะ แก้ไอ ฟอกโลหิต ใบ รักษาโรคผิวหนัง

ต้นส้มทั้งหมดอยู่ในสกุล *Citrus* วงศ์ Rutaceae ส่วนใหญ่มักเรียกว่า Bitter orange (“เปรี้ยว”) อ้างอิงถึง *C. aurantium* L. และเป็นลูกผสมระหว่าง *Citrus maxima* (ส้มโอ) และ *Citrus reticulata* (ส้มMandarin) (USDA, 2013) พืชชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ชาวพื้นเมืองของหมู่เกาะทะเลใต้ เช่น กวม ซามัว และฟิจิ เชื่อว่าต้นไม้นี้ถูกนำมาสู่พื้นที่ของพวกเขาในยุคครั้งก่อนประวัติศาสตร์ ปัจจุบันมีการปลูกพืชชนิดนี้อย่างกว้างขวางทั่วภูมิภาคเมดิเตอร์เรเนียน กินี อินเดียตะวันตก และบราซิล รวมทั้งแคลิฟอร์เนียและฟลอริดา

Bitter orange (*C. aurantium* L.) เติบโตในภูมิอากาศแบบกึ่งเขตร้อน ใกล้เขตร้อน และสามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เอื้ออำนวยได้ง่าย อยู่ได้ในสภาพดินที่หลากหลายและดำรงอยู่ในสภาวะที่รุนแรง ความสูงของต้นส้มขมมีตั้งแต่ 2 ถึง 9 m และมีจุดสุดยอดที่กะทัดรัดกว่าส้มหวาน มีเปลือกเรียบสีน้ำตาล กิ่งก้านสีเขียว เป็นเชิงมุมและ ยืดหยุ่นได้ พืชจะออกใบตลอดปี ดอกมีกลิ่นหอมมาก เดี่ยวหรือเป็นกระจุกเล็กๆ ตามซอกใบ กว้างประมาณ 3.7 cm ผลมีลักษณะกลม รูปไข่หรือรูปไข่กลับ กว้าง 7-8 cm ผิวหยาบ มีความหนา เปลือกขมที่มีกลิ่นหอมซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีส้มแดงสดเมื่อสุกเปลือกผลไม้มีจำนวนมากขนาดเล็ก ต่อมน้ำมันจมในใจกลางของผลและจะกลวงเมื่อผลโตเต็มที่

Citrus aurantium L. หลายชนิดพบได้ในส่วนต่างๆ ของโลกและใช้สำหรับสกัดน้ำมันหอมระเหย น้ำมัน *Citrus aurantium* L. ได้มาจากส่วนต่างๆ (เปลือก ใบ และดอก) ของ *C. aurantium* spp. *amara* Engler (family Rutaceae) ชื่อสามัญ ส้มเปรี้ยว (“ขม”) หรือในกลุ่มต่อไปนี้: “standard” หรือ “Seville” ส้มเปรี้ยวเติบโตมาสำหรับ การผลิตผลไม้ “Bouquet de Fleurs” ปลูกเพื่อผลิตดอกไม้ที่สกัด “น้ำมันเนโรลี (Neroli)” และ“Granito” หรือ “Abers” ส่วนใหญ่ใช้ในการสกัด

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

น้ำมันหอมระเหยจากใบ Chinoto และมะกรูดยังเป็นของสายพันธุ์ *C. aurantium* L. แต่เป็นตัวแทนของพันธุ์ต่างๆ (*myrtifolia* Ker-Gawl และ *bergamia* Wight & Arn ตามลำดับ) น้ำมันที่ได้จากต้นส้มขมสำคัญที่สุด ได้แก่

น้ำมัน Bitter orange peel oil : เตรียมจากเปลือกผลส้ม สกัดแบบบีบเย็นจะได้น้ำมันที่เป็นของเหลวสีน้ำตาลอมเหลืองมีกลิ่นดอกไม้สด วิธีการสกัดแบบบีบเย็นใช้ในการเตรียมน้ำมันนี้จะมีปริมาณ Limonene (มากถึง 90 %) เป็นส่วนประกอบหลักร่วมกับ β-myrcene และ α-pinene

น้ำมัน Petitgrain bigarade: เตรียมโดยการกลั่นด้วยไอน้ำของใบและกิ่งก้านจากการตัดแต่งกิ่งของต้นไม้ที่เก็บรวบรวมที่ต่างๆ ครั้งตลอดทั้งปี มีสีเหลืองจางๆมีกลิ่นไม้และส่วนใหญ่ประกอบด้วย esters linalyl acetate (45 %) geranyl acetate (3 %), linalool (28 %), and geraniol เป็นต้น

น้ำมัน Neroli: เตรียมจากการกลั่นด้วยไอน้ำหรือการกลั่นด้วยไอน้ำของดอกไม้ น้ำมันเป็นสีเหลืองอ่อนๆที่มีกลิ่นดอกส้มหวานๆอ่อนๆ มีรสขมเล็กน้อย มี Linalool, linalyl acetate และ limonene เป็นส่วนประกอบหลัก

น้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L. ได้มาจากการสกัดแบบบีบเย็นนี้จะประกอบไปด้วย ส่วนที่เป็นน้ำมันหอมที่ระเหยได้ (volatile) ซึ่งคิดเป็น 85-99 % ของน้ำมันทั้งหมด สารประกอบหลักที่พบในส่วนที่ระเหยง่ายของน้ำมันที่สกัดจากส่วนดอก(Neroli) และน้ำมันที่สกัดจากส่วนใบ (Petitgrain bigarade) ได้แก่ monoterpenic, sesquiterpenic และ aliphatic hydrocarbons, monoterpenic และ sesquiterpenic aldehydes, monoterpene และ aliphatic ketones, monoterpenic, sesquiterpenic และ aliphatic alcohols และ esters, oxides และ ethers สำหรับ อีก 1-15 % เป็นส่วนที่ไม่ระเหย (nonvolatile) ซึ่งจะประกอบไปด้วย oxygen heterocyclic จะอยู่ในรูปของ coumarins, psoralens และ polymethoxflavones (meranzin hydrate, meranzin, isomeranzin, bergapten, nobiletin, heptamethoxyflavone, epoxybergamottin hydrate, tangeretin, osthol และ epoxybergamottin) ซึ่งต่างจากน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L. ที่ผ่านการสกัดเย็นและกลั่น จะมีสารไฮโดรคาร์บอนอยู่ประมาณ 8-25 % ของการสกัดจากส่วนดอก(neroli) และส่วนใบ (petitgrain bigarade) ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่จะเป็น s-linalool (25–55 %), limonene (2–12 %), α-terpineol (3–7 %), linalyl acetate (3–55 %), alcohols (30–70 %) และ esters (7–60 %) ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้วิธีการสกัดที่ต่างกันจะได้องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L. ที่ต่างกัน

น้ำมันจากเปลือกส้ม (Orange Peel Oil) ส่วนใหญ่ได้มาจากเปลือกส้มที่ตากแห้งหรือจากเปลือกส้มสุกของ *Citrus aurantium* L. เป็นพันธุ์ที่คนพื้นเมืองดั้งเดิมในอินเดียมีการเก็บเกี่ยวและมีเพื่อการค้าที่ สเปน หมู่เกาะคาริเบียน สหรัฐอเมริกา และโมร็อกโก เป็นพันธุ์ที่เติบโตดีในดินอุดมสมบูรณ์

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

มีแหล่งน้ำที่พอเพียง มีการขยายพันธุ์ด้วยการติดตา และจะถูกเก็บเกี่ยวอายุได้ 5-6 ปี ผลจะถูกเก็บเกี่ยวด้วยมือที่ระมัดระวัง เปลือกจะถูกนำมาสกัดเป็นน้ำมัน หรือใช้วิธีตากแห้งแล้วแต่การนำไปใช้

จากรายงานของ Dugo และคณะ (1993) พบว่าองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก Italian Bitter Oramge มีปริมาณของ monoterpene hydrocarbon (97.3-97.8 %) susquiterpenes hydrocarbon (0.2 %) สารประกอบ oxygenated (1.8-2.2 %) สารประกอบ carbonyl (0.35-0.63 %) และ alcohol (0.35-0.63 %) โดยองค์ประกอบที่พบมากที่สุดคือ limonene มีประมาณ 93 % รองลงมาคือ mycene, β -pinene และ γ-pinene สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบ พบว่ามี monoterpenes ของ Colombian lemon, mandarin และ orange เพียง 65.3, 31.2 และ 79.4 % ตามลำดับ โดยพบว่าเป็น citronellal, linalool และ citrol อยู่ในปริมาณสูง ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำจาก *Citrus tangerine* พบสารประกอบทั้งหมด 22 ชนิด สารประกอบส่วนใหญ่เป็นเทอร์ปีนและมีสารประกอบพวก aromatic และ aliphatic เล็กน้อย (Dongyan *et al.*, 1998) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกและใบของส้ม *Citrus reticulate* พบสารที่สำคัญในผิวเปลือกส้ม คือ limonene และ limonene/γ-terpene ในใบพบสารสำคัญ 3 ชนิด คือ sabinene/linalool, linalool/γ-terpene และ methyl N-methylanthranilate (Lota *et al*., 2000)

Gonzalez และคณะ (2002) ศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากส่วน pericarp ของพืชตระกูลส้มทั้ง 4 ชนิด คือ *Citrus paradise*, *Citrus limon*, *Citrus grandis* และ *Citrus reticulate* พบว่าองค์ประกอบหลักคือ limonene ยกเว้น *Citrus grandis* ซึ่งองค์ประกอบหลักคือ linalool องค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหย bitter orange คือ limonene (93.7-94.3 %) องค์ประกอบที่รองลงมาคือ myrcene (1.7-1.9 %), β -pinene (0.4-0.6 %), linalyl acetate (1.2-1.3 %), linalool (0.3-0.5 %) และ decanal (0.1-0.2 %) เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยของ bitter orange จาก Turkish, Italian และ Spanish oil พบว่า องค์ประกอบ Turkish bitter orange จะมี linalyl acetate, linalool และ dodecanol มากกว่า Italian และ Spanish oil และยังพบว่ามีองค์ประกอบบางชนิดที่พบใน Italian และ Spanish oil แต่ไม่พบใน Turkish bitter orange

พืชตระกูลส้มจะมีสารประกอบที่มีความหลากหลายแตกต่างกันออกไปโดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุกรรม สิ่งแวดล้อมและการดูแลรักษา (Lota *et al.,* 2000) สมบัติของน้ำมันหอมระเหยในพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับปัจจัยทางภูมิอากาศ ฤดูกาลและภูมิประเทศ ดิน ฟ้า อากาศ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อส่วนประกอบในพืชแต่ละชนิด (Lanciotti *et al*., 2004)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เกศรินทร์ รามณี (2552) ศึกษาฤทธิ์ต้านการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ด้วยสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม จากการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 2.25 µg/ml สามารถต้านการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของรา *Aspergillus flavus* ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Sucrose ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 60 µg/ml ที่เติมในเมล็ดข้าวโพดที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง สามารถต้านการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์จนถึง 28 วัน แต่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียง 14 วันในเมล็ดข้าวโพดที่เก็บในสภาวะอุณหภูมิห้องที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 90 % นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวทุกระดับความเข้มข้นสามารถลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหยอย่างมีนัยสำคัญ

จาตุรงค์ จงจีน (2555) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรในการต้านราที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียในขนมปัง โดยรา *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp. คัดแยกได้จากขนมปังด้วยวิธี Tissue transplanting บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C นาน 1 สัปดาห์ ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 5 ชนิด คือ มะนาว มะกรูด ตะไคร้ สะระแหน่ และขิง ด้วยวิธีการกลั่น (distillation) โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 95% เป็นตัวทำละลาย ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C นาน 3 ชั่วโมง นำน้ำมันหอมระเหยทั้ง 5 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านการเจริญของราทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี agar disk diffusion เปรียบเทียบผลการต้านกับกลุ่มควบคุม ซึ่งไม่ได้รับน้ำมันหอมระเหย พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดสามารถต้านการเจริญของรา *Aspergillus* sp. ได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 50,000 ppm ในขณะที่ตะไคร้สามารถต้านรา *Penicillium* sp. ได้ดีที่สุดที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 100,000 ppm

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ และคณะ (2556) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรบางชนิด เช่น กานพลู ขิง และอบเชย ในการยับยั้งราที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์ขนมอบ จากการสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยวิธีการกลั่นด้วยน้ำและไอน้ำ พบว่า ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูสูงสุด รองลงมาคือ น้ำมันอบเชยและน้ำมันขิง โดยได้ปริมาณเท่ากับ 4.50 %, 0.60 % และ 0.16 % ตามลำดับ จากการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของรา *Aspergillus flavus, Eurotium* sp., *Penicillium chrysogenum* และ *Rhizopus stolonifera* ในน้ำมันหอมระเหยจากกานพลู ขิง และอบเชย ด้วยวิธี disc agar diffusion พบว่าน้ำมันอบเชยออกฤทธิ์ต้านการเจริญของรา *Eurotium* sp., *Penicillium chrysogenum* และ *Aspergillus flavus* ได้ดีกว่าน้ำมันกานพลูและน้ำมันขิงในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันอบเชยในการต้านราทั้ง 3 ชนิดนี้ คือ 12,500 ppm,

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

12,500 ppm, และ 50,000 ppm ตามลำดับ น้ำมันอบเชยและน้ำมันขิงไม่ออกฤทธิ์ต้านการเจริญของรา *Rhizopus stolonifer* ในขณะที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันกานพลูในการต้านรานี้ คือ 100,000 ppm

Guynot *et al.* (2005) ทำการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยบางชนิดจำนวน 20 ตัวอย่าง ที่มีฤทธิ์ในการต้านราซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์เบอร์เกอร์รี่ ได้แก่ *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. โดยนำน้ำมันหอมระเหยเติมลงในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของแป้งวีต (2 %) เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วงระหว่าง 0 ถึง 1,000 ppm ทำการทดสอบคุณสมบัติในการต้านราที่ระดับแตกต่างกันของ a_w และ pH โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีรา พบว่า มีเพียงน้ำมันหอมระเหยของใบอบเชย โรสแมร์รี่ ไทม์ ใบเบย์ และใบกานพลูที่แสดงฤทธิ์ในการต้านราได้บ้างในทุกไอโซเลตของรา โดยฤทธิ์ในการต้านราจะขึ้นอยู่กับระดับของ a_w และ pH ฤทธิ์ในการต้านราจะมากขึ้นเมื่อ a_w เพิ่มขึ้น ในบางกรณีที่ค่า a_w เท่ากับ 0.80 พบว่าราเจริญได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าโรสแมร์รี่ ไทม์ และใบเบย์จะมีฤทธิ์ในการต้านรามากขึ้นที่ pH เท่ากับ 5 และจะลดลงเมื่อ pH เพิ่มมากขึ้น ขณะที่ใบอบเชยจะมีฤทธิ์ในการต้านราได้ดีที่ pH เป็นกลาง

2.8.1 กลไกการต้านราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

คุณสมบัติของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยในการต้านจุลินทรีย์มีการศึกษามาตั้งแต่อดีต แต่กลไกการเกิดปฏิกิริยานั้นยังไม่ได้มีการศึกษากันมากนัก (Burt, 2004) สารประกอบกลุ่มต่างๆที่พบในสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจะออกฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ แต่จะไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง (Carson *et al.,* 2002) เมื่อน้ำมันหอมระเหยทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ ตำแหน่งของจุลินทรีย์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือ ผนังเซลล์เกิดการฉีกขาด เยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane) ถูกทำลาย (Ultee *et al.,* 2002) โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane protein) ถูกทำลาย ส่งผลให้ชั้นของไขมัน (lipid bilayer) แยกออกจากกัน ส่วนประกอบของเซลล์ถูกทำลาย (Cox *et al.,* 2000) ไซโตพลาสซึมเกิดการตกตะกอนและโปรตรอนโมทีฟ (proton motive force) ถูกทำลาย (Burt, 2004) สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพพวกเทอร์ปีนที่มักพบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีผลทำให้ผนังเซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลาย มีรูรั่วในแบคทีเรียและรา (Lanciotti *et al*., 2004) โมเลกุลของส่วนที่ไม่ชอบน้ำของน้ำมันหอมระเหยละลายในเยื่อเซลล์พลาสมาทำให้ส่วนที่ชอบน้ำเข้าสู่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้ง (Cox *et al.,* 2000) เมื่อมีการฉีกขาดของผนังเซลล์จะเกิดการรั่วไหลของไอออนจำเพาะต่างๆ ทำให้เซลล์สูญเสียองค์ประกอบภายในเซลล์ โมเลกุลและไอออน เกิดภาวะวิกฤตภายในเซลล์ทำให้ราถูกทำลายในที่สุด ส่งผลให้เกิดโปรตรอนโมทีฟฟอซลดการสร้าง ATP (Lanciotti *et al*., 2004)

2.8.2 น้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L. และฤทธิ์การต้านราเพื่อการถนอมอาหาร

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ผลไม้ตระกูลส้มนั้นมีปริมาณของ neral และ geranial acetic esters ที่สูง ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ที่เปลือกผลไม้มีฤทธิ์ต้านรา *Penicillium digitatum, Penicillium italicum* และ*Geotrichum candidum* ซึ่งเป็นราที่ทำให้เกิดการเน่าเสียภายหลังการเก็บเกี่ยวส้ม (Wuryatmo *et al.,* 2003) Belletti *et al*. (2004) พบว่า สารประกอบ citral ที่เป็นส่วนผสมของ isomers neral และ geranial มีความเข้มข้นมากกว่า 7 % ในน้ำมันมะนาวมีฤทธิ์ต้านยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้สูงสุดกว่าสารผสมอื่นๆที่ทดสอบ และได้มีการศึกษาสาร β-Pinene พบในส่วนขั้วหัวของน้ำมันมะนาวและในมะนาวหวานในปริมาณสูง (มากกว่า 20 %) พบว่ามีฤทธิ์ต้าน *Escherichia coli* O157:H7 (Takikawa *et al.,* 2002)

ผลงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์การต้านราของน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L.

ในปี ค.ศ.1998 Caccioni และคณะได้ศึกษาผลกระทบขององค์ประกอบในสารประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L ต่อการเจริญของรา *Penicillium digitatum* และ *Penicillium italicum* โดยศึกษาฤทธิ์ต้านราจากไมซีเลียมของราหลังเพาะบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมีการผสมน้ำมันหอมระเหยนี้และค่า Effective Doses (ED_{50}, ppm) พบว่า ค่า ED_{50} ของรา *Penicillium digitatum* (1,015.4 ppm) และรา *Penicillium italicum* (1,490.6 ppm) (Caccioni *et al.,* 1998)

ในปี ค.ศ.2013 Hsouna และคณะได้ศึกษาฤทธิ์การต้านราของน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L. โดยวิเคราะห์ค่า growth inhibition zone (GIZ) และ minimum fungicidal concentrations (MFC) พบว่า *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans*, และ *Aspergillus fumigants* (GIZ = 15–22 mm; MFC = 0.078–1.25 mg/ml), *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, และ *Fusarium culmorum* (GIZ = 19–22 mm; MFC = 0.078–0.156 mg/ml), และ *Alternaria alternata* (GIZ = 15 ± 0.4 mm; MFC = 1.25 ± 0.8 mg/ml) ฤทธิ์ต้านราของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.นี้ที่เกิดจากสาร limonene และ (E)-nerolidol ซึ่งมีฤทธิ์ต้านราที่รุนแรง (Kim *et al*., 1995) จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงนำมาพิจารณาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Hsouna *et al.*, 2013)

2.8.3 น้ำมันหอมระเหยและการต้านอนุมูลอิสระเพื่อการถนอมอาหาร

อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเลคตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง ซึ่งรวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและอิออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ นอกจากนั้นยังรวมถึงโมเลกุลของออกซิเจนซึ่งนับว่าเป็นอนุมูลเพราะมีอิเลคตรอนจำนวน 2

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

อิเลคตรอน แต่ละอิเลคตรอนจะแยกกันอยู่เป็นอิเลคตรอนเดี่ยวในแต่ละออร์บิทัล อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้าและอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้าโดยมีทั้งประจุบวกและลบ สัญลักษณทางเคมีของอนุมูลหรืออนุมูลอิสระ คือ อิเลคตรอนเดี่ยวของอนุมูลซึ่งจะแสดงด้วยจุดในตำแหน่งข้างบนของสัญลักษณ์ทางเคมี เช่น อนุมูล $A^{\cdot}$ อนุมูล $A^{-\cdot}$ และ อนุมูล $A^{+\cdot}$ โดยเฉพาะอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จะไวต่อต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เนื่องจากอิเลคตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่อิเลคตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระ จึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ อย่างไรก็ตามยังคงมีอนุมูลอิสระบางชนิดที่มีความเสถียร ไม่ไวในการเกิดปฏิกิริยา สามารถคงอยู่ในสภาพอนุมูลได้นาน อนุมูลอิสระที่มีความเสถียรมีจำนวนน้อยชนิดมาก ตัวอย่างอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญในทางชีวภาพ ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซค์แอนอิออน ($O_2^{-\cdot}$) อนุมูลไฮดรอกซี ($^{\cdot}OH$) อนุมูลอัลคอกซี ($RO^{\cdot}$) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี($HO_2^{\cdot}$) อนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจัดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (Free Radical Chain Reaction) ซึ่งมีกลไกในการเกิดปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ

1. Initiation step

ปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ มักเกิดขึ้นจากปฏิริยาการสลายพันธะ ด้วยน้ำ (Hydrolysis) แสง (Photolysis) รังสี (Radiolysis) หรือ ปฏิกิริยารีดอกซ์ (Redox Reaction) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์อื่นๆอีกหลายชนิดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์รวมถึงโมเลกุลที่มีความไวสูงในการทำปฏิกิกิริยา เช่น Nitrix oxide (NO) และ Singlet oxygen ($^1O_2$) ซึ่งหมายถึงออกซิเจนในสถานะที่ถูกกระตุ้น (Excited state) สิ่งเหล่านี้ล้วนทำให้เกิดขั้นตอนอินนิทิเอชันของปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการ 1

$$RH \longrightarrow R^{\cdot} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

2. Propagation step

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในขั้นตอนอินนิทิเอชันจะดำเนินปฏิกิริยาต่อไปในขั้นตอนพรอพาเกชัน โดยเกิดปฏิกิริยาขึ้น 2 ทาง คือ โดยการดึงเอาอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลข้างเคียง หรือโดยการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลออกซิเจนที่อยู่ในสถานะ ground state ทำให้ได้อนุมูลอิสระตัวใหม่ ดังสมการที่ 2-4

$$RH + R^{1\cdot} \rightleftharpoons R^{\cdot} + R^1H \qquad \text{สมการที่ 2}$$

$$R^{\cdot} + {}^3O_2 \rightleftharpoons ROO^{\cdot} \qquad \text{สมการที่ 3}$$

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

$ROO + RH \rightleftharpoons ROOH + R^{\cdot}$ สมการที่ 4

3. Termination step

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น 2 อนุมูลรวมกันได้เป็นสารที่สารที่มีความเสถียร จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ดังสมการที่ 5 และ 6 (อัญชนา เจนวิถี, 2544)

$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightleftharpoons ROOR + O_2$ สมการที่ 5

$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \rightleftharpoons ROOR$ สมการที่ 6

การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

การศึกษาของ Surveswan and Cai (2006) ได้รายงานว่าโดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระหลายชนิดที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และร่างกาย มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษ ซึ่งประกอบไปด้วย อนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมากไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์ หากมีอนุมูลอิสระในปริมาณที่มากเกินสมดุลจะทำให้เซลล์ร่างกายเป็นอัตรายเสียหาย ดังนั้นเซลล์ร่างกายจะมีกลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งมีอยู่ 3 กลไก ที่ทำหน้าที่ลดผลกระทบของอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ในสภาวะปรกติกลไกเหล่านี้ถือว่าพอเพียงต่อการรักษาให้อยู่ในสภาวะสมดุลได้แม้ว่าจะอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปรกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องซึ่งไม่สามารถที่จะควบคุมให้อยู่ในสภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลและสารออกซิแดนท์มีมากเกินสมดุล (Oxidation Stress) และทำให้เกิดโรคต่างๆขึ้นในร่างกายได้

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่มีหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงสารที่สามารถยับยั้งและควบคุมอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจึงช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ไปทำลายองค์ประกอบของเซลล์ สารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งที่เป็นสารจากธรรมชาติ เช่น Amino acid, Ascorbic acid, Carotenoids, Flavonoids, Tanins และTocopherols เป็นต้น โดยทั่วไปจะแบ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. Primary Antioxidant

สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่ สารประกอบฟีนอลลิค (Phenolic compounds) ทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยการทำหน้าที่ให้

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

อิเลคตรอน นอกจากนี้ยังรวมถึงสารโทโคฟีรอลธรรมชาติและสังเคราะห์ (Natural and synthetic tocopherol) alkyl gallate BHA TBHQ และอื่นๆ

2. Oxygen Scavenger

สารในกลุ่มนี้จะเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน จึงเป็นการช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบได้ได้แก่ กรดแอสคอบิค หรือวิตามินซี

3. Secondary Antioxidant

สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่สลายโมเลกุล Lipid hydroperoxide ให้สารที่มีความเสถียร ได้แก่ dilauryl thiopropionate และ Thiopropionic acid

4. Enzymatic Antioxidant

สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุพันธ์ของออกซิเจนโดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซค์(H_2O_2) ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆซึ่งเป็น Primary antioxidant enzyme และ Auxiliary antioxidant enzyme

5. Chelating Agent หรือ Sequestrant

สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ไปจับอิออนของโลหะหนัก เช่น เหล็ก และ ทองแดง ซึ่งอิออนเหล่านี้เป็นอิออนที่ส่งเสริมและเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร ได้แก่ กรดซิตริก เป็นต้น (อัญชนา เจนวิถี, 2544).

การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity, TAC)

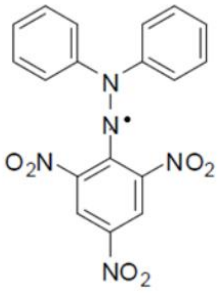
การวิเคราะห์หาความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชันของ Dejian H.และ Boxin O., (2005). ได้ศึกษาว่ามีหลายวิธี ได้แก่

1. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอะตอมไฮโดรเจน (Hydrogen atom transfer, HAT) เช่น
   - วิธี Oxygen radical absorbance capacity assay (ORAC)
   - วิธี Total radical- trapping antioxidant parameter (TRAP)
2. การวิเคราะห์จากการส่งผ่านอิเลคตรอนเดี่ยว (Electron transfer, ET หรือ SET) เช่น
   - วิธี Diphenyl-1-picryhydrazyl assay (DPPH)
   - วิธี The ferric reducing ability of plasm assay (FRAP)
   - วิธี Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

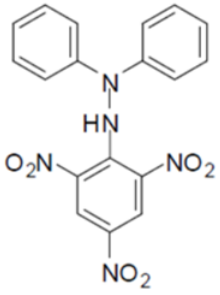
ในการศึกษานี้จะขอกล่าวถึงเฉพาะ DPPH assay 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) การวิเคราะห์นี้เป็นการวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชัน หรือการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ด้วย DPPH assay โดยใช้ reagent คือ DPPH (2,2-

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

diphenyl-1-picrylhydrazyl) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว ดังภาพที่ 2.13 ละลายในเมทานอลได้สารละลายนี้มีสีม่วง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วย microplate reader เมื่อ DPPH˙ ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในเมทานอล อะตอมไฮโดรเจนจากอนุมูลอิสระ (AH) จะถูกถ่ายให้ DPPH˙ เกิดเป็นสารใหม่ที่มีฤทธิ์เป็นอนุมูลอิสระ DPPH-H ดังภาพที่ 2.14



ภาพที่ 2.13 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (free radical)



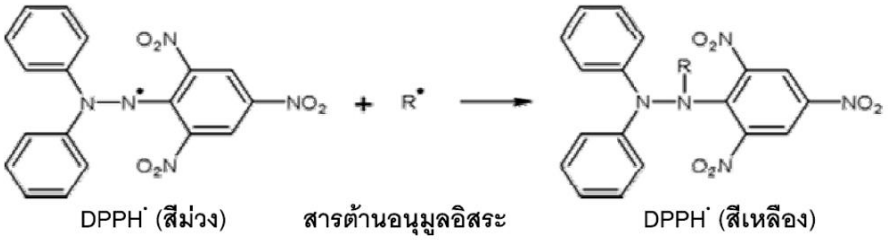
ภาพที่ 2.14 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (non radical)

โดยที่สารสีม่วงของ DPPH˙จะจางลงเป็นสีเหลือง ซึ่ง DPPH ทำปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R˙) ได้สารใหม่ที่ไม่มีฤทธิ์เป็นอนุมูลอิสระ DPPH-H ดังสมการที่ 7 และ 8

$$DPPH^{\cdot} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\cdot} \qquad \text{สมการที่ 7}$$

$$DPPH^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow DPPH\text{-}R \qquad \text{สมการที่ 8}$$

ถ้าสารละลายมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูง ความเข้มของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง ดังภาพที่ 2.15



ภาพที่ 2.15 สมการการเกิดปฏิกิริยาหลังการเติมสารต้านอนุมูล

ที่มา: Brand-William N. (1995)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ซึ่งจะนิยมรายงานผลเป็นค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) ซึ่งหมายถึง ปริมาณสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH˙ ลดลงเหลือ 50% หรือ อาจกล่าวว่าทำให้ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH 50% ซึ่งใช้ค่า EC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารละลายตัวอย่าง กับ สารละลายมาตรฐาน โดยการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน กับ % Radical Scavenging Activity (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ของสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน ซึ่งคำนวณได้ดังสมการ

การคำนวณหา % Radical Scavenging Activity

$$\% \text{ Radical Scavenging Activity} = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH (ควบคุม)

องค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ของน้ำมันหอมระเหยเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่มีโครงสร้างหลักเป็น Aromatic ring แทนที่ด้วย Hydroxy group ส่วนมากเป็นสารที่มีขั้วละลายในตัวทำละลายจำพวกแอลกฮอลล์ได้ดี โดยคุณสมบัติทั่วไปของน้ำมันหอมระเหยและสารประกอบที่มี lipophilic สูง จะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ กลไกของสารจำพวกฟีนอลที่แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระคือเมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไปแต่ในโครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง (Delocalization) ทำให้โครงสร้างเสถียร ไม่เกิดอนุมูลอิสระต่อไป ปฏิกิริยาลูกโซ่จึงสิ้นสุดลง (Pietta, 2000)

ผลงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.

ในปี ค.ศ.2011 Aazza และคณะ ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ร่วมกับน้ำมันหอมระเหยอื่นๆ ที่สกัดแยกได้ด้วยวิธีการกลั่นไอน้ำในโมร็อกโก ซึ่งพบว่ามีสาร Linalool (59 %) และ linalyl acetate (23 %) เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยนี้ โดยการวิเคราะห์การยับยั้ง lipid peroxidation โดย Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) มีค่า IC_{50} = 0.652 ± 0.125 mg/ml และการกำจัด DPPH อนุมูลอิสระที่เสถียร มีค่า IC_{50} = 4.786 ± 0.476 mg/ml (Aazza *et al*., 2013)

ในปี ค.ศ.2011 Tounsi และคณะ ได้ทำการศึกษาน้ำส้มจากการบีบสกัดของผลส้มสุก *Citrus aurantium* L กับอีกส้มสามสายพันธุ์ซึ่งเก็บเกี่ยวทั้งหมดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของตูนิเซีย น้ำผลส้มสุก *Citrus aurantium* L. ประกอบด้วยปริมาณของสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenolic contents) 86.4 ± 0.8 mg GAE/ml การสกัดกลิ่นหอมจากน้ำผลไม้ที่มีส่วนผสม

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ของ ether–pentane (1:1, v/v) และมี limonene (48.85 %) เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดใน *Citrus aurantium* L. รองลงมาคือสาร carvacrol (30.05 %) และทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *Citrus aurantium* L.โดย: (a) วิเคราะห์ DPPH: % I = 96.1; และ (b) วิเคราะห์ β-carotene bleaching method: % I = 18.27 % (Tounsi *et al.,* 2011)

ในปี ค.ศ.2013 Hsouna และคณะได้ทำการศึกษาโดยวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L. โดย 2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) และ β-carotene bleaching inhibition activity พบว่า น้ำมันหอมระเหยของ *Citrus aurantium* L. มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ Inhibitory Concentration (IC_{50}) = 1.85 µg/ml เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ ascorbic acid นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการยับยั้ง lipid peroxidation โดย β-carotene bleaching test (IC_{50} = 15.3 µg/ml) ซึ่งบ่งชี้ว่า การเติมน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. อาจมีประโยชน์ในการปรับปรุงความเสถียรของผลิตภัณฑ์อาหาร (Hsouna *et al*., 2013)

ในปี ค.ศ.2013 Jabri Karoui และ Marzouk ได้ศึกษาถึงสารประกอบธรรมชาติในเปลือกและน้ำส้มของ *Citrus aurantium* L.จากตูนิเซีย โดยได้ศึกษาการต้านอนุมูลอิสระ

(a) วิเคราะห์ความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชัน (Total Antioxidant Capacity; TAC assay) พบว่า น้ำมันหอมระหยจากที่เปลือก มีค่า 5.23 ± 0.05 mg GAE/g (gallic acid equivalents per gram) และในส่วนของน้ำส้มมีค่า 823.13 ± 17.18 mg GAE/l

(b) วิเคราะห์ DPPH assay: พบว่าสารสกัดจากเปลือกมีค่า IC_{50} เท่ากับ 190 ± 0.01 µg/ml และ จากน้ำส้มมีค่า % inhibition เท่ากับ 97.05 ± 0.38

(c) วิเคราะห์ β-carotene bleaching test พบว่าสารสกัดจากเปลือก IC_{50} เป็น 5.81 ± 0.03 mg/ml และ สารสกัดจากน้ำส้มมีค่า % Inhibition เป็น 15.92% ± 0.66 (Jabri Karoui and Marzouk, 2013)

Limonene ใช้เป็นสารแต่งกลิ่นรสในอาหารหลากหลายชนิด เนื่องจากเป็นไขมันที่ละลายน้ำได้ Limonene จึงมักถูกเติมลงในอาหารเป็นอิมัลชันน้ำมันในน้ำ ซึ่งจะมีความไม่เสถียรทางกายภาพและการเสื่อมสภาพจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน oxidative degradation ได้ง่าย จึงทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ไม่ดี Whey protein isolate (WPI) และ sodium dodecyl sulfate chitosan complex สามารถยับยั้งการเสื่อมสภาพ (oxidative deterioration) ของสารลิโมนีนในอิมัลชันน้ำมันในน้ำ และ ไปจับอิออนของโลหะหนัก ได้ โดยการรวมตัวของส่วนต่อประสานของหยดอิมัลชันประจุบวก (Djordjevic *et al*., 2008) เมื่อนำมารวมกันแล้ว ผลลัพธ์เหล่านี้แสดงว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *Citrus aurantium* L. สูงพอที่จะใช้เป็นแหล่งที่มีศักยภาพของสารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่มีฤทธิ์การต้านรา *Aspergillus* sp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของขนมปังสดโดยมีการดำเนินงานดังนี้

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 สารเคมี

แคลเซียมโพรพิโอเนต(SIGMA), ทวีน 20 (Tween-20) (SIGMA), สารละลาย DPPH (SIGMA) เข้มข้น 1 mM, สารละลาย α-tocopherol (Vitamin E) (SIGMA), น้ำมันหอมระเหยเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. (บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด, กรุงเทพฯ), น้ำกลั่น

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก.)

3.1.3 วัสดุและอุปกรณ์

ตะเกียงแอลกอฮอล์, จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาด 100X15 มม., หม้อนึ่งความดันไอน้ำ(autoclave), คอร์กบอเรอร์ (Cork borer), เข็มเขี่ยเชื้อ (Straight wire), เครื่องผสมสารละลาย, เตาอบขนมปังไฟฟ้า (oven), เครื่องนวดแป้ง, ตู้หมักแป้ง, ที่ตัดก้อนโด, ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator), แท่งเกลี่ยเชื้อ (spreader) ปลอดเชื้อทำจากแก้วหรือโลหะ, พาสเจอร์ปิเปตต์ (pasteur pipette), 96 - well plate, เครื่อง Thermo Scientific™ microplate readers.

3.1.4 ราที่ใช้ในการทดสอบ

รา *Aspergillus* sp. ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์จุลินทรีย์ (TISTR) สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่มีฤทธิ์การต้านรา *Aspergillus* sp. ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ด้วยวิธี poisoned food technique

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

3.2.1.1 เตรียมจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่มีสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.32, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ10.00 µl/ml ตามลำดับ เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 15 ml ตั้งทิ้งไว้ในอาหารแข็งเพื่อนำใช้ทดสอบต่อไป โดยจานเพาะเชื้อที่มีน้ำกลั่นเป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นสารมาตรฐานในการต้านราเป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control)

3.2.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ในจานเพาะเชื้อ

นำรา *Aspergillus* sp. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำ Cork borer ที่ปราศจากเชื้อ จุ่มลงในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 % ลนไฟและพักทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเจาะบริเวณขอบของเส้นใยรา ย้ายชิ้นวุ้นดังกล่าวไปวางลงบนจานเพาะเชื้อ ซึ่งมีส่วนผสมของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ในความเข้มข้นต่างๆหรือน้ำหรือสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนต จากนั้นนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 27 ^{o}C ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 7 วัน ทำการติดตามผลการเจริญของรา บันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา จากนั้นนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

นำน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่มีฤทธิ์การต้านรา *Aspergillus* sp. ได้ดี 2 ระดับความเข้มข้น มาทำการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านรา *Aspergillus* sp. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยเตรียมขนมปังสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ 2 ระดับความเข้มข้น เป็นส่วนประกอบของขนมปังสดเป็นชุดทดสอบ และมีแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดควบคุมเชิงบวก และน้ำเป็นส่วนประกอบเป็นชุดควบคุมเชิงลบ โดยมีการทดสอบ 2 วิธี กล่าวคือ วิธีแรก ทำการทดสอบโดยการสังเกตลักษณะปรากฏภายนอกและการเปลี่ยนแปลงของขนมปังสดในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน และ การทดสอบอีกวิธีหนึ่ง คือ ศึกษาจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น โดยทำการนับจำนวนโคโลนีราในขนมปัง ซึ่งใช้เทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 ^{o}C เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีรา (ภาคผนวก ข.)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

3.2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.

การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารทดสอบคือน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) โดยมีสารละลาย DPPH เป็น กลุ่มควบคุม (DPPH Control) ใช้สารละลาย 20 % tween 20 ในเมทานอลเป็นตัวทำละลาย ทั้งสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L., สารละลายมาตรฐาน Vitamin E และ DPPH ละลายในสารละลาย 20 % tween 20 ในเมทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้น 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 และ 200.00 µg/ml และ โดยการนำสารละลาย DPPH 1.0 mM ในเมทานอล และ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E มีความเข้มข้น 31.25, 62.50, 125.00 และ 250.00 µg/ml ทำการเติมสารทั้งหมดลงใน 96 – well plate (ปริมาตร 200 µl ต่อ well) ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Thermo Scientific™ microplate readers.

ความสามารถในการต้านออกซิเดชั่น หรือ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.และ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E รายงานเป็นค่า 50 % Effective Concentration (EC_{50}) ซึ่งคือความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. หรือ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E ที่ทำให้ปริมาณของ DPPH ลดลง 50 % หรืออาจกล่าวว่าทำให้ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH 50 % ซึ่งใช้ค่า EC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารละลายตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.กับ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E การหาค่า EC_{50} ได้จากการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. หรือสารละลายมาตรฐาน Vitamin E และ % Radical Scavenging Activity (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. หรือ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E ซึ่งคำนวณได้ดังสมการ

$$\% \text{ Radical Scavenging Activity} = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ผสมกับ สารละลาย DPPH Radical

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย 20 % tween20 ผสมกับสารละลาย DPPH Radical

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

3.2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านรา *Aspergillus* sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทั้ง 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ย และความแปรปรวนในแต่ละชุดการทดลอง ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$ โดยใช้ Duncan's Multiple Range test (DMRT)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยมีผลการทดลอง ดังนี้

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ในสภาวะหลอดทดลอง (*in vitro*)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. เมื่อนำสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ที่ระดับความเข้มข้น 0.32, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml ตามลำดับ มาทดสอบฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.

เวลา (วัน) / ความเข้มข้น (µl/ml)	ชุดทดลอง		
	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (cm)		
	3	5	7
0.32	3.00 ± 0.17^{c}	4.30 ± 0.19^{c}	6.32 ± 0.20^{d}
0.63	2.88 ± 0.02^{bc}	4.32 ± 0.11^{c}	5.66 ± 0.87^{cd}
1.25	2.73 ± 0.1^{bc}	4.05 ± 0.53^{c}	6.12 ± 0.12^{cd}
2.50	2.68 ± 0.1^{bc}	3.75 ± 0.11^{bc}	5.43 ± 0.09^{bcd}
5.00	2.40 ± 0.24^{b}	3.15 ± 0.11^{ab}	4.82 ± 0.10^{abc}
10.00	1.63 ± 0.09^{a}	2.39 ± 0.03^{a}	3.51 ± 0.12^{a}
สารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต	1.50 ± 0.23^{a}	2.29 ± 0.28^{a}	4.30 ± 0.00^{ab}
สารละลายน้ำ	2.98 ± 0.05^{c}	4.49 ± 0.16^{c}	6.85 ± 0.07^{d}

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

หมายเหตุ. 1. ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

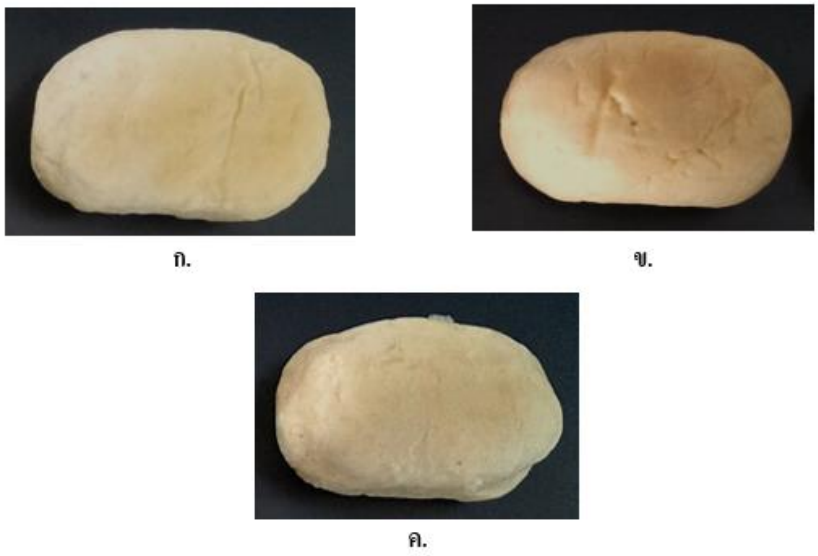
2. ตัวอักษรยก หมายถึง วันที่ในแถวแนวตั้งเดียวกันที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.1 พบว่าที่ระยะเวลาของการบ่มวันที่ 3 สารละลายของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ระดับความเข้มข้น 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml ตามลำดับ สามารถต้านรา *Aspergillus* sp. ได้ โดยวัดขนาดโคโลนีของราได้ 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 และ 1.63 ± 0.09 cm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (2.98 ± 0.05 cm) และพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ได้ใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต 0.2 % ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวกโดยมีโคโลนีของราได้เท่ากับ 1.50 ± 0.23 cm ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลายน้ำที่เป็นชุดควบคุมเชิงลบ ($p \leq 0.05$)

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

จากการทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์การต้านรา *Aspergillus* sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า สารละลายของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml สามารถออกฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ได้ดี ดังนั้นจึงได้เลือกสารละลายของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น มาทำการทดสอบประสิทธิภาพการต้านรา *Aspergillus* sp. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยการเตรียมขนมปังสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml เป็นส่วนประกอบของขนมปังสดและใช้สารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดควบคุมเชิงบวก การสังเกตลักษณะปรากฏภายนอกของขนมปังสด เป็นเวลา 5 วัน พบว่า ในระหว่างการเก็บรักษาวันที่ 1-4 ลักษณะปรากฏภายนอกของขนมปังสดไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ และต่อมาในวันที่ 5 มีจุดสีดำขนาดเล็กบนผิวขนมปังแต่จำนวนของจุดสีดำมีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำซึ่งเป็นชุดควบคุมเชิงลบโดยจุดสีดำเหล่านี้มีขนาดใหญ่ขึ้นและทำให้ขนมปังสดมีกลิ่นเหม็นหืนมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่ชุดควบคุมเชิงบวกที่มีส่วนผสมของแคลเซียมโพรพิโอเนตไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บนผิวหน้าขนมปังสด ดังภาพที่ 4.1

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์



ภาพที่ 4.1 การเจริญของรา *Aspergillus* sp. บนขนมปังในวันที่ 5 ของการเก็บรักษา

หมายเหตุ. ก. ขนมปังที่มีสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนต

ข. ขนมปังที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 5.00 µl/ml

ค. ขนมปังที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml

และ เมื่อทำการนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นซึ่งใช้เทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 °C เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีรา พบว่าในช่วงระหว่าง 1-3 วันของการเก็บรักษานั้นไม่พบการเจริญของรา และต่อมาในวันที่ 4 พบว่าขนมปังที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 5.00 µl/ml มีจำนวนเฉลี่ยของราเท่ากับ 8.20 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g) ในขณะขนมปังที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตไม่พบการเจริญของรา

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

เมื่อทำการวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ระดับความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/ml ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 517

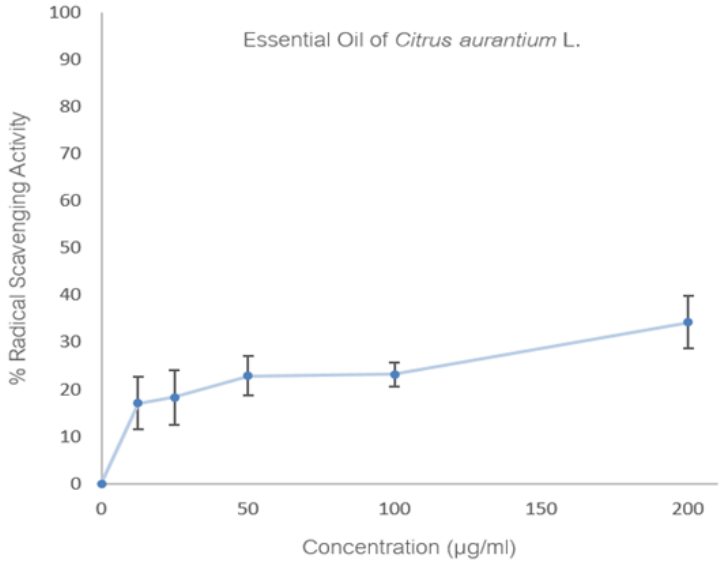
DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

nm โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำมาคำนวณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging Activity) ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และเมื่อนำมาจัดทำกราฟเส้นตรง ระหว่างค่า % Radical Scavenging Activity กับ ค่าความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) พบว่า ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระของสารละลายตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. นี้มีค่าต่ำมาก (EC_{50} > 1,000 µg/ml) ดังภาพที่ 4.2 (ภาคผนวก ค.)

ตารางที่ 4.2 ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging Activity) ของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.

ความเข้มข้น (µg/ml)	**ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging Activity) ของสารละลายตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.**
12.50	17.1±5.6
25.00	18.3±5.8
50.00	22.9±4.13
100.00	23.2±2.5
200.00	34.2±5.6

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. กับ ค่า % Radical Scavenging Activity โดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

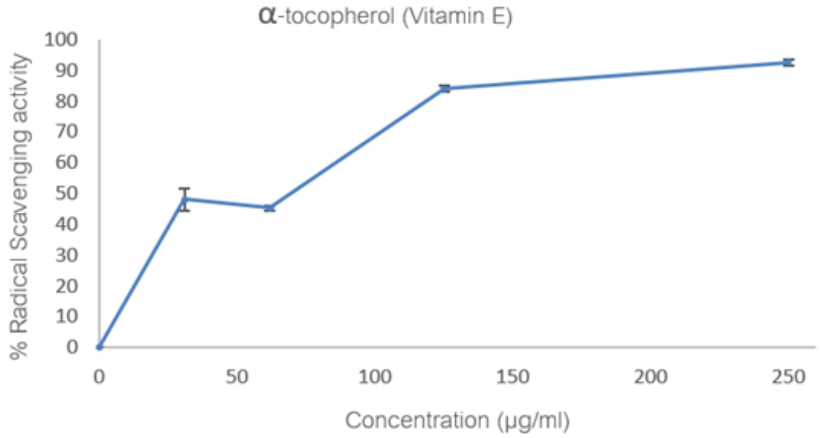
จากการทดสอบพบว่า แต่ละความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้น้อยมาก และในการทดสอบร้อยละการยับยั้งของสารละลายตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. พบว่าความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน มีผลทำให้ร้อยละของการยับยั้งมีค่าต่างกัน

เมื่อวัดการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่ระดับความเข้มข้น 31.25, 62.50, 125.00 และ 250.00 µg/ml ตามลำดับ ที่ความยาวคลื่น 517 nm โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากนั้นนำมาคำนวณร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging Activity) ของสารละลายมาตรฐาน Vitamin E และนำมาหาค่าเฉลี่ย ได้ค่าตามตารางที่ 4.3 และเมื่อนำ มาจัดทำกราฟเส้นตรงระหว่างค่า % Radical Scavenging Activity กับ ค่าความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) พบว่าสารละลายมาตรฐาน Vitamin E มีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml ดังภาพที่ 4.3 (ภาคผนวก ค.)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ตารางที่ 4.3 ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging Activity) ของสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E)

ความเข้มข้น (µg/ml)	**ร้อยละการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH (% Radical Scavenging Activity) ของสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E)**
31.25	48.1±3.68
62.50	45.2±0.91
125.00	83.9±0.96
250.00	92.6±1.02



ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ที่เป็นเส้นตรงของสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) กับ ค่า % Radical Scavenging Activity โดยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

รา *Aspergillus* sp. เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ขนมปังสด และเนื่องด้วยน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีคุณสมบัติในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp.ของ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml มีประสิทธิภาพต้านการเจริญของรา *Aspergillus* sp. ได้ดี และการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านรา *Aspergillus* sp.ของ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีประสิทธิภาพในการต้านรา *Aspergillus* sp. ได้สูงสุดในช่วงระยะเวลาการศึกษา 4 วันของการเก็บรักษาขนมปังสด ซึ่งให้ผลได้ใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนตที่นิยมใช้ในการต้านราในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด และผลการศึกษาฤทธิ์การต้านออกซิเดชั่นด้วยวิธี DPPH assay พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระได้ต่ำมาก (EC_{50} > 1,000 µg/ml) เมื่อเทียบกับกับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml

5.2 อภิปรายผล

5.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าที่ระยะเวลาของการบ่มวันที่ 3 สารละลายน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml สามารถต้านการเจริญของโคโลนีรา *Aspergillus* sp. ได้ 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 และ 1.63 ± 0.09 cm ตามลำดับ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 2.50 µl/ml มีฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ไม่แตกต่างจากสารละลายน้ำซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (2.98 ± 0.05 cm) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp. ได้ไม่แตกต่างกันกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

0.2 % ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราได้เท่ากับ 1.50 ± 0.23 cm ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Knobloch *et al.* (1988) ว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีองค์ประกอบของสารเคมีหลายๆกลุ่มซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และทำลายผนังเซลล์จุลินทรีย์ และ Lanciotti *et al.* (2004) พบว่า สารประกอบออกซิจิเนตเป็นสารที่มีสมบัติในการต้านราได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดย Caccioni *et al.* (1998) รายงานว่า 60 % ของน้ำมันหอมระเหยสามารถต้านราสารประกอบบางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านราได้ดี เช่น รา *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus funigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus parasiticus* เป็นต้น และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Viuda-Maros *et al.* (2008) ที่ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากเลมอน (*Citrus lemon* L.) ส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata* L.) เกรปฟรุต (*Citrus paradise* L.) และส้ม (*Citrus sinensis* L.) ต่อการเจริญเติบโตของราที่มีความสัมพันธ์กับการเน่าเสียของอาหาร ได้แก่ *A. niger, A. flavus, Penicillium chrysogenum* และ *Penicillium verrucosum* ด้วยวิธี agar dilution พบว่าน้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการต้านราทุกชนิด โดยน้ำมันหอมระเหยจากส้มมีประสิทธิภาพในการต้านรา *A. niger* มากที่สุด และน้ำมันหอมระเหยจากส้มแมนดารินมีประสิทธิภาพในการลดการเจริญเติบโตของรา *A. flavus* ขณะที่เกรปฟรุตสามารถต้านรา *P. chrysogenum* และ *P. verrucosum* ได้ดี เช่นเดียวกันกับ Velázquez *et al.* (2013) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านรา *A. flavus* ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม (*Citrus sinensis* var. Valencia) ด้วยการประยุกต์ใช้แบบเติมและแบบสัมผัสไอระเหย พบว่าสารประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม คือ limonene, β-myrcene, β-pinene, α-pinene ตามลำดับ โดยวิธีการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (16,000 mg/l) จะให้ผลยับยั้งที่รวดเร็วกว่า ในขณะที่วิธีการสัมผัสไอระเหย ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (8,000 mg/ EO l /air) จะให้ผลการยับยั้งที่มีประสิทธิภาพ

5.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านรา *Aspergillus* sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสดโดยการเตรียมขนมปังสดที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml เป็นส่วนประกอบและใช้สารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดควบคุมเชิงบวก การสังเกตลักษณะปรากฏภายนอกและการเปลี่ยนแปลงของขนมปังสดในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ในระหว่างการเก็บรักษาวันที่ 1-4 ลักษณะปรากฏภายนอกของขนมปังสดไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ แต่ในวันที่ 5 พบจุดสีดำขนาดเล็กบนผิวขนมปังแต่จำนวนของจุดสีดำมีน้อยกว่าน้ำซึ่งเป็นชุดควบคุมเชิงลบ โดยจุดสีดำเหล่านี้มีขนาดใหญ่ขึ้นและทำให้ขนมปังสดมีกลิ่นเหม็นหืนมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่ชุดควบคุมเชิงบวกที่มีส่วนผสมของแคลเซียมโพรพิโอเนตไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บนผิวหน้าขนมปังสด และเมื่อนับจำนวนโคโลนีของราที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ระหว่าง 1-3 วันของการเก็บรักษานั้น ไม่พบการเจริญของของรา แต่หลังจากเก็บรักษาขนมปังเป็นเวลา 4 วัน พบว่าขนมปังที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ที่ความเข้มข้น 5.00 µl/ml มีจำนวนเฉลี่ยของราเท่ากับ 8.20 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g) ในขณะที่ขนมปังที่มีน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนต ไม่พบว่าการเจริญของรา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kurita *et al.*(1981) รายงานว่าส่วนประกอบต่างๆในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. เช่น aliphatic aldehydes มีพันธะคู่ตั้งแต่หนึ่งพันธะขึ้นไปที่หมู่คาร์บอนิล เช่น Perillaldehyde ซึ่งมีฤทธิ์ต้านราสูงกว่า tertiary alcohol เช่น Linalool ซึ่งไม่ต้านการเจริญของราใดๆ และส่วนหนึ่งอาจมาจากการมี monoterpenes ปริมาณสูงอยู่ใน น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. สารระเหยที่ปล่อยออกมาจากน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.บนพื้นผิวของการเจริญเติบโตของเส้นใย มีผลกระทบต่อการสร้างสปอร์, การเปลี่ยนผ่านไปสู่การผลิตสปอร์, การรับรู้ และ กลไกการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นการพัฒนาการสืบพันธุ์ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการต้านราของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.และการศึกษาของ Debonne *et al*. (2018) รายงานถึงการใช้น้ำมันหอมระเหยที่มีฤทธิ์ในการต้านราเพื่อเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ขนมปังโดยศึกษาถึงประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากโรสแมรี่ที่อยู่ในรูปของไมโครเอ็นแคปซูเลชั่นในก้อนแป้งโด และโดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของพืชตระกูลส้มนี้จะมีสารประกอบที่มีความหลากหลายแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุกรรม สิ่งแวดล้อมและการดูแลรักษา นอกจากนั้นยังพบว่า น้ำมันหอมระเหยที่มาจากแต่ละส่วนของพืชที่แตกต่างกันมีองค์ประกอบที่ต่างกันและประสิทธิภาพของการต้านราของน้ำมันหอมระเหยนั้น ยังขึ้นอยู่กับวิธีการนำไปใช้อีกด้วย (Lota *et al.,* 2000)

5.2.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)โดยการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.แสดงฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ที่ต่ำมาก ซึ่งมีค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) > 1,000 µg/ml. จึงกล่าวได้ว่าสารละลายตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีความสามารถในการต้านออกซิเดชั่นได้ต่ำมาก เมื่อเทียบกับ สารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงมากด้วยค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml จากผลการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ทำปฏิกิริยาให้อะตอมไฮโดรเจน ได้เป็นสารใหม่ DPPH-H นั้นน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. สามารถทำให้ DPPH ที่เป็นสารสีม่วงให้จางลงเป็นสีเหลืองได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Choi *et*

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

al. (2000) รายงานว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำมันจากส้ม 34 ชนิด อยู่ระหว่าง 17-64 % เนื่องมาจากในส่วนของเปลือกน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. นี้ประกอบด้วยสาร Limonene ในสัดส่วนที่มากกว่า 90 % เป็นส่วนใหญ่ และมี β-myrcene ซึ่งสารทั้งสองนี้ไม่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดอนุมูอิสระ และการกำจัดอนุมูลอิสระจะมีค่าสูงขึ้นก็ต่อเมื่อในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีส่วนประกอบของสาร geraniol, terpinolene และ γ-terpinene รายงานของ Sarrou *et al*. (2013) ได้ศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ในส่วนของเปลือก (19.29 %), ใบอ่อน (22.79 %), ดอก (53.98 %) และใบแก่ (94.36 %) ตามลำดับ ซึ่งใบแก่นี้มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH มากที่สุด อาจเกิดจากการสูญเสียน้ำในใบแก่ซึ่งมีผลต่อการสะสมสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เข้มข้นมากขึ้นในขณะที่มีการเจริญเติบโตของใบแก่ลดลงเรื่อยๆ และอีกประการหนึ่ง คือ ส่วนประกอบบางชนิดในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ที่มีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน การที่ใบแก่และดอกแก่ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดอาจเกิดจากการที่ส่วนใบแก่มี α-terpinolene และ nerol ที่ส่วนของดอกแก่มีส่วนของ γ-terpinene, nerol และ geraniol จากการศึกษาของ Anwar *et al*. (2016) ได้รายงานถึงทางพฤกษเคมี (Phytochemical) ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่สกัดแบบบีบเย็น พบว่า มี Monoterpene, Limonene อยู่ในปริมาณมากถึง 65–97 % ของน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด โดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของพืชตระกูลส้มนี้จะมีสารประกอบที่มีความหลากหลายแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม ภูมิประเทศของแหล่งที่ปลูก วิธีการสกัด เวลาในการเก็บเกี่ยว และการดูแลรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ou *et al*. (2015) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยของ *citrus paradisi* ที่ได้มาจากการสกัดแบบบีบเย็นโดยส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ต่ำกว่า 20 % ของน้ำมันหอมระเหยของ *citrus paradisi* ที่ได้มาจากการสกัดแบบกลั่น โดยมีค่า IC_{50} > 40 µg/ml และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Aazza *et al.* (2010) ถึงการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.โดยการสกัดแบบไอน้ำ ในน้ำมันหอมระเหยนี้ จะมีสาร Linalool (59 %) และ linalyl acetate (23 %) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระวัดได้จาก ค่า DPPH (IC_{50} = 4.786 ± 0.476 mg/ml)

ดังนั้น น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ในการต้านรา *Aspergillus* sp. ได้สูงสุด ในช่วงระยะเวลาการศึกษา 4 วันของการเก็บรักษาขนมปังสด ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต และ น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชั่นได้ต่ำ อย่างไรก็ตามน้ำมันหอมระเหย

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

จากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมยา ด้วยว่าปริมาณสาร Limonene ที่มีมากในน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. นี้ถูกใช้กันอย่างมากในการเป็นสารให้กลิ่นของอาหาร เพราะสามารถละลายในไขมันได้ดีและยังถูกใช้มากในการเป็นน้ำมันในน้ำของอีมัลชั่น (Djordjevic *et al.,* 2008) ซึ่งจะมีประโยชน์มากในการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหาร (Hsouna *et al.,* 2013) โดยน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มได้รับพิจารณาจากองค์การอาหารและยา (FDA) ว่า สามารถใช้เติมลงไปในอาหารได้อย่างปลอดภัย เนื่องด้วยน้ำมันหอมระเหยนี้ได้รับการบรรจุชื่อในบัญชีอาหารที่รู้จักกันดีว่ามีความปลอดภัยในการบริโภค (Generally Recognized As Safe; GRAS) ของคณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ทำให้น้ำมันหอมระเหยเป็นทางเลือกหนึ่งของผู้ผลิตและผู้บริโภคที่เน้นถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์และความปลอดภัยในการบริโภคเป็นสำคัญ

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay) โดยอนุมูล $DPPH^{\cdot}$ เป็นอนุมูลไนโตรเจนที่คงตัว ซึ่งจะเห็นได้จากโครงสร้างทางเคมีของ $DPPH^{\cdot}$ ที่แสดงถึงอิเล็คตรอนเดี่ยวของอนุมูลอิสระจะถูกบดบังด้วยวงเบนซีน 3 วง และหมู่ไนโตร ทำให้สารต้านอนุมูลที่มีฤทธิ์ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากำจัดอนุมูลหรือเกิดปฏิกิริยาช้ากว่าความเป็นจริง อนุมูล $DPPH^{\cdot}$ มีสีม่วงอยู่ในรูปอนุมูลอยู่แล้ว ซึ่งไม่ต้องทำปฏิกิริยาเพื่อให้เกิดอนุมูล (Dejian H. and Boxin O., 2005) DPPH assay เป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็ว ง่ายต่อการวิเคราะห์ ให้ความถูกต้อง และ นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลของสารต้านอนุมูลจากธรรมชาติ แต่ไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดขึ้นจริง ดังนั้น ควรมีการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยในวิธีอื่นด้วย

5.3.2 จากคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งสามารถใช้ทดแทนวัตถุกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆได้ แต่ยังมีข้อจำกัดเรื่องการมีกลิ่นรสเฉพาะที่เข้มข้นหรือฉุนและสมบัติในการระเหยได้อย่างรวดเร็ว จึงควรศึกษาและมีการพัฒนาเทคโนโลยีเพิ่มเติมอาทิ การใช้ร่วมกับสารธรรมชาติอื่นๆ เช่น วานิลลิน นาทาไมซิน หรือไนซิน การห่อหุ้มด้วยแคปซูลในระดับนาโน หรือ การใช้ในชั้นของฟิล์มเคลือบบริโภคได้เพื่อช่วยควบคุมอัตราเร็วในการระเหย

5.3.3 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารธรรมชาติอื่นๆ ที่สามารถทนต่อความร้อนสูงได้ดีในกระบวนการผลิต เช่น ผลิตภัณฑ์ขนมอบ หรือผลิตภัณฑ์อื่น ที่ต้องใช้ความร้อนสูง เพื่อช่วยในการถนอมอาหารและลดการใช้สารเคมีในผลิตภัณฑ์อาหาร

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

5.3.4 ควรมีการศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นเพิ่มเติม

5.3.5 ควรมีการศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคในการใช้น้ำมันหอมระเหยในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งด้านรสชาติ สี กลิ่น และภาพรวมที่สามารถยอมรับได้

5.3.6 ควรมีการศึกษาลักษณะทางกายภาพ เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส ความเป็นกรด-ด่าง และการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส หลังจากการใช้น้ำมันระเหยในผลิตภัณฑ์อาหาร

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บรรณานุกรม

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กิตติมา โสนะมิตร์ และวันทนีย์ ขำเลิศ. (2552). ปริมาณโซเดียมเบนโซเอต และสีอินทรีย์สังเคราะห์ในอาหาร. *วารสารกรมวิทย์ พ. 51*(2), 170-175.

เกรียงศักดิ์ พูนสูข. (2540). สารพิษจากเชื้อรา: อดีต ปัจจุบัน และอนาคต. สารพิษเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์. ใน *การประชุมวิชาการ 80ปีแห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คณะสัตวแพทย์ศาสตร์.*(น. 1-11). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เกศรินทร์ รามณี. (2552). *การศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอลฟาทอกซินของเชื้อรา Aspergillus flavus และ Aspergillus parasiticus โดยใช้สารสกัดจากพืชตระกูลส้ม.*[วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยศรีสงขลานครินทร์]. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. https://kb.psu.ac.th

คมสันต์ หุตะแพทย์. (2545). เครื่องสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่น. *วารสารเกษตรธรรมชาติ.* (ม.ป.ท.) 10:10-13.

จาตุรงค์ จงจีน. (2555). ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรในการยับยั้งเชื้อราที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียในขนมปัง. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (Agricultural Science Journal) 43*(2), 145-148

จิตธนา แจ่มเมฆ และอรอนงค์ นัยวิกุล. (2560*). เบเกอรี่เทคโนโลยีเบื้องต้น (Basic Banking Science and Technology)* (พิมพ์ครั้งที่ 13). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฐาปนีย์ หงส์รัตนาวรกิจ. (2550). *น้ำมันหอมระเหยและการใช้ในสุคนธบำบัด.* โรงพิมพ์วิฑูรย์การปก.

ณัฐดนัย หาญการสุจริต. (2559). *เอกสารประกอบการสอนวิชาการบรรจุในอุตสาหกรรมอาหาร.* คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงฤทัย ธำรงโชติ, วิภาวัน จุลยา, และรุ่งทิวา วงศ์ไพศาลฤทธิ์. (2555). *การพัฒนาขนมปังแซนวิชจากแป้งข้าว*(รายงานผลการวิจัย). มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ.

ธิรภา แสนเสนา และนพดล กิตติวราฤทธิ์. (2536). *ฤทธิ์ต้านเชื้อและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสกัดจากผิวผลพืชตระกูลส้ม*(รายงานผลการวิจัย). มหาวิทยาลัยมหิดล.

นฤมล มาแทน. (2560). *ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร.* วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

นิจศิริ เรืองรังษี (2550). ความรู้ทั่วไปของน้ำมันหอมระเหย ใน เทวัญ ธานีรัตน์ และคณะ (บ.ก.), *ตำราวิชาการสุคนธบำบัด*. (น.11-30). โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.

บุษกร อุตรภิชาติ. (2558). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. (พิมพ์ครั้งที่ 6). มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ปิยวรรณ บูรณะพิมพ์ และวริพัสย์ อารีกุล. (2555). ผลการยับยั้งราของเบนโซเอตและซอร์เบตต่อ *Penicillium citrinum* ที่คัดแยกจากเส้นก๋วยเตี๋ยว. ใน *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 49*.(น. 465-472). (ม.ป.พ.)

พนิดา รัตนปิติกรณ์. (2561). น้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชและการประยุกต์ใช้เป็นสารต่อต้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม 13*(2), 1-10.

พรพรรณ ดีระพัฒน์. (2548). ผลของการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศต่อโรคติดเชื้อ. *วารสารสาธารณสุขศาสตร์*. *35*(1), 56-62.

พรรณกร อิ่มวิทยา. (2540). *เชื้อราก่อโรคในคน*. กรุงเทพฯ: สารมวลชนจำกัด.

พิมพร ลีลาพรพิสิฐ. (2545). น้ำมันหอมระเหยและการรักษา. ใน คณะเภสัชศาสตร์(บ.ก.), *สุคนธบำบัด (Aromatherapy)* (น. 14-34). ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิภาวัน จุลยา. (2549). *เอกสารประกอบการสอนวิชาเบเกอรี่*. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพ วิทยาเขตพระนครใต้.

ศรวนีย์ มณีรัตน์ และเฉลิมพร ทองพูน. (มปป.) การวิเคราะห์ปริมาณกรดซาลิไซลิก กรดเบนโซอิก และกรดซอร์บิก ในน้ำผลไม้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. ใน *รายงานสืบเนื่องการประชุมสัมมนาวิชาการระดับชาติ เครือข่ายบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 17*. (น.2715-2726). (ม.ป.พ.)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. (2548). *น้ำมันหอมระเหยไทย*. เซเว่นกรุ๊ป.

สมจิตร อยู่เป็นสุข. (2552). *ราวิทยา = Mycology*. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สามารถ เศรษฐวิทยา สุขะวัฒน์ ทองเหลี่ยว และรศ.ดร.รวี เสรฐภักดี. (2559). ความหลากหลายของสายพันธุ์พืชตระกูลส้ม. สืบค้น 12 กรกฎาคม 2564, จาก http://www.hort.ku.ac.th/2016/index.php/topmenu-news/2016-09-30-05-07-32/91-orange

สุขใจ ชูจันทร์ และพรวิสาข์ ยุ่นประยงค์. (2551). การผลิตกรดโพรพิโอนิกเพื่อยับยั้งเชื้อราและยีสต์โดยเชื้อ *Propionibacterium acidopropionici* ATCC 4965 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยใช้หางนมเป็นซับสเตรต. ใน *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาวิทยาศาสตร์*.(น.709). (ม.ป.พ.)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

สุรางค์รัตน์ แดงจิระ (2558). *องค์ประกอบทางเคมีการต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของบอนหอม* (รายงานผลการวิจัย). คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

อนงค์ บิณฑวิหค. (2546). *สารพิษจากเชื้อราแอลฟาทอกซิน*. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรพิน เกิดชูชื่น (2554). *Plant Essential Oil.* มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อัจฉรา พัฒนเดช. (2543). *เชื้อรา Apergillus ที่สร้างแอลฟาทอกซินในพืชสมุนไพรตากแห้ง*. [วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์]. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. http://kb.psu.ac.th/psukb/handle/2553/1898

อัญชนา เจนวิถี. (2544). *การตรวจหาและบ่งชี้ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระจากผักพื้นบ้านและสมุนไพรไทย* [วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่], มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. http://cmuir.cmu.ac.th/jspui/handle/6653943832/33273

อัมรา ชินภูติ และประวัติ ตันบุญเอก. (2543). การวิเคราะห์การปนเปื้อนของสาพิษแอลฟาทอกซินในผลิตผลทางการเกษตร โดยใช้วิธี ELISA และวิธีการลดปริมาณสารพิษ. ใน*การประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา*. (น.1-14) (ม.ป.พ.)

อุดมลักษณ์ สุขอัตตะ, วิชัย หฤทัยธนาสันติ์ และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. (2545). *การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืชสมุนไพรบางชนิดในการยับยั้งเชื้อราที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์ขนมอบ* (รายงานผลการวิจัย). ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โอภา วัชระคุปต์ (บ.ก.). (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระในธรรมชาติ* (พิมพ์ครั้งที่1). พี.เอส. พริ้นท์.

The Plant List. (2013). "*Citrus × aurantium* L." สืบค้น 5 กรกฎาคม 2564, จาก http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2723957

ภาษาต่างประเทศ

Aazza, S., Lyoussi, B, & Miguel, M.G., (2011). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. *Molecules 16* (9), 7672–7690.

Al Azzam, K. M., Bahruddin, S., Hashim, N. H., Rahim, A. R., & Talib, K. M. (2010). Determination of propionates and propionic acid in bakery products using as chromatography. *International Food Research Journal. 17*, 1107-1112.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Anwar S., N. Ahmed, A. Speciak, F. Cimino, & A. Saija. (2016). Bitter Orange (*Citrus aurantium* L.) Oils. In V.R. Preedy. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety.* (pp. 259-268). Academic Press, Massachusetts.

Atares, L., & Chiralt, A. (2016). Review: Essential oil as additives in biodegradable films and coating for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology. 48*, 51-62.

Banwart GJ. (1989). *Basic Food Microbiology*, New York, Van Nostrand Reinhold.

Brand-Williams N., & Cuvelier M.E. (1995). *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. 28*, 25-30. Academic Press.

Bust, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. *International Journal of Food Microbiology. 94*, 223-253.

Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Renda, A., & Ruberto, G. (1998). Relationship between volatile component of citrus fruit oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *International Journal Food Microbiology*. *43*, 27-36.

Calo, J.R., Crandall, P., O'Bryan, C.A., & Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food system: A review. *Food Control*. *54*, 111-119.

Carson, C. F, & Riley, T. V. (1998). *Antimicrobial activity of the major component of the essential oils of Melaleuca alterniforlia*. *Journal of Applied Microbiology. 78*: 264-269.

Chalie, M.L., & Watkinson, S. (1994). *The fungi*. Academic Press. London.

Choi, H.S., H. S. Song, H. Ukeda, & M. Sawamura. (2000). Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *48*: 4156-4161.

Cox, D.S., Mann, M.C., Markham, L. J., Bell, C. H., Gustafson, E. J., Warmington, R. J., & Wyllie, G.S. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alterniforlia (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology. 88*, 170-175.

Debonne, E., Van Bockstaele, F., Samapundo, S., Eeckhout, M., & Devlieghere, F. (2018). The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. *Journal of Essential Oil Research.* DOI: 10.1080/10412905.2018.148 6239.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Dejian H., & Boxin O., (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. *53*, 1841-1856.

Del-Rio, A. J., Fuster, D. M., Gomez, P., Porras, I., Lidon, G. A., & Ortuno, A. (2004). Citrus limon a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chemistry. 84*: 457-461.

Djordjevic, D., Cercaci, L., Alamed, J., McClements, D.J., & Decker, E.A., (2008). Chemical and physical stability of protein and gum arabic-stabilized oil- in-water emulsions containing limonene. *Journal of Food Science. 73* (3), C167–C172.

Dongyan, H., Wethua, Z., & Ruthua, H. (1998). Separation and determination of chemical constituents in the volatile oil of traditional Chinese crude drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 17*, 1423-1426.

Dugo G., Verzera A., Stagno, S. I., Controneo A., & Ficarra, R., (1993). On the genuineness of citrus essential oil. Part XLI. Italian bitter orange oil: composition and detection of contamination and addition oil of terpenes of sweet orange and lemon. *Flavour and Fragrance Journal. 8*, 25-33.

Fathi, E., & Sefidkon, F. (2012). Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of Eucalyptus sargentii. *Journal of Agricultural Science and Technology. 14*(5), 1035-1042.

Fisher, K., & Phillips, C., (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential ois and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Lisetria monocytogenese*, *Bacillus cereus* and *staphylococcus* in vitro and food systems. *Journal of Applied Microbiology. 101*(6), 1232-1240.

Frazier, W.C. (1958). *Food MiCrobioly* (2nd ed). McGRAW-HILL Book Company. New York.

Goni, P. Lopez, P. Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Beoerril, R., & Nerine, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry. 116*(4), 982-989.

Gonzalez, N. C., Sanchez, F., Quintero, A., & Usubillaga, A. (2002, April 30). Chemotaxonomic value of essential oil compounds in citrus species. *International conference on medical and aromatic plants. Possibilities and limitations of medicinal aromatic plants production in the 21st century*, Hungary.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Gupta, C, A.P. Garg, C.R. Unoyal, & A. Kumari. (2008). *Antimicrobial activity of some herbal oils against common food-borne pathogens*. *African Journal of Microbiology Research. 2*, 258-26

Guynot, M. E., MarÍn, S., Setó, L., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2005). Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. *Food Science and Technology International. 11*(1), 025-8.

Hsouna, A.B., Hamdi, N., Halima, N.B., & Abdelkafi, S., (2013). Characterization of essential oil from *Citrus aurantium* L. flowers: antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Oleo Science. 62* (10), 763-772.

Hyldgarrd, M., Mygind, T., & Meyer, RL., (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology. 3*, 12.

Jabri Karoui, I., & Marzouk, B., (2013). Characterization of bioactive compounds in Tunisian bitter orange (Citrus aurantium L.) peel and juice and determination of their antioxidant activities. *BioMed Research International.* 345415.

Kettenring, M.M., & Geegange, M.V., (2010). Aroma-vital cusine. In Baser, K.H.C.& Buchbauer, G.(Eds.), *Handbook of Essential Oils Science, Technology and Application*. (pp. 863-880). CRC Press, Boca Raton.

Kim, J., Marshall, M., & Wei, C.I., (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43* (11), 2839–2845.

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, N., Weis, H.M., & Weigand, N. (1988). Mode of action of essential oil components on whole cell of bacteria and fungi in plate tests. In P. Schreier (ed.), *Bioflavour*. (pp. 287-299). Walter de Gruyther, Berlin.

Krish, J., Tserennadmid, R., & Váölgyi, C. (2011). Essential oils against yeasts and moulds causing food spoilage. Science against microbial pathogens: *communicating current research and technological advances*, 1135-1142.

Kurita, N., M. Miyaji, R. Kurane, & Y. Takahara. (1981). Antifungal Activity of Components of Essential Oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, *45*(4), 945-952.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Kurtzman C. P., Horn B. W., & Hesseltine C. W. (1987). Aspergillus nomius, a new aflatoxin-producing species related to Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. *Antonie Van Leeuwenhoek 53*, 147–158.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, E. M., & Gardini, F. (2004). Use of natural aroma compound to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science and Technology. 15*, 201-208.

Lota, M. L., Serra, D. D., Tomi. F., & Casanova, J. (2000). Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulate Blanco*. *Journal of Biochemical Systematics and Ecology. 28*, 61-78.

Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Aparnathi, K. D., & Prajapati, J. B. (2016). Essential oils of herbs and spices: their antimicrobial activity and application in preservation of food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 5* (5), 885-901.

Masada, Y. (1976). Analysis of essential oils by gas chromatography and mass spectrometry. p.1, 13-14, 35, 0, 150, 2-2. New York: Wiley.

McGuinness, H. (2003). Aromatherapy therapy basics. (2nd ed.). Hodder & Stoughton, London.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017*).* Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals. 10*, 86.

Ou, M. C., Y. H. Liu, Y. W. Sun, & C. F. Chan. (2015). The Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Cold-Pressed and Distilled Essential Oils of *Citrus paradise* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *Evidence-based complementary and alternative medicine.* eCAM: 1-9.

Pauli, A., (2001). Antimicrobial Properties of Essential Oil Constituents. *The International Journal of Aromatherapy. 11*(3), 126-133.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products. 63*, 1035-1042.

Pitt, J.L., & Hocking, AD. (1999). *Fungi and Food spoilage*. New York & Hall.

Pranoto, Y., VM. Salokhe, & S.K. Rakshit. (2005). Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International. 38*, 267-272.

Prats, SM., & Jimenez, A. (2005). Essential oil: analysis by GC. In Cazes, J. (Ed.), *Encyclopedia of chromatography*. (p. 51-55) (2nd ed.). CRC Press.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Raper, K.B., & Fennell, D. J. (1997). *The genus Aspergillus.* Williams & Wikins, Baltimore.

Rippon, J. W. (1982). *Medical mycology*. (p. 569-594). w.b. Saunder Com. Philadelphia.

Robertson, G. L. (2013). *Food packaging: principles and practice*. CRC press.

Roy, P. S. (1996). *Biology of Citrus*. Cambridge University Press. England.

Sarrou, E., Chatzopoulou, P., Dimassi-Theriou, K., & Therios, I., (2013). Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. *Molecules 2. 18* (9), 10639–10647.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F. J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A. Roy, S.L., Jones, J.L., & Grif-fin, P.M., (2011). Foodborne illness acquired in the United State-major pathogens. *Emerging Infectious Diseases. 17*, 7-15.

Sharma, N., & A. Tripathi, (2008). Effect of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of Aspergillus niger (L.) Van Tieghem. *Microbiological Research.163* (3), 337-344.

Simas D.L.R., S.B.M., Amorim, F.R.V., Goulart, C.S., Alviano, D.S. Alviano, & A.J.R., Silva. (2017). Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. *Industrial Crops and Products. 98*, 108-115.

Surveswan S., & Cai Y. (2006). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicine plants. *Food Chemistry* (online). Available from: http.www.sciencedirect.com/locate/foodchem.html (Accessed 2006 August 15).

Tiwari BK, Valdramidis VP, O' Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P, & Cullen PJ. (2009). Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 57*(14), 5987-6000.

Tounsi, M.S., Wannes, W.A., Ouerghemmi, I., Jegham, S., Ben Njima, Y., Hamdaoui, G., Zemni, H., & Marzouk, B., (2011). Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture. 15*, 142-151.

Turek, C., & Stintzing, F.C., (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Safety.12*, 40-53.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Ultee, A., Bennik, M.H.J., & Moezelaar, R. (2002) The phenolichydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology. 68*, 1561–1568.

USDA. (2013). United States Department of Agriculture (USDA), Natural Recource Conversation (NRCS), 24 September 2013. The PLANTS Database. http://plants.usda.gov Natural Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA.

USFDA. (2017). Code of Federal Regulations Title 21 Volume 3: 21 CFR 182.20 Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). Revised as of April 1, 2017. U.S. Food and Drug Administration.

Velázquez-*Nuñez*, M. J., Avila-Sosa, R., Palou, E., & López-Malo, A. (2013). Antifungal acitivity of orange (*Citrus sinensis var. Valencia*) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact. *Food Control. 31*, 1-4.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon *(Citrus lemon L.),* mandarin *(Citrus reticulata L.),* grapefruit *(Citrus paradise L.)* and orange *(Citrus sinensis L.)* essential oils. *Food Control. 19*, 1130-1138.

Yi, Q., R.E. Hoskins, E.A. Hillringhouse, S.S. Sorensen, M.W. Oberle, S.S. Fuller, & J.C. Wallace (2008). Integrating open-source technologies to build low-cost information system for improved access to public health data. *International Journal of Health Geographics. 7*(1), 29.

Yousef, A.E., & Carlstrom, C. (2003). *Food Microbiology: A Laboratory Manual*. (p. 277) Wiley & Sons, Inc. USA.

Zink, D.L., (1997). The impact of consumer demands and trends on food processing. *Emerging Infectious Diseases. 3*, 467-469.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ภาคผนวก

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ภาคผนวก ก.
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ราโดยทั่วไป รวมทั้งการเลี้ยงเชื้อยีสต์และราให้เจริญ

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อ่านฉลากที่ติดไว้ข้างขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทุกครั้ง ดูวันหมดอายุและบันทึกการใช้งาน จากนั้นจึงมองหาปริมาณต่อกรัมของอาหารสำเร็จรูปที่ต้องละลายในน้ำกลั่น 1 L (1,000 ml) แล้วนำมาคำนวณปริมาณของอาหารสำเร็จรูปที่ต้องการใช้
2. ตักอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปและเติมน้ำในปริมาตรที่ต้องการจากนั้นจึงนำมาต้มให้เดือดเพื่อละลายของแข็งทั้งหมดในน้ำ
3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ละลายทั้งหมดแล้วไปใส่ในขวดรูปชมพู่หรือขวดดูแลน (Duran) ปิดฝาให้เรียบร้อย ก่อนนำไปเข้าหม้อนึ่งความดัน หากเป็นอาหารเหลวให้ปิเปตต์อาหารที่เตรียมได้ใส่ในหลอดทดลอง ปิดฝาให้เรียบร้อยก่อนนาไปเข้าหม้อนึ่งความดัน
4. นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปทำการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอให้หมอนึ่งลดความดันและลดอุณหภมิลงจนสามารถเปิดฝาหม้อนึ่งความดันได้ (อุณหภูมิประมาณ 80 ^{o}C) จึงนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วออกมานอกหม้อนึ่ง แล้วรอให้เย็นประมาณ 45-50 ^{o}C ก่อนนำไปใช้งาน

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ

หากต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) สำหรับเทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 20 จานอาหาร ควรตักอาหารสำเร็จรูปมากี่กรัม โดยที่การเตรียม PDA ต้องละลายอาหาร 48 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 ml และ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเทอาหารเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 15 ml

วิธีการคำนวณ

ต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 จานๆละ 15 ml ทั้งหมดคือ 20x15 = 300 ml

ถ้า 1,000 ml ต้องใช้อาหารสำเร็จรูป PDA 48 กรัม

ดังนั้น ต้องการเตรียมอาหาร PDA 300 ml ต้องตักอาหารมา 300x48/1,000 = 14.4 g

ดังนั้น ตักอาหารสำเร็จรูป PDA มา 14.4 g ละลายในน้ำ 300 ml สำหรับเทจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 20 จาน (นฤมล มาแทน, 2560)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ภาคผนวก ข.

การนับจำนวนจุลินทรีย์ (Enumeration of Microorganism)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

การนับจำนวนจุลินทรีย์ (Enumeration of Microorganism)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ขนมปังสด น้ำหนัก 25 กรัม
2. น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
4. ปิเปตฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์
6. จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

การเก็บตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ขนมปังสด ที่นำมาตรวจต้องเป็นตัวแทนของผลิตภัณฑ์ขนมปังสดทั้งหมด เก็บโดยให้ปลอดเชื้อและสารเคมีปนเปื้อน ควรเก็บรักษาสภาพตัวอย่างอาหารที่อุณหภูมิ 0-4 ^{o}C ภาชนะที่ใช้เก็บตัวอย่างควรมีฝาปิดมิดชิด

การเจือจางตัวอย่าง

1. เตรียมจานเพาะเชื้อสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ทำการจดวันที่ หมายเลขตัวอย่าง และลำดับความเจือจาง ลงบนจานเพาะเชื้อก่อนทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อให้ชัดเจนและไม่หลุดลอกง่าย

2. นำผลิตภัณฑ์ขนมปังสด มา 25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 225 มิลลิลิตร จากนั้นผสมในเครื่องปั่นจนเป็นเนื้อเดียวกัน ทำ dilution plate count ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างเจือจางลงด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จะได้ความเจือจาง 1:10 จากนั้นทำการเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อต่อไปเรื่อยๆ โดยเจือจางจุลินทรีย์ลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) การทำให้เจือจางนี้เพื่อให้มีการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 30-300 โคโลนี

การเทอาหารเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อ

3. ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ความเจือจางที่เหมาะสม ใช้ระดับความเจือจาง 1:10^{2}, 1:10^{3} และ 1:10^{4}

4. ดูดสารละลายเชื้อจุลินทรีย์ความเจือจางละ 0.1 ml หยดลงตรงกลางบนจานอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 15 ml ซึ่งแข็งตัวแล้ว (solidified agar medium) ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จาน (ทำ 2 ซ้ำ, Duplicate)

5. เกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอรูปสามเหลี่ยมและมีด้ามยื่นออกมาให้จับได้ (spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยก่อนใช้ต้องทำให้แท่งแก้วปราศจากเชื้อใดๆโดยจุ่มในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95

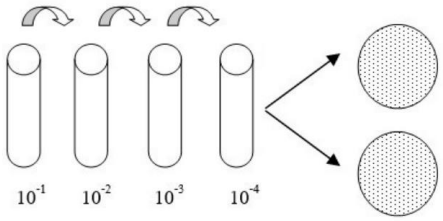
DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

และลนไฟ ใช้แท่งแก้วนี้เกลี่ยเชื้อปริมาณเล็กน้อยให้ทั่วผิววุ้นเพื่อให้เซลล์ต่างๆแยกและกระจายออกจากกัน ทิ้งให้แห้ง เชื้อจุลินทรีย์จะถูกแผ่กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 °C เป็นระยะเวลา 4 วัน จากนั้นนับจำนวนโคโลนี แล้วรายงานผลเป็น Colony Forming Unit (CFU)/g

การตรวจผล

7. การนับจำนวนโคโลนี ให้เลือกเฉพาะจานที่มีโคโลนีเจริญอยู่ประมาณ 30 - 300 โคโลนี จากความเจือจางเดียว ทำ 2 ซ้ำ รวมจำนวนโคโลนีทั้ง 2 จานเพาะเชื้อเข้าด้วยกัน แล้วหาจำนวนเฉลี่ยของโคโลนีที่นับได้ต่อ 1 ความเจือจางต่อจาน ดังภาพที่ ข-1 และ ตารางที่ ข-1



ภาพที่ ข-1 การทำเจือจางจุลินทรีย์ลงครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution)

ตารางที่ ข-1 การนับจำนวนโคโลนีรา

ระดับความเจือจาง	ปริมาณโคโลนีราที่นับได้	
	จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 1	จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 2
10^{-1}	74	90
10^{-2}	346	28
10^{-3}	6	14
10^{-4}	3	8

8. คำนวณจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม ได้ดังนี้

นับจำนวนเฉลี่ยของโคโลนีรา เท่ากับ (74+90)/2 = 82 โคโลนี โดยนับที่ความเจือจาง 1:10 ดังนั้น จำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม คำนวณได้ดังนี้

ตัวอย่าง 1/10 กรัม นับจำนวนโคโลนีรา ได้ = 82 โคโลนี

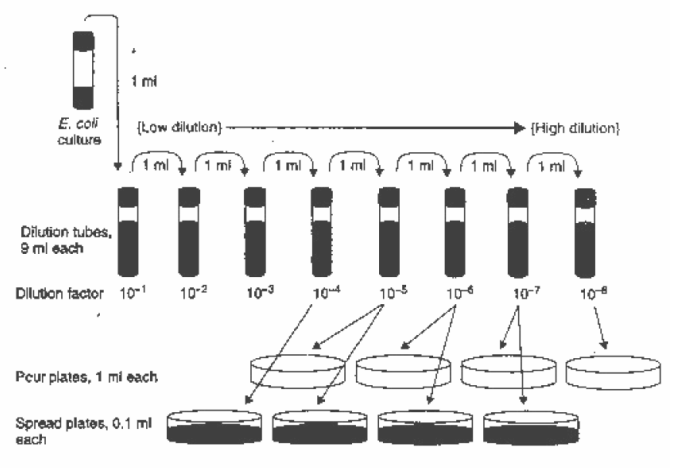
ตัวอย่าง 1 กรัม นับจำนวนโคโลนีรา ได้ = 8.2 โคโลนี (รายงานผลเป็น CFU/g)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

การคำนวณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในหน่วย CFU/g

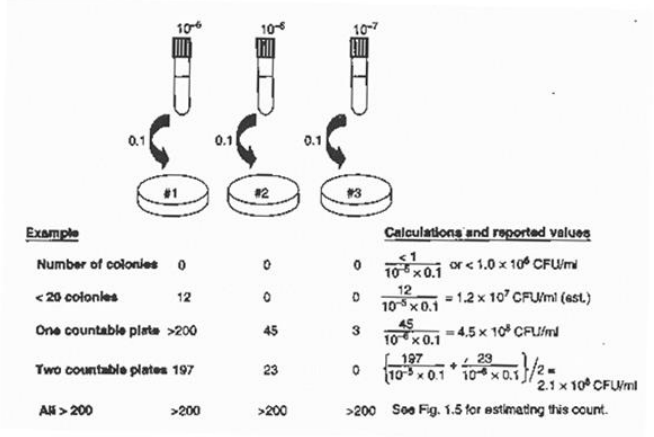
CFU หมายถึง Colony Forming Unit เป็นหน่วยที่ได้จากวิธีการการตรวจนับจุลินทรีย์ ที่เจริญบนผิวหน้าหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดวุ้น โดยอาศัยสมมติฐานว่าจุลินทรีย์หนึ่งเซลล์สร้างโคโลนีบนอาหารวุ้นได้หนึ่งโคโลนี จากแบบปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหารของ นฤมล มาแทน (2560) ได้อธิบายเพิ่มเติมถึง เทคนิคการนับเพื่อหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต การนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตนั้นมักรายงานผลเป็น Colony Forming Unit (CFU) หรือ viable microbial cells ในรูปต่อกรัมหรือปริมาตรอาหาร (CFU/g หรือ CFU/ml)

วิธีการนับเชื้อจุลินทรีย์มีทั้งเทคนิค Pour plated และ เทคนิคการ Spread plated ซึ่งวิธีการทำ Pour plated และ Spread plated ได้แสดงดังภาพที่ ข-2 และ ตัวอย่างคำนวณจำนวนโคโลนีโดยใช้เทคนิคการ Spread plated ดังภาพที่ ข-3



ภาพที่ ข-2 วิธีการทำ Pour plated และ Spread Plated

ที่มา: Yousef และ Carlstrom (2003)



ภาพที่ ข-3 ตัวอย่างคำนวณจำนวนโคโลนีโดยใช้เทคนิคการ Spread plated

ที่มา: Yousef และ Carlstrom (2003)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

กฎการนับและคำนวณหาปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์

1. กรณีจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้นำผลที่นับได้นำไปคำนวณ นอกจากนั้นการแบ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อออกเป็นช่องสี่เหลี่ยมตามแนวตั้งและแนวนอนจะได้ช่องสี่เหลี่ยมทำให้คำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อกรัมอาหารหรือต่อมิลลิลิตรของอาหารได้ดังนี้
   - หากแต่ละช่องสี่เหลี่ยมมีโคโลนีน้อยกว่า 10 โคโลนี ให้นับจำนวนโคโลนีในช่องแนวตรง 7 ช่องและแนวตั้ง 6 ช่องรวมเป็น 13 ช่อง แล้วนำมาคำนวณคือพื้นที่จานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 65 ตารางเซนติเมตร (cm^2) ดังนั้นค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถคำนวณโดยผลรวมที่นับได้คูณด้วย 5
   - หากแต่ละช่องมีโคโลนีอยู่ในช่วงมากกว่า 10 แต่น้อยกว่า 100 โคโลนีต่อช่อง ให้นับช่องสี่เหลี่ยมใดก็ได้เพียง 4 ช่อง เพื่อนำมาคำนวณพื้นที่จานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 65 cm^2 ดังนั้นค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหารสามารถคำนวณโดยผลรวมที่นับได้มาหาค่าเฉลี่ยหาร 4 แล้วคูณด้วย 65
   - หากแต่ละช่องสี่เหลี่ยมมีโคโลนีมากกว่า 100 โคโลนีต่อช่องพื้นที่จานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 65 cm^2 ให้รายงานว่ามีมากกว่า 6,500 ดังนั้นค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถคำนวณโดยหารด้วยปริมาตรตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่ใช้วิเคราะห์
2. กรณีจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 1-20 ให้นับจำนวนโคโลนีในระดับความเจือจางที่ต่ำที่สุด แล้วนำผลไปคำนวณ
3. กรณีการนับจำนวนโคโลนีที่ไม่มีโคโลนีใดเกิดบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (0 โคโลนี) ให้รายงานว่า น้อยกว่า 1 และการนับจำนวนโคโลนีที่มากกว่า 300 โคโลนี ให้รายงาน > 300
4. กรณีไม่มีจานอาหารเลี้ยงเชื้อใดที่มีโคโลนีในช่วง 30-300 โคโลนีต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่มีอย่างน้อย 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อมีจำนวนมากกว่า 300 โคโลนี ให้นับจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนใกล้ 300 มากที่สุด
5. กรณีการนับจำนวนโคโลนีที่ไม่ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวให้นับได้ แต่ขึ้นเป็นสายยาวต่อเนื่องกันเกินกว่า 25 % ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้รายงานผลว่า Spr (Spreaders)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ภาคผนวก ค.

การหาค่า 50% Effective Concentration (EC_{50})

การกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

1. การหาค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) ของ สารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E)

จากสมการ $y = 24.744X - 43.337$

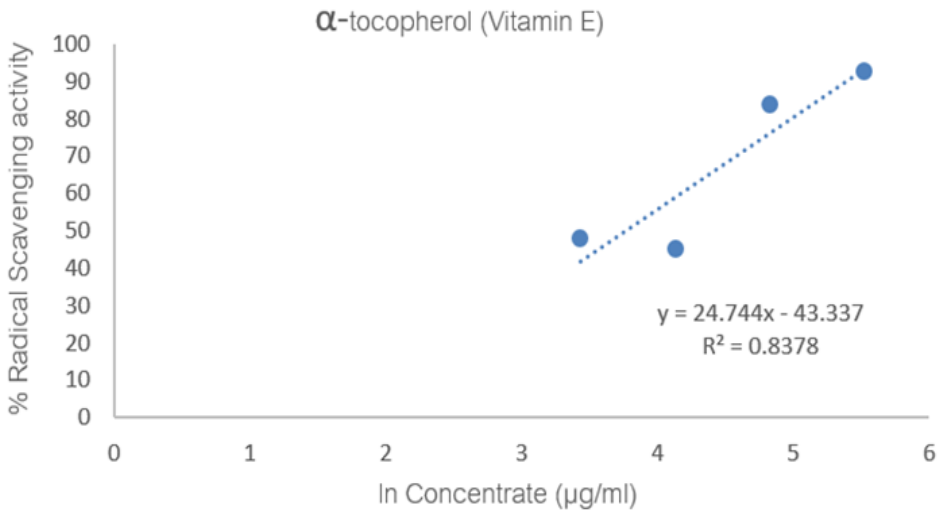
แทนค่า $y = 50$

$50 = 24.744X - 43.337$

$X = 3.7721063$

ความเข้มข้นสาร e^X

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 43.47 µg/ml



ภาพที่ ค-1 กราฟสมการในการคำนวณค่า EC_{50} ของสารมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E)

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

2. การหาค่า 50% Effective Concentration (EC_{50}) ของน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L.

จากสมการ $y = 5.641X + 1.0727$

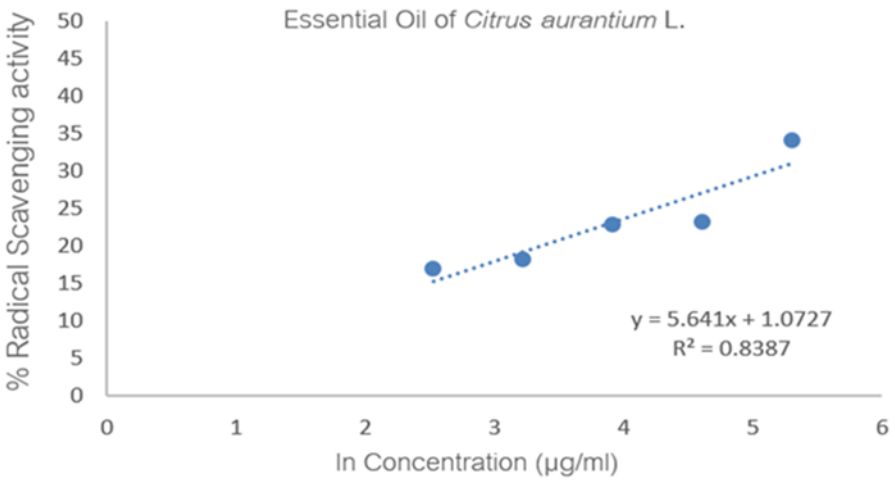
แทนค่า $y = 50$

$50 = 5.641X + 1.0727$

$X = 8.6735153$

ความเข้มข้นสาร e^X

ดังนั้นความเข้มข้นสาร = 5,846.01376 µg/ml (> 1,000 µg/ml)



ภาพที่ ค-2 กราฟสมการในการคำนวณค่า EC_{50} ของน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus aurantium* L.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ภาคผนวก ง.

Specification of Essential Oil

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

TCFF

Thai-China Flavours and Fragrances Industry Co., Ltd.
บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน จำกัด

The Senses of Natural Co-Creation

SPECIFICATION

Product name	: ORANGE OIL A
Product code	: 3103-20024
Country of Origin	: Brazil
Product type	: Essential Oil 100%
INCI Name	: Citrus Aurantium Dulcis (Orange) Peel Oil Expresse
CAS No.	: 8028-48-6
Production	: This essential oil is obtained by cold expression from the outer peel of the almost ripe fruit of *Citrus aurantium L. (Family of Rutaceae)*
Application	: Raw material for the production of foods, beverages, cosmetics and household products.
Colour and appearance	: Yellow to yellow-orange and clear liquid
Odour	: Characteristic orange fruit odour
Specific gravity (20/20°C)	: 0.8300-0.8500
Refractive index (20°C)	: 1.4600-1.4850
Storage	: Keep in cool, preferably at about 20- 25°C dry place and protect from light. Keep containers tightly sealed
Shelf life	: 12 Months quality should be checked visually & olfactory before each use and fully checked after the shelf life period

The document is computer generated and no signature is required.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ภาคผนวก จ.

การเผยแพร่

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บันทึกข้อความ

ส่วนงาน สำนักงานเลขานุการ คณะเกษตร กำแพงแสน โทร. 3300 - 3303

ที่ **อว** ๖๕๐๒.๐๒๐๑/๓๗๕๒ **วันที่** ๒๗ สิงหาคม ๒๕๖๔

เรื่อง แจ้งการตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสารวิชาการวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ

เรียน คุณสุนีย์ เจริญวุฒิธรรม

ตามที่ ท่านได้ส่งบทความวิชาการการเรื่อง การศึกษาฤทธิ์ด้านเชื้อรา Aspergillus sp.ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม Citrus aurantium L. ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด Studies on Antifungal activity of essential oil of Citrus aurantium L. against Aspergillus sp. in fresh bread product **ของท่านและคณะ** เพื่อตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ (Journal of Agricultural Science and Management) คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ความทราบแล้วนั้น

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ **มีความยินดี**แจ้งให้ท่านทราบว่า **บทความวิชาการของท่านได้รับการยอมรับให้ตีพิมพ์ใน** วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ **ปีที่ ๔ ฉบับที่ ๒ ประจำเดือนพฤษภาคม – สิงหาคม ๒๕๖๔** เรียบร้อยแล้ว โดยกองบรรณาธิการจะจัดส่งวารสารฉบับสมบูรณ์ให้ท่านต่อไปเมื่อวารสารได้รับการจัดพิมพ์แล้วเสร็จ

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิธร นาคทอง)
บรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ
คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
โทรศัพท์ ๐๓๔-๓๕๑๔๐๖ ภายใน ๓๓๐๗ e-mail agriscim@gmail.com

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีฤทธิ์ยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

Efficacy of *Citrus aurantium* L. essential oil for inhibition of *Aspergillus* sp. in fresh bread products

สุนีย์ เจริญวุฒิธรรม[1*] และพยงค์ วณิเกียรติ[1]

Sunee Charoenvuttitham[1*] and Payong Wanikiat[1]

Received: July 19, 2021

Revised: August 24, 2021

Accepted: August 27, 2021

Abstract: *Citrus aurantium* L. Orange peel essential oil (CaEO) is terpene and phenylpropene organic compound, which has antimicrobial activity and is safe when used as a food preservative. Therefore, CaEO was used to evaluate for its efficacy in inhibiting *Aspergillus* sp., cause of spoilage in fresh bread products by poisoned food technique and the antioxidant activity of CaEO was determined by spectrophotometric method using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay). The results showed that CaEO at concentrations of 2.50, 5.00 and 10.00 µl/ml was able to inhibit the growth of *Aspergillus* sp. colony with a colony diameter of 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 and 1.63 ± 0.09 cm, respectively, compared to the sterile distilled water used as a control (2.98 ± 0.05 cm).It was found that CaEO at a concentration of 10.00 µl/ml had an inhibitory effect comparable to that of 0.2% calcium propionate used as a reference compound with a colony diameter of 1.50 ± 0.23 cm, which was significantly different to the control ($p \leq 0.05$). CaEO at concentrations of 5.00 and 10.00 µl/ml were used as an ingredient in fresh bread products with calcium propionate as reference compound and the sterile distilled water as control. Fresh bread kept for 1-4 days showed no changes and fewer black spots on the bread surface were found on the 5th day as compared to the control with more black spots, while fresh bread with the reference compound showed no microorganisms on it. When fresh bread was cultured in PDA agar and incubated at 27°C, CaEO at concentrations of 5.00 µl/ml was found to have fungal growth of 8.20 colonies per 1 g of sample (CFU/g) on the 4th day, while CaEO at a concentration of 10.00 µl/ml and calcium propionate solution showed no fungal growth. The antioxidant activity of CaEO was assessed by DPPH scavenging assay. It was found that CaEO exhibited very low antioxidant activity with EC_{50} > 1,000 µg/ml, compared to a standard solution α-tocopherol (Vitamin E), with possesses very high radical scavenging with an EC_{50} value of 43.47 µg/ml. Therefore, the CaEO at a concentration of 10.00 µl/ml exhibited highest inhibitory effect on *Aspergillus* sp Its effect was comparable to that of calcium propionate and the CaEO possesses very low in antioxidant activity.

Keywords: Essential oil; Antifungal activity; free radical scavenging

---

[1]สาขาวิชาการแพทย์บูรณาการ วิทยาลัยการแพทย์บูรณาการ มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิต 110/1-4 ถนนประชาชื่น หลักสี่ กทม. 10210

[1]Department of College of Integrative Medicine (CIM), Faculty of College of Integrative Medicine, Dhurakij Pundit University,110/1-4, Prachachuen Rd., Laksi, Bangkok, 10210

*Corresponding author: tasterpro@gmail.com

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Agricultural Science and Management J. 4 (2) : 60-68 (2021)

บทคัดย่อ: น้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. (CaEO) เป็นสารประกอบอินทรีย์จำพวกเทอร์พีนส์ และฟีนิลโพรพีน ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และมีความปลอดภัยเมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร จึงนำ CaEO มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. สาเหตุการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด ด้วยวิธี poisoned food technique และทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริกโดยทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH assay) ผลการทดสอบพบว่า CaEO ที่ความเข้มข้น 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีรา *Aspergillus* sp. ได้โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 และ 1.63 ± 0.09 cm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม (2.98 ± 0.05 cm) และพบว่า CaEO ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ยับยั้งได้ใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต 0.2% ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 1.50 ± 0.23 cm ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลายน้ำที่เป็นชุดควบคุม ($p \leq 0.05$) เมื่อนำ CaEO ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยมีแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดอ้างอิง และสารละลายน้ำเป็นส่วนประกอบเป็นชุดควบคุม พบว่าขนมปังสดที่เก็บรักษา 1-4 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ และในวันที่ 5 พบจุดสีดำเล็กๆบนผิวขนมปังจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีจำนวนจุดดำมากกว่า ในขณะที่ชุดอ้างอิงไม่พบจุลินทรีย์บนผิวหน้าขนมปังสด เมื่อนำขนมปังสดเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเพาะ ที่อุณหภูมิ 27°C ในวันที่ 4 พบว่า CaEO ความเข้มข้น 5.00 µl/ml มีราเกิดขึ้น 8.20 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g) ในขณะที่ CaEO ความเข้มข้น 10.00 µl/ml และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนต ไม่มีราเกิดขึ้น และการทดสอบการกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า CaEO แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ โดยมีค่า EC_{50} > 1,000 µg/ml เมื่อเทียบกับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระสูงกว่ามีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml ดังนั้น CaEO ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้สูงสุด ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพริโอเนต และ CaEO นี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำ

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย ฤทธิ์ต้านเชื้อรา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คำนำ

ขนมปังเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ขนมอบหรือเบเกอรี่ เป็นผลิตภัณฑ์อาหารกึ่งแห้ง (Intermediate moisture food) ซึ่งมักจะเกิดการเน่าเสียได้รวดเร็ว ส่วนใหญ่จะมีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ในกลุ่มราที่อยู่ในสกุล *Aspergillus* sp. โดยจะทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเปลี่ยนแปลง ทั้งกลิ่น สีและรสชาติ รวมทั้งมีการสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค น้ำมันหอมระเหยถูกนำมาใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาเนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อย ราคาถูกและเป็นสารธรรมชาติ อีกทั้งยังช่วยปรุงแต่งสีกลิ่นรสของอาหารให้น่ารับประทานมากยิ่งขึ้น (วิภาวัน,2549)

มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของพืชตระกูลส้ม Fisher and Phillips (2006) พบว่าในน้ำมันหอมระเหยของมะนาว ส้มเขียวหวาน และมะกรูด มีสารประกอบของ Linalool และ Citral ซึ่งสารดังกล่าวมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ Yi *et al.* (2008) ได้รายงานว่าในพืชตระกูลส้ม เช่น ส้มเขียวหวาน (*Citrus* reticulata Blanco) ส้มโอ (*Citrus grandis* (L.) osbects (Linn.) มะกรูด (Citrus hystrix DC.) ส้มโชกุน (*Citrus reticulata* cv. Shogun) และมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) มีสารที่สำคัญชื่อว่า Hesperidin ซึ่งพบในเปลือกของพืชตระกูลส้มสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli*, *Salmonella Typhi*, *Enterococcus faecalis*, *S. epidermidis* และ *S. aureus* และสารประกอบ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

บางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราได้ดี (ธิราภา และ คณะ, 2536) และน้ำมันหอมระเหยยังได้รับการพิจารณาจากองค์การอาหารและยา (FDA) ว่าสามารถใช้เติมลงไปในอาหารได้อย่างปลอดภัย Generally recognized as safe; (GRAS) (Simas *et al.* 2017)

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ที่เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ขนมปังสดโดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม(CaEO)โดยทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสดและทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CaEO เพื่อนำไปสู่การพัฒนานำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. น้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบ

น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม *Citrus aurantium* L. (Family of Rutaceae) ที่ได้มาจากกระบวนการสกัดแบบบีบเย็น (cold-pressed) จากเปลือกด้านนอกของผลส้มสุก (orange peel oil) เป็นของเหลวใสสีน้ำตาลออกเหลืองอ่อน มีกลิ่นส้มสดๆ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท อุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย จีน จำกัด กรุงเทพฯ

2. ราที่ใช้ในการทดสอบ

รา *Aspergillus* sp. ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์จุลินทรีย์ (TISTR) สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3. การทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L.(CaEO) ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ด้วยวิธี poisoned food technique

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่มีสารละลาย CaEO ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.32, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml ตามลำดับ เทใส่ลงในจานเพาะเชื้อตั้งทิ้งไว้ในอาหารแข็งเพื่อนำใช้ทดสอบต่อไป โดยจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายน้ำ เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (negative control) และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตซึ่งเป็นสารมาตรฐานเป็นชุดควบคุมเชิงบวก (positive control) จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO ในจานเพาะเชื้อ โดยนำรา *Aspergillus* sp. มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน นำ Cork borer จุ่มลงในสารละลายเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95% ลนไฟและพักทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเจาะบริเวณขอบของเส้นใยรา ย้ายชิ้นวุ้นวางในจานเพาะเชื้อ ซึ่งมีส่วนผสมของสารละลาย CaEO ในความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำไปบ่มใน incubator ที่อุณหภูมิ 27°C ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เป็นเวลา 7 วัน ติดตามผลการเจริญของรา บันทึกผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของรา แล้วนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

4. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

นำ CaEO ที่มีฤทธิ์การยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้ดี 2 ระดับความเข้มข้น มาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยเตรียมขนมปังสดที่มี CaEO เป็นส่วนประกอบของขนมปังสดเป็นชุดทดสอบ และมีแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดอ้างอิง และสารละลายน้ำเป็นส่วนประกอบเป็นชุดควบคุมลบ โดยมีการทดสอบ 2 วิธี กล่าวคือ วิธีแรก สังเกตลักษณะปรากฏภายนอกและการเปลี่ยนแปลงของขนมปังสดในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน และ การทดสอบอีกวิธีหนึ่ง คือ ศึกษาจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น โดยทำการนับจำนวนโคโลนีราในขนมปัง ซึ่งใช้เทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27°C เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วนับจำนวนโคโลนีรา

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CaEO

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (free radical scavenging) ของ CaEO ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-l-1-picrylhydrazil assay (DPPH assay) โดยใช้ DPPH (2,2-diphenyl-l-1-picrylhydrazil) ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่คงตัว

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Agricultural Science and Management J. 4 (2) : 60-68 (2021)

(Figure 1) ละลายในเมทานอลได้สารละลายนี้มีสีม่วง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วย microplate reader เมื่อ DPPH• ทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในเมทานอล อะตอมไฮโดรเจนจากอนุมูลอิสระ (AH) จะถูกถ่ายให้ DPPH• เกิดเป็นสารใหม่ที่มีฤทธิ์เป็นอนุมูลอิสระ DPPH-H (Figure 2) โดยที่สารสีม่วงของ DPPH•จะจางลงเป็นสีเหลือง ซึ่ง DPPH ทำปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R•) ได้สารใหม่ที่ไม่มีฤทธิ์เป็นอนุมูลอิสระ DPPH-H ดัง (Figure 3)

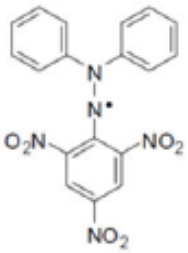


Figure 1 Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)

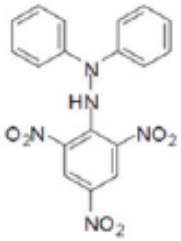


Figure 2 Diphenylpicrylhydrazyl (non radical)

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$
$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

Figure 3 The reduction of DPPH radical scavenging

การประเมินฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของสารทดสอบคือ CaEO ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ซึ่งเปรียบเทียบฤทธิ์กับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) โดยมีสารละลาย DPPH เป็น สารละลายควบคุม (DPPH Control) ใช้สารละลาย 20% Tween 20 ในเมทานอลเป็นตัวทำละลายทั้งสารละลาย CaEO, สารละลายมาตรฐาน Vitamin E และ DPPH ละลายในสารละลาย 20% Tween 20 ในเมทานอล และ CaEO ที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้น 12.5, 25, 50, 100 และ 200 µg/ml และโดยการนำสารละลาย DPPH 1.0 mM ในเมทานอล และ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E มีความเข้มข้น 31.25, 62.5, 125 และ 250 µg/ml ทำการเติมสารทั้งหมดลงใน 96 - well plate (ปริมาตร 200 µl ต่อ well) ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Thermo Scientific™ microplate readers ความสามารถในการต้านออกซิเดชั่น หรือ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของ CaEO และ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E รายงานเป็นค่า 50% effective concentration (EC_{50}) ซึ่งคือความเข้มข้นของ CaEO หรือ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E ที่ทำให้ปริมาณของ DPPH ลดลง 50% หรือ อาจกล่าวว่าทำให้ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH 50% ซึ่งใช้ค่า EC_{50} ในการเปรียบเทียบความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระระหว่างสารละลายตัวอย่างของ CaEO กับ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E การหาค่า EC_{50} ได้จากการสร้างกราฟระหว่างความเข้มข้นของ CaEO หรือสารละลายมาตรฐาน Vitamin E และ % Radical Scavenging Activity (เปอร์เซ็นต์การออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ) ของ CaEO หรือ สารละลายมาตรฐาน Vitamin E ซึ่งคำนวณได้ดังสมการ

$$\% \text{ Radical Scavenging Activity} = [(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของ CaEO ผสมกับ สารละลาย DPPH Radical

$A_{control}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย 20% Tween 20 ผสมกับ สารละลาย DPPH Radical

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ของ CaEO บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ทั้ง 3 ซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ย และ ความแปรปรวนในแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p \leq 0.05$ โดยใช้ Duncan's Multiple Range test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO ในหลอดทดลอง (*in vitro*) เมื่อนำสารสกัด CaEO ที่ระดับความเข้มข้น 0.32, 0.63, 1.25, 2.50, 5.00 และ10.00 µl/ml ตามลำดับ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งรา *Aspergillus* sp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้ผลการทดลองดังแสดงใน (Table 1)

Table 1 Antifungal activity of essential oil of CaEO against *Aspergillus* sp.

Incubation time (Days) / CaEO concentration (µl/ml)	Experiment set		
	Average diameter of *Aspergillus* sp. colony (cm)		
	3	5	7
0.32	3.00 ± 0.17^{c}	4.30 ± 0.19^{c}	6.32 ± 0.20^{d}
0.63	2.88 ± 0.02b^{c}	4.32 ± 0.11^{c}	5.66 ± 0.87^{cd}
1.25	2.73 ± 0.1b^{c}	4.05 ± 0.53^{c}	6.12 ± 0.12^{cd}
2.50	2.68 ± 0.1^{bc}	3.75 ± 0.11^{bc}	5.43 ± 0.09^{bcd}
5.00	2.40 ± 0.24^{b}	3.15 ± 0.11^{ab}	4.82 ± 0.10^{abc}
10.00	1.63 ± 0.09^{a}	2.39 ± 0.03^{a}	3.51 ± 0.12^{a}
Calcium propionate solution	1.50 ± 0.23^{a}	2.29 ± 0.28^{a}	4.30 ± 0.00^{ab}
Water solution	2.98 ± 0.05^{c}	4.49 ± 0.16^{c}	6.85 ± 0.07^{d}

Note: $^{a-d}$ Means with the different letters in the same column were significantly different ($p<0.05$).

จากผลการศึกษาพบว่าที่ระยะเวลาของการบ่มวันที่ 3 สารสกัดของ CaEO ที่ความเข้มข้น 2.50, 5.00 และ 10.00 µl/ml ตามลำดับ สามารถยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้โดยวัดจากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราได้ 2.68 ± 0.1, 2.40 ± 0.24 และ 1.63 ± 0.09 cm ตามลำดับ CaEO ที่ความเข้มข้น 2.50 µl/ml ให้ผลการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมเชิงลบ (2.98 ± 0.05 cm) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ CaEO ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีฤทธิ์ยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้ไม่แตกต่างกันกับสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนต 0.2% ที่ใช้เป็นชุดควบคุมเชิงบวก โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของราได้เท่ากับ 1.50 ± 0.23 cm ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Knobloch *et al*. (1988) ที่รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีองค์ประกอบของสารเคมีหลายๆ กลุ่มที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์และทำลายผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และการศึกษาของ Sharma and Tripathi (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก epicarp ของ *C. sinensis* (L.) Osbeck มีผลต่อการเติบโตและลักษณะรูปร่างของ *Aspergillus niger* (L.) van Tiegherm โดยเส้นใย (mycelium) ถูกยับยั้งและตายที่ความเข้มข้น 2.50 และ 3.00 µg/ml ตามลำดับ และ Lanciotti *et al*. (2004) พบว่า สารประกอบออกซิจิเนตเป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งราได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง โดย Caccioni *et al*. (1998) รายงานว่า 60% ของน้ำมันหอมระเหยสามารถต้านรา สารประกอบบางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราได้ดี เช่น รา

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Agricultural Science and Management J. 4 (2) : 60-68 (2021)

Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus funigatus, Aspergillus terreus, Aspergillus parasiticus เป็นต้น และยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มาจากชิ้นส่วนของพืชที่แตกต่างกันมีองค์ประกอบที่ต่างกันและประสิทธิภาพของการยับยั้งราของน้ำมันหอมระเหยนั้น ขึ้นอยู่วิธีการนำไปใช้อีกด้วย (Lota *et al*., 2000)

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ของ CaEO บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด

จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ของ CaEO ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า สารละลายของ CaEO ที่ระดับความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ได้ดี ดังนั้นจึงได้เลือกสารละลายของ CaEO ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด โดยการเตรียมขนมปังสดที่มี CaEO ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml เป็นส่วนประกอบและใช้สารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นชุดควบคุม การสังเกตลักษณะปรากฏภายนอกและการเปลี่ยนแปลงของขนมปังสดในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน พบว่า ในระหว่างการเก็บรักษาวันที่ 1-4 ลักษณะปรากฏภายนอกของขนมปังสดไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดๆ แต่ในวันที่ 5 พบจุดสีดำขนาดเล็กบนผิวขนมปังแต่จำนวนของจุดสีดำมีน้อยกว่าน้ำซึ่งเป็นชุดควบคุมลบ โดยจุดสีดำเหล่านี้มีขนาดใหญ่ขึ้นและทำให้ขนมปังสดมีกลิ่นเหม็นหืนมากขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่ชุดควบคุมที่มีส่วนผสมของแคลเซียมโพรพิโอเนตไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บนผิวหน้าขนมปังสด (Figure 4)

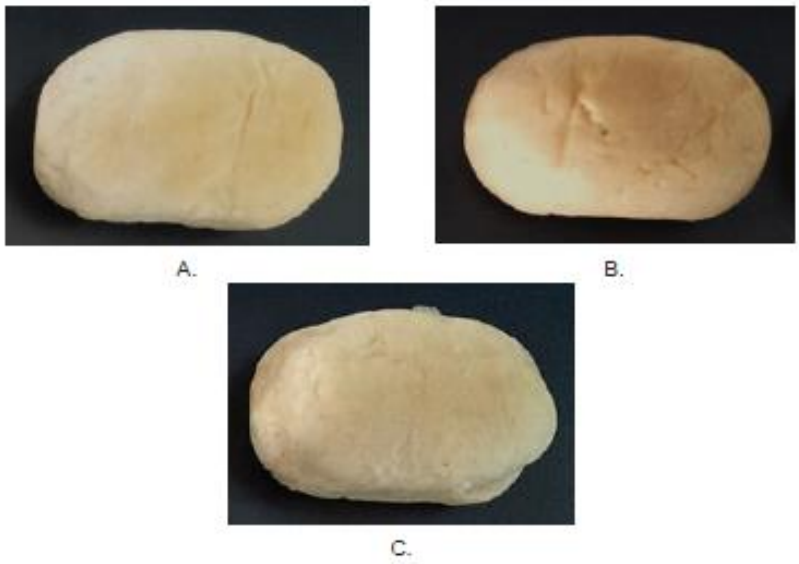


Figure 4 Growth of *Aspergillus* sp. in fresh bread product
Note: A) Fresh bread with calcium propionate
B) Fresh bread with 5 µl/ml of CaEO
C) Fresh bread with 10 µl/ml of CaEO

และเมื่อนับจำนวนโคโลนีของราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าระหว่าง 1-3 วันของการเก็บรักษานั้น ไม่พบการเจริญของรา แต่หลังจากเก็บรักษาขนมปังเป็นเวลา 4 วัน พบว่า ขนมปังที่มี CaEO ที่ความเข้มข้น 5.00 µl/ml มีจำนวนเฉลี่ยของราเท่ากับ 8.20 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/g) ในขณะที่ขนมปังที่มี CaEO ความเข้มข้น 10.00 µl/ml และสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตไม่พบการเจริญของรา ซึ่งสอดคล้องกับ

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

การศึกษาของ Kurita *et al.* (1981) รายงานว่าส่วนประกอบใน CaEO ต่างๆ เช่น aliphatic aldehydes มีพันธะคู่ตั้งแต่หนึ่งพันธะขึ้นไปที่หมู่คาร์บอนิล เช่น Perillaldehyde ซึ่งมีฤทธิ์ต้านราสูงกว่า tertiary alcohol เช่น Linalool ซึ่งไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของราใดๆ และส่วนหนึ่งอาจมาจากการมี monoterpenes ปริมาณสูงอยู่ใน CaEO สารระเหยที่ปล่อยออกมาจาก CaEO บนพื้นผิวของการเจริญเติบโตของเส้นใย มีผลกระทบต่อการสร้างสปอร์, การเปลี่ยนผ่านไปสู่การผลิตสปอร์, การรับรู้ และกลไกการส่งสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเป็นการพัฒนาการสืบพันธุ์ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการยับยั้งราของ CaEO และรายงานของ Debonne *et al.* (2018) ที่รายงานถึงการใช้น้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งราเพื่อเป็นสารกันเสียจากธรรมชาติในผลิตภัณฑ์ขนมปังโดยศึกษาถึงประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากโรสแมรี่ที่อยู่ในรูปของไมโครเอ็นแคปซูเลชั่นในก้อนแป้งโด

. 3. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ CaEO ด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay)

การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของ CaEO โดย การวัดค่า 2,2-Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งในการทดสอบร้อยละการยับยั้งของสารละลายตัวอย่างของ CaEO นี้ พบว่า แต่ละความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง CaEO มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ต่ำมาก (EC_{50} > 1,000 µg/ml) ดัง Figure 5 เมื่อเทียบกับกับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml ดัง (Figure 6)

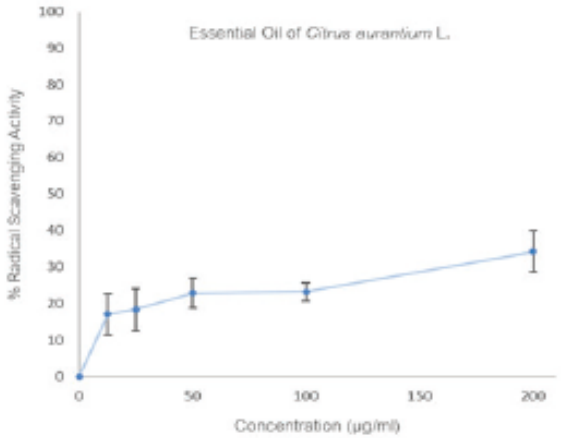


Figure 5 Linear graph of CaEO with % Radical Scavenging Activity value by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay).

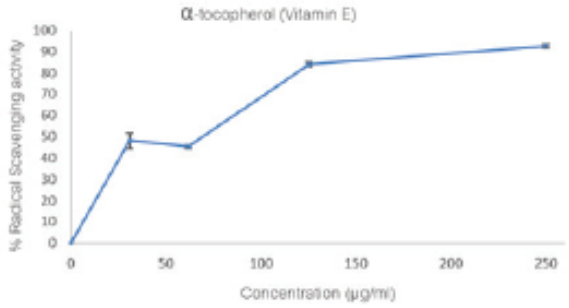


Figure 6 Linear graph of α-tocopherol (Vitamin E) with % Radical Scavenging Activity value by 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH assay).

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Agricultural Science and Management J. 4 (2) : 60-68 (2021)

ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของ CaEO ที่ทำปฏิกิริยาให้อะตอมไฮโดรเจน ได้เป็นสารใหม่ DPPH-H CaEO สามารถทำให้ DPPH ที่เป็นสารสีม่วงให้จางลงเป็นสีเหลืองได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Choi *et al.* (2000) รายงานว่าฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูล DPPH ของน้ำมันจากส้ม 34 ชนิด อยู่ระหว่าง 17-64% เนื่องมาจากในส่วนของเปลือก CaEO นี้ประกอบด้วยสาร Limonene ในสัดส่วนที่มากกว่า 90% เป็นส่วนใหญ่ และมี β-myrcene ซึ่งสารทั้งสองนี้ไม่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดอนุมูลอิสระ และการกำจัดอนุมูลอิสระจะมีค่าสูงขึ้นก็ต่อเมื่อใน CaEO มีส่วนประกอบของสาร geraniol, terpinolene และ γ-terpinene รายงานของ Sarrou *et al.* (2013) ได้ศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของ CaEO ในส่วนของเปลือก (19.29%), ใบอ่อน (22.79%), ดอก (53.98%) และใบแก่ (94.36%) ตามลำดับ ซึ่งใบแก่นี้มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH มากที่สุด อาจเกิดจากการสูญเสียน้ำในใบแก่ซึ่งมีผลต่อการสะสมสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) ที่เข้มข้นมากขึ้นในขณะที่มีการเจริญเติบโตของใบแก่ลดลงเรื่อยๆ และอีกประการหนึ่ง คือส่วนประกอบบางชนิดใน CaEO ที่มีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน การที่ CaEO จากใบแก่และดอกแก่ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้มากที่สุดอาจเกิดจากการที่ส่วนใบแก่มี α-terpinolene และ nerol ที่ส่วนของดอกแก่มี γ-terpinene, nerol และ geraniol การศึกษาของ Anwar *et al.* (2016) ได้รายงานถึงพฤกษเคมี (Phytochemical) ของ CaEO ที่สกัดแบบบีบเย็น พบว่ามี Monoterpene, Limonene อยู่ในปริมาณมากถึง 65–97% ของน้ำมันหอมระเหยทั้งหมด โดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยของพืชตระกูลส้มนี้จะมีสารประกอบที่มีความหลากหลายแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุกรรม สิ่งแวดล้อม ภูมิประเทศของแหล่งที่ปลูก วิธีการสกัด เวลาในการเก็บเกี่ยว และการดูแลรักษา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ou *et al.* (2015) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยของ *Citrus paradisi* ที่ได้มาจากการสกัดแบบบีบเย็นโดยส่วนใหญ่จะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้ต่ำกว่า 20% ของน้ำมันหอมระเหยของ *Citrus paradisi* ที่ได้มาจากการสกัดแบบกลั่น โดยมีค่า IC50 > 40 µg/ml

สรุป

จากการศึกษาประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO ในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า CaEO ที่ความเข้มข้น 5.00 และ 10.00 µl/ml สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของรา *Aspergillus* sp. ได้ดี และการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp.ของ CaEO บนผลิตภัณฑ์ขนมปังสด พบว่า CaEO ที่ความเข้มข้น 10.00 µl/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ได้สูงสุด ซึ่งให้ผลได้ใกล้เคียงกับสารละลายแคลเซียมโพรพิโอเนตที่นิยมใช้ในการยับยั้งราในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด และผลการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay พบว่า CaEO นี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ต่ำมาก (EC_{50} > 1,000 µg/ml) เมื่อเทียบกับกับสารละลายมาตรฐาน α-tocopherol (Vitamin E) ที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 43.47 µg/ml

เอกสารอ้างอิง

อิราภา แสนเสนา นพดล กิตติวราฤทธิ์ มาลิน จุลศิริ และรุ่งระวี เติมศิริฤกษ์กุล. 2536. ฤทธิ์ต้านเชื้อและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสกัดจากผิวผลพืชตระกูลส้ม. โครงการพิเศษ คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล 27(1): 1-5.

วิภาวัน จุลยา. 2549. เอกสารประกอบการสอนวิชาเบเกอรี่. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลกรุงเทพวิทยาเขตพระนครใต้.

Anwar S., N. Ahmed, A. Speciak, F. Cimino and A. Saija. 2016. Bitter Orange (*Citrus aurantium* L.) Oils. pp. 259-268. *In*: V.R. Preedy. (Ed.). Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Academic Press, Massachusetts.

Caccioni, D. R. L., M. Guizzardi, D. M. Biondi, A. Renda and G. Ruberto.1998. Relationship between volatile component of citrus fruit oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. International Journal Food Microbiology 43: 27-36.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

Choi, H.S., H. S. Song, H. Ukeda and M. Sawamura. 2000. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 4156-4161.

Debonne, E., F.Van Bockstaele, S. Samapundo, M. Eeckhout and F. Devlieghere. 2018. The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. Journal of Essential Oil Research doi: 10.1080/10412905. 2018. 148 6239.

Fisher, K. and C. A. Phillips. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, Escherichia coli O157, *Lisetria monocytogenese*, *Bacillus cereus* and *Stephylococcus aureus in vitro* and in food systems. Journal of Applied Microbiology 101(6): 1232-1240.

Knobloch, K., A. Pauli, N. Iberl, H.M Weis and N. Weig. 1988. Mode of action of essential oil components on whole cell of bacteria and fungi in plate tests. pp. 287-299. *In*: P. Schreier (Ed.). Bioflavour. Walter de Gruyther, Berlin.

Kurita, N., M. Miyaji, R. Kurane and Y. Takahara. 1981. Antifungal activity of components of essential oils. Agricultural and Biological Chemistry 45(4): 945-952.

Lanciotti, R., A. Gianotti, F. Patrignani, N., Belletti, E. M. Guerzoni and F. Gardin. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. Trends in Food Science and Technology 15: 201-208.

Lota, M. L., D.D. Serra D, F. Tomi and J. Casanova. 2000. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. Journal of Biochemical Systematics and Ecology 28: 61-78.

Ou, M. C., Y. H. Liu, Y. W. Sun and C. F. Chan. 2015. The composition, antioxidant and antibacterial activities of cold-pressed and distilled essential oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine vol.2015 https://doi.org/10.1155/2015/804091.

Sarrou, E., P. Chatzopoulou, K. Dimassi-Theriou and I. Therios. 2013. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of *Citrus aurantium* L. growing in Greece. Molecules. 18: 10639-10647.

Sharma, N., and A. Tripathi. 2008. Effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Microbiological Research 163(3): 337-344.

Simas D.L.R., S.B.M., Amorim, F.R.V., Goulart, C.S., Alviano, D.S. Alviano and A.J.R., Silva. 2017. Citrus species essential oils and their components can inhibit or stimulate fungal growth in fruit. Industrial Crops and Products 98: 108-115.

Yi, Q., R.E. Hoskins, E.A. Hillringhouse, S.S. Sorensen, M.W. Oberle, S.S. Fuller, and J.C. Wallace 2008. Integrating open-source technologies to build low-cost information system for improved access to public health data. International Journal of Health Geographics 7, 29(2008). https://doi.org/10.1186/1476-072x-7-29.

DPU DHURAKIJ PUNDIT UNIVERSITY มหาวิทยาลัยธุรกิจบัณฑิตย์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	สุนีย์ เจริญวุฒิธรรม
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2540 ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต วิทยาศาสตร์การอาหาร (วท.บ.) มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ. 2560 ผู้ประกอบวิชาชีพการแพทย์แผนไทย ด้านเภสัชกรรมไทย (พท.ภ.๒๕๑๔๐) สภาการแพทย์แผนไทย พ.ศ. 2561 ผู้ประกอบวิชาชีพการแพทย์แผนไทย ด้านเวชกรรมไทย (พท.ว.๒๒๗๒๗) สภาการแพทย์แผนไทย พ.ศ. 2561 Certificate of Attendance training program for Homeopathy: Hahnemann and Boeninghausen Way, Thailand พ.ศ. 2562 ผู้ประกอบวิชาชีพการแพทย์แผนไทย ด้านการผดุงครรภ์ไทย (พท.ผ.๑๒๒๑๒) สภาการแพทย์แผนไทย พ.ศ. 2562 การแพทย์โฮมีโอพาธีย์ : ทางเลือกดูแลตนเอง และครอบครัว ครั้งที่ 13 กรมการแพทย์ทางเลือก ร่วมกับ สมาคมโฮมีโอพาธีย์ประเทศไทย พ.ศ. 2563 Certificate for course covering the use of Dr. Edward Bach's system of 38 flower remedies (Level One), Thailand
ตำแหน่งและสถานที่ทำงานปัจจุบัน	ผู้จัดการผลิตภัณฑ์และฝ่ายขาย ห้างหุ้นส่วนจำกัด เทสเตอร์ โปร
ผลงานวิชาการที่ได้รับการตีพิมพ์	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากเปลือกส้ม *Citrus aurantium* L. มีฤทธิ์ยับยั้งรา *Aspergillus* sp. ในผลิตภัณฑ์ขนมปังสด (วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรและการจัดการ Journal of Agricultural Science and Management ปีที่ 4 ฉบับที่ 2 ประจำเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม 2564)