

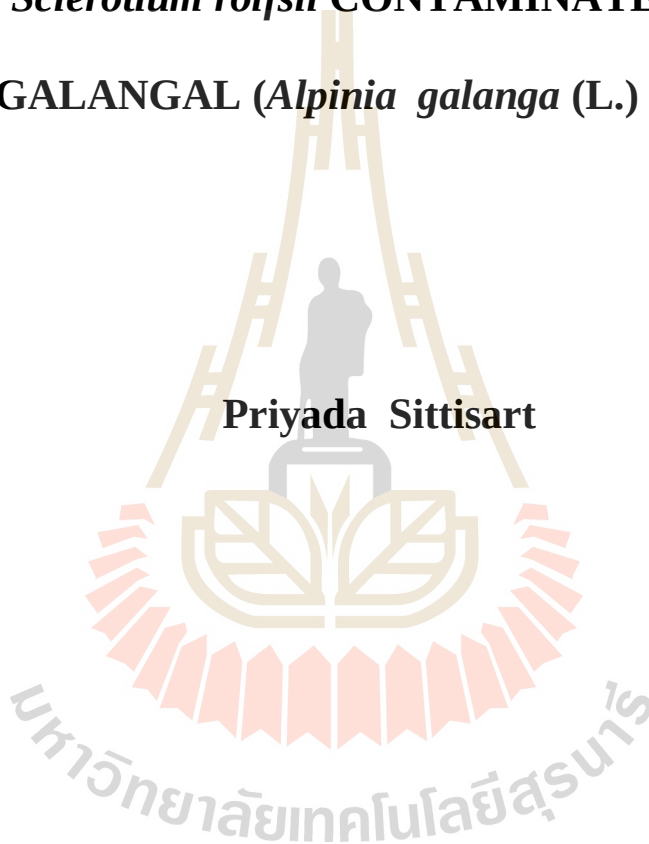
ประสิทธิภาพการล้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักผลเชอร์รี่เปรี้ยว
(*Prunus cerasus* L.) เพื่อลด ไคเมโรเซท ตะกั่ว *Sclerotium rolfsii*
บนเป็๋นในข่า (*Alpinia galanga* (L.) Wild.)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2558

**WASHING EFFECTIVENESS OF BIOSURFACTANT
FROM SOUR CHERRY (*Prunus cerasus* L.)
FOR REDUCING DIMETHOATE, LEAD,
Sclerotium rolfsii CONTAMINATED IN
GALANGAL (*Alpinia galanga* (L.) Wild.)**

Priyada Sittisart



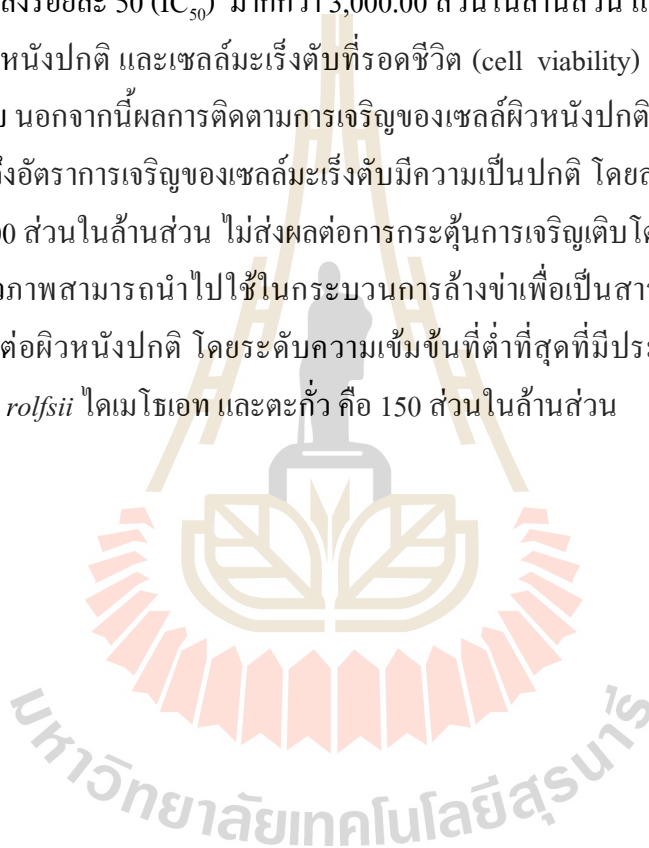
**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Food Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2015**

ปริยดา สิทธิศาสตร์: ประสิทธิภาพการล้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักผล
เชอร์รี่เปรี้ยว (*Prunus cerasus* L.) เพื่อลด ไคเมโรเอท ตะกั่ว *Sclerotium rolfsii* ปนเปื้อน
ในข่า (*Alpinia galanga* (L.) Wild.) (WASHING EFFECTIVENESS OF
BIOSURFACTANT FROM SOUR CHERRY (*Prunus cerasus* L.) FOR REDUCING
DIMETHOATE, LEAD, *Sclerotium rolfsii* CONTAMINATED IN GALANGAL
(*Alpinia galanga* (L.) Wild.)) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ
กาสลัก, 98 หน้า

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ และทดสอบประสิทธิภาพ (biosurfactant) หาความเป็นไปได้ของการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) สำหรับกระบวนการล้างเพื่อลดการปนเปื้อนทางด้านเคมี และชีวภาพในผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง (Fresh-Cut produce) และทดสอบความปลอดภัยของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังปกติ เพื่อเป็นต้นแบบในการนำไปใช้ล้างสำหรับลดการปนเปื้อนในวัตถุดิบทางการเกษตร

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นสารลดแรงตึงผิวไม่มีประจุ (nonionic surfactant) ที่เกิดจากกระบวนการหมักจากจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ในการทดสอบกระบวนการล้างจึงใช้ที่ระดับความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน (มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นความเข้มข้นที่สูงกว่าสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide solution) คือ 8 ส่วนในล้านส่วน เพื่อลดดัชนีความเสี่ยงสูงสุดที่ปนเปื้อนในข่า (*Alpinia galanga* (L.) Wild) คือ เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ไคเมโรเอท และตะกั่ว โดยกระบวนการล้างที่ประกอบด้วยการล้างแบบน้ำไหลผ่านนาน 2 นาที จากนั้นแช่ในน้ำที่มีส่วนผสมของสารฆ่าเชื้อ นาน 5 นาที โดยวัตถุดิบที่นำมาล้างเป็นข่าที่ผ่านการเติมในปริมาณที่มากเกินไป (challenge) ด้วยเส้นใยของ *S. rolfsii* 10 กรัมของน้ำหนักเปียก ต่อข่า 1 กิโลกรัม พบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้นอย่างต่ำ 150 ส่วนในล้านส่วนขึ้นไป สามารถควบคุมปริมาณเชื้อราที่หลงเหลือสุดท้ายในข่าตั้งแต่หลังกระบวนการล้างไปจนถึงการบ่มที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียสให้อยู่ในระดับ 4.00 log CFU/g (มาตรฐานกำหนด น้อยกว่า 4.00 log CFU/g ของอาหารสด) และที่ระดับความเข้มข้นนี้ได้นำไปทดสอบกลไกการยับยั้งเชื้อรา พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่งผลต่อผนังเซลล์ของเส้นใย (hypha wall) ทำให้เกิดการเสียสมดุลบริเวณชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ที่มีองค์ประกอบของไขมันและโปรตีนในชั้นนี้ และส่งผลต่อเม็ดสเคลอโรเทีย (sclerotia) โดยชะลอการงอกของเส้นใย (germ tube) นอกจากนี้มีสารพฤษเคมี (phytochemical) ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งเป็นส่วนประกอบในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติในการเกิดฟองยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และมีการนำไปใช้เป็นส่วนผสมในสารชำระล้าง (detergent) ทางการค้า คือ

ซาโปนินอยู่ในระดับ 194.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนผลการศึกษาประสิทธิภาพการลดสารตกค้างในข้าวที่ผ่านการเติมไคเมโรเซทปริมาณมากเกินพอ 0.2 มิลลิกรัมต่อข้าว 1 กิโลกรัม และข้าวที่ผ่านการเติมตะกั่วปริมาณมากเกินพอ 1 มิลลิกรัมต่อข้าว 1 กิโลกรัม พบว่าสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 50 ถึง 200 ส่วนในล้านส่วน สามารถลดปริมาณการตกค้างของไคเมโรเซทให้อยู่ในระดับที่น้อยกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และสามารถลดปริมาณตะกั่วเมื่อเทียบกับข้าวที่ไม่ผ่านการล้าง (No wash) เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการนำไปใช้งาน การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังปกติ (Normal Dermal Fibroblast) และเซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1) มีค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ลดจำนวนลงร้อยละ 50 (IC_{50}) มากกว่า 3,000.00 ส่วนในล้านส่วน และที่ความเข้มข้นดังกล่าว ยังคงมีเซลล์ผิวหนังปกติ และเซลล์มะเร็งตับที่รอดชีวิต (cell viability) สูงถึงร้อยละ 70.96 และ 75.55 ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการติดตามการเจริญของเซลล์ผิวหนังปกติ และเซลล์มะเร็งตับ (cell growth) แสดงถึงอัตราการเจริญของเซลล์มะเร็งตับมีความเป็นปกติ โดยสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 600 ส่วนในล้านส่วน ไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ สรุปได้ว่า สารลดแรงดึงผิวชีวภาพสามารถนำไปใช้ในกระบวนการล้างข้าวเพื่อเป็นสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพและไม่เป็นพิษต่อผิวหนังปกติ โดยระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนจาก *S. rolfsii* ไคเมโรเซท และตะกั่ว คือ 150 ส่วนในล้านส่วน



PRIYADA SITTISART : WASHING EFFECTIVENESS OF
BIOSURFACTANT FROM SOUR CHERRY (*Prunus cerasus* L.) FOR
REDUCING DIMETHOATE, LEAD, *Sclerotium rolfsii* CONTAMINATED
IN GALANGAL (*Alpinia galanga* (L.) Wild.). THESIS ADVISOR : ASST.
PROF. PIYAWAN GASALUCK, Ph.D., 98 PP.

FRESH-CUT PRODUCE/BIOSURFACTANT/DECONTAMINATION OF SIGNIFICANT HAZARDS/FOOD SAFETY CONTROL

The aims of this research were to apply and evaluate the biosurfactant (BSF) effectiveness as a sanitizer to possibly be used for minimizing the chemical and biological hazards in fresh-cut products and to confirm the safety of biosurfactant affecting toxicity on cell cultures, which are the prototype of contamination level decreasing in agricultural materials by washing process.

The biosurfactant used in this research was non-ionic surfactant that was produced from the spontaneous microbial fermentation. The biosurfactant concentrations used were at 50, 100, 150 and 200 ppm (mg/L), which was higher than that of chlorine dioxide solution which was 8 ppm. In order to minimize the highest risk levels of *Sclerotium rolfsii*, dimethaoate and lead (Pb) in galangals (*Alpinia galanga* (L.) Wild.), the process steps were challenged by the wet mycelium of *S. rolfsii* 10 g in 1 kg to the galangal samples, and washed by the rinsing sample with water for 2 minutes, followed by the each sanitizer soaking for 5 minutes. The results showed that the biosurfactant concentration of at least 150 ppm could control the final level of mold (based on standard level, less than 4.00 log CFU/g of fresh food) at 4 °C,

while those concentrations were demonstrated by the mode of action, such as the hypha wall inhibitory, the leakage of cell membrane, of which composing lipid and protein retardation of sclerotia germination at germ tube. In addition, the bioactive phytochemical compound possessed the foam formation, fungal inhibition and antimicrobial, of which is contained in commercial detergent, function as biosurfactant called saponin is 194.31 µg/ml. According to the study of biosurfactant efficacy for reducing the pesticide and heavy metal by means of a challenge test, the dimethoate and lead were added to the galangal at an adequate amounts of 0.20 mg/kg and 1.00 mg/kg, respectively. The results showed that the biosurfactant concentration of 50-200 ppm (mg/L) could reduce the dimethoate < 0.02 mg/kg and lead (Pb) residue which was greater than that of the No-wash treatment. The normal dermal fibroblast and liver cancer cells (SK-HEP-1 cell) tests were performed to ensure the biosurfactant implementation toxicity. Results showed that the 50 percent inhibitory concentration (IC_{50}) was over 3,000.00 ppm (mg/L). These biosurfactant concentrations showed normal dermal fibroblast and liver cancer cells survival (cell viability) at 70.96 and 75.55 percent, respectively. Moreover, the cell growth of the normal dermal fibroblast and liver cancer cells revealed a normal growth rate of liver cancer cells. The biosurfactant concentration effectively of 600 ppm had no effect on the cell growth stimulation. In conclusion, the biosurfactant can be applied as a sanitizer for the galangal washing processes and is non-toxic to skin cells. The lowest effective concentration for reducing the *S. rolfsii*, dimethoate and lead contamination is 150 ppm.

School of Food Technology

Academic Year 2015

Student's Signature

ชัชวาล ใสวิมล

Advisor's Signature



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบุคคลและกลุ่มบุคคลต่างๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำ ช่วยแก้ปัญหาและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ เกียรติกร ดร.เกรียงศักดิ์ เอี่ยมเก็บ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และดร.สุวิมล เจตะวัฒนะ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งแนะนำให้ปรึกษาในเรื่องการทดสอบ ความความเป็นพิษในเซลล์ กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ด้านวิชาการตลอด ระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนอุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ อำเภองครักษ์ จังหวัดนครนายก ที่ให้การสนับสนุนและให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่พักอาศัย ตลอดจนบุคคลกรเจ้าหน้าที่ผู้ประสานงานของสถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ที่ร่วมเรียนระดับบัณฑิตศึกษา และผู้ช่วยวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษา อบรมสั่งสอน และให้กำลังใจมาโดยตลอด จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

ปริญดา สิทธิศาสตร์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ก
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตของการศึกษา.....	3
2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 การปนเปื้อนทางด้านจุลินทรีย์.....	5
2.1.1 ราโรคพืชที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในวัตถุดิบทางการเกษตร.....	7
2.1.2 เชื้อราสเกลอโรเทียม รอล์ฟฟิไอ (<i>Sclerotium rolfsii</i>)	8
2.2 การปนเปื้อนจากสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticide)	12
2.2.1 ยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate insecticide).....	13
2.2.2 ไดเมโทเอท (dimethoate)	15
2.3 การปนเปื้อนจากโลหะหนัก	16
2.3.1 คุณสมบัติและความเป็นพิษของตะกั่ว (lead, Pb)	19
2.4 กระบวนการล้างหลังการเก็บเกี่ยว (washing procedures)	21
2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการล้าง.....	22
2.4.2 ขั้นตอนการล้างผลิตภัณฑ์ผักสดชนิด ราก ลำต้น และการตัดแต่ง (Fresh-Cut non leafy vegetable).....	23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5	สารฆ่าเชื้อ (sanitizer)	25
2.5.1	สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide).....	27
2.5.2	สารลดแรงตึงผิว (surfactants)	28
2.5.3	ความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิว.....	31
2.6	สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant).....	32
2.6.1	โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	32
2.6.2	ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	34
2.6.3	การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	35
2.7	การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	36
2.7.1	กลไกการของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อโลหะหนัก	38
2.7.2	กลไกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อสารกำจัดศัตรูพืช	40
2.7.3	กลไกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเชื้อรา.....	40
2.7.4	ความปลอดภัยของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	40
3	วิธีการทดลอง.....	42
3.1	แหล่งที่มาของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	42
3.2	การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลเชอร์รี่เปรี้ยวหมัก	42
3.3	ทดสอบคุณสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	43
3.3.1	การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด.....	42
3.3.2	การวิเคราะห์ค่าพีเอช.....	42
3.3.3	การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์	42
3.3.4	การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน	42
3.3.5	การวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนิน	42
3.4	ทดสอบคุณสมบัติด้านจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	44
3.4.1	แหล่งที่มาและการเตรียมเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> DOAC 2312.....	44
3.4.2	การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา (Antifungal Activity)	44

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.3	การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเหลวในเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane Fluidity)	44
3.4.4	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Sclerotium rolfsii</i> ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด.....	45
3.5	การทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	46
3.5.1	การเตรียมเซลล์และการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์	46
3.5.2	การทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ (Cell Viability)	46
3.5.3	การทดสอบอัตราการเจริญของเซลล์ (Cell Growth)	47
3.6	การทดสอบการเติม <i>Sclerotium rolfsii</i> DOAC 2312 ไคโมโซเอท และตะกั่วใน ปริมาณที่มากเกินไป (Challenge Test).....	48
3.6.1	แหล่งข่า (Galangals) และการเตรียม	48
3.6.2	การเตรียมเส้นใยของเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> DOAC 2312 และการเติมเส้นใยในข่าที่มีปริมาณมากเกินไป.....	48
3.6.3	การเติมไคโมโซเอทที่ความเข้มข้นที่มากเกินไปในข่า	48
3.6.4	การเติมตะกั่วที่ความเข้มข้นที่มากเกินไปในข่า.....	49
3.7	ทดสอบประสิทธิภาพการล้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	49
3.7.1	การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ สำหรับล้างข่า.....	49
3.7.2	วิธีการล้างข่า.....	49
3.8	การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการล้าง เพื่อลดอันตรายทางจุลินทรีย์ในข่า.....	50
3.8.1	การตรวจนับจำนวนของเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i>	50
3.8.2	การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด	50
3.9	การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้านการล้าง เพื่อลดอันตรายทางเคมีในข่า.....	50

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.9.1 การวิเคราะห์ปริมาณไดเมโทเอทด้วย Gas Chromatograph- Flame Photometric Detector (GC-FPD).....	50
3.9.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วด้วย Inductive Coupled Plasma Spectrometer Mass Spectrometer (ICP-MS).....	51
3.10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	51
4 ผลการทดลองและวิจารณ์	52
4.1 คุณสมบัติทางด้านเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	52
4.2 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	54
4.2.1 คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืช	54
4.2.2 ผลการศึกษา Membrane fluidity ของ <i>Sclerotium rolfsii</i> DOAC 2312 ที่รับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	56
4.2.3 ผลการศึกษาโครงสร้างภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปของ Sclerotia ที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	57
4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	60
4.3.1 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังปกติ.....	60
4.3.2 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ	61
4.3.3 การศึกษาอัตราการเจริญ (cell growth) ของเซลล์ผิวหนังปกติที่รับสัมผัส ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	62
4.3.4 การศึกษาอัตราการเจริญ (cell growth) ของเซลล์มะเร็งตับที่รับสัมผัส ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....	63
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดอันตราย จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ฆ่าศัตรูพืช.....	64
4.4.1 การศึกษาประสิทธิภาพการลดลงของเชื้อราหลังกระบวนการล้าง	64
4.4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการลดลงของดัชนีคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์หลัง กระบวนการล้าง	67

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 การศึกษาประสิทธิภาพการล้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลด อันตรายทางด้านเคมีในผลิตภัณฑ์ฆ่าสัตว์ตัดแต่ง	69
4.5.1 การศึกษาการลดลงของไดเมโทเอท (dimethoate) ด้วยกระบวนการล้าง	69
4.5.2 การศึกษาการลดลงของตะกั่ว (lead, Pb) ด้วยกระบวนการล้าง	70
5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	72
5.1 บทสรุป.....	72
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	74
รายการอ้างอิง.....	75
ภาคผนวก.....	81
ภาคผนวก ก วิธีการทดลอง.....	82
ภาคผนวก ข ผลการทดลอง.....	90
ประวัติผู้เขียน.....	99

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในสมุนไพรและเครื่องเทศ	6
2.2 จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ.....	7
2.3 ประกาศปรับระดับปริมาณสารตกค้างสูงสุดของผักสดกลุ่มราก ลำต้น ใต้ดินเขตร้อน โดย สหภาพยุโรปมีผลบังคับใช้ปี 2552	15
2.4 ปริมาณความเข้มข้นของโลหะหนักที่ตรวจพบในผักสดพร้อมบริโภค.....	18
2.5 ปริมาณโลหะหนักตกค้างไม่เกินข้อกำหนด (maximum levels) ในอาหาร	19
2.6 มาตรฐานแห่งชาติสาธารณสุขประชาชนจีน ภายใต้ USDA ว่าด้วยปริมาณตะกั่ว ที่อนุญาตให้มีสูงสุดในอาหาร	20
2.7 ระดับปกติและระดับที่เป็นพิษของตะกั่วในเลือด และปัสสาวะ.....	21
2.8 ชนิดสารฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น และความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์.....	26
2.9 สรุปความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของสารฆ่าเชื้อกลุ่มต่าง ๆ.....	30
2.10 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ.....	36
2.11 จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงดึงผิวชีวภาพและการนำไปใช้	37
4.1 คุณสมบัติทางเคมีของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ.....	53
4.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i> DOAC 2312 ที่มีสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์และสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ.....	55
4.3 ปริมาณสารไดเมโทเอตตกค้างในข้าหลังกระบวนการล้าง.....	70
4.4 ปริมาณตะกั่วที่ตกค้างในข้าหลังกระบวนการล้าง.....	71
5.1 สรุปผลการทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพื่อลดการ ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ข้าสดตัดแต่ง	74

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 เชื้อรา <i>Sclerotium rolfsii</i>	10
2.2 โครงสร้างของเซลล์ <i>Sclerotium rolfsii</i> ที่เป็นแบบมีผนังกัน	10
2.3 โครงสร้างและส่วนประกอบภายในเซลล์	11
2.4 โครงสร้างทั่วไปของฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต	13
2.5 โครงสร้างเคมีของไดเมโทเอท (Dimethoate).....	16
2.6 ปริมาณความเข้มข้นของโลหะหนัก (mg/kg) ที่ตรวจพบในผักสดทั้งหมด 28 ชนิด	17
2.7 ระบบหมุนเวียนน้ำล้างและขั้นตอนการล้างด้วยสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพ สำหรับการล้างผัก ผลไม้สดตัดแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร	23
2.8 กระบวนการล้างผัก ผลไม้ และรากหรือลำต้นใต้ดินเขตร้อน	24
2.9 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของสารลดแรงตึงผิว.....	28
2.10 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่ได้รับสัมผัสสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์	32
2.11 โครงสร้างต่าง ๆ ของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็น โมเลกุลแบบแอมฟิพาติก.....	34
2.12 ผลการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการควบคุมการงอกของสปอร์ <i>Aspergillus parasiticus</i> NCIM 898.....	38
2.13 กลไกการจับและทำปฏิกิริยาของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับโลหะหนัก	39
4.1 กิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	54
4.2 ค่า Fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ <i>Sclerotium rolfsii</i> ที่ผ่าน การสัมผัสด้วยสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	57
4.3 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อโครงสร้างและรูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทีย (sclerotia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Scanning Electron Microscope, SEM).....	59
4.4 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อร้อยละการอยู่รอด (cell viability, %) ของเซลล์ผิวหนังปกติ (Normal dermal Fibroblast cells)	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.5 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อร้อยละการอยู่รอด (cell viability, %) ของเซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1 cells).....	62
4.6 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการเจริญ (cell growth) ในเซลล์ผิวหนังปกติ (Normal Dermal Fibroblast cells).....	63
4.7 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อร้อยละการอยู่รอด (cell viability, %) ของเซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1 cells).....	64
4.8 ประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดลงของเชื้อราในข้าว ด้วยกระบวนการล้างและบ่มที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส	66
4.9 ประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดลงของเชื้อราในข้าว ด้วยกระบวนการล้างและบ่มที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส.....	67
4.10 ประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในข้าวด้วยกระบวนการล้างและบ่มที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส.....	68
4.11 ประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในข้าวด้วยกระบวนการล้างและบ่มที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส.....	69

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ANOVA	=	Analysis of variance
As	=	Arsenic
BSF	=	Biosurfactant
°C	=	Degree Celsius
Cd	=	Cadmium
Co	=	Cobalt
CFU/ml or g	=	Colonies forming unit per milliliter or gram
DMRT	=	Duncan's New Multiple Range Test
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
et al.	=	et alia (and others)
g	=	Gram
hr	=	Hour
Hg	=	Mercury
kg	=	Kilogram
L	=	Liter
LOD	=	Limit of detection
LOQ	=	Limit of quantitation
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
mm	=	Millimeter
mM	=	Millimolar

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

N	=	Normality
ND	=	Not detection
Pb	=	Lead
ppm	=	Part per million
SD	=	Standard deviation
Sn	=	Tin
w/w	=	Weight : weight
w/v	=	Weight : volume
×g	=	Gravitational acceleration
μg	=	Microgram
μl	=	Microliter
μm	=	Micrometer
%	=	Percent
mM	=	Millimolar
N	=	Normality
ND	=	Not detection
Pb	=	Lead
ppm	=	Part per million
SD	=	Standard deviation
Sn	=	Tin
w/w	=	Weight : weight
w/v	=	Weight : volume

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

$\times g$	=	Gravitational acceleration
μg	=	Microgram
μl	=	Microliter
μm	=	Micrometer
%	=	Percent



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัญหาสถานการณ์ปัจจุบันการส่งออกสินค้าผักและผลไม้สดของไทยในตลาดอาเซียนและตลาดโลกมาจากปัญหาด้านความปลอดภัย (food safety) โดยเฉพาะสหภาพยุโรปที่มีมาตรการควบคุมการนำเข้าผักผลไม้สดจากไทยเร่งด่วน (Rapid Alert System for Food and Feed; RASFF) การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogens) ในผัก ผลไม้ สมุนไพรและเครื่องเทศสูงถึงร้อยละ 13 และสารเคมีตกค้างจึงทำให้มีการออกกฎระเบียบมาตรการคุ้มครองผักและผลไม้ที่นำเข้าจากไทย ซึ่งในปัจจุบันได้มีการลงความตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures) ที่คุ้มครองชีวิตหรือสุขภาพของพืชภายในอาณาเขตของประเทศความเสี่ยงที่เกิดจากการใช้สารปรุงแต่ง สิ่งเจือปน สารพิษ หรือสิ่งมีชีวิตที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร โดยมาตรฐานและหลักเกณฑ์การพิจารณาความเสี่ยง ความปลอดภัยเหล่านี้ได้ผ่านคณะกรรมการมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex Alimentarius Commission; Codex) เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหาร เนื่องจากสิ่งปนเปื้อนที่มากับวัตถุดิบทางการเกษตรมีทั้งด้านเคมีและจุลินทรีย์ โดยเฉพาะกลุ่มของผักผลไม้ ประเภท ราก ลำต้น ใต้ดิน ที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนสูง ต้องมีการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวมากกว่าชนิดอื่น ข้อมูลจากสถาบันอาหารได้รายงานสถานการณ์การค้าอาหารไทยประจำปี 2558 และแนวโน้มการส่งออกปี 2559 พบว่าประเทศไทยมีแนวโน้มการส่งออกกลุ่มเครื่องเทศในอัตราที่สูงอย่างต่อเนื่อง แต่ปัญหาที่ตามมาจากการส่งออก คือ รายงานการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง (Fresh-Cut products) อยู่ในระดับที่สูงเกินมาตรฐานการส่งออก ผักในกลุ่มนี้ได้แก่ จิงกระเทียม พริกไทย และ ข่า (กองเศรษฐกิจการเกษตรระหว่างประเทศ, 2558) ซึ่งข่า (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Alpinia galanga* (L.) Willd. ชื่อภาษาอังกฤษ Galangal วงศ์ Zingiberaceae) จัดเป็นผักที่อยู่ในกลุ่มสมุนไพรและเครื่องเทศ นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องเทศ ในต่างประเทศนิยมนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพ เนื่องด้วยสารสกัดจากข่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และยับยั้งการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (Avasthi, Jain, Bhatnagar and Ghosal, 2015) ปัจจุบันได้มีการศึกษาสารสกัดสเตรปโตโซโตซิน (streptozotocin) ที่ได้จากข่า นำไปพัฒนาเป็นยาสำหรับรักษาโรคเบาหวานเพื่อลดระดับกลูโคสในเลือด (Verma, Mishar, Singh, Jha and Khosa, 2015) ซึ่งส่วนที่

นิยมนำมาสกัดเป็นยาและบริโภค คือ ส่วนที่เป็นลำต้นใต้ดิน หรือ “เหง้า” ที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน จุลินทรีย์โดยเฉพาะเชื้อราโรคพืช ได้แก่ *Sclerotium rolfsii* ที่สามารถสร้างเม็ดสเคลอโรเทีย สามารถดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งทนแสงแดด กรด และรังสียูวี รวมถึงสามารถเจริญและแตกตัวเป็นเส้นใยใหม่ จึงจัดเป็นเชื้อราที่สำคัญและยากต่อการทำลาย สามารถพบได้ในพืชไร่ หลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก และข้าว (Yaqub and Shahzad, 2005) นอกจากนี้สารเคมีกำจัดแมลง (insecticide) และโลหะหนักที่สะสมอยู่ในดิน พิจารณาความเสี่ยงสูงสุดปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่สามารถมีได้ (maximum residue levels; MRL) ซึ่งแต่ละประเทศสามารถกำหนดได้โดยจะต้องมีค่าเทียบเคียงกับค่ามาตรฐานของโคเด็กซ์ พบว่าสารเคมีกำจัดแมลงชนิด ไคเมโทเอท เฟนิโตรไทออน และ ไอโพรไดโอน อนุญาตให้มีสารตกค้างสูงสุดไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อพิจารณาปริมาณที่ยอมรับได้ว่าเมื่อมนุษย์ได้รับในแต่ละวันแล้วจะไม่เป็นอันตราย (acceptable daily intake; ADIs) พบว่าไคเมโทเอท มีค่าดังกล่าวเท่ากับ 0.004 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (Vongbuddhapitak et al., 2002) ที่ผ่านมาสหภาพยุโรปตรวจพบไคเมโทเอทในพืชผักส่งออกของ ไทยในปี 2553-2558 จึงทำให้สหภาพยุโรปได้ออกกฎระเบียบฉบับใหม่เพื่อปรับปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุดที่สามารถมีได้ ดังนั้นไคเมโทเอทจึงเป็นความเสี่ยงสูงสุดที่จำเป็นจะต้องควบคุมให้อยู่ในระดับที่ไม่เกินมาตรฐานกำหนด สารเคมีตกค้างที่เป็นพิษนอกเหนือจากสารเคมีกำจัดแมลงแล้ว กลุ่มของโลหะหนักเป็นอีกหนึ่งความเสี่ยงสูงสุดที่มักพบในพืช ผัก ที่อยู่ใต้ดิน โดยเฉพาะตะกั่ว จากข้อกำหนดด้านความปลอดภัยสินค้าเกษตรและอาหารอนุญาตให้พบตะกั่วได้ในพืชประเภทรากหรือลำต้นใต้ดินมีปริมาณของตะกั่วได้ไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

หนึ่งในขั้นตอนที่สำคัญและสามารถจัดการได้ภายใต้การควบคุมให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์ และวิธีการปฏิบัติการที่ดี คือ การจัดเก็บหลังการเก็บเกี่ยว (postharvest management) และกระบวนการล้าง (washing procedure) การล้างเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพนั้นอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่จะนำเอาสารประเภทสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) มาใช้ร่วมกับการล้างเพื่อยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ รวมถึงสารเคมีตกค้าง ได้แก่ คลอรีน ในรูปแบบคลอรีนไฮโปคลอไรท์ มีประสิทธิภาพในการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารสูง แต่มีข้อเสียที่เกิดจากปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) คือ คลอรีนจะไปทำปฏิกิริยากับสารออกแทนิกในน้ำก่อให้เกิดเป็นสารไตรฮาโลมีเทน (trihalomethane; THM) และ ฮาโลอะซิติกแอซิก (haloacetic acid; HAAs) สารเหล่านี้เป็นสารก่อให้เกิดมะเร็ง มีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ ระบบไหลเวียนโลหิต และอาจส่งผลต่ออวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต เป็นต้น เป็นสาเหตุให้มีการนำคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide; ClO₂) ในรูปแบบของเหลวสีเหลืองกึ่งเขียว นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และน้ำดื่ม ผลที่เกิดจากปฏิกิริยาของคลอรีนไดออกไซด์กับสารออกแทนิกที่ละลายอยู่ในน้ำมีผลความเป็นพิษน้อยกว่าทั้งในด้านปริมาณและความรุนแรง นอกจากนี้คลอรีนไดออกไซด์สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า ทำให้องค์การอนามัยโลก

(WHO) คณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (FDA) และคณะกรรมการอาหารและยาประเทศไทย (อย.) ได้ส่งเสริมสนับสนุนให้มีการใช้สารคลอรีนไดออกไซด์แทนคลอรีนทั่วไป อย่างไรก็ตามคลอรีนไดออกไซด์เป็นสารเคมีที่มีกลิ่น หากได้รับหรือสัมผัสเป็นเวลานานจะทำให้เกิดพิษ

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณสมบัติและโครงสร้างจัดเป็นสารลดแรงตึงผิว สามารถยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร รวมถึงละลายน้ำได้ดีมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการล้างฆ่า เพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สารเคมีกำจัดศัตรูพืชไดเมโทเอท และ ตะกั่ว โดยอาศัยกระบวนการล้างที่เป็นมาตรฐานสำหรับการล้างผลิตภัณฑ์ประเภทผักผลไม้สดตัดแต่ง (Fresh-Cut products) และมีการควบคุมสุขอนามัยร่วมด้วย เพื่อให้มีการนำไปประยุกต์ใช้ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยจะต้องมีความปลอดภัยต่อผู้สัมผัส และเป็นต้นแบบการนำไปใช้ในกระบวนการล้างวัตถุดิบทางการเกษตรอื่น ๆ

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อประยุกต์และทดสอบประสิทธิภาพ ความเป็นไปได้ของการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) สำหรับกระบวนการล้างเพื่อลดการปนเปื้อนทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ชำสดตัดแต่ง (Fresh-Cut Alpina)

1.2.2 ทดสอบความปลอดภัยของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังปกติ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้กระบวนการต้นแบบในการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ วิธีการ เวลา และความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ดีและมีประสิทธิภาพการนำไปใช้ในการล้างวัตถุดิบประเภทรากหรือลำต้นใต้ดิน เพื่อลดการปนเปื้อนจากเชื้อรา สารกำจัดศัตรูพืช และโลหะหนัก

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากการหมักผลเชอร์รี่เปรี้ยว นำไปทดสอบคุณสมบัติทางด้านเคมีและจุลินทรีย์ เพื่อหาความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นสารฆ่าเชื้อชีวภาพ (biosanitizer) โดยการทดสอบหาปริมาณกรดทั้งหมด (total acid) สารพิษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ซาโปนิน ฟลาโวนอยด์ และคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ รวมถึงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา และกลไกการยับยั้งเชื้อรา จากนั้นทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์

ผิวหนังปกติ (Normal Dermal Fibroblast cells) และเซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1 cells) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ แล้วทำการทดสอบล้างฆ่า (อายุ 5 ถึง 6 เดือน) มีขั้นตอนดังนี้ คือ ตัดแต่งฆ่าแล้วชั่งน้ำหนัก โดยฆ่าจะต้องมีน้ำหนัก 125 ถึง 135 กรัมต่อฆ่า 1 เหย้า เปรียบเทียบประสิทธิภาพการล้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน และน้ำสะอาด โดยตัวอย่างฆ่าที่จะนำไปล้างมีการเติมเส้นใยที่มากเกินไปของ *Sclerotium rolfsii* ปริมาณ 10 กรัมต่อฆ่า 1 กิโลกรัม (น้ำหนักเปียกของเส้นใย) สำหรับฆ่าที่มีการเติมไคเมโรเซท 0.20 มิลลิกรัมต่อฆ่า 1 กิโลกรัม ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไป และตัวอย่างที่มีการเติมตะกั่ว เช่นกัน คือ เติมในความเข้มข้นที่มากเกินไป 1 มิลลิกรัมต่อฆ่า 1 กิโลกรัม ด้วยวิธีการจุ่ม (dipping method) กรณีของเชื้อราใช้เวลา 20 วินาที ส่วนไคเมโรเซทและตะกั่วใช้เวลา 60 วินาที จากนั้นนำไปทดสอบล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 50 ถึง 200 ส่วนในล้านส่วน ด้วยวิธีการให้น้ำไหลผ่าน 2 นาที แล้วนำไปแช่ในแต่ละน้ำที่มี สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน น้ำสะอาด และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน นาน 5 นาที จากนั้นตรวจวัดและวิเคราะห์หาปริมาณที่แน่นอนที่หลงเหลือหลังการล้าง เพื่อประเมินประสิทธิภาพการล้างการเป็นสารฆ่าเชื้อชีวภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้



บทที่ 2

ปรัทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การปนเปื้อนทางด้านจุลินทรีย์

การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับพืชอาหารได้พัฒนาขึ้นมาเพื่อเป็นหลักประกันด้านการผลิตอาหารปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคผู้ผลิตและสิ่งแวดล้อมดังนั้นทุกขั้นตอนการผลิตควรดำเนินการให้ถูกต้องเป็นและเป็นไปในทิศทางเดียวกันโดยเริ่มตั้งแต่การปลูกการดูแลรักษาการเก็บเกี่ยว การปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวการล้างคัดแต่งการบรรจุหีบห่อการขนส่งจนกระทั่งการขายผลผลิตซึ่งความปลอดภัยของอาหารจะเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยการควบคุมติดตามกระบวนการผลิตที่จะต้องสามารถควบคุมหรือลดอันตรายที่มีผลกระทบต่อความปลอดภัยของอาหารซึ่งเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนอันตรายที่มีผลกระทบต่อความปลอดภัยของผักและผลไม้เกิดจากการปนเปื้อนของสารเคมีการปนเปื้อนทางจุลินทรีย์และทางกายภาพซึ่งหมายถึงมีวัสดุแปลกปลอมใดๆก็ตามปนเปื้อนผักสดและผลไม้ที่ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อสุขภาพและการยอมรับของผู้บริโภค

ผลิตภัณฑ์ผักผลไม้สดคัดแต่งมีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่เกินมาตรฐานโดยมีรายงานสาเหตุการปฏิเสธการนำเข้าสินค้าจากไทยด้วยการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป็นสาเหตุหลักคิดเป็นร้อยละ 26 ตลาด EU ร้อยละ 54 จากญี่ปุ่น และร้อยละ 13 จากสหรัฐฯ (สำนักงานที่ปรึกษาด้านอุตสาหกรรมในต่างประเทศ, 2558) ปัญหาด้านจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่การปนเปื้อนเชื้อก่อโรคในอาหาร *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* และ *Salmonella* spp. ส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นความเสี่ยงและปนเปื้อนในผักสดทั่วไป ได้แก่ ผักกาด บร็อกโคลีแตงกวา และผักกาดหอมเป็นต้น กรณีของพืชผักที่บริโภคส่วนที่เป็น ราก ลำต้น ใต้ดิน จะมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในกลุ่มที่แตกต่างจากผักผลไม้สดทั่วไป ดังตารางที่ 2.1 แสดงปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในสมุนไพรและเครื่องเทศ พบว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนและพบใน ข่า จิง ขมิ้น พริกไทยดำ ส่วนใหญ่จะพบเชื้อราในปริมาณที่สูง ในขณะที่แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ตรวจไม่พบการปนเปื้อน

ตารางที่ 2.1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในสมุนไพรและเครื่องเทศ

Spice/herb common and scientific name	ABC	MSFB	TSFB	Fungi	Coliforms	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
Black pepper <i>Piper nigrum</i>	3.04x10 ⁵	1.32x10 ³	9.10x10 ²	1.64x10 ⁴	3.44x10 ²	N.D	N.D
Chilli pepper <i>Capsicum annum</i>	1.58x10 ⁵	1.88x10 ³	8.60x10 ²	1.18x10 ⁴	< 10 ²	N.D	N.D
Cinnamon <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	1.12x10 ⁴	9.50x10 ²	6.30x10 ²	9.70x10 ³	< 10 ²	N.D	N.D
Clove <i>Eugenia caryophyllis</i>	1.30x10 ⁴	1.12x10 ³	5.30x10 ²	1.40x10 ⁴	< 10 ²	N.D	N.D
Fenugreek <i>Trigonella foenumgraecum</i>	2.32x10 ⁵	1.24x10 ³	8.70x10 ²	2.20x10 ⁴	< 10 ²	N.D	N.D
Ginger <i>Zingiber officinale</i>	2.12x10 ⁵	1.40x10 ³	6.80x10 ²	1.82x10 ⁴	1.20x10 ²	N.D	N.D
Great galangal <i>Languas galangal</i>	1.16x10 ⁵	9.20x10 ²	4.10x10 ²	1.04x10 ³	< 10 ²	N.D	N.D
Licorice <i>Glycyrrhiza glabra</i>	1.90x10 ⁴	1.32x10 ³	8.70x10 ²	1.04x10 ⁴	1.22x10 ²	N.D	N.D
Mustard <i>Brassica alba</i>	5.10x10 ⁵	1.24x10 ⁴	1.20x10 ³	1.10x10 ⁴	< 10 ²	N.D	N.D
Oat <i>Avena sativa</i>	1.64x10 ³	8.70x10 ²	1.10x10 ³	1.04x10 ⁴	< 10 ²	N.D	N.D
Oregano <i>Origanum vulgare</i>	6.40x10 ³	3.10x10 ²	1.20x10 ³	1.34x10 ⁴	1.40x10 ²	N.D	N.D
Pimento <i>Pimenta dioica</i>	4.10x10 ³	1.20x10 ²	9.10x10 ²	1.30x10 ⁴	3.18x10 ²	N.D	N.D
Stevia <i>Stevia rebaudiana</i>	1.88x10 ⁵	5.40x10 ²	6.70x10 ²	2.20x10 ⁴	< 10 ²	N.D	N.D
Tea <i>Camellia sinensis</i>	1.18x10 ³	7.10x10 ²	4.80x10 ²	1.30x10 ⁴	< 10 ²	N.D	N.D
Turmeric <i>Curcuma longa</i>	1.22x10 ⁴	8.50x10 ²	5.10x10 ²	1.52x10 ⁴	< 10 ²	N.D	N.D
White pepper <i>Piper nigrum</i>	5.10x10 ⁴	9.70x10 ³	8.10x10 ²	1.22x10 ⁴	3.24x10 ²	N.D	N.D

หมายเหตุ : ABC คือ แบคทีเรียกลุ่ม aerobic mesophilic bacteria

MSFB คือ แบคทีเรียกลุ่ม mesophilic spore former bacteria

TSFB คือ แบคทีเรียกลุ่ม thermophilic spore former bacteria

ND คือ ตรวจไม่พบ (Not detected)

ที่มา : Dababneh (2013)

จากข้างต้นจะเห็นได้ว่า ข้า จัดอยู่ในพืชกลุ่มสมุนไพรและเครื่องเทศและยังบริโภคส่วนที่เป็นลำต้นใต้ดิน ความสูญเสียของผลิตผลทางการเกษตรส่วนใหญ่จึงเกี่ยวข้องกับเชื้อราเป็นหลัก โดยพบว่าปริมาณเชื้อราที่คัดแยกได้จากข้า คิดเป็นร้อยละ 81.20 (ตารางที่ 2.2) นอกจากนี้มีการรายงานถึงจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อราที่มีผลไปทำลายผลิตผลทางการเกษตรหลังการเก็บ

เกี่ยวข้องทำให้เกิดความเสียหายระหว่างการขนส่ง เก็บรักษาจนไปถึงผู้บริโภค (Khamna, Yokota and Lumyong, 2009) ดังนั้นการที่จะลดความเสียหายต้องมีการควบคุมที่ถูกต้อง

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ

S. No	Name of spices	Botanical Name	Plant Part Used	% of fungal infection	Bacteria	Yeast
1	Galangal	<i>Alpinia officinarum</i>	Rhizomes	81.2		
2	Turmeric	<i>Curcuma longa</i>	Rhizomes	40		+
3	Coriander	<i>Coriandrum sativum</i>	Seed	100		
4	Fennel	<i>Foeniculum vulgare</i>	Seed	80		+
5	Anise	<i>Pimpinella anisum</i>	Seed	2		+
6	Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Bark	70	+	
7	Ginger	<i>Zingiber officinale</i>	Rhizomes	75		
8	Black pill	<i>Nigeria sativa</i>	Seed	50		+
9	Nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>	Fruit	25		
10	Caraway	<i>Carum carui</i>	Seed	13.3		+
11	Sesame	<i>Sesamum indicum</i>	Seed	15	+	
12	Cardamom	<i>Elettaria cardamemum</i>	Fruit	65		
13	Black pepper	<i>Piper nigrum</i>	Seed	45		+
14	Cumin	<i>Cuminum cyminum</i>	Seed	100		

หมายเหตุ : + หมายถึง ตรวจพบ

ที่มา : Gali (2014)

2.1.1 ราโรคพืชที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในวัตถุดิบทางการเกษตร

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพืชมากที่สุด เมื่อพืชติดเชื้อแล้วจะก่อให้เกิดความเสียหาย ที่ส่งผลกระทบต่ออายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเชื้อราสามารถทำให้เกิดอาการประเภทต่างๆ บนพืช เช่น ใบเป็นแผลจุด ใบไหม้ ใบเหี่ยว รากเน่า โคนเน่า ผลเน่า เมล็ดเน่า หรือแห้งตายทั้งต้น เชื้อราส่วนใหญ่มีการแพร่ระบาดโรคด้วยส่วนที่เรียกว่า สปอร์ (spore) โดยมี น้ำ ลม หรือสิ่งมีชีวิตเป็นตัวนำ หรืออาจติดไปกับส่วนของพืชและดินที่เป็นโรค เชื้อราบางชนิดพักตัวอยู่ในส่วนของพืชและดินเป็นเวลานานนับปี มีความสามารถเข้าทำลายพืชได้ทั้งทางแผล ช่องเปิดธรรมชาติของพืช หรือสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อพืชได้โดยตรง (สวทช, 2559) แบ่งเชื้อราโรคพืชเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 4 กลุ่ม

2.1.1.1 ไฟโคไมทิส (phycomycets) มีลักษณะที่สำคัญคือ เชื้อราเส้นใยที่ไม่มีผนังเซลล์กั้นด้านขวาง เรียกว่า โคนไซติกไฮฟีหรืออะเซพเทตไฮฟี (coenocytic hyphae หรือ aseptate

hyphae) ขยายพันธุ์ทั้งแบบใช้เพศ โดยผสมระหว่างเส้นใยที่มีลักษณะและเพศต่างกัน และขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศโดยสร้างไซโกสปอร์ หรือสปอร์ที่มีหางในถุงหุ้มไซโกสปอร์ (zoosporangium) สปอร์เหล่านี้จะแพร่ระบาดโดยลม น้ำ เชื้อราในกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคที่สำคัญกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น โรคราน้ำค้างของข้าวโพด เกิดจากเชื้อสเคลอโรสปอรา ซอร์โง โรครากเน่าของทุเรียน เกิดจากเชื้อไฟทอฟทอรา เป็นต้น

2.1.1.2 แอสโคไมซีทิส (ascomycets) เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกัน (septate hyphae) ขยายพันธุ์ทั้งแบบไม่มีเพศ โดยสร้างสปอร์ที่เรียกว่า โคนิเดีย (conidia) และแบบใช้เพศโดยผสมระหว่างเส้นใยที่มีลักษณะเพศต่างกัน จะเกิดเป็นแอสโคสปอร์ (ascospore) ในถุงหุ้มสปอร์ (ascus) ถุงหุ้มสปอร์นี้อยู่ในกลุ่มเส้นใยที่ผสานตัวกันทำให้เกิดเป็นผนังหนาสีดำ เรียกว่า ฟรุติงบอดี (fruiting) คนโทปากเปิด (perithecium) และรูปถ้วยแซมเปญ (apothecium) เมื่อเกิดบนพืชเป็นโรคโดยจะเห็นเป็นจุดสีดำๆ ได้แก่ โรคราแป้งข้าวขององุ่น กุหลาบ เป็นต้น

2.1.1.3 เบสิดิโอไมซีทิส (basidiomycetes) เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกัน ขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศโดยสร้างสปอร์ เรียกว่า โคนิเดีย และแบบมีเพศ โดยผสมระหว่างเส้นใยที่มีลักษณะและเพศต่างกันเกิดสปอร์ เรียกว่า เบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ซึ่งอาจเกิดอยู่ในฟรุติงบอดี หรือเกาะติดอยู่บนเส้นใยที่มีรูปร่างคล้ายกระบอง เรียกว่า เบสิดียม (basidium) เชื้อราในกลุ่มนี้ทำให้เกิดโรคพืชต่างๆ เช่น โรคสนิม เกิดจากเชื้อยูสตีลาโก เมย์คิส โรคเขม่าดำหรือเส้นดำ ของอ้อย เกิดจากเชื้อยูสตีลาโก ไชตามิเนีย เป็นต้น

2.1.1.4 ฟังไจิมเปอร์เฟกไท หรือ คิวเทอโรไมซีทิส (fungi imperfecti or deuteromycetes) เป็นเชื้อราที่เส้นใยมีผนังกัน จัดให้เป็นเชื้อราในกลุ่มชั่วคราว เนื่องจากไม่พบการสืบพันธุ์แบบมีเพศ พบเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ จะมีการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า โคนิเนีย เกิดจากก้านสปอร์ที่เรียกว่า โคนิไดโอฟอร์ (conidiophore) หรือบรรจุอยู่ในฟรุติงบอดี ซึ่งสามารถเห็นด้วยตาเปล่า การแพร่ระบาดของราในกลุ่มนี้มักเกิดขึ้นหรือติดไปกับส่วนของพืช เชื้อราในกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของโรคพืชที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรคใบจุด ใบไหม้ และรากเน่า เกิดจากเชื้อราหลายชนิด เช่น ฟิวราเรียม แอลเทอนาเรียคอลลีโททริเซียม โกลิโอสปอเรียมเซอร์โคสปอรา เซอร์วูลาเรีย และ สเคลอโรเทียม เป็นต้น โดยเชื้อราในกลุ่มนี้เป็นปัญหาสำคัญในกลุ่มพืช ลำต้นใต้ดิน และข่า ได้แก่ สเคลอโรเทียมที่มีลักษณะและโครงสร้างพิเศษที่ยากต่อการทำลาย ทนแสงแดด สารเคมี และรังสียูวี เมื่อปนเปื้อนไปกับวัตถุดิบทางการเกษตรจะก่อให้เกิดการเน่าเสีย ส่งผลต่ออายุการเก็บรักษา เนื่องจากสามารถทนต่อสถานะอุณหภูมิต่ำ (ปราณี พัฒนาพิพิธไพศาลและ ชนิดภา นวะพิณ, 2555) ซึ่งสเคลอโรเทียม มีคุณสมบัติและลักษณะต่างดังต่อไปนี้

2.1.2 เชื้อราสเคลอโรเทียม รอล์ฟสีย (Sclerotium rolfii)

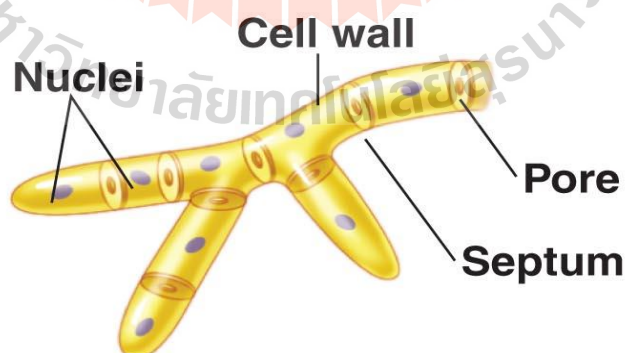
Sclerotium rolfii เป็นราในอาณาจักรฟังไจ (fungi) มีระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัย

พืชไม่สร้างสปอร์เหมือนราทั่วไปแต่จะสร้างเม็ดสเคลอโรเทีย (sclerotia) เกิดจากการที่เส้นใยพันกันอัดแน่นจนเป็นเม็ดกลมขนาดใกล้เคียงกับเมล็ดพันธุ์ผักกาดตอนเริ่มสร้างจะเป็นเม็ดสีขาวเมื่อเจริญเต็มที่จะกลายเป็นสีน้ำตาลเป็นโครงสร้างที่ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมช่วยให้เชื้อราชนิดนี้อยู่ข้ามฤดูได้ยังสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและพักตัวอยู่ในดินได้นานหลายปีเม็ดสเคลอโรเทียที่พักรอจะงอกกระตุ้นให้มีการงอกของเส้นใย (germ tube) และเข้าทำลายพืชได้ เชื้อรานี้สามารถทำลายพืชได้มากกว่า 500 ชนิด จึงเป็นสาเหตุโรคพืชในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดรวมทั้ง พืชตระกูลขิง ทำให้พืชมีอาการเหี่ยวและเหี่ยวตายในที่สุด การเข้าทำลายพืชของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* (รูปที่ 2.1) มีรายงานพบว่าเชื้อมีการสร้างเส้นใย (mycelia aggregates) ในขณะที่เข้าทำลายพืชแต่ไม่ทราบถึงบทบาทของโครงสร้างนี้ในการทำให้เกิดโรค ต่อมาได้มีการศึกษาในพืช 3 ชนิด คือ ถั่ว ชูการ์บีท และแครอท พบว่าเชื้อ *Sclerotium rolfii* จะสร้างโครงสร้างที่เรียกว่าเส้นใยเป็นกลุ่ม ซึ่งมีรูปร่างคล้ายโดม ทำหน้าที่แทงเข้าทำลายผนังเซลล์พืช (infection cushions) โดยโครงสร้างนี้จะทำหน้าที่ปล่อยเอนไซม์และกรดออกซาลิก (oxalic acid) ออกมาทำลายเซลล์พืชก่อนการแทงเส้นใยเข้าไป เส้นใยที่เจริญออกมา เรียกว่าจุดสัมผัสยึดพืช (penetration peg) มีขนาดความกว้าง 1 ถึง 3 ไมครอน ทำหน้าที่แทงผ่านผิวของพืชเข้าไป นอกจากนี้ส่วนปลายของเส้นใยเดี่ยว จะพบการสร้างเส้นใยเป็นรากยึดแผ่เป็นตุ่ม (appressorium) ซึ่งมีจุดสัมผัสยึดพืชที่จะแทงผ่านผนังเซลล์ของพืชเข้าสู่เซลล์ภายในได้เช่นกัน ทำให้โครงสร้างการเจริญในลักษณะข้างต้นยากต่อการทำลายหรือล้างออกด้วยน้ำสะอาดการเกิดโรคติดเชื้อของพืชเกือบทั้งหมดเป็นผลของปฏิกิริยาทางชีวเคมีระหว่างสารที่เชื้อปล่อยออกมาในพืช เอนไซม์ สารพิษ สารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulators) โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) และปฏิชีวนะสารต่างๆ เช่น กรดออกซาลิก เอนไซม์เอนโด โพลีกาแลคทูโรเนส (endo-polygalacturonase) ที่เข้าทำลายพืชให้เกิดความเสียหาย นอกจากนี้ เอนไซม์โพลีกาแลคทูโรเนสมีชื่อตามระบบ IUPAC ว่า poly - α -1,4- galacturonide glyconohydrolase ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคซิดิกที่อยู่ต่อกับหมู่คาร์บอกซิลย่อยแบบไม่เป็นระเบียบในสายโพลีเมอร์ (endo-splitting) ในสารประกอบเพคติน และกรดออกซาลิก (oxalic acid) ที่เชื้อราชนิดนี้ผลิตขึ้น จัดได้ว่าเป็นสารพิษที่มีผลต่อไต เป็นอันตรายต่อระบบปัสสาวะและไตมีลักษณะอีกเสบรุนแรง



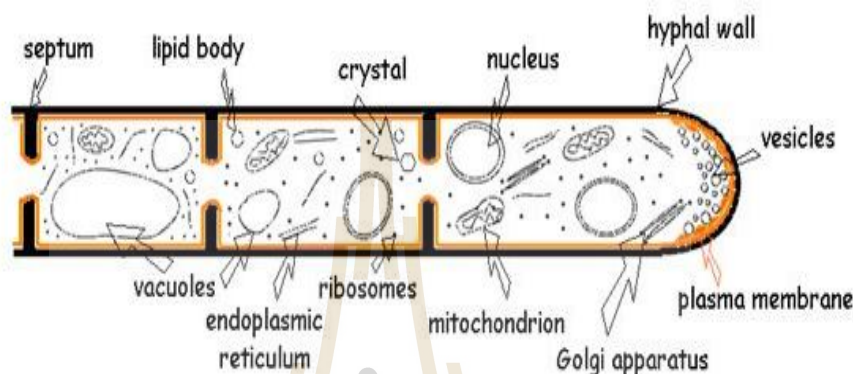
รูปที่ 2.1 เชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

2.1.2.1 สันฐานวิทยาของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* จัดอยู่ในคลาสดิวเทอโรไมซีทิส (class Deuteromycetes) ดิวิชันยูไมโคไฟตา (division Eumycopyta) และออเดอร์ไมซีเลียเลส (order Myceliales หรือ Mycelia Sterilia หรือ sterile fungi) เป็นเชื้อราที่ไม่พบการสร้างสปอร์สำหรับสืบพันธุ์ (asexual spores) ที่มีลักษณะต่างไปจากเส้นใยปกติและการอยู่ข้ามฤดูกาลโดยจะสร้างโครงสร้างพิเศษเรียกว่าสเคลอโรเทีย (sclerotia) ซึ่งเกิดจากกลุ่มเส้นใยที่มอดตัวกันแน่น ลักษณะคล้ายเมล็ดผักกาดเซลล์ของเชื้อราชนิดนี้เป็นแบบหลายเซลล์โดยแต่ละเซลล์จะเรียงต่อกันเป็นเส้นใย (hypha) และเมื่ออยู่รวมกันเป็นกลุ่มจะเรียกว่า กลุ่มเส้นใย (mycelium) ซึ่งเส้นใยแต่ละเส้นใยสามารถแตกแขนงและเจริญกลายเป็นเซลล์ใหม่ได้



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของเซลล์ *Sclerotium rolfsii* ที่เป็นแบบมีผนังกัน
ที่มา : Whittaker (1967)

รูปที่ 2.2 แสดงโครงสร้างของเชื้อรา ชนิดนี้เป็นแบบเส้นใยมีผนังกัน (septate hyphae) คือ ในแต่ละตอนของเส้นใยจะมีผนังกันทำให้มีลักษณะเป็นห้องๆ โดยเส้นใยจะประกอบด้วยส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้ ผนังเซลล์ (hyphal wall) เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) นิวเคลียส (nucleus) ไรโบโซม (ribosome) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum) กอลจิแอปพาราตัส (golgi apparatus) แวกิวโอล (vacuole) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และช่องในผนังกัน (septum) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 โครงสร้างและส่วนประกอบภายในเซลล์

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Whittaker (1967)

2.1.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Sclerotium rolfii* การเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเชื้อขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิและความชื้น นอกจากนั้นชนิดและส่วนประกอบของอาหารระดับความเป็นกรดค่าแสงการถ่ายเทอากาศและ ไบโอไทป์ (biotype) ของเชื้อก็มีส่วนทำให้การเจริญแตกต่างกันไป อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดประมาณ 33 องศาเซลเซียสอุณหภูมิที่มีความสำคัญต่อสีของเมล็ดเคลอโรเทียที่ 22 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่านี้สีของเมล็ดเคลอโรเทียจะอ่อนลงและงอกได้ในช่วง 10 ถึง 35 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส และเมล็ดเคลอโรเทียจะไม่งอกที่ความชื้นต่ำกว่าจุดอิ่มตัวของไอน้ำแต่ที่ความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่าร้อยละ 99 สามารถงอกได้ดีและเมื่อการถ่ายเทอากาศไม่ดีการงอกจะเป็นไปได้ไม่ดีเช่นกัน การงอกจะลดลงเมื่อเมล็ดเคลอโรเทียยังอยู่ลึกกลงไปในดิน เมื่อสภาพแวดล้อมอื่นๆเหมาะสม การเจริญเติบโตของเส้นใยในช่วงมืดตลอดจะเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อไว้ในที่ที่มีแสงสว่างตลอดเวลาที่ 25 องศาเซลเซียสเชื้อจะเจริญได้มากที่สุดและเมล็ดเคลอโรเทียจะถูกสร้างมากที่สุดในที่ที่มีแสงจากรายงานการศึกษาวิจัยต่างได้สรุปว่าเชื้อรา *Sclerotium rolfii* เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดจะมีผลต่อขนาดและจำนวนเมล็ดเคลอโรเทียกล่าวคืออาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดจะสร้างเมล็ดเคลอโรเทียจำนวน

น้อยลงและขนาดเล็กกว่าการเลี้ยงบนอาหาร PDA (Lyle, 1953) นอกจากนี้พบวิตามินไทอามีน (thiamine) เก็บอยู่ภายในเมล็ดสเคลอโรเทีย ดังนั้นถ้านำเมล็ดสเคลอโรเทียไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีไทอามีนเชื้อก็ยังสามารถเจริญได้เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* เจริญได้ในช่วงค่าพีเอช (กรด-ด่าง) ก่อนข้างกว้าง (พีเอช 3.5 ถึง 6.5) และสร้างเมล็ดสเคลอโรเทียมากที่สุดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 เม็ดสเคลอโรเทียจะงอกได้ดีในช่วงค่าพีเอช 2.6 ถึง 7.7 โดยที่ช่วงค่าพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการงอกคือ 2.6 ถึง 4.5 และที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 2.1 เม็ดสเคลอโรเทียจะไม่งอก

2.2 การปนเปื้อนจากสารกำจัดศัตรูพืช (pesticide)

สินค้าเกษตรและอาหารของไทยเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายทั่วโลก รวมถึงพืชผักและผลไม้สดหลายประเภท เมื่อปี 2558 การส่งออกสินค้าเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรมีสัดส่วนการส่งออกถึง 1 ใน 5 ของการส่งออกทั้งหมดของประเทศไทยที่ส่งออกไปตลาดสหภาพยุโรป (European Union; EU) เป็นมูลค่าประมาณ 128, 000 ล้านบาท อย่างไรก็ตามการส่งออกผักผลไม้ไปยุโรปจะต้องได้มาตรฐานและมีกระบวนการตรวจสอบคุณภาพที่เข้มงวด แบ่งออกเป็น 2 ด้านหลัก ได้แก่ ด้านสุขอนามัยของคน คือ การตรวจสอบสารตกค้างที่จะต้องไม่มีสารเคมีที่เป็นพิษหลงเหลืออยู่ในผักผลไม้ ไม่ว่าจะเป็นยาฆ่าแมลง หนู หรือสารเคมีปลอมปนอื่นๆ และการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์รวมถึงด้านสุขอนามัยพืชที่จะต้องตรวจสอบว่าผักผลไม้ต้องปราศจากสารกำจัดศัตรูพืช สารเคมีกำจัดแมลงซึ่งเกษตรกรไทยมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและแมลงอย่างกว้างขวาง และใช้ในปริมาณสูง โดยสารกำจัดศัตรูพืช (pesticides) หมายถึง สารเคมีที่มนุษย์นำมาใช้กำจัด ทำลาย ควบคุม และป้องกันสิ่งมีชีวิตที่เป็นศัตรูมารบกวนความเป็นอยู่ของมนุษย์ สัตว์เลี้ยงและพืชสามารถแบ่งชนิดของสารกำจัดศัตรูพืช (pesticides) ตามการออกฤทธิ์ได้ 5 ชนิด ดังนี้

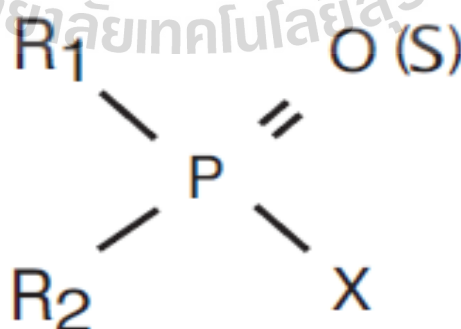
- (1) สารฆ่าแมลง (insecticides) เช่น ดีดีที (DDT) ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate)
- (2) สารฆ่าสัตว์ฟันแทะ (rodenticides) เช่น สารหนู
- (3) สารกำจัดวัชพืช (herbicides)
- (4) สารฆ่าเชื้อรา (fungicides)
- (5) กลุ่มเบ็ดเตล็ด

โดยสารฆ่าแมลง (insecticides) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดคือ สารฆ่าแมลงชนิดอนินทรีย์สาร (inorganic insecticides) ได้แก่ ปรอต ตะกั่ว สารหนู บิสมัท พลวง ฟลูออรีน ฟอสฟอรัส เป็นต้น สารฆ่าแมลงชนิดอินทรีย์สังเคราะห์ (synthetic organic insecticides) ได้แก่ พวกไฮโดรคาร์บอนที่มีคลอรีนเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล (chlorinate hydrocarbons) เช่น ดีดีที (DDT) และฟอสเฟตอินทรีย์ (organophosphates) ได้แก่ ฟอสฟอริลคลอไรด์ (phosphoryl chloride) พาราไทออน

(parathion) และ โฟลิดอล (folidol) ในกลุ่มคาร์บาเมต (carbamates) ได้แก่ แอลดิคาร์บ (aldicarb) คาร์โบฟูแรน (carbofuran) เป็นต้น ส่วนสารฆ่าแมลงชนิดสุดท้าย คือ สารฆ่าแมลงชนิดอินทรีย์จากพืช (organic insecticides from plants) เช่น ไพรีทรัม ทางไหล ตะไคร้หอม สะเดาอินเดีย ยาสูบ เป็นต้น จากข้อมูลสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) สุ่มตรวจผักผลไม้ พบสารพิษตกค้างเกินมาตรฐาน 11 ชนิด ได้แก่ คลอไพริฟอส (chlorpyrifos) มาลาไธออน (malathion) โมโนโครโตรฟอส (monocrotophos) โปรฟีโนฟอส (profenfos) โอเมโทเอต (omethoate) ไซเปอร์เมทริน (cypermethrin) ไดเมโทเอต (dimethoate) แลมบ์ดาไซฮาโลทริน (lambdacyhalothrin) ไดโครโตฟอส (dicrotophos) และ อีพีเอน (Ethyl p-nitrophenyl thionobenzene phosphonate; EPN) นอกจากนั้นในปี 2553-2558 สหภาพยุโรปได้ตรวจพบสารตกค้างไดเมโทเอต มากถึง 6 ครั้ง ซึ่งไดเมโทเอตเป็นสารกำจัดศัตรูพืชประเภทสารฆ่าแมลง (insecticides) อยู่ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate)

2.2.1 สารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate insecticides)

ออร์กาโนฟอสเฟตเป็นยาฆ่าแมลงกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ใช้ในปัจจุบัน แทนที่สารฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน (organochlorine insecticides) เนื่องจากมีความสามารถในการฆ่าแมลงได้กว้างมากกว่ายาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน และไม่มีความเสี่ยงในสภาพแวดล้อม หรือตกค้างในสิ่งแวดล้อมนานเท่ากับยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน อย่างไรก็ตามยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตมีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์มีกระดูกสันหลังสูงกว่ายาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนคลอรีน การเป็นพิษส่วนใหญ่เกิดจากการหายใจ สัมผัสเข้าทางผิวหนัง อาการที่เกิดคือ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ เวียนหัวอาเจียน ตะคริว ท้องร่วง แขนขาออก น้ำตาไหลพราก น้ำลายไหลเหงื่อแตกตามตัว ตัวเขียว และกล้ามเนื้อกระตุก อาจมากถึงชักหมดสติและตายได้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทั่วไปของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟต

ที่มา : Costa (2006)

โครงสร้างทั่วไปของยาฆ่าแมลงประเภทออร์กาโนฟอสเฟตแสดงดังรูปที่ 2.4 ซัลเฟอร์หรือออกซิเจนจะต้องเชื่อมโดยตรงกับฟอสฟอรัส ซึ่งมีวาเลนซ์เป็นห้า R_1 และ R_2 จะต้องเป็นกลุ่มอัลคอกซี (alkoxy) อัลคิล (alkyl) หรืออะมิโน (amino) และ X ต้องเป็นกลุ่มเอซิล (acyl) หรือกลุ่มที่มีประจุลบในกรดอินทรีย์ หรืออนินทรีย์ เช่น ฟลูโอรีน (fluorine) ไซยาเนต (cyanate) ไธโอไซยาเนต (thiocyanate) หรือต้องเป็นส่วนหนึ่งของกรด เช่น อินอล (enol) เมอแคปโต (mercapto) ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์ด้วยโครงสร้างฟอสฟอรัสจับกับซัลเฟตด้วยพันธะคู่ การจับกันลักษณะดังกล่าวมีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ acetyl choline esterase (AchE) ที่ทำให้เกิดการค้างของ acetyl choline ที่ปลายประสาท สามารถจำแนกประเภทของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มไดเอท็อกซี (diethoxy) ยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้มีความคงทนสูง และมีพิษตกค้างนานกว่ายาฆ่าแมลงในกลุ่มไดเมท็อกซี ตัวอย่างยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้คือ ดีมีตอน (demeton) ไดอาซีนอน (diazinon) โฟเรท (phorate) และทีอีพีพี (TEPP) ส่วนกลุ่มไดเมท็อกซี (dimethoxy) กลุ่มนี้เป็นสารแปรสภาพง่าย ของกรดฟอสฟอริกที่ประกอบด้วยไฮโดรเจนส่วนหนึ่ง ต่อเนื่องกัน ยาฆ่าแมลงในกลุ่มนี้คือ มาลาไธออน (malathion) ไตรคลอโรฟอน (trichlorfon) โมโนโครฟอส (monochlorophos) คาร์โบฟีโนไทธ-ออน (carbophenothion) คูมาฟอส (cumaphos) ครูฟอเมต (crufomate) ไดคลอโรวอส (dichlorvos) เฟนไทธออน (fenthion) เมวินฟอส (mevinphos) รอนเนล (runnel) และฟอสฟามิดอน (phosphamidon) ได้มีการนำมาลาไธออนมาใช้ในครัวเรือน และสัตว์เลี้ยง และไตรคลอโรฟอนใช้ในการเกษตรกับพืชและการควบคุมแมลงวันในฟาร์ม ยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ที่สามารถดูดซึมมาก ได้แก่ ไดเมโทเอท

ด้วยกลไกการออกฤทธิ์ที่มีอันตรายต่อผู้สัมผัส ปี 2552 สหภาพยุโรปได้ออกกฎระเบียบใหม่เพื่อปรับระดับสารตกค้างสูงสุดของยาปราบศัตรูพืชและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ 3 ชนิด โดยจากกฎระเบียบที่ปรับใหม่ในกลุ่มผักที่บริโภคส่วนราก ลำต้นใต้ดินเขตร้อน (tropical root and tuber vegetable) ให้มีปริมาณตกค้างสูงสุดในผลิตภัณฑ์ผักสด ตัดแต่ง ให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าเดิม แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ประกาศปรับระดับปริมาณสารตกค้างสูงสุดของผักสดกลุ่มราก ลำต้นใต้ดินเขตร้อน
โดยสหภาพยุโรปมีผลบังคับใช้ปี 2552

Groups and examples of individual products to which the MRLs apply	Pesticide residues and maximum residue levels (mg/kg)
Azoxystrobin	0.05 ⁽¹⁾
Indoxacab	0.02 ⁽¹⁾
Ioxynil	0.05 ⁽¹⁾
Dimethoate	0.02 ⁽²⁾
Cyprodinil	0.05 ⁽³⁾
Dithiocarbamates	0.05 ⁽³⁾

ที่มา : ⁽¹⁾ Commission Regulation (EC) No 1050/2009 (2009)

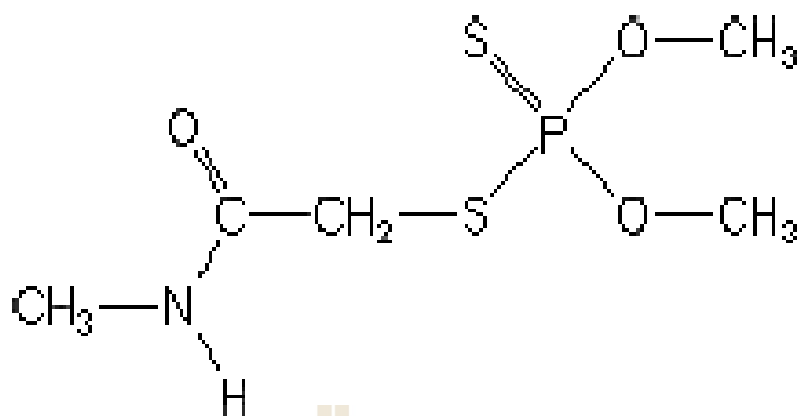
⁽²⁾ Commission Regulation (EC) No 1097/2009 (2009)

⁽³⁾ Commission Regulation (EC) No 822/2009 (2009)

จากตารางที่ 2.3 พบว่าไดเมโทเอท จัดอยู่ในกลุ่มที่มีการปรับปริมาณสารตกค้าง ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมและลดการปนเปื้อนหรือสาร ไดเมโทเอทที่ตกค้างในข้าว เพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานการส่งออก ลดการกีดกันด้านการค้า และที่สำคัญเพื่อให้ผู้บริโภคได้วัตถุดิบที่ปลอดภัย และไม่เป็นพิษต่อร่างกาย

2.2.2 ไดเมโทเอท (dimethoate)

ไดเมโทเอทเป็นสารเคมีตกค้างที่มีการปรับข้อกำหนดใหม่ของสหภาพยุโรปมีชื่อสารเคมี o,o dimethyl s-(N-methylcarbamoylmethyl) phosphorodithioate โครงสร้างแสดงดังรูปที่ 2.5 คุณสมบัติทางเคมีกายภาพตัวผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 52 ถึง 52.5 องศาเซลเซียสความหนาแน่นสัมพัทธ์ 1.277 (65 องศาเซลเซียส) ดัชนีหักเห 1.5334 (65 องศาเซลเซียส) อยู่ใน 21 องศาเซลเซียส การละลายในน้ำเป็น 2.5 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ส่วนใหญ่ได้ยาก เช่นแอลกอฮอล์ คีโตน อีเทอร์ เอสเทอร์ เบนซีน โทลูอิน เป็นต้น ไม่ละลายในปิโตรเลียมอีเทอร์และไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัว มีความเสถียรในสารละลายที่เป็นกรด ย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสารละลายเบสมีเสถียรภาพในแสงแดด เป็นสารเคมีฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพสูง มีผลสำหรับศัตรูพืชหลากหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งศัตรูพืชชนิดเจาะคูด สามารถควบคุมเพลี้ย หนอนหนอนใบ เพลี้ยไฟ แมลงวันผลไม้ เพลี้ยจักจั่น และเพลี้ยหอย เป็นต้น

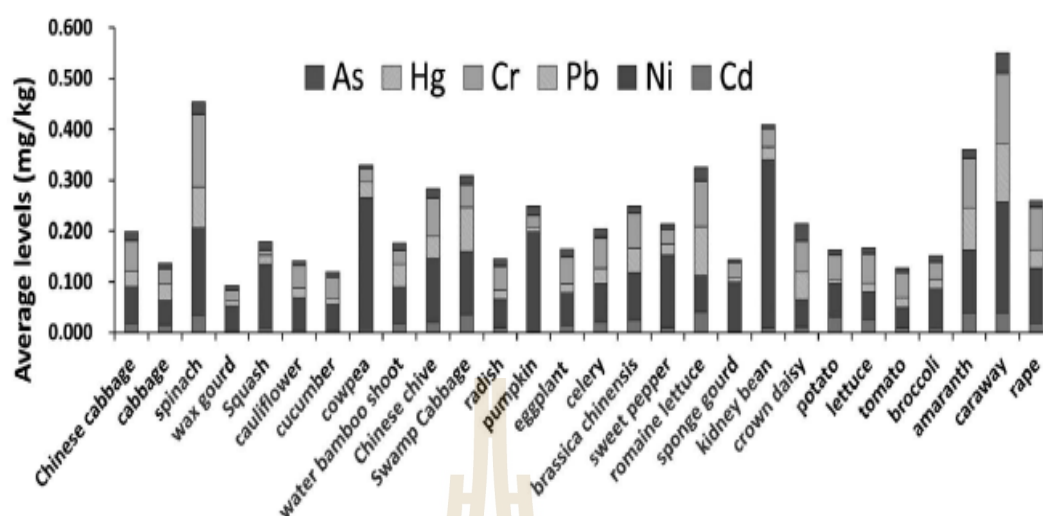


รูปที่ 2.5 โครงสร้างเคมีของไดเมโทเอท (dimethoate)

ที่มา : European Food Safety Authority (2012)

2.3 การปนเปื้อนจากโลหะหนัก

โลหะเป็นสารที่พบอยู่ทั่วไปการปนเปื้อนของโลหะหนักในอาหารของมนุษย์ มีสาเหตุที่มาสำคัญ 3 ประการ คือ จากธรรมชาติ คือ ในดิน น้ำ อากาศ พืชและสัตว์ ตามวงจรธรรมชาติจากของเสียทางอุตสาหกรรม ไม่ว่าจะเป็นโรงงานผลิตสารเคมี ถลุงโลหะ หล่อหรือผสมโลหะ ฯลฯ โลหะที่ออกสู่สิ่งแวดล้อมจะมีทั้งเป็นก๊าซ ของเหลว ของแข็งและจากกระบวนการผลิตอาหาร เช่น การสัมผัสระหว่างอาหารกับเครื่องจักรและอุปกรณ์ระหว่างผลิต และโลหะจากภาชนะบรรจุอาหาร โลหะบางชนิดมีความเป็นพิษแม้จะได้รับปริมาณน้อย บางชนิดเป็นโลหะที่ร่างกายต้องการเพื่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามหากได้รับมากเกินไปก็ทำให้เกิดพิษได้ บางชนิดสะสมอยู่ในร่างกายได้นาน บางชนิดร่างกายจะขับถ่ายได้เร็ว ทำให้ปัจจุบันหันมาสนใจและให้ความสำคัญกับปริมาณโลหะที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเฉพาะวัตถุดิบทางการเกษตร สืบค้นจากการเกษตรที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนโลหะหนักจากกระบวนการเพาะปลูกและการจัดการหลังเก็บเกี่ยวที่ไม่เป็นไปตามสุขอนามัยของพืช ก่อให้เกิดการสะสมจนมาถึงมือผู้บริโภค จะเห็นได้ (รูปที่ 2.6) ผักสดพร้อมบริโภคจำนวน 28 ชนิด เช่น ข้าวโพด มะเขือเทศ ผักกาด โดยเฉพาะหัวไชเท้า และมันฝรั่งซึ่งเป็นพืชที่บริโภคส่วนที่อยู่ใต้ดินเหมือนกับข้าว มีการปนเปื้อนของ สารหนู (As) ปรอท (Hg) โครเมียม (Cr) ตะกั่ว (Pb) นิกเกิล (Ni) และ แคดเมียม (Cd) (Pan, Wu and Jiang, 2016)



รูปที่ 2.6 ปริมาณความเข้มข้นของโลหะหนัก (mg/kg) ที่ตรวจพบในผักสดทั้งหมด 28 ชนิด
ที่มา : Pan, Wu and Jiang (2016)

นอกจากนี้โลหะหนักกลุ่มดังกล่าวยังเป็นที่สนใจของนักวิจัยที่ทำการทดสอบทางด้านพิษวิทยาเนื่องจากโลหะหนักมีครึ่งชีวิตในการย่อยสลายในระบบนิเวศเป็นเวลานานหลายปีทำให้เกิดการสะสม โดยเฉพาะในแหล่งน้ำและดินที่ทำการเพาะปลูก ส่งผลให้ผัก ผลไม้สด ใต้รับการปนเปื้อนโลหะ เช่น ข้าวโพด กะหล่ำปลี ผักกาด เป็นต้น (ตารางที่ 2.4) สาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนโลหะหนักที่สำคัญอีกประการ คือ ตะกั่ว ที่เป็นส่วนผสมสำคัญในสารกำจัดศัตรูพืช นิยมนำมาใช้ในแปลงเกษตร รวมถึงไร่ข้าว จึงทำให้เกิดการสะสมในระบบนิเวศ และเข้าด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 2.4 ปริมาณความเข้มข้นของโลหะหนักที่ตรวจพบในผักสดพร้อมบริโภค

Vegetables	Scientific Name	State of Origin	n ^a	Consumption	Cd	Ni	Pb	Co	Cr
				kg per year	mg kg ⁻¹				
Chard	<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>cicla</i>	SP	2	0.12	0.05 ^b	0.21	0.58	0.17	0.07
Watercress	<i>Nasturtium officinale</i> sp.	SP	2	0.19	0.10	0.34	0.86	0.30	0.34
Iceberg Lettuce	<i>Lactuca sativa</i> L.	SP	2	0.22	0.03	0.13	0.41	0.07	0.20
Crisphead Lettuce	<i>Lactuca sativa</i> L.	SP	2	0.22	0.08	0.33	0.48	0.15	0.20
Smooth Lettuce	<i>Lactuca sativa</i> L.	SP	2	0.22	0.07	0.13	0.44	0.16	0.09
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i> L.	SP	2	0.02	0.16	0.57	1.24	0.50	0.02
Cabbage	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>acephala</i> D.C.	SP	2	0.09	0.12	0.54	1.66	0.51	0.39
Broccoli	<i>Brassica oleracea</i> L.	SP	2	0.20	0.08	0.26	0.93	0.25	0.48
Cauliflower	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	SP	2	0.29	0.08	0.24	0.36	0.15	nd ^c
Endive	<i>Cichorium endivia</i> L.	SP	2	0.02	0.07	0.31	0.49	0.19	0.10
Spinach	<i>Tetragonia expansa</i>	SP	2	0.02	0.13	0.48	1.05	0.46	0.27
Sweetcorn	<i>Zea Mays</i> L.	SP	2	0.34	0.08	0.07	0.16	0.32	nd
White Cabbage	<i>Brassica oleracea</i> L. var. <i>capitata</i>	- ^d	2	0.50	0.04	0.21	0.60	0.23	0.06
Purple Cabbage	<i>Brassica oleracea</i> L.	-	2	0.50	0.06	0.32	0.63	0.34	0.43
Rocket	<i>Eruca sativa</i> L.	SP	2	0.02	0.07	0.29	0.76	0.21	0.23
Parsley	<i>Petroselinum crispum</i> (Mill.) Nym.	SP	2	0.02	0.18	0.70	1.02	0.47	0.03
Celery	<i>Apium graveolens</i> L.	SP	2	0.02	0.05	0.19	0.47	0.17	0.14

หมายเหตุ : n หมายถึง จำนวนตัวอย่างที่ทำการทดสอบ

ND หมายถึง ค่าที่ตรวจวัดต่ำกว่าค่ามาตรฐานเครื่องมือวิเคราะห์ (below detection-limit) และ แคดเมียม (Cd) นิกเกิล (Ni) ตะกั่ว (Pb) โคบอลต์ (Co) และโครเมียม (Cr)

ที่มา : Guerra, Trevizam, Muraoka, Marcante and Brazaca (2012)

จากที่กล่าวในข้างต้นข้างเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ผักสดตัดแต่งที่ส่งออกของไทย จึงมีการกำหนดปริมาณโลหะหนักสูงสุดที่มีได้ในผลิตภัณฑ์อาหารประเภท ผักสดบริโภค สมุนไพร ขกเว้นใบผักสดที่บริโภคหรือลำต้นใต้ดิน เนื้อปลา และเนื้อสัตว์ สำหรับ แคดเมียม โปรท ดินุกและตะกั่ว ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มต้องมีการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนตามมาตรฐานยุโรปเมื่อพิจารณาตามปริมาณตกค้างสูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ (maximum residue levels; MRL) พบแคดเมียมและตะกั่ว อนุญาตให้ตรวจพบหรือมีได้ในผลิตภัณฑ์ผักสดที่บริโภคหรือลำต้นใต้ดิน ได้ไม่เกิน 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 2.5) ดังนั้น ข่า เป็นผัก สมุนไพร และเครื่องเทศ ที่จัดอยู่ในกลุ่มบริโภคหรือลำต้นใต้ดิน ที่มีโอกาสการปนเปื้อนจากตะกั่ว และพิจารณาพร้อมกับ ปริมาณตกค้าง

สูงสุดที่อนุญาตให้มีได้ นั้นทำให้สามารถวิเคราะห์และสรุปได้ว่าตะกั่ว เป็นหนึ่งในสารเคมีตกค้างที่เป็นอันตรายสูงสุดที่จะต้องได้รับการควบคุมเพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ผักสดเพื่อให้เป็นไปตามมาตรฐานการส่งออก และความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ตารางที่ 2.5 ปริมาณโลหะหนักตกค้างไม่เกินข้อกำหนด (maximum levels) ในอาหาร

โลหะหนัก	ประเภทอาหาร	MRL (Minimal Residue levels) mg/kg wet weight
ตะกั่ว	ผักและส่วนอื่นๆที่บริโภค สมุนไพร ชกเว้น ใบ	0.10
แคดเมียม	ผัก/ลำต้น รากใต้ดิน	0.10
ปรอท	เนื้อปลา/เนื้อสัตว์	1.0
ดีบุก	อาหารกระป๋องทั่วไป	200

ที่มา : Official Journal of the European Union (2008)

2.3.1 คุณสมบัติและความเป็นพิษของตะกั่ว (lead, Pb)

ตะกั่วในธรรมชาติส่วนใหญ่อยู่ในรูปซัลไฟด์ หรือกาไลนา ซึ่งหากเกิดการปนเปื้อน ตะกั่วในดินมีผลต่อการเพาะปลูก ตารางที่ 2.6 ข้อมูลจากสถาบันอาหารที่ประกาศแจ้งเตือนต่อผู้ผลิตไปยังสาธารณรัฐประชาชนจีน มีการแก้ไขมาตรฐานปริมาณตะกั่วที่อนุญาตให้มีสูงสุดในอาหาร กลุ่มผลิตภัณฑ์ผักสดกำหนดปริมาณตะกั่วตกค้างต้องไม่เกิน 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะเห็นได้ว่านานาชาติให้ความสำคัญและตระหนักถึงการปนเปื้อนของตะกั่วในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากพิษของตะกั่วมีผลแบบไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecific) จึงอาจเกิดพยาธิสภาพได้หลายระบบ และได้มีการศึกษาทดลองเพื่อกำหนดมาตรฐาน เพื่อป้องกันสารตะกั่วปนเปื้อนในอากาศ อาหาร และ น้ำ เพื่อความปลอดภัยขึ้นในหลายประเทศ รวมทั้งไทยด้วย ได้ข้อสรุปว่า ในบุคคลทั่วไป ตะกั่วเข้าสู่ร่างกายได้ ทางปากโดยรับประทานอาหาร และน้ำดื่มที่ปนเปื้อนตะกั่ว ทางการหายใจส่วนการดูดซึมทางผิวหนัง ส่วนมากเกิดกับบุคคลที่มีอาชีพเกี่ยวข้องกับตะกั่วเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งปริมาณการปนเปื้อนตะกั่วที่เป็นพิษแสดงดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.6 มาตรฐานแห่งชาติสาธารณสุขประชาชนจีน ภายใต้ USDA ว่าด้วยปริมาณตะกั่วที่อนุญาตให้มีสูงสุดในอาหาร

Item	Index (mg/kg)
ธัญพืช	0.2
ถั่ว	0.2
มัน	0.2
ผักสด	0.1
ผลไม้	0.1
เนื้อสัตว์	0.2
ปลา กุ้ง	0.5
ไข่	0.2
ผลิตภัณฑ์ (นมสด)	0.05
ชา	5

ที่มา : สถาบันอาหาร (2558)

ตะกั่วเมื่อเข้าสู่ร่างกายไม่ว่าทางใดจะถูกดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตไปจับกับเม็ดเลือดแดง แทนที่เหล็ก (Fe^{+2}) ซึ่งเป็นโลหะที่จำเป็นในการสร้างเม็ดเลือดแดง ทำให้เกิดอาการโลหิตจาง (anaemia) และมีผลให้ปริมาณเหล็กในน้ำเหลืองเพิ่มขึ้นผิดปกติ ตะกั่วบางส่วนไปสะสมในกระดูก ตะกั่ว (Pb^{+2}) จะเข้าไปแทนที่แคลเซียม (Ca^{+2}) ซึ่งเป็นโลหะที่จำเป็นในการสร้างกระดูก และฟันทำให้มีอาการปวดตามข้อ กระดูกผุ และหักง่ายอาการพิษเรื้อรังที่พบบ่อย คือ อาการของระบบย่อยอาหาร จะเกิดการปวดท้อง น้ำหนักลดเบื่ออาหารคลื่นไส้ อาเจียน ท้องผูก อาการพิษทางประสาท และสมอง ทำให้ทรงตัวไม่อยู่เกิดอาการประสาทหลอน ชิมไม่รู้สึกรสชาติ ชัก มือและเท้าตก เป็นอัมพาต สลบ และอาจตายได้

ดังนั้น การปนเปื้อนจากอันตรายทางด้านจุลินทรีย์ ได้แก่ *Sclerotium rolfsii* และเคมี ได้แก่ ไคเมโรเอท และตะกั่ว จัดเป็นความเสี่ยงสูงสุดที่ต้องมีการควบคุมเพื่อลดปริมาณการตกค้าง ให้อยู่ในระดับมาตรฐานอาหารยอมรับ และไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภค ซึ่งกระบวนการควบคุมเพื่อลดอันตรายดังกล่าวสามารถจัดการด้วยการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีและเหมาะสม (Good Agriculture Practices; GAP) เป็นแนวทางในการทำการเกษตร เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพตรงตามมาตรฐานกำหนด กระบวนการผลิตจะต้องปลอดภัยต่อเกษตรกรผู้บริโภค มีการใช้ทรัพยากรที่เกิดประโยชน์สูงสุด และไม่ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม โดยหลักการนี้ได้รับการกำหนดโดยองค์การอาหาร

และเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) นอกจากนี้ขั้นตอนต่อไปที่สามารถลดระดับการปนเปื้อนดังกล่าวได้ จะเกี่ยวข้องกับการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ กระบวนการที่ล้างและเป็นกระบวนการหรือวิธีการเบื้องต้นที่สามารถลดอันตรายทางด้านจุลินทรีย์ เคมี และทางกายภาพได้ โดยอาศัยหลักการปฏิบัติที่ดีในการผลิตอาหาร (Good Manufacturing Practice; GMP) เป็นระบบประกันคุณภาพที่มีการปฏิบัติในการผลิตอาหาร เพื่อให้เกิดความปลอดภัย และมั่นใจต่อการบริโภคที่ครอบคลุมทุกขั้นตอนการผลิต รวมถึงการล้าง และสารฆ่าเชื้อที่เลือกใช้ ในปัจจุบันประเทศไทยได้มีหน่วยงานโดยสถาบันส่งเสริมคุณภาพเกษตรกรไทย สถาบันอาหารและภาคเอกชน ผลักดันให้เกิดมาตรฐาน Thai GAP เพื่อสร้างความมั่นใจให้กับคู่ค้าและผู้บริโภคว่าสินค้าเกษตรที่ผลิตในประเทศไทย ได้ถูกผลิตตามมาตรฐานและกระบวนการที่ปลอดภัย ถูกสุขอนามัย ปลอดภัยจากสารเคมีและเชื้อโรคที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ผลิต ผู้บริโภค รวมถึงสัตว์ ธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 2.7 ระดับปกติและระดับที่เป็นพิษของตะกั่วในเลือด และปัสสาวะ

ระดับตะกั่ว	ระดับปกติ	ระดับเริ่มเป็นพิษ	ระดับแสดงอาการพิษ
ระดับตะกั่วในเลือด ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)	10-20	40	70
ระดับตะกั่วในปัสสาวะ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	10-70	100	200-400
Coproporphyrin (μg)	80 /1 วัน	200 /ปัสสาวะ 1 ลิตร	600 /ปัสสาวะ 1 ลิตร
Delta-ALA (mg/day)	2-3	5-10	10-20

ที่มา : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2532)

2.4 กระบวนการล้างหลังการเก็บเกี่ยว (washing procedures)

การล้าง (washing) เป็นการเตรียมวัตถุดิบเบื้องต้นก่อนการแปรรูป หรือเพื่อส่งออกในรูปแบบผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง (fresh-cut products) ไปต่างประเทศ มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อลดสิ่งปนเปื้อนทุกชนิดที่มากับวัตถุดิบ ทั้งการปนเปื้อนทางกายภาพ การปนเปื้อนจุลินทรีย์และทางด้านเคมี มีผลทำให้วัตถุดิบลดระดับจุลินทรีย์ สารเคมีที่เป็นพิษ หรือวัตถุอันตรายให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภคปลอดภัยต่อการบริโภค และอยู่ในระดับมาตรฐานอาหารกำหนด รวมถึงเป็นกระบวนการที่ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีอายุการเก็บรักษานานขึ้น สำหรับกรณีส่งออกผลิตภัณฑ์ผัก

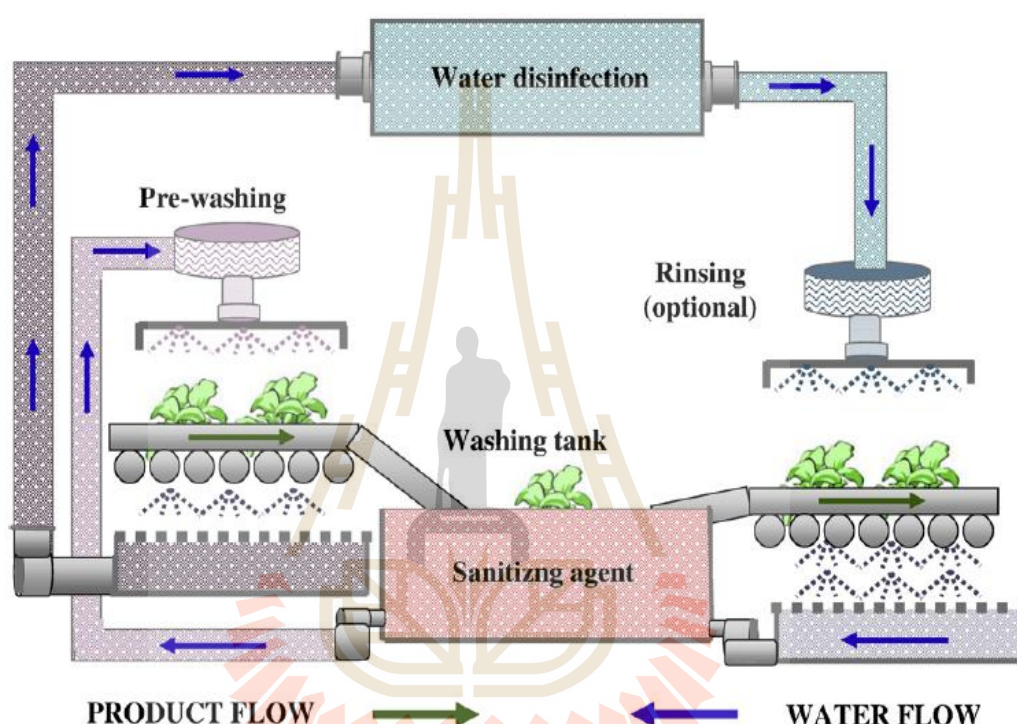
ผลไม้สดตัดแต่ง ไปยังสหภาพยุโรปได้ถูกกำหนดให้มีการตรวจสอบปริมาณสารพิษยาฆ่าแมลงตกค้างและเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ในผลิตภัณฑ์ที่มีเงื่อนไขให้ผู้ส่งออกจากไทยจะต้องมีการตรวจสอบเพื่อรับรองความปลอดภัย เช่น การตรวจและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช (phytosanitary certificate) หรือจะต้องผ่านการรับรองมาตรฐานคุณภาพสินค้าที่เรียกว่ามาตรฐานการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP) จากกรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในการออกใบรับรองสินค้าผักผลไม้แทนสหภาพยุโรปซึ่งเป็นมาตรการของภาครัฐของไทยที่กำหนดขึ้นเพื่อควบคุมคุณภาพการส่งออกและมาตรฐานสินค้าผักผลไม้ไทยที่สอดคล้องกับความต้องการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชภายใต้องค์การการค้าโลก (World Trade Organization; WTO) หรือในส่วนของภาคเอกชนไทยได้มีการกำหนดมาตรฐาน Thai GAP ซึ่งเป็นมาตรฐานของภาคเอกชนไทยในการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีที่ได้ผ่านกระบวนการเทียบเคียงมาตรฐานเข้มงวดของระบบโกลบอล จี เอ พี (Global GAP) ที่เน้นการปฏิบัติคือ ความปลอดภัย สภาพแวดล้อม สุขภาพความปลอดภัยและสวัสดิภาพของผู้ปฏิบัติงาน

การล้างจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เป็นขั้นตอนในส่วนของปฏิบัติที่ดีหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อลดอันตรายด้านความเสี่ยงที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบทางการเกษตร การล้างมีหลายแบบขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่จะล้าง ได้แก่ การทำความสะอาดแบบแห้ง (dry cleaning) เหมาะกับวัตถุดิบที่ไม่ต้องการให้เปียกน้ำ เช่น เมล็ดธัญชาติ ถั่วเมล็ดแห้ง ลูกเดือย งาม รวมทั้งวัตถุดิบประเภทของแห้ง การทำความสะอาดแบบเปียก (wet cleaning) เป็นการทำความสะอาดวัตถุดิบด้วยน้ำ อาจเรียกว่า การล้าง (washing) มีวัตถุประสงค์เพื่อกำจัด ลด สิ่งสกปรก จุลินทรีย์ สารพิษที่ติดอยู่กับวัตถุดิบ ให้หลุดออกหรือละลายอยู่ในน้ำล้างเหมาะกับผัก ผลไม้สด พืชหัว เช่น ขิง ข่า ขมิ้น เป็นต้น การที่จะลดและควบคุมการปนเปื้อนอันตรายทางด้านต่างๆ ได้นั้นจะต้องอาศัยปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการ ดังต่อไปนี้

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการล้าง

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการล้าง ได้แก่ ความสะอาดของน้ำล้างอุณหภูมิของน้ำล้างระยะเวลาการล้างหรือการแช่ในน้ำล้างสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) และแรงกลระหว่างการล้าง เช่น การฉีดน้ำ การทำน้ำให้ปั่นป่วน การขัดถูระหว่างการล้าง โดยจะต้องผ่านการพิจารณาแล้วว่า การล้างแต่ละประเภทและการเลือกใช้สารฆ่าเชื้อจะต้องมีความเหมาะสมกับวัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาล้าง เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด โดยขั้นตอนการล้างในอุตสาหกรรมมีการใช้สารฆ่าเชื้อร่วมกับการล้างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ เมื่อพิจารณาจากรูปที่ 2.7 สามารถแบ่งขั้นตอนการล้างได้ 2 ขั้นตอน คือ การล้างเพื่อเตรียม (pre-washing) เป็นการล้างเพื่อลดหรือกำจัด การปนเปื้อนทางด้านกายภาพเป็นการล้างในลักษณะให้น้ำไหลผ่าน (rinsing) วัตถุดิบผักผลไม้สดที่เรียงอยู่บนสายพานจะถูกล้างและผ่านไปยังขั้นตอนที่สอง เป็นการล้างที่มีการใช้สารฆ่าเชื้อ

ร่วมในกระบวนการ ในขั้นนี้จะต้องมีการจำแนกชนิดวัตถุดิบที่นำมาล้างว่าสามารถล้างด้วยการแช่ (soaking) หรือต้องล้างด้วยการฉีดพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อ ดังนั้นการจำแนกประเภทวัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาล้างจะช่วยให้การล้างเพื่อลดระดับจุลินทรีย์ สารเคมี สารพิษ มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยค่า ส่วนที่ล้างคือ ราก เหง้าที่อยู่ใต้ดิน ทำให้มีวิธีการล้างที่เฉพาะและแตกต่างจากผักผลไม้ทั่วๆ ดังต่อไปนี้



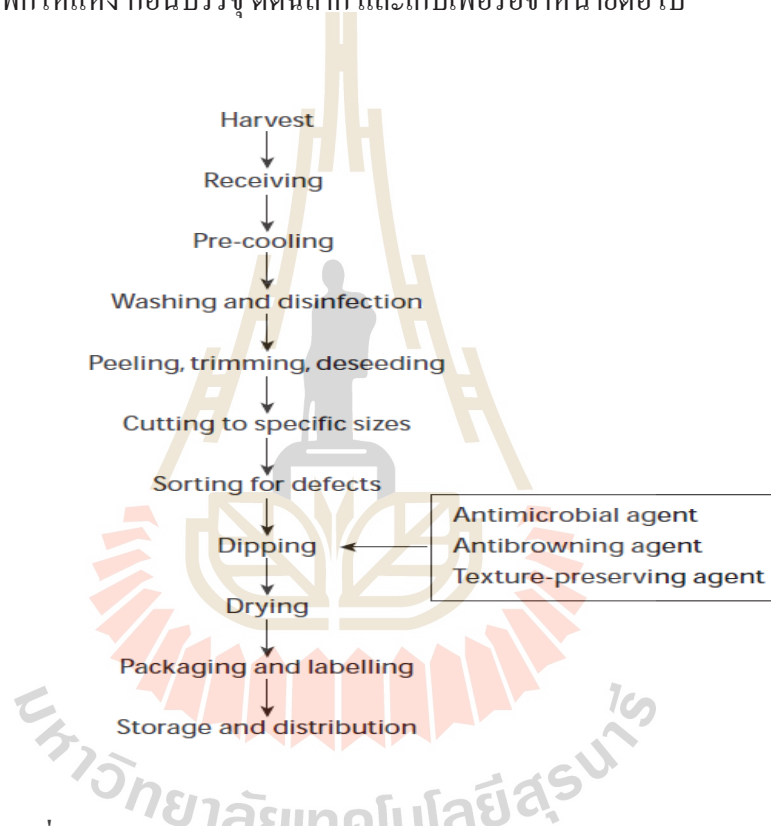
รูปที่ 2.7 ระบบหมุนเวียนน้ำล้างและขั้นตอนการล้างด้วยสารฆ่าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสำหรับการล้างผัก ผลไม้สดตัดแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร

ที่มา : Gil, Selma, Galvez and Allende. (2009)

2.4.2 ขั้นตอนการล้างผลิตภัณฑ์ผักสดชนิด ราก ลำต้น และก้านตัดแต่ง (Fresh-Cut non leafy vegetables)

การล้าง (รูปที่ 2.8) ผลผลิตทางการเกษตร ประเภท ลำต้น หัว เหง้า ใต้ดิน เช่น จิงข้าว หรือส่วนลำต้นเช่น หน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น ขั้นตอนการล้างเริ่มตั้งแต่การรับวัตถุดิบหลังการเก็บเกี่ยว (receiving) มีการจัดเก็บรักษาในห้องเย็น (pre-cooling) กรณีที่ไม่ได้มีการล้างทันทีในขั้นตอนนี้ต้องคำนึงถึงชนิดของผัก ปริมาณน้ำในผักนั้นๆ การหายใจ และความชื้นสัมพัทธ์ที่

เหมาะสมโดยขำจัดเป็นพืชตระกูลจิง จึงสามารถเก็บรักษาก่อนการล้างได้ที่อุณหภูมิ 8 ถึง 13 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 65 จะทำให้มีอายุการเก็บรักษาไม่เกิน 6 เดือนอย่างไรก็ตาม ขึ้นกับกระบวนการจัดการซึ่งในการเก็บรักษานี้จะต้องเป็นวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการล้าง จากนั้นเป็นกระบวนการล้างเบื้องต้น (pre-washing) อาจมีการใช้สารฆ่าเชื้อร่วมในกระบวนการนี้ ทำการตัดแต่ง หรืออาจรวมการลอกเปลือกและกัณขนาด (peeling, trimming, cutting and specific size) ลำเลียงบนสายพานไปยังถังบรรจุสารฆ่าเชื้อ หรือสารที่มีส่วนผสมสารกันเสีย (preservative agent) ด้วยการจุ่ม (dipping) หรือแช่ (soaking) ระยะเวลาขึ้นกับชนิดของสารฆ่าเชื้อและความเข้มข้น จากนั้นพักให้แห้ง ก่อนบรรจุ ตัดฉลาก และเก็บเพื่อรอจำหน่ายต่อไป



รูปที่ 2.8 กระบวนการล้างผัก ผลไม้ และรากหรือลำต้นใต้ดินเขตร้อน

ที่มา : James and Ngarmsak (2010)

ดังนั้นสามารถสรุปขั้นตอนการล้าง คือ หลังจากเก็บเกี่ยวต้องเก็บวัตถุดิบไว้ในที่เย็น ก่อนเข้าสู่กระบวนการล้างขั้นตอนที่ 1 เป็นการล้างโดยยังไม่มี การตัดแต่งที่สามารถล้างด้วยน้ำสะอาดหรือร่วมด้วยการใช้สารฆ่าเชื้อ ขั้นตอนที่ 2 เป็นการตัดแต่งให้ได้ขนาดหรือรูปร่างตามที่ต้องการ ขั้นตอนที่ 3 คัดเลือกส่วนหรือชิ้นไม่ตรงตามความต้องการออก ขั้นตอนที่ 4 นำไปจุ่มด้วยน้ำที่ผสมสารฆ่าเชื้อ และขั้นตอนที่ 5 ทำให้แห้ง ขั้นตอนที่ 6 บรรจุลงในบรรจุภัณฑ์ ขั้นตอนที่ 7 เก็บรักษาในสภาวะที่เหมาะสมก่อนจำหน่ายหรือส่งออก กระบวนการล้างที่ดีจะต้องสอดคล้องกับ

การเลือกใช้สารฆ่าเชื้อโดยจะต้องพิจารณาถึงประสิทธิภาพและผลกระทบต่อผู้ใช้งานและผู้บริโภค ทำให้หน่วยงานองค์การอาหารและเกษตร (Food and Agriculture Organization of the United Nations; FAO) และองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) ได้ออกกฎหมายและมาตรฐานการเลือกใช้สารฆ่าเชื้อสำหรับล้างผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง

2.5 สารฆ่าเชื้อ (sanitizer)

สารฆ่าเชื้อ หมายถึง สารที่ใช้เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ แบคทีเรีย โดยเฉพาะ จุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) รวมถึงสปอร์ของรา และสปอร์ของแบคทีเรียที่ปนเปื้อน ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค (วรรณพร ศรีสุคนธ์รัตน์, 2558) มีการนำสารฆ่าเชื้อมาประยุกต์ใช้ล้างผักผลไม้ โดยมีรายงานการวิจัยที่ทำการศึกษาค้นคว้าถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยมานานนับสิบปีเพื่อให้เกิดความมั่นใจในการนำไปใช้งานและไม่เป็นพิษผลการศึกษาสารฆ่าเชื้อในกลุ่มคลอรีน (chlorine; Cl_2) โซเดียมฟอสเฟต (Sodium Phosphate; Na_3PO_4) สารละลายที่เป็นกรดเข้มข้นร้อยละ 1 และ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) นำไปใช้ในการล้างแอปเปิ้ล เพื่อลดปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* เปรียบเทียบกับการล้างด้วยน้ำธรรมดา ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการล้างด้วยสารฆ่าเชืวดังกล่าวสามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้ แต่ก็ยังไม่สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ได้มากกว่าร้อยละ 90 (Sapers, 2001) จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้นเพื่อหาความเป็นไปได้ในการใช้งาน ประสิทธิภาพและกลุ่มจุลินทรีย์เป้าหมายที่สามารถทำลายหรือยับยั้งได้ซึ่งได้รับการยอมรับและอนุญาตให้ใช้โดยคณะกรรมการอาหารและยาประเทศอเมริกา (FDA) ได้แก่ ไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) คลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide) ไอโอดีน (iodine) เป็นต้น (Parish et al., 2003) แต่ในปัจจุบันมีการนำสารคลอรีนไดออกไซด์มาใช้ในการกระบวนการล้างผักผลไม้อย่างกว้างขวางเนื่องจากเกิดผลกระทบท การกักร่อนน้อยกว่าการใช้สารแคลเซียมไฮโปคลอไรท์

ตารางที่ 2.8 ชนิดสารฆ่าเชื้อ ความเข้มข้น และความสามารถในการทำลายจุลินทรีย์

Mitigation Method	Advantages	Limitations	Comments on current use	Comments on research
Hypochlorite	• Long history of use	• Potential adverse health effects of chlorinated by-products • Corrosive to equipment • Sensitive to temperature, light, air, metals and organic materials • pH dependent • Some resistance by bacterial spores and protozoan oocysts	• Commonly used in the 50 to 200 ppm range with a 1 to 2 min contact time. • Usefulness on many produce commodities has been investigated	• Very high concentrations may not eliminate pathogens on produce • Commonly used concentrations produce a maximum 1 to 2 log reduction on many commodities.
Acidified sodium chlorite	• Greater efficacy than hypochlorite due to low pH	• Little information on production of chlorinated by-products • Limited amount of research conducted	• Studied for use on meats, seafood, poultry, produce • 500 to 1200 ppm range studied	• Usefulness for produce needs further research
Chlorine dioxide	• Less reactivity than hypochlorite with organics • Fewer chlorinated by-products • Better antimicrobial activity at neutral pH than hypochlorites	• Stability • Not permitted for cut produce	• Up to 5 ppm allowed on whole fruits and vegetables • 1 ppm maximum allowed on peeled potatoes	• Studied concentrations range from about 1 ppm to 500 ppm on commodities such as alfalfa seeds and sprouts, cucumbers, shredded lettuce, cabbage, oranges • Studies conducted with fungal spores, native microflora, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>E. coli</i>, <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i>, <i>Cryptosporidium parvum</i> oocysts. • Reductions of a few logs reported
Bromine	• Possible synergy with chlorine compounds	• Information lacking on production of brominated by-products and their potential health effects	• Not widely used as a sanitizer	• More effective against <i>E. coli</i>, <i>Salmonella Typhosa</i> and <i>Staphylococcus aureus</i> than against <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. • Not as effective as hypochlorite against <i>Bacillus cereus</i> spores
Iodine	• Less corrosive than chlorine at low temperature • Broad spectrum • Iodophor less volatile than iodine	• Stains commodities and equipment • Corrosive above 50 °C	• Commonly used on food contact surfaces and equipment • No direct contact use on produce	• May have significant sporocidal capacity • Possible usefulness on some whole produce deserves investigation
Trisodium phosphate	• Less corrosive than most other compounds	• <i>Listeria</i> relatively resistant • Has very high pH (11-12)	• Occasional use on fresh-market citrus • Authorized for use on raw poultry	• Concentrations between 1 and 15% yielded reductions in pathogen populations from 0 to 6 logs
Quaternary ammonium compounds	• Colorless, odorless • Stable at high temperature • Noncorrosive • Good penetrating ability • Relatively stable to organic compounds • Leaves residual	• Limited usefulness at low pH (<6) • Not compatible with soaps or anionic detergents • Costly	• Commonly used on food contact surfaces and equipment	• As effective as chlorine at reducing populations of <i>Xanthomonas campestris</i> pathovar <i>vesicatoria</i>. • Reduced native orange-surface microflora 95% compared to 60% reduction on control fruit.

ที่มา : Parishet al. (2003)

2.5.1 สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide)

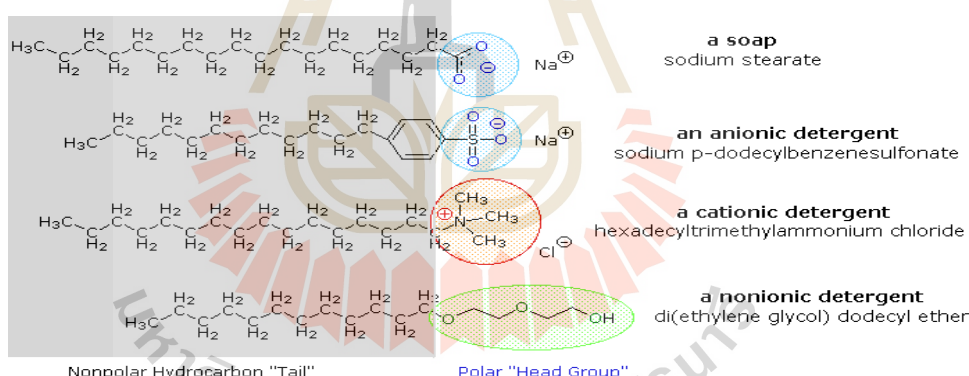
สารละลายคลอรีนไดออกไซด์อยู่ในรูปแบบของเหลวสีเหลืองกึ่งเขียว มีความสำคัญมากในปัจจุบัน เนื่องจากการบริโภคน้ำเพื่อแบบธรรมดาโดยใช้คลอรีนจะเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง (side reaction) คือคลอรีนจะไปทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ในน้ำ ก่อเกิดเป็นสารไตรฮาโลมีเทน (trihalomethane; THM) และสารอินทรีย์คาร์บอนซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารก่อให้เกิดมะเร็งจึงต้องพยายามหลีกเลี่ยงการใช้คลอรีนและสารไบโอไซด์ แต่ผลที่ได้จากปฏิกิริยาของคลอรีนไดออกไซด์ กับสารอินทรีย์ที่ละลายอยู่ในน้ำจะมีผลความเป็นพิษน้อยกว่าทั้งในด้านปริมาณและความรุนแรง นอกจากนี้คลอรีนไดออกไซด์ยังละลายน้ำได้ดีกว่าและเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการฆ่าเชื้อโรคทั้งในน้ำดื่มและในน้ำดิบที่มีสารประเภทสารอินทรีย์ละลายอยู่อย่างมาก เช่น น้ำผิวดิน หรือน้ำใต้ดิน ที่ผ่านการหมักหมมของซากอินทรีย์ต่างๆ การเติมคลอรีนไดออกไซด์ลงไปเพียงปริมาณน้อย ก็สามารถฆ่าเชื้อโรคได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากคลอรีนไดออกไซด์จะไม่รวมกับสารอื่นๆ เป็นสารประกอบคลอรีน ซึ่งทำให้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของคลอรีนลดลง ในการใช้งานส่วนใหญ่แล้วจะใช้เวลาความเข้มข้นของคลอรีนไดออกไซด์ เพียง 0.1 ส่วนในล้านส่วน (part per million; ppm) ก็เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อโรค ออกฤทธิ์ได้ดีในช่วงค่าพีเอชกว้าง คือ 3 ถึง 10 และเมื่อคลอรีนไดออกไซด์สัมผัสกับอาหารจะไม่ทำให้อาหารนั้นมีรสชาติเปลี่ยนแปลงอย่างไรเป็นสารที่เหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการฆ่าเชื้อโรคในน้ำอุ่นหรือน้ำที่มีค่าพีเอชสูงๆ อันเป็นสถานะที่ความสามารถในการฆ่าเชื้อของคลอรีนไดออกไซด์มากกว่าคลอรีน โดยที่คลอรีนเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของไฮโปคลอไรท์ (OCI) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อลดลง ปัจจุบันทั้ง องค์การอนามัยโลก คณะกรรมการอาหาร และยาประเทศอเมริกา คณะกรรมการอาหารและยาประเทศไทย (อย.) ได้ส่งเสริมสนับสนุนให้มีการใช้สารคลอรีนไดออกไซด์แทนคลอรีนทั่วไป โดยเฉพาะในกลุ่มอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มที่ส่งออกไปยังประเทศในแถบยุโรปและอเมริกา ซึ่งกลุ่มประเทศเหล่านี้จะขอความร่วมมือจากทางผู้ส่งออกให้ใช้สารฆ่าเชื้อในกลุ่มของคลอรีนไดออกไซด์เพื่อความปลอดภัยที่ดีกว่าของผู้บริโภคจากการทดลองการนำคลอรีนไดออกไซด์ไปล้างมะเขือเทศ (Park, 2008) พบว่าเมื่อมะเขือเทศสัมผัสกับสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ 1 นาที จะสามารถลดปริมาณแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Salmonella* ได้ 1 log

การนำคลอรีนไดออกไซด์ไปใช้ในกระบวนการล้างผัก ผลไม้สดมีการกำหนดปริมาณการใช้งานด้วยหน่วยงานคณะกรรมการอาหารและยาประเทศอเมริกา (FDA) สำหรับการล้างผัก ผลไม้สดตัดแต่งไม่เกิน 2 ถึง 5 ส่วนในล้านส่วน ในการล้างผัก ถ้าเป็นผักหัวใต้ดิน ลำต้นใต้ดิน เหง้าใต้น้ำให้ใช้ได้ที่มีความเข้มข้น 5 ถึง 8 ส่วนในล้านส่วน อย่างไรก็ตามคลอรีนไดออกไซด์สามารถออกซิไดซ์ง่ายมากกว่าก๊าซคลอรีน (Cl_2) 2.5 เท่า แต่เนื่องจากคลอรีน

ไดออกไซด์เกิดการระเบิดได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเล็กน้อย และสัมผัสกับสารอินทรีย์ ไม่สามารถเก็บรักษาได้อย่างปลอดภัย ไม่สะดวกในการขนส่ง นอกจากสารฆ่าเชื้อในกลุ่มคลอรีนแล้ว ปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์สำหรับล้างผัก ผลไม้สดจำหน่ายในท้องตลาดที่สะดวกต่อการใช้งาน ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ส่วนใหญ่ประกอบด้วยสารในกลุ่มสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ซึ่งมีบทบาทและคุณสมบัติต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.5.2 สารลดแรงตึงผิว (surfactants)

ในปัจจุบันสารลดแรงตึงผิวเข้ามามีบทบาทในการดำรงชีวิตของมนุษย์ทั้งในครัวเรือนและอุตสาหกรรม บทบาทที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิว คือ การทำความสะอาด การซักล้าง บทบาทและกิจกรรมเหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยหนึ่งในการดำรงชีวิตของมนุษย์ตั้งแต่ตื่นนอน การทำความสะอาดร่างกาย อุปกรณ์ ภาชนะ พื้นผิว การบำบัดน้ำ การเกษตร รวมไปถึงการนำไปใช้ในการแปรรูป เป็นต้น สารลดแรงตึงผิวเป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) และ ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของสารลดแรงตึงผิว

ที่มา : Reusch (2013)

ส่วนที่ไม่ชอบน้ำมักจะเป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอน คือมีธาตุคาร์บอนและไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนใหญ่แล้วจะมาจากไขมันและน้ำมันตามธรรมชาติ รวมทั้งผลิตภัณฑ์ปิโตรเลียม และโพลิเมอร์สังเคราะห์ ลักษณะสำคัญของสารลดแรงตึงผิวคือ สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำเพื่อให้เกิดกระบวนการต่างๆง่ายขึ้น เช่น การเกิดฟอง การทำให้เปียก คุณสมบัติในการลดปริมาณจุลินทรีย์ และสารพิษ เป็นต้น ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะพยายามไปเกาะกับพื้นผิวที่ว่าง

เช่น อากาศ แต่ส่วนที่ชอบน้ำจะยังคงอยู่ในน้ำ จึงทำให้สามารถแบ่งประเภทของสารลดแรงตึงผิวตามลักษณะของประจุของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ได้เป็น 4 ประเภท

ประเภทที่ 1 สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (cationic surfactant) ได้แก่ ซิทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltrimethyl ammonium bromide; CTAB) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3^+Br^-$ สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวกนี้มักพบในผลิตภัณฑ์ยาสีฟันครีมนวดผม และน้ำยาปรับผ้านุ่ม เป็นต้น

ประเภทที่ 2 สารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) ได้แก่ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate; SDS) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $CH_3(CH_2)_{11}SO_4^-Na^+$ มักเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในผงซักฟอกและสบู่

ประเภทที่ 3 สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (nonionic surfactant) ได้แก่ โพลีออกซีเอทิลีนแฟตตีแอลกอฮอล์ (polyoxyethylene alcohol) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล คือ $(C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH)$ สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุนี้มักจะนำไปผสมในสบู่เหลวล้างหน้าส่วนใหญ่เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง รวมถึงผลิตภัณฑ์น้ำยาล้างผักผลไม้

ประเภทที่ 4 สารลดแรงตึงผิวที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ (amphoteric surfactants) มีสูตรโมเลกุล คือ $RN^+H_2CH_2CH_2COO^-$ โดยส่วนใหญ่แล้วสารลดแรงตึงผิวประเภทนี้จะเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง สารป้องกันการกัดกร่อน และสารยับยั้งแบคทีเรีย เป็นต้น นอกจากสารลดแรงตึงผิวที่กล่าวไปข้างต้นซึ่งจัดได้ว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ซึ่งเป็นที่นิยมและใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันแล้วยังมีสารลดแรงตึงผิวอีกชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต เรียกว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในวัตถุดิบทางการเกษตรที่ผ่านการล้างการทดสอบการนำสารลดแรงตึงผิวมาใช้ควบคุม ลดปริมาณจุลินทรีย์สปอร์ และไวรัส (ตารางที่ 2.9) พบว่าสารลดแรงตึงผิวประเภทที่มีประจุบวกสามารถทำลายสปอร์ของแบคทีเรีย แบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่สามารถทำลายเชื้อราและไวรัสได้

ตารางที่ 2.9 สรุปความสามารถในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของสารฆ่าเชื้อกลุ่มต่างๆ

Classes of compounds	Usual activity against bacteria					Fungi	Viruses
	Spores	TB	G+	G-	G-B		
Low potency							
1. Acid							
- Acetic acid	None	None	Poor	Poor	Good	Good	Fair
- Boric acid	None	None	Fair	Fair	Fair	Fair	Fair
2. Biguanide							
- Chlorhexidine	None	Good	Good	Fair	Poor	None	None
3. Surfactant							
- Benzalkonium chloride (cationic surfactant)	None	None	Good	Fair	Poor	None	None
Intermediate potency							
4. Alcohol							
- Ethanol	None	Fair	Good	Good	Good	Fair	Fair
- Methanol	None	Fair	Fair	Fair	Fair	Fair	Fair
- Isopropanol	None	Good	Good	Good	Good	Good	Good
5. Iodophor							
- Iodine	Poor	Good	Good	Good	Good	Good	Good
- Povidone-iodine	None	Fair	Good	Good	Good	Good	Good
6. Chlorine							
- Chlorine	Fair	Fair	Good	Good	Good	Good	Good
- Sodium hypochlorite	Fair	Fair	Good	Good	Good	Good	Good
7. Oxidant							
- Hydrogen peroxide	None	Fair	Good	Good	Good	Fair	?
- Potassium permanganate	None	None	Fair	Fair	Fair	Fair	Fair
8. Phenolic							
- Phenol	Poor	Fair	Fair	Good	Good	Fair	Fair
- Cresol	Poor	Fair	Fair	Good	Good	Fair	Fair
High potency							
9. Aldehyde							
- Formaldehyde	Fair	Good	Good	Good	Good	Good	Good
- Glutaraldehyde	Good	Good	Good	Good	Good	Good	Good

หมายเหตุ: G+ , G- และ G-B หมายถึง แบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และแกรมลบรูปแท่ง

Good Fair และ Poor หมายถึง ความสามารถในการทำลายเชื้อได้ดี ปานกลาง และไม่ดี

None หมายถึง ไม่สามารถทำลายเชื้อชนิดนั้น ๆ

ที่มา : วรณพร ศรีสุคนธ์รัตน์ (2558)

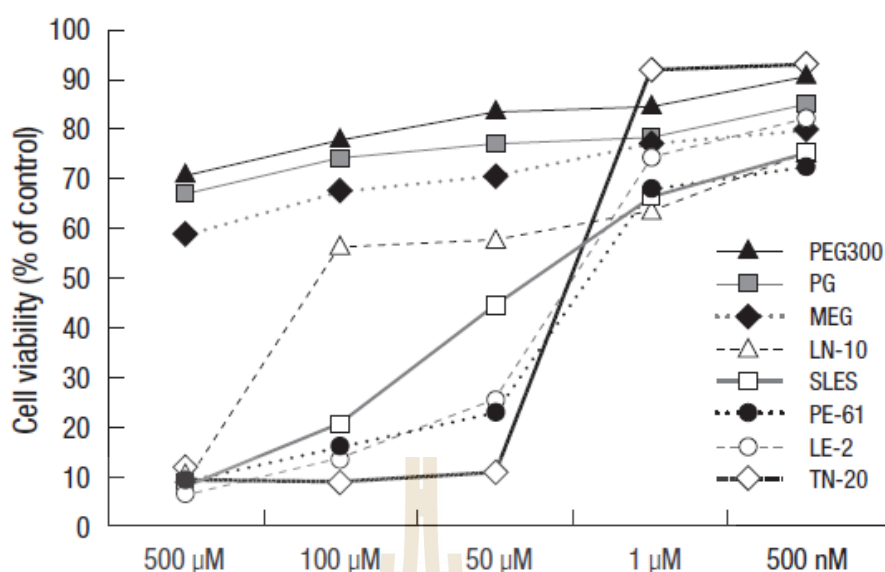
ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ล้างผักผลไม้ทางการค้าส่วนใหญ่มีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ อัลคิลโพลิไกล์โคไซด์ (alkyl poly glycoside) สูงกว่าร้อยละ 40 และยังมีส่วนผสมของสารอื่นๆ อาทิ เช่น โซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟต (sodium lauryl ether sulfate; SLES) ร้อยละ

5 ถึง 10 อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ที่มีข้อจำกัดในการใช้งานเนื่องจาก มีรายงานความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ ทำให้ผู้บริโภค อุปโภคไม่ยอมรับ

2.5.3 ความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิว

ปัจจุบันมีการใช้สารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากการสังเคราะห์มากกว่าสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติ สารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากปิโตรเลียมเช่น แอลกอฮอล์ อัลคิลเบนซีนอัลคิลฟีนอล หรือผลิตมาจากวัตถุดิบธรรมชาติเช่น น้ำมันพืช มันสัตว์ และไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยสารเหล่านี้ต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเนื่องด้วยกระบวนการผลิตสารเหล่านี้เป็นกระบวนการทางเคมี จึงต้องมีการทดสอบความปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน มีรายงานสารลดแรงตึงผิวโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตมีค่า LD50 (หนู) 1,600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีพิษปานกลาง เป็นสารทำให้เกิดฟอง มักใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และแชมพูอาจทำให้เกิดการระคายเคืองตาและผิวหนัง หากเกิดอาการหลังจากใช้ผลิตภัณฑ์ควรหยุดใช้ทันที ในกระบวนการผลิตโซเดียมลอริลอีเทอร์ซัลเฟตอาจปนเปื้อนด้วย 1,4 ไดออกเซน (1,4-dioxane) ซึ่งอาจเป็นสารก่อมะเร็ง เป็นสาเหตุให้หน่วยงานอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ได้นำเสนอให้มี 1,4 ไดออกเซนในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่ความเข้มข้นไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีการทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ทั้ง 4 ประเภท (รูปที่ 2.10) สารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุไฟฟ้า (nonionic surfactant) โพลีเอทิลีน ไกลคอล (polyethylene glycol; PEG) ไม่มีความเป็นพิษ (Song et al., 2012)

จึงได้มีการพัฒนาสารจากธรรมชาติ (natural emulsifying agents) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ได้มาจากธรรมชาติมาใช้เพื่อทดแทนการใช้เคมีสังเคราะห์ เช่น อะคาเซียเจลาติน เมทิลเซลลูโลส บีแวกซ์ เป็นต้น ไม่เป็นพิษต่อร่างกายจึงเตรียมเป็นยาใช้ภายในได้ แต่มักมีความแปรปรวนในแต่ละรุ่นของการผลิตสูงจึงไม่ค่อยนิยมใช้ในทางอุตสาหกรรมการผลิตสารจากธรรมชาติอีกชนิดที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่จุลินทรีย์สามารถผลิตได้ และสารที่ผลิตได้นี้มีคุณสมบัติและโครงสร้างที่ทำหน้าเหมือนกับสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ เป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำมาใช้พัฒนา ให้เกิดความปลอดภัย และนำไปใช้ในกระบวนการล้างผักผลไม้สด



รูปที่ 2.10 ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่ได้รับสัมผัสสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์

หมายเหตุ : PG คือ propylene glycol MEG คือ monoethylene glycol

SLES คือ sodium lauryl ether sulfate LN-10 คือ polyoxyethylene lauryl amine ether PEG 300 คือ polyethylene glycol PE-61 คือ polyoxyethyleneglycolblock copolymer LE-2 คือ polyoxyethylene lauryl ether และ TN-20 คือ polyoxyethylene tallow amine

ที่มา : Song et al. (2012)

2.6 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตได้จากจุลินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์เป็นหลักที่นำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รองลงมา คือ ยีสต์ บางสายพันธุ์ ซึ่งสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว เป็นผลของความมีขี้และไม่มีขี้ อยู่ในโมเลกุลเดียวกันนอกจากจะสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่หลากหลาย จุลินทรีย์ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน (carbon and nitrogen source) ที่เป็นองค์ประกอบในผักผลไม้ได้ (Xu, Nakajima, Liu and Shiina, 2011) และสามารถนำของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง

2.6.1 โครงสร้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

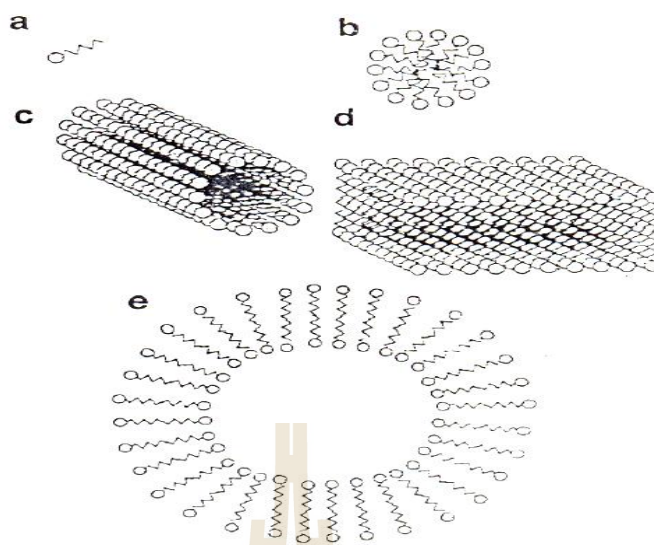
สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจัดเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างของ

โมเลกุลแบบป็นแบบแอมฟิพาติก (amphipathic molecules) ประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้

(1) ส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนหัว (head group) อาจจะเป็น คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acid) ฟอสเฟต (phosphate) กรดอะมิโน (amino acid) ไชคลิก เปปไทด์ (cyclic peptide) หรือ แอลกอฮอล์ (alcohol)

(2) ส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนหาง (tail group) อาจจะเป็น กรดไขมันสายยาว (long-chain fatty acid) กรดไขมันไฮดรอกซี (hydroxyl fatty acid) เป็นต้น

เมื่ออยู่ในสารละลาย โมเลกุลแบบแอมฟิพาติกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะจับกับบริเวณพื้นผิวของตัวทำละลาย จากโครงสร้างดังกล่าว จึงทำให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนละลายได้ในน้ำหรือส่วนของน้ำละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารชำระล้าง (detergent) สารเกิดฟอง และการเกิดอิมัลชัน โดยทั่วไปสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถทำหน้าที่ลดแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวที่สัมผัสกันได้ เช่น ระหว่างของแข็งกับของเหลว ของเหลวกับของเหลว และของเหลวกับก๊าซ ค่าแรงตึงผิวระหว่างพื้นผิวของน้ำกับอากาศ เรียกว่า surface tension และค่าแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับไฮโดรคาร์บอน เรียกว่า interfacial tension ค่าแรงตึงผิวที่เกิดขึ้นสามารถวัดได้และมีหน่วยเป็น มิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือ ไดน์ (Dyne) เมื่อสารลดแรงตึงผิวมีความเข้มข้นในตัวทำละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากัน ด้วยแรงจับกันของสารลดแรงตึงผิว (surfactant self-association) เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) ดังรูปที่ 2.11 ซึ่งความเข้มข้น ณ จุดที่ทำให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวมารวมตัวกันนี้ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด เรียกความเข้มข้น (critical micelle concentration; CMC) การเกิดไมเซลล์จะมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุดซีเอ็มซี (CMC) คือ ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้จะมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย



รูปที่ 2.11 โครงสร้างต่างๆของสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นโมเลกุลแบบแอมฟิพาติก

หมายเหตุ : (a) surfactant monomer คือ มีส่วนหัวเป็นส่วนที่ชอบน้ำและส่วนหางที่ไม่ชอบน้ำ
(b) circular micelle (c) rod – shaped micelle (d) micellar layer และ (e) vesicle
representation

ที่มา : Fiechter (1992)

2.6.2 ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

2.6.2.1 ไกลโคไลปิด (glycolipid) ส่วนใหญ่จุลินทรีย์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวได้กลุ่มนี้ได้ โครงสร้างประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่เป็นน้ำตาล เช่น น้ำตาลแรมโนส (rhamnose) ทรีฮาโลส (trehalose) ซูโครส (sucrose) และ กลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกับ กรดแอลิแฟติกที่เป็นสายยาว (long chain aliphatic acid) หรือ กรดไฮดรอกซีแอลิแฟติก (hydroxyaliphatic acid) สารลดแรงตึงผิวกลุ่มไกลโคไลปิดมีกลุ่มย่อย ได้แก่ แรมโนลิปิด (rhamnolipids) ทรีฮาโลลิปิด (trehalolipids) และ โซโฟโลลิปิด (sophorolipids)

2.6.2.2 ลิโปเปปไทด์ (lipopeptide) สารลดแรงตึงผิวกลุ่มนี้เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โครงสร้างมีไขมันจับอยู่กับสายเปปไทด์ จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* สามารถผลิตได้มีคุณสมบัติการลดแรงตึงผิวและการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้ได้แก่ เซอร์แฟกติน (surfactin) อิทูริน (iturin) และเฟนจีซิน (fengycin) ซึ่งมีโครงสร้างและคุณสมบัติแตกต่างกัน กล่าวคือ เซอร์แฟกตินมีกรดอะมิโนชนิดแอลฟา 7 โมเลกุล เฟนจีซินจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นวงซึ่งมีคาร์บอน 14 ถึง 18 อะตอม ในขณะที่

ที่อิฐรินประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดเบต้า 7 โมเลกุลต่อกันเป็นวงและมีโมเลกุลของกรดไขมัน 14 ถึง 17 คาร์บอน

2.6.2.3 ฟอสโฟไลปิด กรดไขมัน และนิวทรัลไลปิด (phospholipids หรือ fatty acid และ neutral lipids) เป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) มีโครงสร้างที่เกิดจากพันธะเอสเทอร์ขึ้นระหว่างหมู่แอลกอฮอล์ของลิพิดและฟอสเฟต โดยจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มนี้ได้ เช่น *Aspergillus* spp. *Thiobacillusthiooxidans* *Arthrobacter* sp. AK-19 โดยมีการสะสมไขมันในโครงสร้างร้อยละ 40 ถึง 80

2.6.2.4 สารลดแรงตึงผิวชนิดพอลิเมอร์ริก (polymeric surfactant) เป็นสารที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวของหน่วย โพลีแซคคาไรด์กับโปรตีน (polysaccharide-protein) และหน่วยของกรดไขมันมีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ในธรรมชาติ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในกลุ่มนี้ คือ อิมัลชัน (emulsan) อะลาแซน (alasan) และไบโอคิสเพอแซน (biodispersan) เป็นต้น

2.6.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่นำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รองลงมา คือ ยีสต์และเชื้อราบางสายพันธุ์ โดยการผลิตจะใช้ความสามารถของจุลินทรีย์ ในการย่อยองค์ประกอบของวัตถุดิบที่เป็นผักผลไม้ โดยวัตถุดิบที่เป็นผักผลไม้เหลือใช้จากอุตสาหกรรมหรือจากการเกษตรสามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง องค์ประกอบของวัตถุดิบผักผลไม้มีทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส น้ำตาล และส่วนประกอบอื่นๆ ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายองค์ประกอบเหล่านี้ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เพื่อเจริญเติบโตและมีการสร้างสารเมตาบอไลต์ขึ้นระหว่างกระบวนการเจริญนี้ สารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์จะทำให้เกิดคุณสมบัติที่เป็นสารลดแรงตึงผิวโดยจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารทำความสะอาดชีวภาพ กลุ่มของแบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus* sp. *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* sp. *Pseudomonas* sp. *Pseudozyma* sp. และ *Micrococcus luteus* กลุ่มของเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger* *Penicillium* และ *Rhizopus* และกลุ่มของยีสต์ ได้แก่ *Candida* sp. (Makkar, Cameotra and Banat, 2011) ในกลุ่มของแบคทีเรียจะมีบทบาทในการย่อยสลายวัสดุที่ใช้ในการผลิต ทำให้สารประกอบโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ให้เล็กลงได้ โดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Protease) ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติก มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยแบคทีเรียจะมีการใช้น้ำตาลในผักผลไม้ หรือสารตั้งต้นโดยกระบวนการหมัก (fermentation) สภาพที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (อานัฐ ตันโช, 2551)

นอกจากนี้ยังมีการนำวัตถุดิบทางการเกษตร หรือส่วนประกอบในวัตถุดิบทางการเกษตรมาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต (ตารางที่ 2.10) ได้แก่ เปลือกส้ม แครอทเหลือทิ้ง เปลือกมะนาว น้ำมันมะพร้าว และกล้วย เป็นต้น กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเกิดขึ้นด้วยกระบวนการหมักที่มี *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 2297 เป็นจุลินทรีย์ เปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ กลุ่มแรมโนลิพิด

ตารางที่ 2.10 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Substrates	Rhamnolipid concentration ^a (g/l)	Emulsification index ^a (EI) (%)
Orange peelings	9.180±0.004 ^b	73.3
Carrot waste	5.712±0.570	30.12
Lime peelings	4.352±0.016	9.64
Coconut oil cake	2.174±0.413	50.60
Banana waste	2.108±0.386	48.19

ที่มา : George and Jayachandran (2009)

2.7 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารยับยั้ง ทำลายจุลินทรีย์ สารลดแรงตึงผิว สารเพิ่มความคงตัวในอาหาร เพิ่มการละลายในยาบางชนิด และสารฆ่าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์อาหาร (Nitschke and Costa, 2007) นอกจากนี้ยังมีการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต่างๆ ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง อื่นๆ ดังตารางที่ 2.11

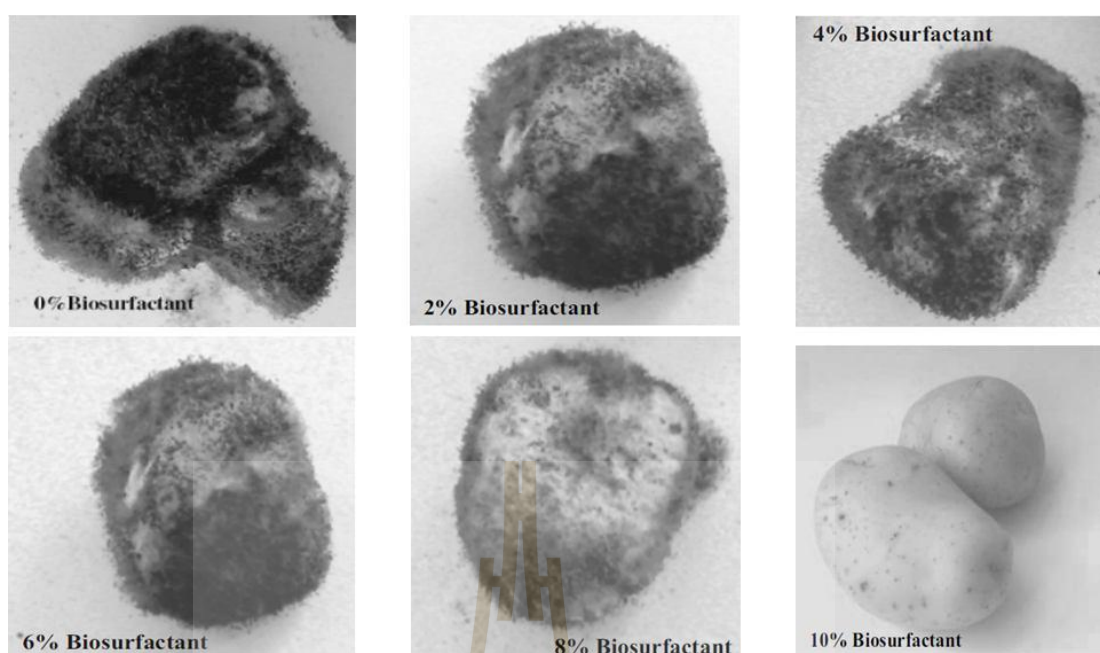
ตารางที่ 2.11 จุลินทรีย์ที่ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและการนำไปใช้

MEOR agents	Microbes	Product	Possible application
	<i>Bacillus sp.</i>	Cells and EPS (mainly exopolysaccharides)	Selective plugging of oil depleted zones and wettability angle alteration
	<i>Leuconostoc</i>		
	<i>Xanthomonas</i>		
Surfactants	<i>Acinetobacter</i>	Emulsan and alasin	Emulsification and deemulsification through reduction of interfacial tension
	<i>Bacillus sp.</i>	Surfactin, rhamnolipid, lichenysin	
	<i>Pseudomonas</i>	Rhamnolipid, glycolipids	
	<i>Rhodococcus sp.</i>	Viscosin and trehaloselipids	
	<i>Arthrobacter</i>		Injectivity profile and viscosity modification, selective plugging
Biopolymers	<i>Xanthomonas sp.</i>	Xanthan gum	
	<i>Aureobasidium sp.</i>	Pullulan	
	<i>Bacillus sp.</i>	Levan	
	<i>Alcaligenes sp.</i>	Curdlan	
	<i>Leuconostoc sp.</i>	Dextran	
	<i>Sclerotium sp.</i>	Scleroglucan	
solvents	<i>Clostridium</i> ,	Acetone, butanol, propan-2-diol	Rock dissolution for increasing permeability, oil viscosity reduction
	<i>Zymomonas and</i>		
	<i>Klebsiella</i>		
Acids	<i>Clostridium</i>	Propionic and butyric acids	Permeability increase, emulsification
	<i>Enterobacter</i>		
	<i>Mixed acidogens</i>		
Gases	<i>Clostridium</i>	Methane and hydrogen	Increased pressure, oil swelling, reduction of interfacial section and viscosity, increase permeability
	<i>Enterobacter</i>		
	<i>Methanobacterium</i>		

หมายเหตุ : MEOR คือ microbial enhanced oil recovery

ที่มา : Fakruddin (2012)

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารฆ่าเชื้อ หรือที่เรียกว่า สารฆ่าเชื้อชีวภาพ (biosanitizer) ในอุตสาหกรรมอาหาร แป้งเกษตร และฟาร์ม สำหรับด้านวัตถุดิบทางการเกษตร เพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์สารกำจัดศัตรูพืช และสารเคมีที่เป็นพิษตกค้างในวัตถุดิบทางการเกษตร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดการใช้สารเคมี และต้องการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่วนใหญ่มีรายงานความเป็นพิษต่ำ รายงานการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทางการค้ามาใช้ในกระบวนการล้างผักกาดหอมเพื่อลดสารกำจัดศัตรูพืชไซเปอร์เมทริน (cypermethrin) เทียบกับการล้างด้วยเกลือ น้ำส้มสายชู และด่างทับทิม พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีประสิทธิภาพในการลดไซเปอร์เมทริน โดยปริมาณที่ลดลงนั้นแปรผันตรงกับระยะเวลาที่ใช้ในการล้าง (Cheowtirakuland and Nguyen, 2010) และมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ มาใช้ในการล้างเพื่อควบคุม *Aspergillus parasiticus* NCIM 898 พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 สามารถควบคุมสปอร์และการงอกของสปอร์ได้ (รูปที่ 2.12)



รูปที่ 2.12 ผลการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการควบคุมการงอกของสปอร์

Aspergillus parasiticus NCIM 898

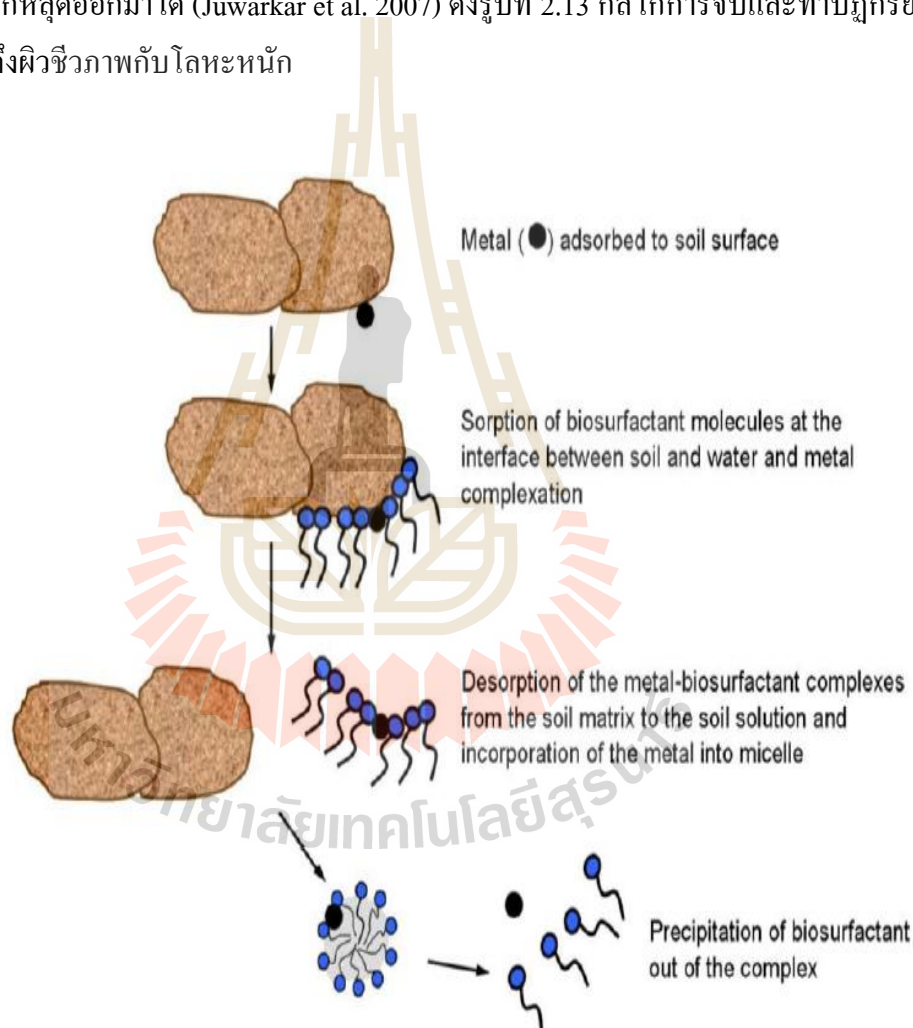
ที่มา : Mule and Bhathena (2012)

นอกจากการนำไปใช้ล้างผักกาดและมันฝรั่งแล้วยังมีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด โซโฟโรลิพิด (sophorolipids) ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้วว่าเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุ ผลิตจาก *Candida bombicola* ATCC 22214 ที่มีการประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส นำไปใช้ไปใช้ล้างละมุด มะนาว มะเขือเทศ และแตงกวา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมการงอกของ สปอร์ ซึ่งผลการทดสอบพบว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญและการงอกของสปอร์ รวมถึงแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (Pulate, Joshi, Bhagwat and Prabhune, 2014)

2.7.1 กลไกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อโลหะหนัก

สารทำความสะอาดชีวภาพที่ผลิตจาก *Streptomyces* spp. มีความสามารถในการขจัดขบวนการปนเปื้อนของโลหะหนัก ชนิด โปรท ตะกั่ว แคดเมียม สังกะสี และเหล็ก (Deepika and Kannabiran, 2010) การปนเปื้อนของโลหะหนักในดินและธรรมชาติเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งมีชีวิต สารทำความสะอาดชีวภาพมีความสามารถในการดูดซับการปนเปื้อนโลหะหนักในดินได้ คือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จะไปเพิ่มกระบวนการละลายให้โลหะหนักที่ไม่ค่อยละลายน้ำถูกละลายอยู่ในส่วนของโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ โลหะหนัก จะเข้าไปแทรกอยู่ในส่วนของไฮโดรคาร์บอน จนกระทั่งถึงความเข้มข้น ณ จุดหนึ่ง สารลดแรงตึง

ผิวชีวภาพจะเกิดการรวมตัวกันเป็นแบบไมเซลล์ ดังนั้นจึงเป็นกลไกการกำจัดหรือลดปริมาณโลหะหนักได้ ด้วยสารลดแรงตึงผิวจะทำให้โลหะหนักละลายได้ในสารละลายไฮโดรคาร์บอน และจะถูกกักเก็บอยู่ภายในเซลล์ และส่วนที่มีขั้วของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะทำหน้าที่เพิ่มการละลายโลหะหนักเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ (Plociniczak, Plaza, Seget and Cameotra, 2011) ในกรณีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดประจุลบ จะอาศัยการเกิดปฏิกิริยากับพันธะของโลหะหนัก ซึ่งพันธะประเภทไอออนิกที่ยึดเกาะระหว่างโลหะหนักกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพแข็งแรงกว่าพันธะระหว่างโลหะหนักกับดินหรืออนุภาคอื่น เนื่องจากแรงพันธะที่แข็งแรงกว่าจึงทำให้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพดึงโลหะหนักหลุดออกมาได้ (Juwarkar et al. 2007) ดังรูปที่ 2.13 กลไกการจับและทำปฏิกิริยาของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับโลหะหนัก



รูปที่ 2.13 กลไกการจับและทำปฏิกิริยาของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพกับโลหะหนัก
ที่มา : Mulligan (2005)

2.7.2 กลไกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อสารกำจัดศัตรูพืช

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Burkholderia cenocepacia* BSP3 มีผลต่อสารกำจัดศัตรูพืชกล่าวคือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะเพิ่มการละลายในสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ทำให้สามารถสลายได้ กลไกการลดสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ด้วยคุณสมบัติที่สามารถรวมตัวกันเป็นโครงสร้างแบบไมเซลล์ (micellar solubilization) คือ เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเข้มข้นในระดับที่เกิดการจับรวมตัวเป็นโครงสร้างดังกล่าว โดยโครงสร้างนี้จะจับกับโครงสร้างของสารกำจัดศัตรูพืช กลายเป็นสารเอสเทอร์ (ester) ของกรดฟอสฟอริก (phosphoric acid) ที่สามารถละลายได้ดีในไขมัน จากนั้นโครงสร้างแบบไมเซลล์จะเปลี่ยนเป็นโครงสร้างแบบทรงกลม (spherical micelle) ซึ่งสารประกอบกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเหล่านี้จะถูกละลายอยู่ในโครงสร้างแบบทรงกลมนี้ที่จับแบบหันด้านที่ไม่ชอบน้ำเข้าจับกันแล้วรวมตัวกัน ทำให้สามารถละลายน้ำได้ (Wattanaphon, Kerdsin, Thammacharoen, Sangvanich and Vangnai, 2008)

2.7.3 กลไกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเชื้อรา

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* spp. สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพประเภทไลโปลิพิด ที่มีโครงสร้างไขมันจับอยู่บนสายเปปไทด์ โครงสร้างที่เป็นไขมันอยู่บนสายทำให้สามารถจับกับผนังเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งมีผนังเซลล์เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ไคติน (chitin) จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ N-acetyl glucosamine มาเชื่อมกันด้วย β -1,4 glycosidic bond ลักษณะดังกล่าวนี้ไม่ละลายน้ำ แต่เมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ไปจับกับผนังเซลล์ของเชื้อราจะไปมีผลต่อกิจกรรมผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายหรือหยุดชะงักทำให้สามารถยับยั้งเชื้อรา

2.7.4 ความปลอดภัยของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นใจต่อการนำไปใช้งานโดยเฉพาะนำไปใช้ร่วมกับกระบวนการล้างวัตถุทางการเกษตรที่จะต้องสัมผัสกับอาหารโดยตรงจึงต้องตระหนักถึงระดับความเข้มข้นที่สามารถใช้งานได้ โดยจะต้องมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยทั้งต่อผู้ที่สัมผัสและผู้บริโภค จำเป็นจะต้องมีการศึกษาความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ รายงานการทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ (lipopeptide biosurfactant) ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 6633 พบว่าผลต่อการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงที่ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มีความเป็นพิษต่ำ (low-toxicity) ต่อผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง (Noudeh, Housaindokht and Bazzaz, 2005) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ แบบกึ่งเรื้อรัง (subacute) ในหนูแรท (rat) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย เป็นเวลา 28 วัน ที่ความเข้มข้น 500 ถึง 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าที่ความเข้มข้น

สูงไม่มีผลต่อน้ำหนักของหนู (Hwang, et al., 2009) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารลดแรงดึงผิวชีวภาพประเภทไม่มีประจุไฟฟ้าไปประยุกต์สร้างวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อลดปริมาณเชื้อราสารเคมีตกค้างที่เป็นความเสี่ยงและอันตรายสูงสุดในข้าว และจะต้องมีความปลอดภัย



บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 แหล่งที่มาของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักผลเชอร์รี่เปรี้ยว (ปิยะวรรณ กาสลัก, 2553) มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยให้ผลการทดลองคือ มีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) ของเชื้อ *E. coli*, *Salmonella* sp., *S. aureus* และ *B. cereus* เท่ากับ 25, 25, 6.25 และ 1.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 99 (Minimal Bactericidal Concentration; MBC) เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพพบว่ามีความเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุ (nonionic surfactant) 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่หมักโดยผลเชอร์รี่จัดเป็นพวกที่ไม่มีประจุไฟฟ้า ตรงที่เป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุเป็นสารประเภทโพลีอีเทอร์ (polyether) หรือสารในกลุ่มโพลีไฮดรอกซิล (polyhydroxyl) เป็นกลุ่มที่แสดงคุณสมบัติในการชะล้างและผ่านการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นโดยแก๊สโครมาโทกราฟี แมสสเปกโตรเมทรี (Gas chromatography - mass spectrometry) พบว่า ให้สารประกอบในกลุ่ม ไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) แอลกอฮอล์ (alcohol) กรด (acid) เอสเทอร์ (esters) แอลดีไฮด์ (aldehyde) และไมเซลล์เนนัส (Miscellaneous)

3.2 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลเชอร์รี่เปรี้ยวหมัก

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักผลเชอร์รี่เปรี้ยว กรองหยابผ่านสำลีปลอดเชื้อ จากนั้นนำส่วนใสไปกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนและเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งส่วนใสที่ได้นี้เรียกว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant; BSF)

3.3 ทดสอบคุณสมบัติด้านเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรไทเทรต

กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล (Normality; N) โดยใช้สารฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) เป็นอินดิเคเตอร์ไทเทรตจนสารเกิดเป็นสีชมพูอ่อน ๆ บันทึกผลและนำปริมาตรที่ได้ไปคำนวณหาหาปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity; %TA) โดยจะต้องมีการหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (AOAC, 2000)

3.3.2 การวิเคราะห์ค่าพีเอช

เก็บตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (Erlenmeyer flask) จากนั้นนำไปวัดค่าพีเอช (pH) ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)

3.3.3 การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ด้วยวิธีการอะลูมิเนียมคลอไรด์ (aluminum chloride method) นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 400 ไมโครลิตร และอะลูมิเนียมคลอไรด์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 415 นาโนเมตร นำไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานสารมาตรฐานเควอร์ซีทิน (quercetin) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.4 การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติม สารละลาย DPPH เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลลาร์ (mM) ปริมาตร 75 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ปิดสารละลาย 100 ไมโครลิตร เติมนีโตนอล (methanol) เข้าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 517 นาโนเมตร และคำนวณหาร้อยละการยับยั้ง (% inhibition) จากสมการ ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Absorbance blank} - \text{Absorbance sample} / \text{Absorbance blank}) \times 100$$

3.3.5 การวิเคราะห์หาปริมาณซาโปนิน

การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนิน (p-anisaldehyde colorimetric method) ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยเอทิลอะซิเตตความเข้มข้นร้อยละ 95 (ethyl acetate 99.5%) และเปิดสารข้างต้นปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม p-anisaldehyde เข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และกรดซัลฟิวริก เข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่าให้เข้ากันบ่มในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แขน้ำแข็ง ประมาณ 3 ถึง 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 435 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานซาโปนินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.4 ทดสอบคุณสมบัติด้านจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.4.1 แหล่งที่มาและการเตรียมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* DOAC 2312

เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* DOAC 2312 ได้จากสำนักงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผิวหน้าเอียง potato dextrose agar (PDA slant) เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การเก็บเชื้อ (stock culture) สำหรับใช้ในการทดลองเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA ใช้ห้วงเชี่ยเชื้อ (loop) ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วย้ายเม็ดสเกลอโรเทียวางบนบริเวณจุดศูนย์กลางของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA บ่มที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยด้วยเวอร์เนีย แคลลิเปอร์ (vernier calliper) จากนั้นทำการเก็บเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผิวหน้าเอียง PDA การนำไปใช้ในการทดสอบอื่นๆ ใช้ห้วงเชี่ยเชื้อ (loop) ที่ทำการฆ่าเชื้อย้ายเม็ดสเกลอโรเทียวางบนบริเวณจุดศูนย์กลางของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA บ่มที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน เชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาวปกคลุมเต็มผิวหน้าอาหารสามารถนำไปใช้ในการทดสอบกิจกรรมอื่นๆ ต่อไป

3.4.2 การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา (antifungal activity)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA ใหม่สำหรับการทดสอบ โดยในขั้นตอนการเทอาหารเลี้ยงลงในจานเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อแต่ละจาน มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คือ 20 มิลลิลิตร รองอาหารแข็งตัว จากนั้นใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรเจาะหลุมโดยให้มีระยะห่างจากเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร แล้วเปิดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในหลุมปริมาตร 30 ไมโครลิตร จากนั้นเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ที่เจริญบนเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน ใช้ที่เจาะจุกคอร์กที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ย้ายชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยไปยังจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA วางชิ้นวุ้นห่างจาก หลุมที่เจาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA ระยะห่างจากเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ติดตามผลโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของการเจริญของเส้นใย และบริเวณที่ยับยั้งการเจริญของเส้นใยด้วยเวอร์เนียแคลลิเปอร์

3.4.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเหลวในเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane fluidity)

เลี้ยงเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ย้ายเส้นใย (mycelium) ด้วยที่เจาะจุกคอร์กที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (เพื่อให้ได้เส้นใยปริมาณเท่ากันมากที่สุด) เติมน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที จากนั้นเติมน้ำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 50 100 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ความเร็ว

รอบ 125 รอบต่อนาทีนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างเส้นใยของเชื้อราด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (phosphate buffer saline) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ (mM) ทำการล้างด้วยสารดังกล่าวจำนวน 2 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,700xg นาน 5 นาที จากนั้นละลายเส้นใยของเชื้อราด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ และเติมสาร DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene, Sigma) โดยสารมีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลลาร์ปรับความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายเส้นใยที่มี DPH ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ DPH 0.004 มิลลิโมลลาร์ นำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นล้างเส้นใยด้วย 10 มิลลิโมลลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ จำนวน 2 ครั้ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,700xg นาน 5 นาทีปิเปตสารแขวนลอยนำไปวัดค่าการเรืองแสงโดยใช้ DPH probe fluorescence ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) ที่ความยาวคลื่นที่ใช้ในสภาวะกระตุ้นที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่ปล่อยออกมา 425 นาโนเมตร

3.4.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Sclerotium rolfsii* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

เลี้ยงเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ย้ายเส้นใย (mycelium) ด้วยที่เจาะจุกคอร์กที่ทำกรหน้าเชื้อแล้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (เพื่อให้ได้เส้นใยปริมาณเท่ากันมากที่สุด) เติมน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว PDB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาที จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 50 100 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ความเร็วรอบ 125 รอบต่อนาทีนาน 48 ชั่วโมงทำการล้างเซลล์เส้นใยของ *Sclerotium rolfsii* และเม็ดสเคลอโรเทียด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ (phosphate buffer saline) ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลลาร์ 2 ครั้ง แล้วทำการตรึงเซลล์ด้วยสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ชาไลน์ ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลลาร์ และทำการไล่น้ำออกจากเส้นใยด้วย absolute ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 50 70 80 90 95 และ 100 โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) ตามลำดับ และนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสข้ามคืนจะได้ตัวอย่างที่เป็นผง (powder specimen) นำไปติดบนฐานสตัฟสำหรับติดตัวอย่างแล้วฉาบด้วยทอง นำไปส่องด้วย SEM รุ่น SNE-4500M เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.5 การทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.5.1 การเตรียมเซลล์และการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ ได้แก่ เซลล์ผิวหนังปกติ (Normal Dermal Fibroblast cell ATCC PCS-201-012) สำหรับทดสอบความเป็นพิษต่อผิวหนังผู้สัมผัส และเซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1 cell ATCC HTB-52) สำหรับทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพว่ามีผลต่อการกระตุ้นการเจริญและการแบ่งตัวในเซลล์ที่ผิดปกติหรือเซลล์มะเร็งตับ การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิด โดยใช้อาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) เติม กลูโคส (glucose) 3.5 กรัม และ โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate; NaHCO_3) 3.7 กรัม เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 900 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริกประมาณ 7.15 ถึง 7.20 จากนั้นเติม fetal bovine serum ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติม penicillin streptomycin ความเข้มข้นร้อยละ 1 นำไปกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูเมมเบรน 0.2 ไมครอน ในตู้ปลอดเชื้อ การเตรียมเซลล์นำเซลล์ทั้งสองชนิดออกจากถังไนโตรเจนเหลว ทำการละลายเซลล์ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) 3,000xg นาน 5 นาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เซลล์ที่ใช้ในการทดลองจะใช้เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตประมาณร้อยละ 80

3.5.2 การทดสอบการอยู่รอดของเซลล์ (cell viability)

ทดสอบโดย MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ซึ่งเรียกว่า tetrazole เป็นสีย้อมสีเหลืองที่ละลายน้ำได้ และจะถูกเปลี่ยนเป็นตะกอนสีฟ้าของ formazan โดย mitochondria reductase enzyme จากเซลล์ที่มีชีวิต จากนั้น formazan จะถูกละลายใน DMSO (dimethyl sulfoxide) เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 500 ถึง 600 นาโนเมตร ทั้งนี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารทดสอบต่อเซลล์จะวัดจำนวนเซลล์ที่รอดหลังการบ่มกับสารทดสอบด้วยการดูการลดลงของ MTT ที่เปลี่ยนเป็น formazan เทียบกับสถานะที่ไม่มีสารทดสอบ ในการทดสอบมีขั้นตอน ดังต่อไปนี้ นำเซลล์ผิวหนังปกติและเซลล์มะเร็งตับ มาเพาะเลี้ยงใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้ความเข้มข้น 4,000 เซลล์ต่อหลุม แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารใหม่แล้วเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพลงในหลุม ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่คิดจากสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุไฟฟ้า ความเข้มข้นสุดท้าย 75 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ 75 ส่วนในล้านส่วนทำการทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไปจนถึงที่ความเข้มข้น

สุดท้าย 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เติมน้ำลงไปให้รับสัมผัสกับเซลล์ในหลุม แล้วบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ ก่อนเติมสาร MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดเอาสาร MTT และอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมสาร DMSO เพื่อละลาย formazan product ในการทดสอบความเป็นพิษนี้มีการควบคุมการทดลองด้วย blank control (ภายในหลุมทดสอบประกอบด้วย อาหาร DMEM สาร MTT และสาร DMSO) MTT control (ภายในหลุมทดสอบประกอบด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาไลน์ สาร MTT และสาร DMSO) ตัวควบคุมเชิงลบ (เซลล์ผิวหนังปกติและเซลล์มะเร็งระดับ 4000 เซลล์ อาหาร DMEM สาร MTT และสาร DMSO) ตัวควบคุมเชิงบวก (ภายในหลุมทดสอบ ประกอบด้วยเซลล์ผิวหนังปกติและเซลล์มะเร็งระดับ 4000 เซลล์ ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารละลาย คลอรีนไดออกไซด์ สาร MTT และสาร DMSO) และตัวควบคุมที่ทำให้เซลล์ตาย (ประกอบด้วย ภายในหลุมทดสอบประกอบด้วยเซลล์ผิวหนังปกติและเซลล์มะเร็งระดับ 4000 เซลล์ ที่รับสัมผัสด้วย สาร Triton X- 100 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 เติมน้ำ MTT และสาร DMSO) นำไปอ่านค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader TECAN ซึ่งร้อยละการอยู่รอด ของเซลล์สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ Cell Viability} = (\text{Absorbance of test group} / \text{Absorbance of control group}) \times 100$$

3.5.3 ทดสอบอัตราการเจริญของเซลล์ (cell growth)

นำเซลล์ผิวหนังปกติและเซลล์มะเร็งระดับมาเพาะเลี้ยงใน 12-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้มีความเข้มข้น 1,000 เซลล์ต่อหลุมแล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น สุดท้าย 150 300 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไปในแต่ละหลุม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ติดตามการเจริญของเซลล์ ณ วันที่ 3 5 7 10 และ 14 โดยการนับเซลล์ในแต่ละจุดที่ติดตาม ทำได้โดย ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม Trypsin/EDTA 0.5 มิลลิลิตร trypsin/EDTA ให้เซลล์ที่เกาะกันหลุมหลุดออกดูเซลล์ ในแต่ละหลุมปริมาตร 1 มิลลิลิตรออกมาใส่ด้วยนับเซลล์ที่มีสารละลาย isotonic ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปนับด้วยเครื่องนับเซลล์ โดยรวมค่าที่นับได้จากเครื่องจำนวน 2 ครั้ง คูณกับ dilution factor 10 เท่า จะได้จำนวนเซลล์ต่อ 1 มิลลิลิตร แล้วสร้างกราฟการเจริญ ของเซลล์ที่เวลาต่างๆ

3.6 การทดสอบการเติม *Sclerotium rolfii* DOAC 2312 ไคเมโรเอท และตะกั่วในปริมาณที่มากเกินไป (challenge test)

3.6.1 แหล่งข้า (galangals) และการเตรียม

ข้าที่นำมาใช้ในการทดสอบจะต้องมีอายุช่วง 5 ถึง 6 เดือน รับซื้อจากตลาดสุรนคร โดยมีแหล่งเพาะปลูกที่อำเภอเสิงสาง จังหวัดนครราชสีมา ตัดใบทิ้งให้เหลือแค่ส่วนที่เป็นลำต้น ได้ดิน คัดเฉพาะเหง้าที่สมบูรณ์ กำจัดเศษกรวด ดิน ทราช ชั่งน้ำหนักให้มีปริมาณใกล้เคียงกัน 125 ถึง 135 กรัม แล้วนำมาทำความสะอาดด้วยน้ำไหลผ่านปราศจากคลอรีน 2 นาที พักให้ข้าสะเด็ดน้ำและแช่ในน้ำปราศจากคลอรีน 5 นาที

3.6.2 การเตรียมเส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* DOAC 2312 และการเติมเส้นใยในข้าที่มีปริมาณที่มากเกินไป

เตรียมเส้นใย *Sclerotium rolfii* ในรูปของสารละลายแขวนลอย 30 กรัม ของน้ำหนักเส้นใยเปียกต่อสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร 3 ลิตร (ต่อปริมาตร 1 ลิตร คิดเป็นปริมาณเส้นใย 10 กรัม) จากนั้นจุ่ม (dipping method) ข้าจำนวน 1 กิโลกรัมลงในสารละลายแขวนลอยเป็นเวลา 20 วินาที ตลอดจนการทดสอบจะปฏิบัติให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic techniques) จะได้ข้าที่มีเส้นใยคิดเป็นปริมาณสุดท้าย คือ 10 กรัมของเส้นใยต่อข้าหนัก 1 กิโลกรัม นำขึ้นมาพักแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อให้เส้นใยของเชื้อรามีการเจริญและงอก ก่อนนำไปทดสอบการล้าง

3.6.3 การเติมไคเมโรเอทที่ความเข้มข้นที่มากเกินไปในข้า

เตรียมสารละลายไคเมโรเอทเข้มข้น 0.6 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 3 ลิตร (ต่อปริมาตร 1 ลิตร คิดเป็น คิดเป็นความเข้มข้นสารละลายไคเมโรเอท 0.2) จากนั้นนำข้าจุ่ม (dipping method) ในสารละลายไคเมโรเอทข้าจำนวน 1 กิโลกรัมลงในสารละลายเป็นเวลา 60 วินาที นำขึ้นมาพักให้สะเด็ดน้ำ (จะได้ข้าที่มีสารไคเมโรเอทความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 มิลลิกรัมต่อข้า 1 กิโลกรัม)

3.6.4 การเติมตะกั่วที่ความเข้มข้นที่มากเกินไปในข้า

เตรียมโดยละลาย Lead (II) acetate trihydrate เข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 3 ลิตร (ต่อปริมาตร 1 ลิตร คิดเป็นความเข้มข้นของสารละลายตะกั่ว 1.0 มิลลิกรัม) จุ่มข้าจำนวน 1 กิโลกรัมลงในสารละลายตะกั่วเป็นเวลา 60 วินาที นำขึ้นมาพักให้สะเด็ดน้ำ (จะได้ข้าที่มีสารตะกั่วความเข้มข้นสุดท้าย 1.0 มิลลิกรัมต่อข้า 1 กิโลกรัม)

3.7 ทดสอบประสิทธิภาพการล้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

3.7.1 การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารละลายคลอรีนไดออกไซด์สำหรับล้าง

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากข้อ 3.2 ข้างต้นมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุไฟฟ้า 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากความเข้มข้น 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรให้มีความเข้มข้นของสารไม่มีประจุไฟฟ้าสุดท้าย 50 100 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำปริมาตร 5 ลิตร สำหรับการเตรียมสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ (chlorine dioxide; ClO_2) เตรียมจากคลอรีนไดออกไซด์ในรูปแบบเม็ด (บริษัท Thai Bio Oxzing) ปริมาณ 1 กรัม (1 เม็ด) ละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 ลิตร จะได้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (100 ppm) เก็บในขวดพลาสติกทึบ (stock solution) จากนั้นเตรียมสารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร (8 ppm) จากสารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรให้มีความเข้มข้นสารละลายคลอรีนไดออกไซด์สุดท้าย 8 มิลลิกรัมต่อน้ำ 5 ลิตร

3.7.2 วิธีการล้าง

นำข้าวผ่านการเติมเส้นใยของ *Sclerotium rolfsii* ไคเมโซเอท และตะกั่วในปริมาณและความเข้มข้นที่มากเกินไป (ข้อ 3.6) มาทดสอบประสิทธิภาพการล้างเพื่อลดปริมาณดังกล่าว ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีขั้นตอนการล้างโดยอ้างอิงตามมาตรฐาน (Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific Bangkok) ดังนี้ในการทดสอบจะทำการล้างครั้งละ 1 กิโลกรัม เพื่อสะดวกต่อการควบคุมปริมาณและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อ นำข้าวล้างด้วยน้ำไหลผ่าน (rinsing) ที่ปราศจากคลอรีนเป็นเวลา 2 นาที พักให้สะเด็ดน้ำ 2 นาที จากนั้นนำข้าวแช่ (soaking) ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารไม่มีประจุไฟฟ้า 50 100 150 และ 200 มิลลิกรัมต่อน้ำปริมาตร 5 ลิตร สารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้นสุดท้าย 8 มิลลิกรัมต่อน้ำ 5 ลิตร และน้ำปราศจากคลอรีน เป็นเวลา 5 นาที พักให้สะเด็ดน้ำ กรณีข้าวที่มีการเติมเส้นใยของ *Sclerotium rolfsii* กระบวนการล้างด้วยสารชนิดต่างๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากเชื้อราจะต้องให้ระยะเวลาในการงอกของเส้นใย

3.8 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการล้าง เพื่อลดอันตรายทางจุลินทรีย์ในข้าว

3.8.1 การตรวจนับจำนวนของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ซึ่งตัวอย่างข้าว 125 กรัมเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ที่ระดับ 10 เท่า จากนั้นเจือจางเป็นลำดับเลือกความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ ถ่ายลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทำการเกลี่ยให้ทั่ว บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 7 วัน จากนั้นตรวจนับเฉพาะโคโลนีที่มีเส้นใยสีขาว หรือเป็นแฉก รอบโคโลนีแล้วนำไปยืนยันศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสไลด์ (slide culture) ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.8.2 การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ใช้วิธีการ spread plate technique ซึ่งตัวอย่างข้าว 125 กรัมเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระดับ 10 เท่า จากนั้นเจือจางเป็นลำดับเลือกความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ ถ่ายลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง plate count agar (PCA) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทำการเกลี่ยให้ทั่ว บ่มจานเพาะเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 ถึง 300 โคโลนีนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g)

3.9 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการล้าง เพื่อลดอันตรายทางเคมีในข้าว

3.9.1 การวิเคราะห์ปริมาณไดเมโรเอทด้วย Gas Chromatograph-Flame Photometric Detector (GC-FPD)

นำตัวอย่างข้าวสดมาทำแห้งให้ได้น้ำหนัก 1 กิโลกรัม ชักตัวอย่างปริมาณ 25 ± 0.05 กรัม ลงในขวดเตรียมตัวอย่าง แล้วเติม acetone 50 มิลลิลิตร dichloromethane 40 มิลลิลิตร และ sodium chloride 10 กรัม สกัดตัวอย่างโดย homogenizer ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตั้งทิ้งไว้จนสารละลายใส เติมสารละลายส่วนใสลงในขวดที่มี sodium sulfate anhydrous 15 กรัม ปิดฝา ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เขย่าแบบแกว่งเบาๆ เพื่อให้ sodium sulfate ผูกน้ำในตัวอย่าง แล้วกรองสารละลายผ่าน sodium sulfate anhydrous ที่บรรจุในกรวยแก้วที่มีสำลีรองอยู่ เติสารละลายที่ได้ลงในขวดรูปชมพู่แล้วชะด้วย acetone นำไปลดปริมาตรด้วย rotary evaporator จนเกือบแห้งแล้วปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปทดสอบด้วยเครื่อง gas chromatograph ที่มีตัวตรวจวัดชนิด flame photometric detector (GC-FPD)

3.9.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วด้วย Inductive Coupled Plasma Spectrometer - Mass Spectrometer (ICP-MS)

นำตัวอย่างข้าวไปปิ้งให้เป็นผงละเอียดชั่งตัวอย่าง 1 กิโลกรัม และชั่ง 1 กรัม ใส่ในครุชีเบิ้ล นำไปเผาที่อุณหภูมิ 450 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเอ้าที่ได้มาชั่งน้ำหนักหลังจากนั้นนำเอ้าที่เผาได้ไปทำการย่อย (digest) ด้วยกรดไนตริกเข้มข้น ปริมาตร 7 มิลลิลิตรและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทิ้งไว้นาน 2 ชั่วโมง ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 95 ± 5 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน นำสารละลายของมากรองด้วยชุดกรอง buchner funnel ใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 42 และนำไปวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง inductive coupled plasma spectrometer-mass spectrometer (ICP-MS)

3.10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 23 (SPSS Inc., Illinois, U.S.A.)



บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 คุณสมบัติทางด้านเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทนอนไอออนิก (nonionic surfactant) 0.30 กรัมต่อ 100 กรัม (3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร) จัดเป็นพวกที่ไม่มีประจุไฟฟ้า ตรงที่เป็นโมเลกุลที่ไม่มีประจุมี polyether หรือ polyhydroxyl เป็นกลุ่มสารที่แสดงคุณสมบัติในการชะล้าง (ปิยะวรรณ กาสลัก, 2553) ในผลิตภัณฑ์หรือน้ำยาสำหรับล้างผักผลไม้โดยส่วนใหญ่จะมีสารลดแรงตึงผิวประเภทนี้เป็นส่วนประกอบสูงถึงร้อยละ 40 ได้แก่ alky polyglycoside lauryl glucoside glycerol monostearate และ triton X-100 เป็นต้น จึงทำให้สามารถนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (BSF) ที่ได้จากการหมักเชอร์รี่เปรี้ยวมาประยุกต์ร่วมกับการล้าง คุณสมบัติที่สำคัญได้ทำการศึกษา คือ ปริมาณกรดทั้งหมด (% total acidity) และสารพฤษเคมี (phytochemical) ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ให้ผลดังตารางที่ 4.1 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีปริมาณกรดทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 1.30 และมีค่าพีเอช 3.22 ซึ่งแสดงถึงความเป็นกรดสูงเนื่องจากสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ผลิตจากกระบวนการหมักด้วยผลเชอร์รี่ ซึ่งเป็นผลไม้รสเปรี้ยวมีความเป็นกรดและมีค่าพีเอช 3 โดยประมาณ ทำให้จุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญ กระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้เกิดจากการหมักภายใต้สภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (facultative condition) อุณหภูมิ 28 ถึง 33 องศาเซลเซียส นาน 12 สัปดาห์ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก และเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติก ที่จะสามารถผลิต กรดแลคติก แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ (primary metabolite) รวมถึงสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น สารในกลุ่มแบคทีริโอซิน ด้วยการหมักกลูโคส (Makarova et al., 2006) สารเมตาบอไลต์ ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก จะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเมตาบอไลต์อื่น ๆ โดยจุลินทรีย์อีกกลุ่ม ได้แก่ เชื้อรา และกลุ่ม *Acetobacter* sp. หรือ *Gluconobacter* sp. ที่พบในผลไม้ส่วนใหญ่ร้อยละ 70 และ *Acetobacter* sp. ร้อยละ 8 แบคทีเรียนี้จะสามารถผลิตกรดอะซิติกโดยใช้แอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้น (วันเชิญ โพธาเจริญ และคณะ 2550) นอกจากนั้นมีรายงานสนับสนุนการนำกรดแลคติกที่ผลิตจาก *Pediococcus*, *Acidilactici* และ *Lactobacillus* ไปประยุกต์ในผลไม้เพื่อป้องกันการยืดยาวของ *Listeria monocytogenes* (Ndahetuye et al., 2012)

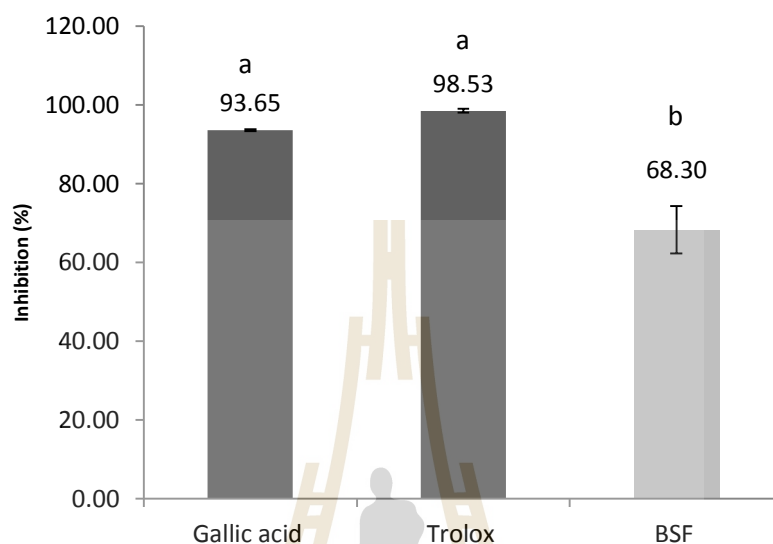
ตารางที่ 4.1 คุณสมบัติทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

รายการตรวจวิเคราะห์	ผลการวิเคราะห์
ปริมาณกรดทั้งหมด (% total acidity)	1.30 ± 0.11
ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH)	3.22 ± 0.03
ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids, $\mu\text{g/ml}$)	5.25 ± 0.20
ปริมาณซาโปนินทั้งหมด (total saponin, $\mu\text{g/ml}$)	194.31 ± 6.52

หมายเหตุ : $\pm$ หมายถึง ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละผลการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ ปริมาณฟลาโวนอยด์ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานเคอซิทิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณซาโปนินได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐานซาโปนิน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาสารพฤกษเคมีที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.1) พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid) 5.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณซาโปนินทั้งหมด (total saponin) 194.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (รูปที่ 4.1) การตรวจวัดคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดย DPPH radical scavenging activity (%) พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีกิจกรรมแสดงการยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) ร้อยละ 68.30 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน gallic acid และ trolox อย่างไรก็ตามคุณสมบัติดังกล่าวนี้ส่งผลต่อประสิทธิภาพและความปลอดภัย สารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตจากสารตั้งต้น คือ ผลเชอร์รี่เปรี้ยว ที่มีสีส้มอมเหลือง เมื่อผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ จะได้สารประกอบหลายชนิดที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ชนิด เช่น สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) สารประกอบไนโตรเจน (nitrogen compounds) แคโรทีนอยด์ (carotenoid) รวมถึงฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทนต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในเซลล์ (Chattopadhyay et al., 2010) เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถทำลายองค์ประกอบหลักของเซลล์ ทำลายหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์จนอาจทำให้เซลล์ตาย โดยดีเอ็นเอไปจับกับหมู่ฟอสเฟต และน้ำตาลดีออกซีไรโบส อนุมูลอิสระยังสามารถแตกพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ เป็นสาเหตุก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และการเกิดมะเร็ง จากผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็นสารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถป้องกันการถูกทำลายของเซลล์และการเจริญที่ผิดปกติ นอกจากนี้สารซาโปนินที่ตรวจพบ มีการศึกษาพบว่าสามารถนำไปผลิตสารลดแรงตึงผิว

ชีวภาพจากผลไม้ชนิดเบอร์รี่ (*Sapindus mukorossi*) ได้สารประเภทซาโปนินที่มีความเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุไฟฟ้า สามารถนำไปล้างเพื่อลดการปนเปื้อนสารประกอบฟีนแอนทริน (phenanthrene) (Zhou, Wang, Chen and Zhu, 2013)



รูปที่ 4.1 กิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity) ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หมายเหตุ : สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ gallic acid และ trolox เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.01$)

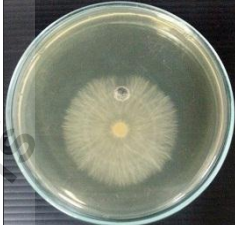
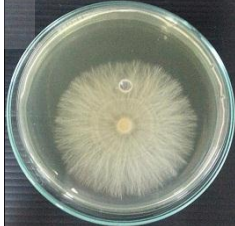
4.2 การศึกษาคุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.2.1 คุณสมบัติการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในพืช

การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เส้นใยของ *Sclerotium rolfsii* DOAC 2312 ที่อายุการทดลอง 5 วัน ทำการตรวจสอบผลการทดลองโดยการวัดการเจริญของเส้นใย ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA ที่มีสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าช่วงความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแผ่เส้นใย *Sclerotium rolfsii* คือ ที่ความเข้มข้น 50 ถึง 200 ส่วนในล้านส่วน (ppm) แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 4.2 บริเวณเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใย และบริเวณยับยั้งการเจริญของเส้นใยของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเทียบกับสารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการล้างผักผลไม้ในอุตสาหกรรม (FDA แนะนำการนำให้สามารถใช้

สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วนไปใช้ล้างผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง สำหรับพืชลำต้นใต้ดิน เหง้า รวมถึงสมุนไพร) โดยที่สารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน มีเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเส้นใย 73.18 มิลลิเมตร ซึ่งคิดเป็นความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยร้อยละ 5.18 (5.18 % inhibition) แต่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่า สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเส้นใย 56.43 และ 52.76 มิลลิเมตร ตามลำดับ คิดเป็นความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยร้อยละ 26.89 และ 31.64 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* DOAC 2312 ที่มีสารละลายคลอรีนไดออกไซด์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Concentration	Dimeter of colonies (millimeter)	Inhibition zone (millimeter)	Characteristic
Control	77.18±2.72	0.00±0.00	
Chlorine dioxide 8 ppm	73.18±2.04	0.00±0.00	
BSF 50 ppm	76.15±0.82	0.00±0.00	
BSF 100 ppm	75.55±1.49	0.00±0.00	

ตารางที่ 4.2 ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* DOAC 2312 ที่มีสารละลายคลอรีนไดออกไซด์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (ต่อ)

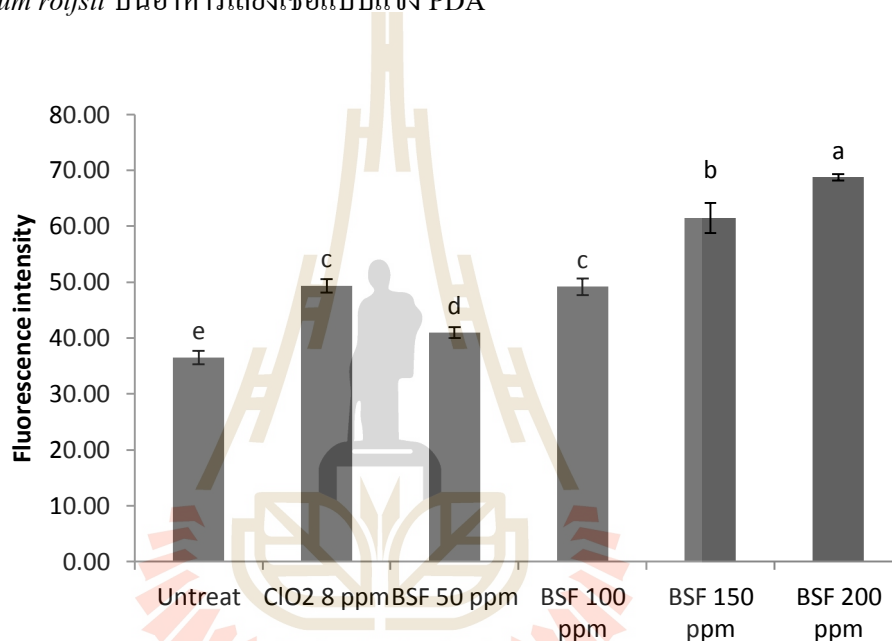
Concentration	Dimeter of colonies (millimeter)	Inhibition zone (millimeter)	Characteristic
BSF 150 ppm	56.43±0.56	4.83±0.29	
BSF 200 ppm	52.76±2.23	6.23±0.25	

หมายเหตุ : Inhibition zone คือ บริเวณที่วัดจากปลายนอกสุดของเส้นใยไปยังหลุมที่มีสารต่างๆ
ผลการวิเคราะห์ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำ

4.2.2 ผลการศึกษา Membrane fluidity ของ *Sclerotium rolfsii* DOAC 2312 ที่รับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

รูปที่ 4.2 เป็นการติดตามและตรวจวัดสภาพของความสัมพันธ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีส่วนประกอบของ ไคติน ไขมัน และโปรตีนเพื่อรักษาสภาพการเป็นของไหล (membrane fluidity) ของเซลล์ *Sclerotium rolfsii* ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยด้วย DPH probe fluorescence (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene) ที่อาศัยหลักการตรวจวัดการเรืองแสงของ DPH พบว่าเส้นใยที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน เส้นใยไม่ผ่านการรับสัมผัส (untreated) และเส้นใยที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 50 100 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน มีค่า fluorescence intensity แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 100 ส่วนในล้านส่วนมีค่า fluorescence intensity ที่ไม่แตกต่างหรืออยู่ในระดับเดียวกับเส้นใยที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน ในขณะที่เซลล์หรือเส้นใยที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วนนั้นมีค่า fluorescence intensity สูงกว่าสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ คือ 61.49 และ 68.79 ตามลำดับ ซึ่งบ่งบอกถึงเยื่อหุ้มเซลล์ที่ได้รับการทำลายหรือรบกวน จนทำให้ผนังเซลล์เสียหาย เมื่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย

จะทำให้เกิดการผ่านเข้าออกของสารภายในเซลล์เสียไปจนทำให้ DPH probe ที่มีคุณสมบัติเป็นสารชนิด hydrophobic สามารถจับกับโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ที่ประกอบด้วยสารประเภท ไขมัน ไคติน และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ membrane protein จึงทำให้เกิดการเรืองแสงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ที่สมบูรณ์ หรือไม่ได้ผ่านการรับสัมผัสด้วยสาร ทำให้มีผลต่อความหนืดที่สูงขึ้นและมีค่า fluorescence intensity สูง (Liu, Duan, Wang and Li, 2010) ดังนั้นเมื่อสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมีความเข้มข้นสูงขึ้นจะส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการทำลายผนังเซลล์เส้นใยของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกันกับผลการทดสอบผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Sclerotium rolfii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง PDA



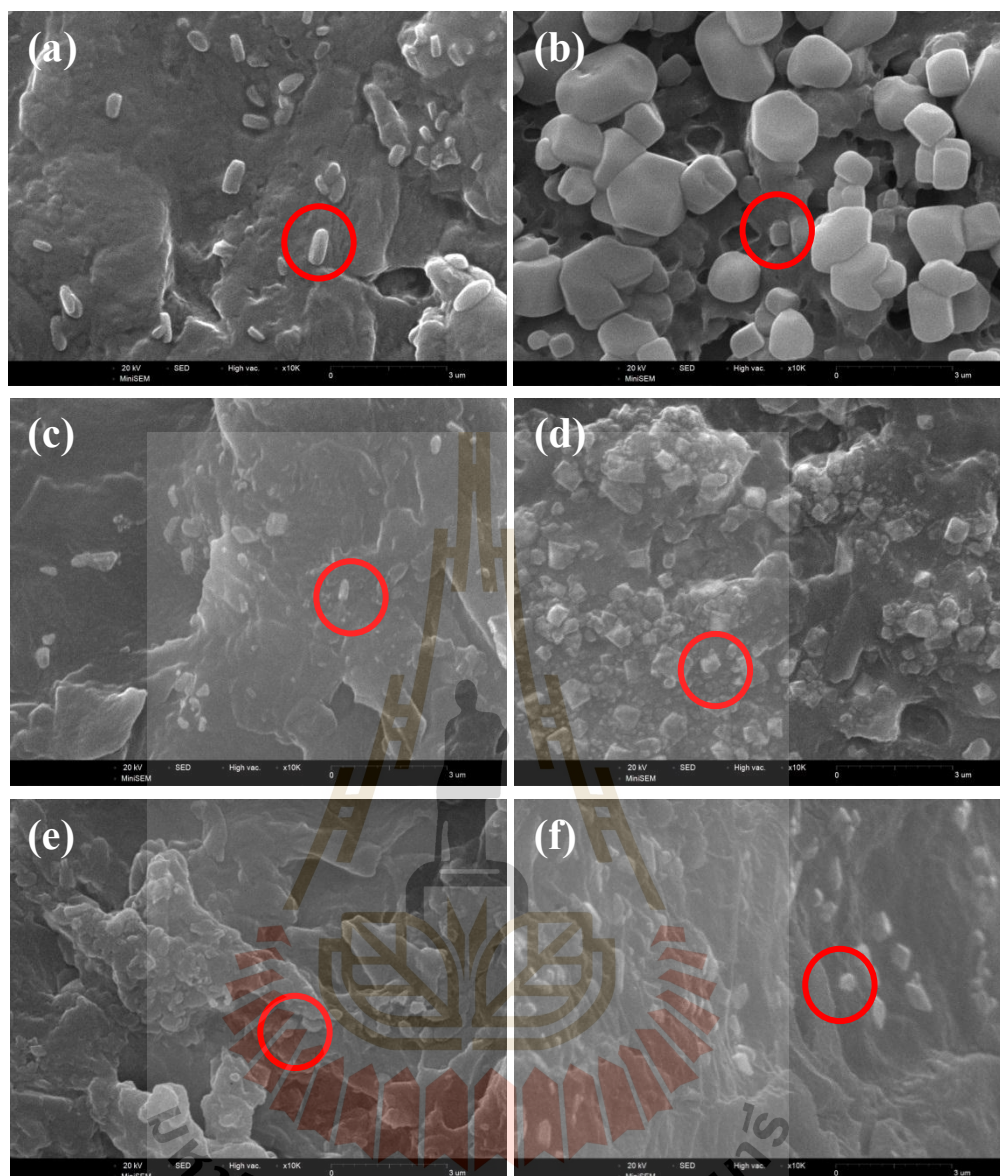
รูปที่ 4.2 ค่า Fluorescence intensity ที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ *Sclerotium rolfii* ที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่กำกับที่แตกต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.01$)

4.2.3 ผลการศึกษาโครงสร้างภายนอกที่เปลี่ยนแปลงของ Sclerotia ที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

เชื้อรา *Sclerotium rolfii* ไม่สร้างสปอร์ในการสืบพันธุ์ (asexual spore) แต่จะสร้างโครงสร้างชนิด resistance structure เรียกว่า “sclerotia” หรือ “เม็ดสเกลอโรเทีย” ที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลมมีสีตั้งแต่สีขาวไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม โครงสร้างดังกล่าวเกิดจากเส้นใยมาเรียงตัวขนานกันเป็นกลุ่ม (hyphal strand) ลักษณะโครงสร้างลักษณะนี้ทำให้ sclerotia ทนต่อ

สภาพแห้งแล้งได้เป็นเวลายู่ข้ามฤดูกาล สามารถอยู่ได้ในสภาวะที่ไม่มีสารอาหารหรือแร่ธาตุ สำหรับการเจริญเติบโต สามารถออกเป็นเส้นใยใหม่ได้ (germ tube) โดยภายในสเคลอโรเทียม จะมีการสะสมของวิตามินโทอะมิน จึงทำให้สามารถเจริญในอาหารที่ไม่มีวิตามิน ชนิดนี้ได้ ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อโครงสร้างของสเคลอโรเทียมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Scanning Electron Microscope; SEM) ดังรูปที่ 4.3 พบว่า (a) คือ รูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทียม (control) ที่มีลักษณะเป็นกิ่งทรงกลมรูปไข่ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความสมบูรณ์ (b) คือ รูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทียมเมื่อผ่านการรับสัมผัสด้วยสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์เข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน ที่มีผลทำให้โครงสร้างรูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทียม เกิดการบิดเบี้ยวไปจากเดิม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากสารละลายคลอรีนไดออกไซด์มีผลต่อผนัง เซลล์ (hypha wall) ของสเคลอโรเทียมโดยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์จะไปทำปฏิกิริยากับ ส่วนที่เป็นเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เซลล์เกิด permeabilized คือ เกิดการสูญเสียไอออน (potassium K^+ leakage) และพลัง ATP ในระดับที่เล็กน้อย ทำให้ membrane protein ที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงและเสียสภาพ เซลล์เกิดการหยุดชะงักชั่วคราวแต่ไม่ทำให้เซลล์ตายในทันที (Wei et al., 2008) (c) คือ รูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทียมเมื่อผ่านการรับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 50 ส่วนในล้านส่วน (d) คือ รูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทียมเมื่อผ่านการรับสัมผัส ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 100 ส่วนในล้านส่วน สามารถสังเกตลักษณะโครงสร้างที่ เปลี่ยนแปลงไปได้ชัดกว่าที่ 50 ส่วนในล้านส่วน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพส่งผลต่อลักษณะ รูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทียม โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างผนังเซลล์ เช่นเดียวกับกับ (e) และ (f) คือรูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทียมเมื่อผ่านการรับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน ตามลำดับ ได้มีการรายงาน (Tanuja, Hemalatha, Karuna and Sashidhar Rao, 2010) สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุไฟฟ้า (nonionic) มีผลต่อการงอก (germ tube) ของสปอร์ โดยทำให้ช้าลง จะเห็นได้ว่าโครงสร้างแบบเม็ดสเคลอโรเทียม ที่เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* สร้างขึ้นนี้ยากต่อการทำลายเนื่องจากเม็ดสเคลอโรเทียม ประกอบด้วย ชั้นโครงสร้างทั้งหมด 4 ชั้น ได้แก่ cuticle เป็นชั้นที่อยู่รอบนอกสุดทำหน้าที่คล้ายผนังเซลล์ rind เป็นชั้นที่อยู่ถัดเข้ามามีการไหลเวียนของสารที่จำเป็นต่อการมีชีวิตของเชื้อรา cortex ชั้นที่มีการจัดเรียงตัวของเส้นใยอย่างหนาแน่นจึงทำหน้าที่เปรียบเสมือนเยื่อหุ้มเซลล์ และ medulla เป็นส่วนที่อยู่ภายในสุดเป็นเส้นใยที่มีชีวิตสามารถงอกและเจริญกลายเป็นเส้นใยใหม่ได้



รูปที่ 4.3 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อโครงสร้างและรูปร่างของเม็ดสเคลอโรเทีย (sclerotia)

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Scanning Electron Microscope; SEM)

หมายเหตุ : (a) Untreated (control), (b) ClO_2 8 ppm, (c) BSF 50 ppm, (d) BSF 100 ppm,

(e) BSF 150 ppm และ (f) BSF 200 ppm

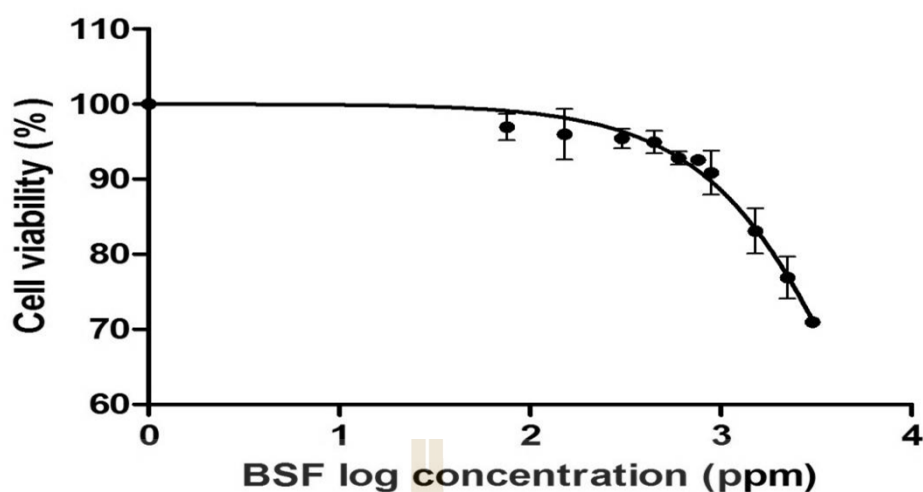
ภาพ (a) – (f) ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่ 20Kv (กิโลโวลต์)

ด้วยกำลังขยาย x10K (10,000 เท่า) สเกล 0.3 μm (ไมโครเมตร)

4.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.3.1 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังปกติ

ผลการทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อประเมินความปลอดภัยต่อการนำไปใช้งานในเซลล์ผิวหนังปกติ (Normal Dermal Fibroblast cells) ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ซึ่งเรียกว่า tetrazole เป็นสีย้อมสีเหลืองที่ละลายน้ำได้ และจะถูกเปลี่ยนเป็นตะกอนสีฟ้าของ formazan โดย mitochondria reductase enzyme จากเซลล์ที่มีชีวิต จากนั้น formazan จะถูกละลายใน DMSO (Dimethyl Sulfoxide) เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ดังนั้นจึงเป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเซลล์ผิวหนังปกติที่จะตรวจวัดจากจำนวนเซลล์ที่รอด (cell viability) หลังการรับสัมผัสกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นสุดท้าย 75, 150, 300, 450, 600, 750, 900, 1500, 2250 และ 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร (ส่วนในล้านส่วน) ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบเป็นความเข้มข้นของสารที่แสดงว่าไม่มีประจุไฟฟ้า (nonionic surfactant) ที่อยู่ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ดังรูปที่ 4.4 พบว่าเซลล์ผิวหนังปกติที่มีชีวิตมีแนวโน้มจำนวนเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังมีเซลล์อยู่รอดคิดเป็นร้อยละ 70.96 และเมื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้เซลล์ลดลงร้อยละ 50 (inhibitory concentration; IC_{50}) ได้จากโปรแกรม GraphPad Prism 5 พบว่าเซลล์ผิวหนังปกติมีค่า IC_{50} เท่ากับ 7,272 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือกล่าวโดยสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มากกว่า 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร จึงจะทำให้เซลล์ลดลงร้อยละ 50 และเมื่อเทียบกับตัวควบคุมที่ใช้ในการทดสอบนี้ ได้แก่ ตัวควบคุมเชิงบวก คือเซลล์ผิวหนังปกติที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อลิตร และตัวควบคุมที่ทำให้เซลล์ตาย คือ เซลล์ผิวหนังปกติที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารละลาย Triton-X100 (nonionic surfactant) เข้มข้นร้อยละ 1 ที่มีเซลล์อยู่รอดคิดเป็นร้อยละ 85.14 และ 25.68 ตามลำดับดังนั้นสรุปได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ไม่มีความเป็นพิษ (non-toxicity) ต่อเซลล์ผิวหนังปกติ

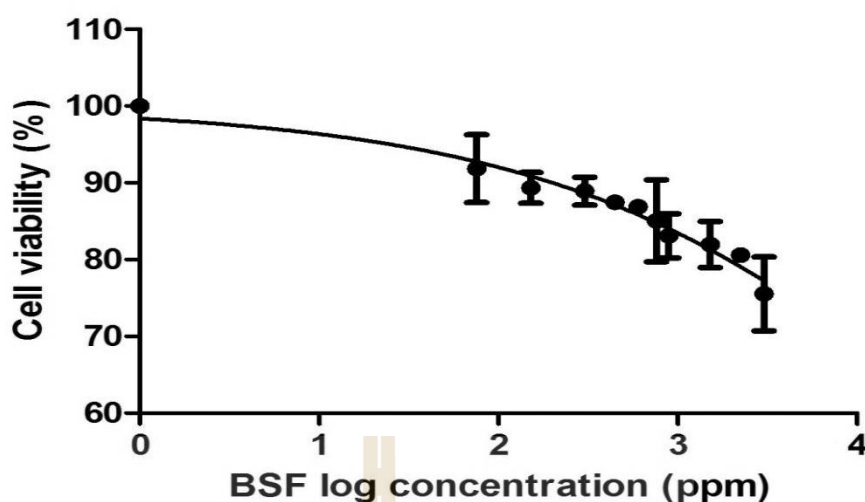


รูปที่ 4.4 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อร้อยละการอยู่รอด (cell viability, %) ของเซลล์ผิวหนังปกติ (Normal Dermal Fibroblast cells)

หมายเหตุ : แกน x คือ ความเข้มข้นในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในฐาน 10

4.3.2 การทดสอบสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ

การทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อเซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1 cells) โดยตรวจวัดจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cell viability) หลังการสัมผัสกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นสุดท้าย 75 150 300 450 600 750 900 1,500 2,500 และ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5) พบว่าเซลล์มะเร็งตับที่มีชีวิตมีแนวโน้มจำนวนเซลล์ลดลงตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังมีเซลล์มะเร็งตับอยู่รอดสูงถึงร้อยละ 75.55 ในขณะที่เมื่อเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก และตัวควบคุมที่ทำให้เซลล์ตาย มีเซลล์มะเร็งตับอยู่รอดร้อยละ 76.01 และ 33.15 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ทำให้เซลล์มะเร็งตับลดลงร้อยละ 50 (inhibitory concentration, IC_{50}) มีค่า IC_{50} เท่ากับ 9,235 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถสรุปได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพไม่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ

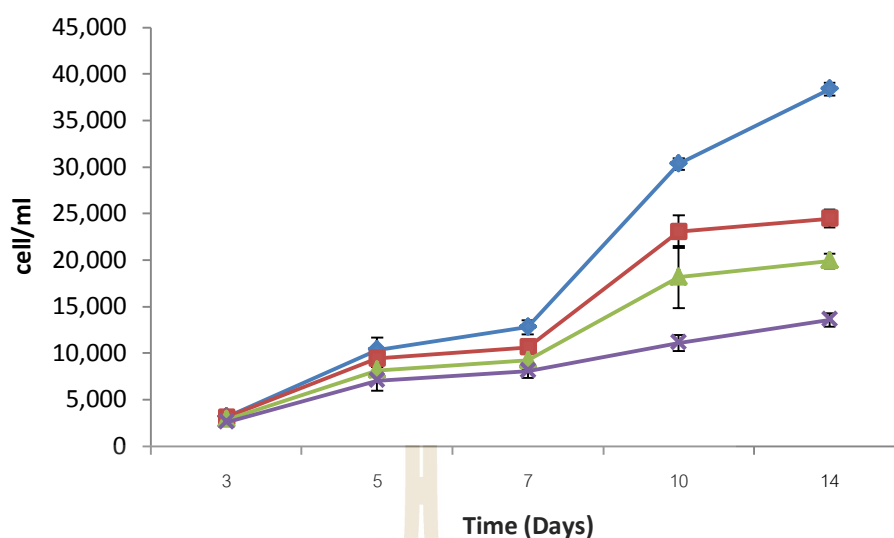


รูปที่ 4.5 ผลของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพต่อร้อยละการอยู่รอด (cell viability, %) ของเซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1cells)

หมายเหตุ : แกน x คือ ความเข้มข้นในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) ของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพในฐาน 10

4.3.3 การศึกษาอัตราการเจริญ (cell growth) ของเซลล์ผิวหนังปกติที่รับสัมผัสด้วยสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

เซลล์ผิวหนังปกติ (Normal Dermal Fibroblast cells) ที่เพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 12 หลุม (12-well plate) จำนวน 1,000 เซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์และสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 150, 300 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในวันที่ 3, 5, 7, 10 และ 14 วัน (รูปที่ 4.6) จำนวนเซลล์จากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 3 เพิ่มขึ้นจาก 1,000 เซลล์เป็น 2,500 ถึง 3,200 เซลล์โดยประมาณในทุกความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ ซึ่งสารลดแรงดึงผิวชีวภาพไม่ได้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้อัตราการเจริญ (cell growth) ในเซลล์ผิวหนังปกติมีอัตราการเจริญที่เพิ่มมากขึ้นในแต่ละวันอย่างปกติเช่นกัน โดยที่เซลล์ผิวหนังปกติที่ได้รับสัมผัสด้วยสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับสัมผัสด้วยสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ และเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพเพิ่มสูงขึ้น จะส่งผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์ที่น้อยลง



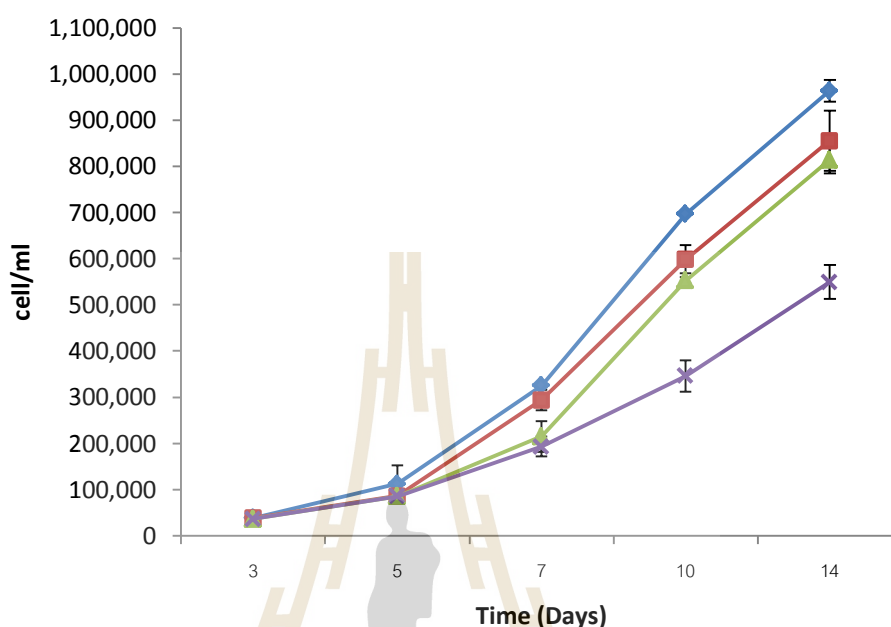
รูปที่ 4.6 ผลของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพต่อการเจริญ (cell growth) ในเซลล์ผิวหนังปกติ (Normal Dermal Fibroblast cells)

หมายเหตุ : cell untreat —◆—, BSF 150 ppm —■—, BSF 300 ppm —▲—, BSF 600 ppm —×—

4.3.4 การศึกษาอัตราการเจริญ (cell growth) ของเซลล์มะเร็งตับที่รับสัมผัสด้วยสารลดแรงดึงผิวชีวภาพ

เซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1 cells) ที่เพาะเลี้ยงในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 12 หลุม (12-well plate) จำนวน 1,000 เซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์และสารลดแรงดึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 0, 150, 300 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต วันที่ 3, 7, 10 และ 14 วัน (รูปที่ 4.7) พบว่าเซลล์มีอัตราการเจริญหรือการแบ่งเซลล์ที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกๆ วันสังเกตได้จาก จำนวนเซลล์จากวันที่ 0 จนถึงวันที่ 3 เพิ่มขึ้นจาก 1,000 เซลล์เป็น 30,000 เซลล์โดยประมาณ โดยที่เซลล์มะเร็งตับจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่มากกว่าเซลล์ผิวหนังปกติ ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ผิวหนังปกติและเซลล์มะเร็งตับจะต้องเจริญเติบโตผ่านขั้นตอนทางชีวเคมีที่เป็นวงจรที่เรียกว่า วงจรชีวิตของเซลล์ หรือ cell cycle โดยเซลล์ปกติจะมีกลไกที่ซับซ้อนที่ควบคุมให้มีจำนวนเซลล์อยู่ในระดับที่เหมาะสม ในขณะที่เซลล์มะเร็งตับนั้นเป็นเซลล์ที่มีสภาพสูญเสียการควบคุมกิจกรรมและวงจรชีวิตของเซลล์ จึงทำให้เซลล์มะเร็งสามารถเจริญเติบโต หรือ สร้าง DNA เพื่อแบ่งเซลล์ไปเรื่อย ๆ โดยไม่สามารถควบคุม cell cycle ที่ทำหน้าที่สร้าง DNA ได้ เช่นเดียวกันกับผลการทดลองนี้ที่พบว่าเซลล์มะเร็งตับที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารลดแรงดึงผิวชีวภาพมีแนวโน้มอัตราการเจริญของเซลล์ที่ลดลง โดยที่เซลล์มะเร็งตับก็ยังสามารถเจริญและแบ่งเซลล์ไปได้

ปกติ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งตับสังเกตได้จาก อัตราการเจริญของเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการรับสัมผัสมีแนวโน้มอัตราการเจริญและแบ่งเซลล์สูงกว่า เซลล์ที่ผ่านการรับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ



ภาพที่ 4.7 ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการเจริญ (cell growth) ในเซลล์มะเร็งตับ (SK-HEP-1 cells)

หมายเหตุ : cell untreat —◆—, BSF 150 ppm —■—, BSF 300 ppm —▲—, BSF 600 ppm —×—

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพการล้างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดอันตรายทางด้านจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ฆ่าสัตว์ตัดแต่ง

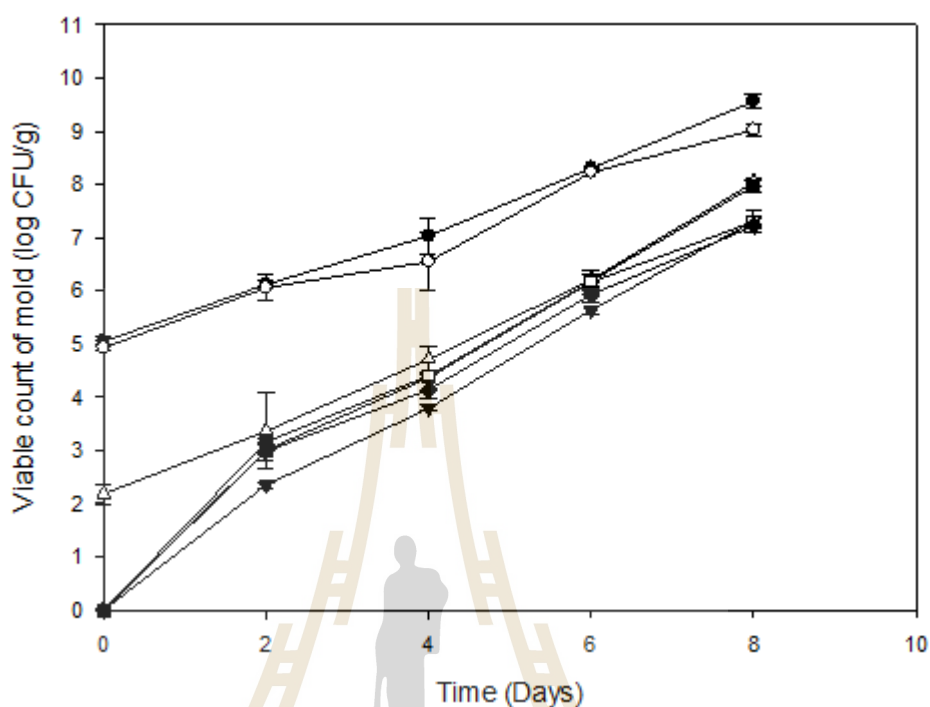
4.4.1 การศึกษาประสิทธิภาพการลดลงของเชื้อราหลังกระบวนการล้าง

การทดสอบนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในกระบวนการล้างฆ่า เป็นพืชที่มีเหง้าอยู่ใต้ดิน ต้องมีขั้นตอนในการตัดแต่งก่อนกระบวนการล้าง ซึ่งสารทำความสะอาดที่ใช้ในอุตสาหกรรมการล้างผักผลไม้ หรือ sanitizer ที่อนุญาตให้ใช้ได้โดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) คือสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน เป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการล้างเพื่อลดจุลินทรีย์ในพืชที่มีลักษณะลำต้น รากที่อยู่ใต้ดิน เช่นเดียวกับข้าว ดังนั้นการทดสอบประสิทธิภาพในกระบวนการล้างด้วย สารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จึงเลือกใช้สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 ส่วนในล้าน ส่วน เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) และตัวอย่างข้าวที่มีการเดิมเส้นใยและไม่ได้ผ่าน

การล้าง (No wash) เป็นตัวควบคุมเชิงลบ วิธีดำเนินการทดสอบเพื่อติดตามประสิทธิภาพการลดจำนวนจุลินทรีย์ในข้าที่นำมาล้าง มีการเติมเส้นใยปริมาณที่มากเกินไป (challenge test) ของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* 10 กรัม ลงในข้าจำนวน 1 กิโลกรัม แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้เส้นใยที่เติมมีการเจริญและงอกของเส้นใยใหม่ดังรูปที่ 4.8 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดลงของเชื้อราในข้าที่ด้วยกระบวนการล้างและบ่มที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส มีเชื้อราเริ่มต้น (No wash) เท่ากับ $5.05 \pm 0.10 \log \text{CFU/g}$ เมื่อนำข้าไปผ่านกระบวนการล้างด้วย น้ำที่ไม่มีคลอรีน (water free chlorine; WFC) สารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน พบว่าข้าหลังล้าง (วันที่ 0) ด้วยสารต่าง ๆ และที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีปริมาณเชื้อราหลงเหลือแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยที่ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน สามารถควบคุมเชื้อราหลงเหลือในข้าให้อยู่ในระดับเดียวกันกับสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ คือ ตรวจไม่พบ (ND) จากผลการทดสอบดังกล่าวได้ข้อสรุปว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วนสามารถลดปริมาณเชื้อราลงได้ 5 log

และเพื่อเป็นการยืนยันความปลอดภัยและประสิทธิภาพของการล้าง จึงทำการบ่มข้าหลังล้างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. rolfsii* เนื่องจากเชื้อราดังกล่าวจะต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญ หรือการงอกของ mycelium (germ tube) อย่างน้อย 3 ถึง 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์ (วันที่ 8) พบว่าในชุดควบคุมการทดลองเชิงลบ (No wash) มีปริมาณเชื้อรา $9.56 \log \text{CFU/g}$ เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น $4 \log$ โดยประมาณ ในขณะที่การล้างด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์พบปริมาณเชื้อรา $7.31 \log \text{CFU/g}$ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการตรวจวิเคราะห์ในวันที่ 0 (หลังการล้าง) ที่มีผลการทดสอบว่าไม่พบเชื้อรา เนื่องจากเชื้อราจะต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญจึงทำให้ปริมาณเชื้อราที่ตรวจพบค่อย ๆ เพิ่มจำนวนขึ้นตามระยะเวลาการบ่มซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตการเพิ่มขึ้นของ hypha (เส้นใยเดี่ยวๆ) และเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (No wash) ในวันเดียวกันพบว่าสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณเชื้อราให้อยู่ในระดับที่น้อยกว่า $2 \log$ โดยประมาณ ส่วนข้าที่ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 ส่วน มีปริมาณเชื้อราในวันที่ 8 เท่ากับ 7.97, 7.30 และ 7.22 $\log \text{CFU/g}$ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมเชิงลบ (No wash) พบว่ามีเชื้อราในระดับที่น้อยกว่า $2 \log$ โดยประมาณ ดังนั้นผลของการบ่มข้าหลังล้างที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส นาน 8 วัน มีปริมาณเชื้อราที่ตรวจพบในข้าที่ล้างด้วยสารต่าง ๆ และที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

โดยฆ่าที่ล้างด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ มีปริมาณเชื้อราอยู่ในระดับเดียวกันกับสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน

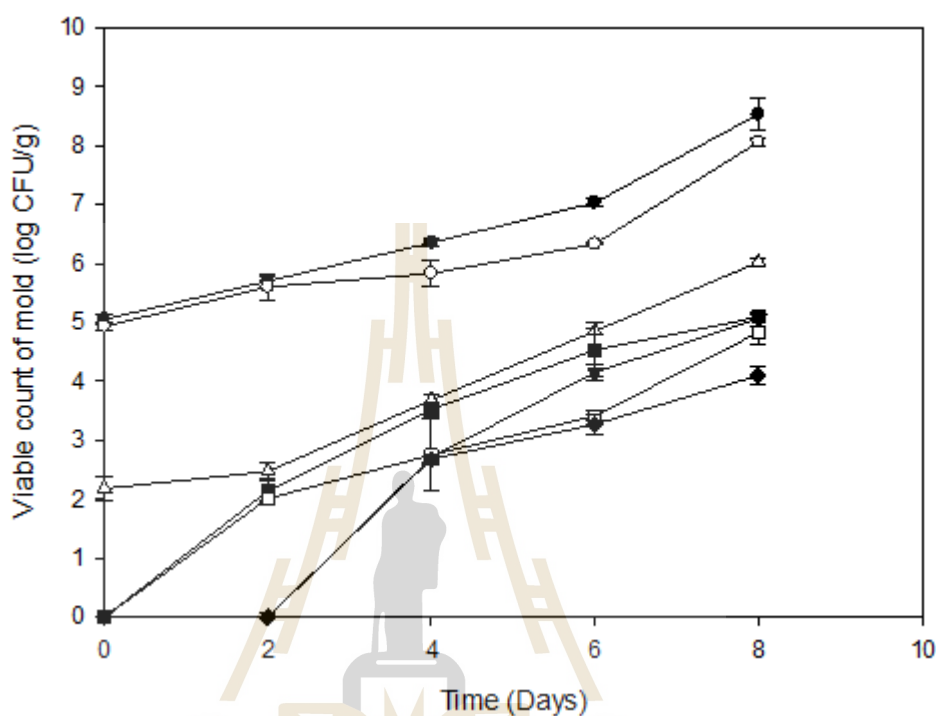


รูปที่ 4.8 ประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดลงของเชื้อราในข้าว ด้วยกระบวนการล้างและบ่มที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : No wash—●—, WFC (water free chlorine) —○—, ClO₂ 8ppm —▼—, BSF 50 ppm —△—, BSF 100 ppm —■—, BSF 150 ppm —□—, BSF 200 ppm —◆—

รูปที่ 4.9 แสดงถึงผลของการสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่นำไปใช้ในการล้างข้าวและบ่มข้าวหลังล้างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ในการขนส่งเก็บรักษาข้าวสด รวมถึงเป็นสภาวะที่ช่วยชะลอการเจริญและการงอกของเส้นใยพบว่าจำนวนเชื้อราที่หลงเหลือในข้าวหลังการล้างและนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงที่ผ่านการล้างด้วยสารต่าง ๆ และที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีปริมาณเชื้อราหลงเหลือที่ตรวจพบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยที่สารละลายคลอรีนไดออกไซด์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 100 และ 150 ส่วนในล้านส่วน มีปริมาณเชื้อราอยู่ในระดับเดียวกัน คือ 5.06, 5.09 และ 4.83 log CFU/g ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับตัวควบคุมเชิงลบ (No wash) ยังคงมีปริมาณเชื้อราน้อยกว่าชุดควบคุม 3 log โดยประมาณ ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน มีปริมาณเชื้อรา 4.10 log CFU/g ซึ่งต่ำกว่า

ชุดควบคุม 4 log โดยประมาณ และเป็นความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการควบคุมเชื้อรา และที่ความเข้มข้น 150 ส่วนในล้านส่วนของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพยังคงประสิทธิภาพในการควบคุมปริมาณเชื้อราได้ดีเช่นเดียวกันกับการใช้สารเคมี



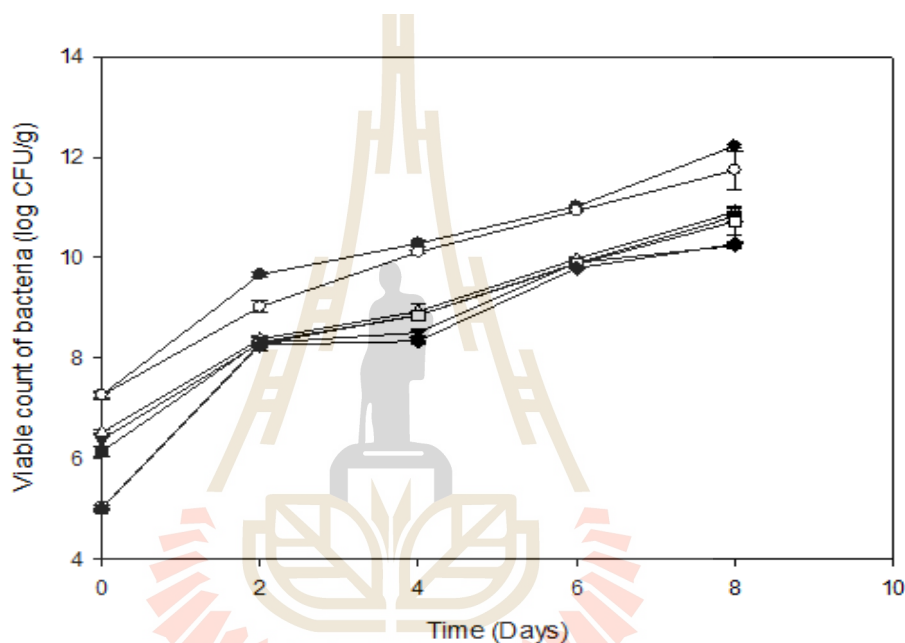
รูปที่ 4.9 ประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดลงของเชื้อราในข้าว ด้วยกระบวนการล้าง และบ่มที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : No wash—● , WFC (water free chlorine)—○ , ClO₂ 8ppm—▼ , BSF 50 ppm—△ , BSF 100 ppm—■ , BSF 150 ppm—□ , BSF 200 ppm—◆

4.4.2 การศึกษาประสิทธิภาพการลดลงของดัชนีคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์หลังกระบวนการล้าง

เพื่อเป็นการประเมินความปลอดภัยของการใช้งานสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงทำการวิเคราะห์และตรวจวัดดัชนีคุณภาพทางด้านความปลอดภัยและสุขอนามัย ได้แก่ การตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่หลงเหลือหลังกระบวนการล้าง (รูปที่ 4.10) มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 7.27 ± 0.08 log CFU/g เมื่อผ่านการล้างด้วยสารละลายคลอรีน ไดออกไซด์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เข้มข้น 50 และ 100 ส่วนในล้านส่วน มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลงอย่างน้อย 1 log ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 150 และ 200 ส่วน

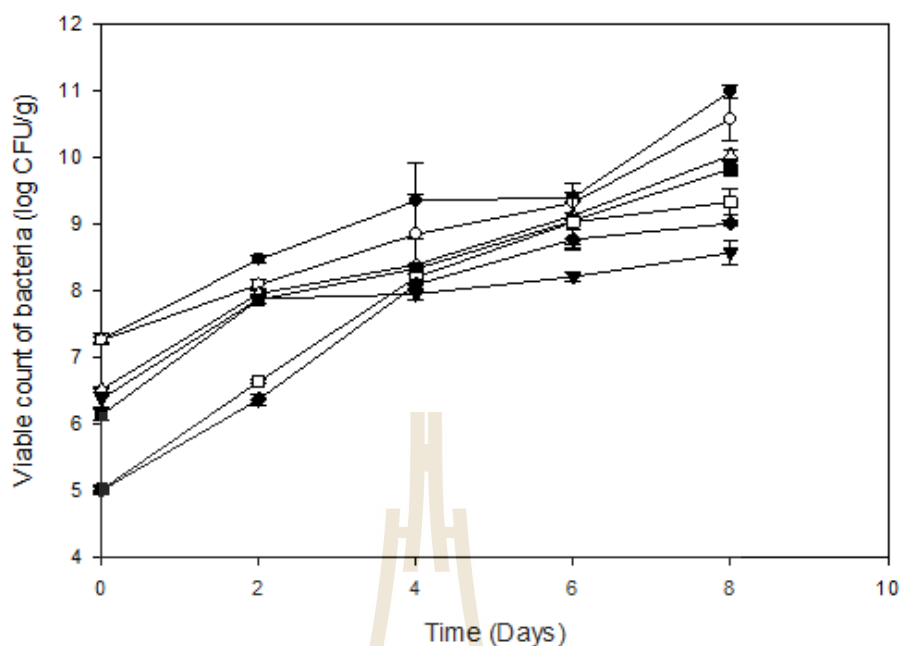
ในด้านส่วน ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลงอย่างน้อย 2 log ในขณะที่การล้างด้วยน้ำปราศจากคลอรีน (WFC) มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในระดับเดียวกันกับชุดควบคุมเชิงลบ (No wash) ทำให้ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดหลังกระบวนการล้าง (วันที่ 0) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อบ่มที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) อย่างไรก็ตาม สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วน มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในระดับเดียวกับสารละลายคลอรีนไดออกไซด์



รูปที่ 4.10 ประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในข้าวด้วยกระบวนการล้างและบ่มที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : No wash —△— , WFC (water free chlorine) —○— , ClO₂ 8 ppm —▼— , BSF 50 ppm —△—
BSF 100 ppm —■— , BSF 150 ppm —□— , BSF 200 ppm —◆—

รูปที่ 4.11 พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่หลงเหลือหลังการล้างและบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่ชะลอการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ในวันที่ 8 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) โดยที่ชุดควบคุมเชิงลบ (No wash) มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด 10.99 log CFU/g อย่างไรก็ตาม ข้าวที่ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดน้อยกว่าชุดควบคุม 1 log โดยประมาณ



รูปที่ 4.11 ประสิทธิภาพสารลดแรงดึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในข้าวด้วย กระบวนการล้างและบ่มที่สภาวะ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ : No wash —●— , WFC (water free chlorine) —○— , ClO₂ 8 ppr —▼— , BSF 50 ppm —△— , BSF 100 ppm —□— , BSF 150 ppm —■— , BSF 200 ppm —◆—

4.5 การศึกษาประสิทธิภาพการล้างของสารลดแรงดึงผิวชีวภาพต่อการลดอันตรายทางด้านเคมีในผลิตภัณฑ์ข้าวสดตัดแต่ง

4.5.1 การศึกษาการลดลงของไดเมโทเอท (dimethoate) ด้วยกระบวนการล้าง

ข้าที่นำมาล้างได้ทำการเติมสารไดเมโทเอท (challenge test) ในปริมาณที่มากเกินไป (safety factor) คือ 0.2 มิลลิกรัมต่อข้าว 1 กิโลกรัม ด้วยวิธีการ dipping จากนั้นตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารตกค้างยากำจัดศัตรูพืชไดเมโทเอท (จัดอยู่ในกลุ่ม organophosphate) ด้วยวิธีการเชิงปริมาณ คือ GC-FPD และเป็นวิธีการที่ได้มาตรฐาน โดยคอลัมน์ที่เลือกใช้เป็นคอลัมน์สำหรับวิเคราะห์หาสารกลุ่ม organophosphate โดยเฉพาะซึ่งเครื่องมือวิเคราะห์มีค่าปริมาณต่ำสุดที่เครื่องตรวจวัดได้ (limit of detection; LOD) คือ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งหากค่าที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างมีค่าต่ำกว่านี้ จะมีการรายงานผลเป็นตรวจไม่พบ (ND) และเครื่องมือที่ใช้มีปริมาณต่ำสุดที่สามารถรายงานค่าเป็นตัวเลขได้ (limit of quantitation; LOQ) คือ 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งหากค่าที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างมีค่าต่ำกว่านี้จะต้องรายงานผลเป็น < LOQ การพิจารณาค่า LOD และ LOQ เนื่องจาก

ให้เกิดความแม่นยำในการวิเคราะห์ผล และการส่งออกผักผลไม้สดไปยังต่างประเทศจำเป็นต้องมีการรายงานผลค่าความเที่ยงของเครื่องมือที่ใช้ในการวิเคราะห์

แสดงดังตารางที่ 4.3 ปริมาณไดเมโทเอทหลังกระบวนการเติมสารไดเมโทเอทในข่าในปริมาณที่มากเกินไป และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย GC-FPD พบว่าในข่าที่ไม่ได้ผ่านการล้าง (ตัวควบคุมการทดลอง หรือ No wash) มีปริมาณสารไดเมโทเอท 0.02 มิลลิกรัมต่อหนึ่งกิโลกรัม เมื่อนำข่าไปผ่านกระบวนการล้างด้วย น้ำที่ไม่มีคลอรีน (water free chlorine; WFC) สารละลายสารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 50 100 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทุกความเข้มข้นสามารถลดปริมาณสารตกค้างไดเมโทเอทในข่าให้อยู่ในระดับที่ไม่เกินมาตรฐานกำหนด คือ ต่ำกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารไดเมโทเอทตกค้างในข่าหลังกระบวนการล้าง

Challenge dimethoate test	Treatment	Dimethoate in galangal after washing (mg/kg)	Standard (Maximum residue limit)	
			EC No. 1097/2009 ¹	TAS 9002-2008 ²
0.2 mg/kg	No wash	0.02	0.02 mg/kg	0.10 mg/kg
	WFC	<0.02		
	CIO2 8 ppm	ND		
	BSF 50 ppm	<0.02		
	BSF 100 ppm	<0.02		
	BSF 150 ppm	<0.02		
	BSF 200 ppm	<0.02		

หมายเหตุ : ทำการวิเคราะห์จำนวน 3 ซ้ำทำการ ทดลองเพื่อหาค่าเฉลี่ยที่มีความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบโดยอาศัยค่าความแม่นยำของเครื่องมือ (LOD, LOQ) ในการรายงานผล ND = Not Detection, ¹ = Pesticide residues and maximum residue levels in tropical root and tuber Commission Regulation, (2009), ² = Pesticide residues and maximum residue limits Thai agricultural standard, (2008)

4.5.2 การศึกษาการลดลงของตะกั่ว (lead, pb) ด้วยกระบวนการล้าง

ข่าที่นำมาล้างได้ทำการเติมตะกั่วในปริมาณที่มากเกินไป (safety factor) คือ 1.00

มิลลิกรัมต่อกรัม 1 กิโลกรัม ด้วยวิธีการ dipping จากนั้นตรวจวิเคราะห์ปริมาณตะกั่ว ด้วยวิธีการเชิงปริมาณ คือ ICP-MS แสดงดังตารางที่ 4.4 ปริมาณตะกั่วหลังกระบวนการ challenge test ที่ตรวจพบ คือ 0.57 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อนำเข้าไปผ่านกระบวนการล้างด้วยน้ำที่ไม่มีคลอรีน (water free chlorine; WFC) สารละลายคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน และ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน พบปริมาณตะกั่ว 0.29, 0.23, 0.26, 0.20, 0.19 และ 0.16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณที่พบนี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ผ่านการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน มีปริมาณตะกั่วที่ตรวจพบต่ำกว่าสารละลายคลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน

เมื่อพิจารณาปริมาณตะกั่วที่ตรวจพบในข่าหลังล้างเทียบกับมาตรฐานที่กำหนดให้ไม่เกิน 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เนื่องจากในการทดลองนี้เป็นการทดสอบประสิทธิภาพการลดลงของตะกั่วด้วยกระบวนการล้างที่มีการใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและข่าที่นำมาล้างได้ผ่านการเติมตะกั่วในระดับที่สูงเกินมาตรฐานกำหนดถึง 10 เท่า จึงทำให้ปริมาณตะกั่วที่ตรวจพบในข่าหลังล้างยังสูงกว่ามาตรฐานกำหนดอย่างไรก็ตามจากผลการทดสอบนี้สามารถสรุปได้ว่า สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วนสามารถลดปริมาณตะกั่วได้ และอยู่ในระดับเดียวกับการใช้คลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 ส่วนในล้านส่วน

ตารางที่ 4.4 ปริมาณตะกั่วที่ตกค้างในข่าหลังกระบวนการล้าง

Challenge Lead	Treatment	Lead in galangal after washing (mg/kg)	Standard (Maximum residue limit) ¹
1 mg/kg	No wash	0.57 ^a	0.10 mg/kg
	WFC	0.29 ^b	
	CIO2 8 ppm	0.23 ^{bcd}	
	BSF 50 ppm	0.26 ^{bc}	
	BSF 100 ppm	0.20 ^{cd}	
	BSF 150 ppm	0.19 ^{cd}	
	BSF 200 ppm	0.16 ^d	

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรที่แตกต่างกันในตาราง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P < 0.01$)

¹ = ปริมาณโลหะหนักตกค้างไม่เกินข้อกำหนด (maximum levels) ในอาหารตามมาตรฐานยุโรป, Official Journal of the European Union, (2008)

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ประเภทไม่มีประจุไฟฟ้า สำหรับสารฆ่าเชื้อชีวภาพ หรือ biosanitizer ในกระบวนการล้างฆ่า ปัจจุบันรัฐบาลให้ความสนใจสนับสนุนอุตสาหกรรมเครื่องเทศและการส่งออกสู่ตลาดสากลให้ได้คุณภาพ สะอาด ปลอดภัย โดยมุ่งเน้นขยายตลาดและกระตุ้นสร้างมูลค่าเพิ่มสินค้าเครื่องเทศ สมุนไพร ด้วยการสร้างตราสินค้าให้เป็นที่รู้จักทั่วโลก (สำนักข่าวกรมประชาสัมพันธ์ สำนักเลขาธิการนายกรัฐมนตรี ทำเนียบรัฐบาล, 2556) ส่วนที่เป็นลำดับต้นได้ดิน หรือที่เรียกว่า เหง้า ที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนทั้งทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ โดยเมื่อพิจารณาจากดัชนีความเสี่ยงสูงสุดและความเป็นไปได้ในการปนเปื้อนพบว่า *Sclerotium rolsii* ไคเมโรเอท และตะกั่ว เป็นดัชนีความเสี่ยงสูงสุดที่พบการปนเปื้อน และมาตรฐานกำหนด MRL ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับสารเคมีในกลุ่มการตกค้าง จึงนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการล้าง (a technical guide, food and agriculture organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific Bangkok, 2010) ที่มีวิธีการล้างมาตรฐาน คือ (1) ขั้นตอนการคัดแต่ง และคัดขนาด (2) ล้างด้วยวิธีการน้ำไหลผ่าน นาน 2 นาที (3) ขั้นตอนการล้างด้วยวิธีการแช่ในน้ำที่มีสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) นาน 5 นาที โดยให้ข้อสังเกตกระบวนการในข้อที่ (3) จะต้องเป็นขั้นตอนที่ให้ความสำคัญและจะต้องป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) และในขั้นตอนดังกล่าวนี้เป็นขั้นตอนที่มีการนำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาใช้ ได้ข้อสรุป ดังตารางสรุปผลที่ 5.1 การใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่สามารถลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ ความเข้มข้นที่สามารถใช้ได้อย่างน้อย 150 ส่วนในล้านส่วน โดยความเข้มข้นที่ 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน ได้ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพที่ส่งผลต่อเซลล์ *Sclerotium rolsii* โดยสามารถทำลายผนังเซลล์ของเชื้อรา (hypha wall) ได้ทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลภายในเซลล์ และที่ความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลต่อเม็ดสเกลอโรเทีย (sclerotia) ที่เชื้อราชนิดนี้สร้างขึ้นมา มีความแข็งแรงและสามารถอยู่ข้ามฤดูกาลได้ โดยจะส่งผลต่อโครงสร้างภายนอกชั้น cuticle เป็นชั้นที่มีการขดเรียงตัวพันกันของเส้นใย (mycelium) ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะอาศัยโครงสร้างที่เป็น hydrophobic จับกับผนังเซลล์ที่มีชั้นไขมัน โคติด ทำให้เกิดการเสียสภาพ ส่งผลให้เม็ดสเกลอโรเทีย ะลอกการงอกใหม่

ของเส้นใย นอกจากนั้นสารนี้ยังพบว่ามีสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ ซาโปนิน 194.31 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรีย สำหรับการลดปริมาณสารเคมีตกค้าง พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทุกความเข้มข้น (50 100 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน) สามารถลดปริมาณไดเมโทเอท ที่ตกค้างในข่าให้อยู่ในระดับที่ไม่สูงกว่ามาตรฐานกำหนดได้ (0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับปริมาณตะกั่วเมื่อคำนวณเพื่อเปรียบเทียบเป็นร้อยละ ที่สามารถลดปริมาณตะกั่วในข่าได้ จะได้ว่าข่าที่ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 50 100, 150 และ 200 ส่วนในล้านส่วน มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณตะกั่วในข่าคิดเป็นร้อยละ 54.39, 64.91, 66.67 และ 71.93 ซึ่งสามารถลดปริมาณตะกั่วในข่าได้มากกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าหากปริมาณตะกั่วในข่าที่มีอยู่ต่ำกว่าที่ทำการทดสอบเดิมเข้าไปในปริมาณที่มากเกินไป ก็จะยังสามารถลดตะกั่วอยู่ในระดับที่มาตรฐานกำหนดได้ ซึ่งจะต้องอาศัยกระบวนการล้างและกรรมวิธีที่ได้ทำการทดสอบข้างต้น

เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการนำไปใช้งาน ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังปกติ และเซลล์มะเร็งตับพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ที่ความเข้มข้นของสารประเภทไม่มีประจุไฟฟ้า 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังคงมีเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการรับสัมผัสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสูงถึงร้อยละ 70 โดยประมาณ และต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงถึง 7,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยประมาณถึงจะทำให้เซลล์ผิวหนังปกติลดลงร้อยละ 50 (IC_{50}) และสารดังกล่าวนี้ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการเจริญ หรือแบ่งเซลล์ในเซลล์มะเร็งตับ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จึงไม่มีความเป็นพิษที่สามารถใช้ในความเข้มข้น 50 ถึง 200 ส่วนในล้านส่วน ในการล้างผักสดตัดแต่งได้ หรือสามารถใช้ในระดับที่มากกว่า 200 แต่ไม่เกิน 3,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในการล้างผักสดได้เช่นกัน

ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการลดความเสี่ยงสูงสุดของการปนเปื้อนทางด้านจุลินทรีย์และเคมี ในวัตถุดิบทางการเกษตร สำหรับล้างในผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง (Fresh-Cut products) ที่เป็นต้นแบบการนำไปล้างเฉพาะพืชที่มีลำต้นได้ดิด เหง้า ราก หรือมีกระบวนการล้าง ระยะเวลา ที่เหมือนกับการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ จึงจะให้ผลการทดสอบที่มีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยในอาหาร

ตารางที่ 5.1 สรุปผลการทดสอบประสิทธิภาพการประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อลดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ชำสดตัดแต่ง

Hazard risk contamination	Standard / Law	Biosurfactant concentrations (ppm)			
		50	100	150	200
Mold	4.0 log CFU/g	X	X	X	✓
Total bacterial	6.0 log CFU/g	✓	✓	✓	✓
Dimethoate	0.02 mg/kg	✓	✓	✓	✓
Lead	0.10 mg/kg	X	X	X	X
Toxicity	Non-toxicity (<3,000 mg/L)				

5.2 ข้อเสนอแนะ

ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการล้างผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง (Fresh-Cut products) ชนิดที่มีความใกล้เคียงกับชำ ด้วยวิธีการล้างด้วยการไหลผ่านของน้ำ และการแช่ในสารทำความสะอาด

รายการอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2532). ความรู้เกี่ยวกับสิ่งเป็นพิษ ตอนที่ 5. กระทรวงสาธารณสุข. 1-8.
- กองเศรษฐกิจการเกษตรระหว่างประเทศ สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2558). รายงานการติดตามสถานการณ์การค้าสินค้าเกษตรภายใต้ AFTA และ FTA (เฉพาะที่มีผลบังคับใช้แล้ว) ประจำปี 2557.
- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล และ ชนิดภา นวะพิณ. (2555). การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium Rolfsii* ด้วยเชื้อแอคติโนมัยสิท *Streptomyces hygroscopicus* PACCH24 ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 14(1): 10-22.
- ปิยะวรรณ กาสลัก. (2554). สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลเชอร์รี่เปรี้ยว. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วรรณพร ศรีสุคนธ์รัตน์. (2558). สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข. กลุ่มพัฒนาระบบวัตถุอันตราย สำนักควบคุมเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข.
- วันเชิญ โพธาเจริญ, ภัทรพร (ยุคน) รัตนวารี, ทวีศักดิ์ มะลิมาศ และ ยูโซะ ยามาตะ. (2550). แบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู. รายงานการวิจัยในโครงการ BRT 2550: ชุดโครงการทองผาภูมิตะวันตก (หน้า 400-408). กรุงเทพฯ.
- สถาบันอาหาร. (2558). ปริมาณโลหะหนักตกค้างในอาหารที่อนุญาตสูงสุด. [ออนไลน์]. ได้จาก: http://iiu.oie.go.th/food/Food%20Document%20Library/China_HeavyMetal.pdf
- สำนักงานที่ปรึกษาด้านอุตสาหกรรมในต่างประเทศ. (2558). ส่งออกเกษตรไทยได้รับยกเป็นกรณีศึกษาการดำเนินการตามมาตรฐานการนำเข้าสินค้า. [ออนไลน์]. ได้จาก: <https://thaiindustrialoffice.wordpress.com/2015/09/17/%E0%B8%AA%E0%B9%88%E0%B8%87%E0%B8%AD%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0%B9%80%E0%B8%81%E0%B8%A9%E0%B8%95%E0%B8%A3%E0%B9%84%E0%B8%97%E0%B8%A2%E0%B9%84%E0%B8%94%E0%B9%89%E0%B8%A3%E0%B8%B1%E0%B8%9A%E0%B8%A2%E0%B8%81/>

- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (2559). การควบคุมโรคพืชและการเก็บเมล็ดพันธุ์พืชเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรและลดต้นทุนการผลิต. **เอกสารประกอบการอบรม**. ฝ่ายชุมชนและผู้ด้อยโอกาส สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- อานันท์ ตันโส. (2551). **เกษตรธรรมชาติประยุกต์: แนวคิด หลักการ และจุลินทรีย์ท้องถิ่น**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- Avasthi, A. S., Jain, S., Bhatnagar, M., and Ghosal, S. (2015). In vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antihemolytic activities of *Alpinia galanga*. **International Journal of Phytomedicine**. 7(1): 78-89.
- Chattopadhyay et al. (2010). Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural features and antioxidant capacity. **Food Chemistry**. 118: 823-829.
- Cheowtirakul, C., and Nguyen, D. L. (2010). The study of biosurfactant as a cleaning agent for insecticide residue in leafy vegetables. **Assumption University Journal of Technology**. 14(2): 75-87.
- Commission Regulation (EC) No 822/2009 of 27 August 2009 amending Annexes II, III and IV to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for azoxystrobin, atrazine, chlormequat, cyprodinil, dithiocarbamates, fludioxonil, fluroxypyr, indoxacarb, mandipropamid, potassium triiodide, spirotetramat, tetraconazole, and thiram in or on certain products. [On-line]. Available: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0822&rid=2>
- Commission Regulation (EC) No 1050/2009 of 28 October 2009 amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for azoxystrobin, acetamiprid, clomazone, cyflufenamid, emamectin benzoate, famoxadone, fenbutatin oxide, flufenoxuron, fluopicolide, indoxacarb, ixoxynil, mepanipyrim, prothioconazole, pyridalyl, thiacloprid and trifloxystrobin in or on certain products. [On-line]. Available: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1050&rid=2>

- Commission Regulation (EC) No 1097/2009 of 16 November 2009 amending Annex II to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for dimethoate, ethephon, fenamiphos, fenarimol, methamidophos, methomyl, omethoate, oxydemeton-methyl, procymidone, thiodicarb and vinclozolin in or on certain products. [On-line]. Available: (<http://eur-lex.europ.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1097&rid=3>)
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*. 366(1-2): 1-13.
- Dababneh, B. F. (2013). An innovative microwave process for microbial decontamination of spices and herbs. **African Journal of Microbiology Research**. 7(8): 636-645.
- Deepika, L., and Kannabiran, K. (2010). Biosurfactant and heavy metal resistance activity of *Streptomyces* spp. isolated from saltpan soil. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**. 1(1): 33-39.
- European Food Safety Authority. (2012). Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for dimethoate in olives for oil production and table olives. **European Food Safety Authority Journal**. 10(5): 2709 (31 pp.).
- Fakruddin, M. (2012). Biosurfactant: Production and application. **Petroleum and Environmental Biotechnology**. 3(4): 1000124 (5 pp.).
- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Biotechnology**. 10(6): 208-217.
- Gali, Z. I. E. (2014). Detection of fungi associated with some spices in original form. **Global Journal of Scientific Researches**. 2(3): 83-88.
- George, S. and Jayachandran, K. (2009) Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 158(3): 694-705.
- Gil, M. I., Selma, M. V., Galvez, F. L., and Allende, A. (2009). Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. **International Journal of Food Microbiology**. 134(1-2): 37-45.
- Guerra, F., Trevizam, A. R., Muraoka, T., Marcante, N. C., and Brazaca, S. G. C. (2012). Heavy metals in vegetables and potential risk for human health. **Scientia Agricola**. 69(1): 54-60.

- Hwang, Y. H., et al. (2009). Subacute (28 day) toxicity of surfactin C, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, in rats. **Journal of Health Science**. 55(3): 351-355.
- James, J. B., and Ngarmsak, T. (2010). Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: A technical guide. **Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific**. Bangkok.
- Juwarkar et al. (2007). Biosurfactant technology for remediation of cadmium and lead contaminated soils. **Chemosphere Journal**. 68(10): 1996-2006.
- Khamna, S., Yokota, A., and Lumyong, S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 25(4): 649-655.
- Lakshmipathy, T. D., Arun Prasad, A.S., and Kannabiran, K. (2010). Production of biosurfactant and heavy metal resistance activity of *Streptomyces* sp. VITDDK3-a novel halo tolerant Actinomycetes isolated from saltpan soil. **Advances in Biological research**. 4(2): 108-115.
- Lyle, J.A. (1953). A comparative study of *Sclerotium rolfsii* Sacc. and *S. delphinii* Welch. Ph.D. Dissertation, **University of Minnesota**. 43 p.
- Makkar, R. S., Camerotra, S. S., and Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**. 1(1): 5 (19 pp.).
- Mule, A. D., and Bhathena, Z. P. (2012). Control of *Aspergillus parasiticum* NCIM 898 infection in potato tubers using biosurfactant. **Asian Journal of Experimental Sciences**. 26(1): 27-38.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**. 133(2): 183-198.
- Ndahetuye et al. (2012). Role of lactic acid bacteria as a biosanitizer to prevent attachment of *Listeria monocytogenes* F6900 on deli slicer contact surfaces. **Journal of food protection**. 75(8): 1429-1436.
- Nitschke, M., and Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**. 18(5): 252-259.

- Noudeh, G. D., Housaindokht, M., and Bazzaz, B. S. F. (2005). Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **The Journal of Microbiology**. 43(3): 272-276.
- Official Journal of the European Union. (2008). **Amending regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs**. [On-line]. Available: http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv:OJ.L_.2008.173.01.0006.01. ENG
- Pan, X. D., Wu, P. G., and Jiang, X. G. (2016). Levels and potential health risk of heavy metals in marketed vegetables in Zhejiang, China. **Scientific Reports**. 6: 20317 (7 pp.).
- Parish, M. E., et al. (2003). Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 2(1): 161-173.
- Park, E. J. (2008). Fate of foodborne pathogens on green onions and tomatoes by electrolysed water. **Journal of Applied Microbiology**. 46(1): 519-525.
- Plociniczak, M. P., Plaza, G. A., Seget, Z. P., and Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**. 12(1): 633-654.
- Pulate, V. D., Joshi, J., Bhagwat, S., and Prabhune, A. (2014). Application of sophorolipids synthesized using lauryl alcohol as a germicide and fruit-vegetable wash. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. 3(7): 1630-1643.
- Reusch. (2013). Natural Products. [On-line]. Available: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/biomol.htm>
- Sapers, G. M. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. **Food Technology and Biotechnology**. 39(4): 305-311.
- Song, H. Y., et al. (2012). Cellular toxicity of surfactants used as herbicide additives. **Journal of Korean Medical Science**. 27(1): 3-9.
- Tanuja, K., Hemalatha, K., Karuna, R., and Sashidhar Rao, B. (2010). Effect of various surfactants (cationic, anionic and non-ionic) on the growth of *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999) in relation to aflatoxin production. **Mycotoxin Research**. 26(3): 155-170.

- Verma, R. K., Mishar, G., Singh, P., Jha, K. K., and Khosa, R. L. (2015). Anti-diabetic activity of methanolic extract of *Alpinia galanga* Linn. aerial parts in streptozotocin induced diabetic rats. **An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda**. 36(1): 91-95.
- Vongbuddhapitak, A., et al. (2002). Dietary exposure of Thais to pesticides during 1989-1996. **Journal of AOAC International**. 85(1): 134-40.
- Wattanaphon, H.T., Kerdsin, A., Thammacharoen, C., Sangvanich, P., Vangnai, A. S. (2008). A biosurfactant from *Burkholderia cenocepacia* BSP3 and its enhancement of pesticide solubilization. **Journal of Applied Microbiology**. 105(2): 416-423.
- Wei, H. C., et al. (2008). Depletion of plasma membrane PtdIns (4,5) P2 reveals essential roles for phosphoinositides in flagellar biogenesis. **Journal of Cell Science**. 121(7): 1076-1084.
- Whittaker R. H. (1967). Gradient analysis of vegetation. Biol. Rev. 42: 207-264. **Biological Reviews**. 42(2): 207-264.
- Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z., and Shiina, T. (2011). Biosurfactants for microbubble preparation and application. **International Journal of Molecular Sciences**. 12(1): 462-475.
- Yaqub, F., and Shahzad, S. (2005). Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different crops and effect of inoculum density on colonization of mungbean and sunflower roots. **Pakistan Journal of Botany**. 37(1): 175-180.
- Zhou, W., Wang, X., Chen, C., and Zhu, L. (2013). Enhanced soil washing of phenanthrene by a plant-derived natural biosurfactant, sapindus saponin. **Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects**. 425: 122-128.





1. อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียม

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวดหนึ่ง
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
D (+) Glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ใส่ขวด หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส นาน 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 20 มิลลิลิตร

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งลาดเอียง Potato dextrose Agar Slant (PDA slant)

Potato	200	กรัม
D (+) Glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ดูดแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร ปิดจุกนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส นาน 15 นาที วางหลอดให้เอียงจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว Potato dextrose Broth (PDB)

Potato	200	กรัม
D (+) Glucose	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ดูดแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขวดละ 50 มิลลิลิตร ปิดฝา นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา
เซลเซียส นาน 15 นาที

2. สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

2.1 สารละลาย Sodium chloride ความเข้มข้น 0.85 % (w/v)

NaCl	8.50	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดทดลอง และนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2 Sodium hydroxide 0.1 N

NaOH	4.0	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

2.3 Phosphate buffer saline 10 mM

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
Na ₂ HPO ₄	1.44	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.24	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

2.4 DPH (1,6-Diphenyl-1,3,5-hexatriene) 1 mM

DPH (232.33 g/mol)	23.23	มิลลิกรัม
Methanol	100	มิลลิลิตร

2.5 Phosphate buffer saline (pH 7.4)

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.20	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.25	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

2.6 สารละลาย Glutaraldehyde 2%

Glutaraldehyde 50%	4	มิลลิลิตร
Phosphate buffer saline pH 7.4	100	มิลลิลิตร

2.7 สารละลาย chlorine dioxide

เตรียมสารละลายคลอรีนไดออกไซด์จาก chlorine dioxide tablet 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ได้สารละลาย chlorine dioxide เข้มข้น 100 ppm เก็บในขวดทึบแสงที่เป็นพลาสติกเท่านั้น

2.8 สารละลาย dimethoate 0.2 ppm (mg/L)

เตรียมสารละลาย dimethoate จาก dimethoate 99.5% (MW 229.26 g/mol) ปริมาณ 0.2 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

2.9 สารละลาย lead (II) acetate trihydrate 1.00 ppm (mg/L)

เตรียมสารละลายตะกั่ว จาก lead (II) acetate trihydrate (MW 379.33 g/mol) ปริมาณ 1.00 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3. กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน quercetin (calibration curve)

การสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐาน quercetin (Aluminum chloride method was used for flavonoid determination) สำหรับสร้างกราฟเพื่อหาปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ดังนี้

3.1 สารเคมีสำหรับกราฟมาตรฐาน quercetin

3.1.1 Quercetin stock solution เตรียมจากสาร quercetin ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายใน 80% ethanol (Final concentration 1mg/ml)

3.1.2 $AlCl_3$ (Aluminum chloride) เตรียมจากสาร $AlCl_3$ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เตรียมในน้ำปราศจากไอออน

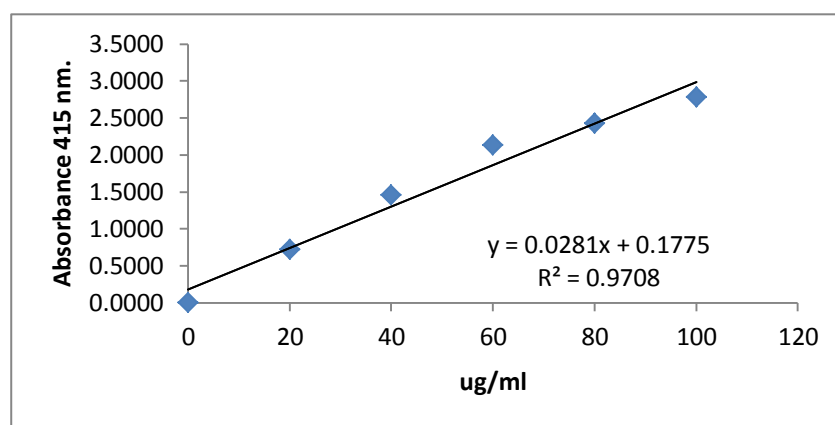
3.1.3 KCH_3COO (Potassium acetate) เตรียมจาก 1M potassium acetate (93.14g/mol) ปริมาณ 4.91 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน 50 มิลลิลิตร

3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

ตาราง ก 1 ปริมาตรและความเข้มข้นสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน quercetin

Take stock	0	40	80	120	160	200	μ l
95% ethanol	2000	1960	1920	1880	1840	1800	μ l
Final conc.	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.1	mg/ml
แปลงหน่วย	0	20	40	60	80	100	μ g/ml

สารที่เตรียมแต่ละความเข้มข้นจากตารางภาคผนวก ก 1 นำมาเติม 10% aluminum chloride ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 1M potassium acetate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร



รูปที่ ก 1 กราฟมาตรฐาน quercetin

4. กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน saponin (calibration curve)

การสร้างกราฟมาตรฐานจากสารละลายมาตรฐาน saponin (p-anisaldehyde colorimetric method) สำหรับสร้างกราฟเพื่อหาปริมาณสารซาโปนิน ดังนี้

4.1 สารเคมีสำหรับกราฟมาตรฐาน Saponin

4.1.1 7% Ethyl acetate. เตรียมจากสาร ethyl acetate 99.5% เตรียมในน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 93 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

4.1.2 0.5% P-anisaldehyde. โดยละลายใน ethyl acetate (99.5%)

4.1.3 50% Sulfuric acid. เตรียมจาก sulfuric acid เข้มข้น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ละลายใน ethyl acetate (99.5%) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

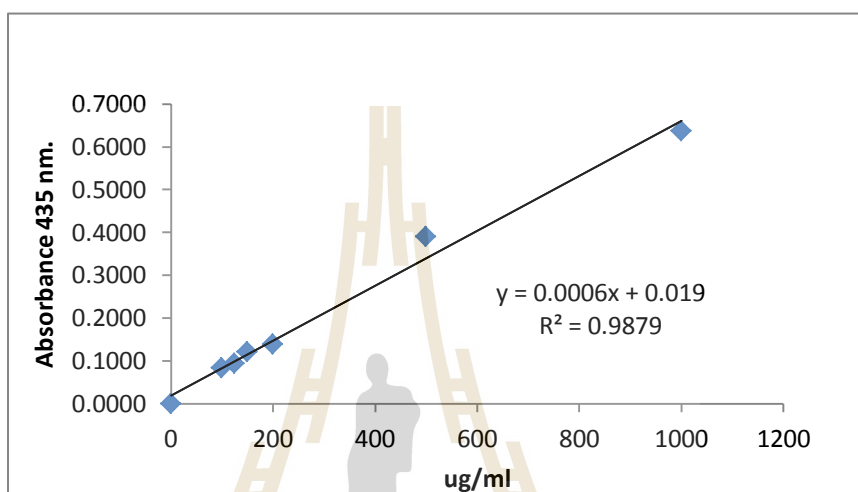
4.1.4 Saponin stock solution เตรียมจากสารซาโปนิน ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ละลายใน ml 7% ethyl acetate ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Final concentration 1 mg/ml)

4.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน saponin สำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน

ตาราง ก 2 ปริมาตรและความเข้มข้นสำหรับสร้างกราฟมาตรฐาน saponin

Take stock	0	100	125	150	200	225	500	750	1000	μl
99.5% ethyl acetate	1000	900	875	850	800	775	500	250	0	μl
Final conc.	0	0.10	0.125	0.15	0.20	0.225	0.50	0.75	1.00	mg/ml
แปลงหน่วย	0	100	125	150	200	225	500	750	1,000	μg/ml

สารที่เตรียมแต่ละความเข้มข้นจากตารางภาคผนวก ก 2 นำมาเติม 0.5% p-anisaldehyde 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 50% sulfuric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยจะต้องเติมอย่างช้าๆ จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำมาทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็งนาน 4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 435 นาโนเมตร



รูปที่ ก 2 กราฟมาตรฐาน saponin

5. สภาพะสำหรับ Gas Chromatograph ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโดเมโซเอท

ตาราง ก 3 Gas Chromatograph ชนิด FPD Detector ผู้ผลิต Agilent technologies รุ่น 6890N Network GC System

Column	DB 1701 ซีห้อ J&W 30 mx 0.25 mm x 250 µm
Carrier gas	Helium ชนิด high purity (HP) Flow rate 1.5 ML/min
Make up gas	Nitrogen ชนิด high purity (HP) Flow rate 60 ML/min
Detector type	Flame Photometric Detector (FPD)
Detector temperator	250°C
Injection volume	2 µl

ตาราง ก 3 Gas Chromatograph ชนิด FPD Detector ผู้ผลิต Agilent technologies รุ่น 6890N Network GC System (ต่อ)

Column	DB 1701 ยี่ห้อ J&W 30 mx 0.25 mm x 250 μ m
Oven temperature:	initial temp 80°C rate 10°C /min to 180°C rate 4°C /min to 205°C hold 7 min rate 30°C /min to 260°C hold 5 min

6. สภาวะสำหรับ ICP-MS ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่ว

ตาราง ก 4 Inductive Coupled Plasma Spectrometer- Mass Spectrometer (ICP-MS) ยี่ห้อ Agilent Technologies รุ่น 7,500 series

Plasma Condition	
Reward power	1,500 W
RF matching	1.66 V
Smpl Depth	7 mm
Torch-H	0.7 mm
Plasma Condition	
Torch-V	-1.1 mm
Carrier Gas	0.9 L/ min
Make up gas	0.2 L/min
Auxiliary gas flow	1.0 L min ⁻¹
Nebulizer pump	0.10 rps
Make up gas flow	0.2 L min ⁻¹
Spray chamber temperature	2°C

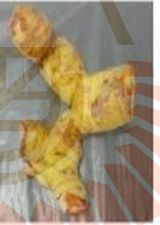


ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

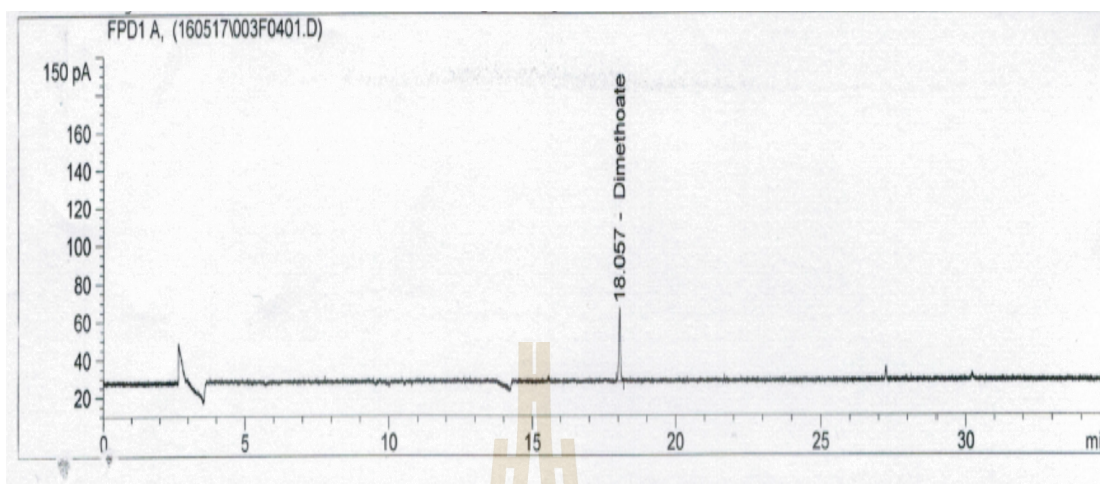
1. ผลของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการควบคุมปริมาณเชื้อราและเส้นใยในข่า ด้วยวิธีการล้าง

ตาราง ข 1 แสดงลักษณะเส้นใยของเชื้อราในข่าหลังล้างที่บ่มเป็นเวลา 8 วัน

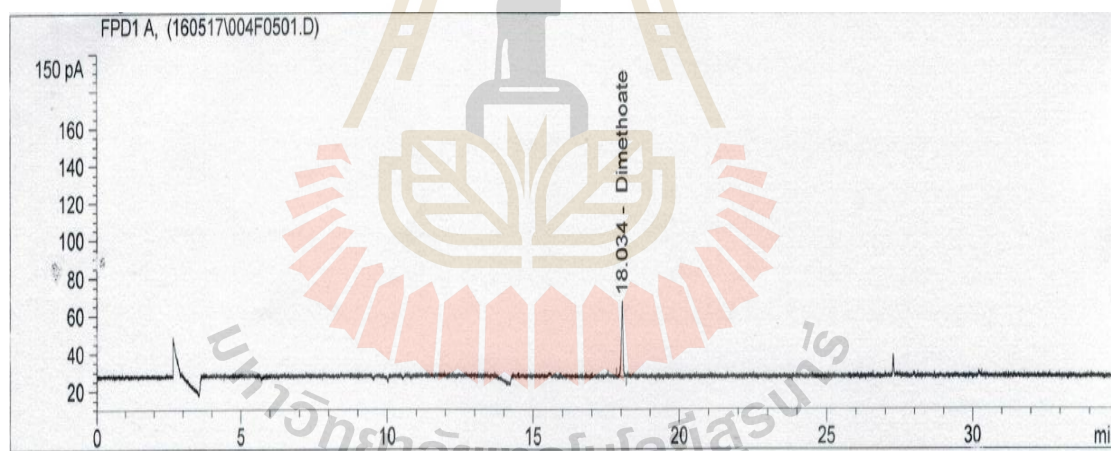
Day	Storage condition	Control	Chlorine dioxide 8ppm	BSF 100ppm	BSF 150ppm	BSF 200ppm
0	-					
8	25°C					
	4°C					

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

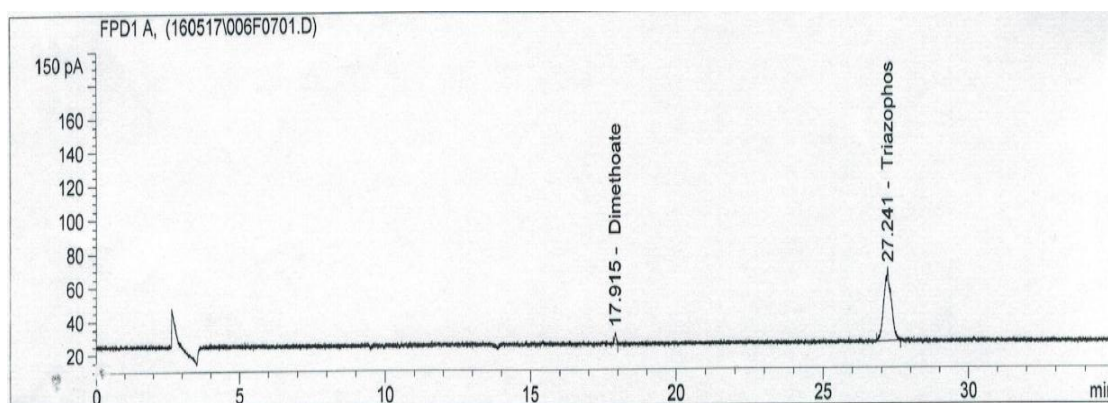
2. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณไดเมธอเอทในข้าว ด้วย GC-FPD



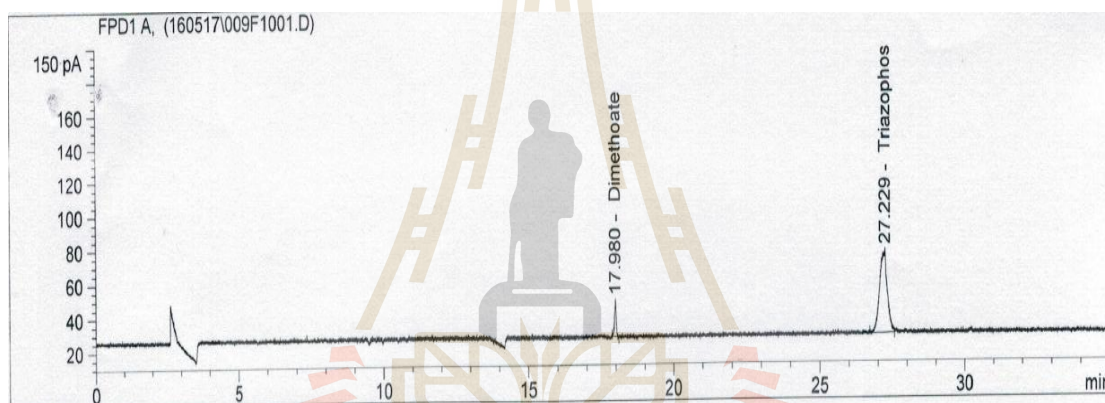
รูปที่ ข 1 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณ dimethoate ในข้าวที่ไม่ได้ล้าง



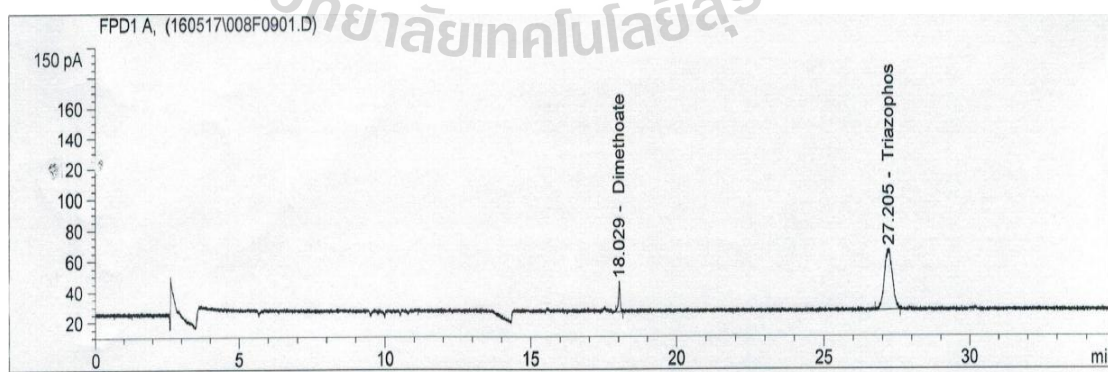
รูปที่ ข 2 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณ dimethoate ในข้าวที่ล้างด้วยน้ำปราศจากคลอรีน



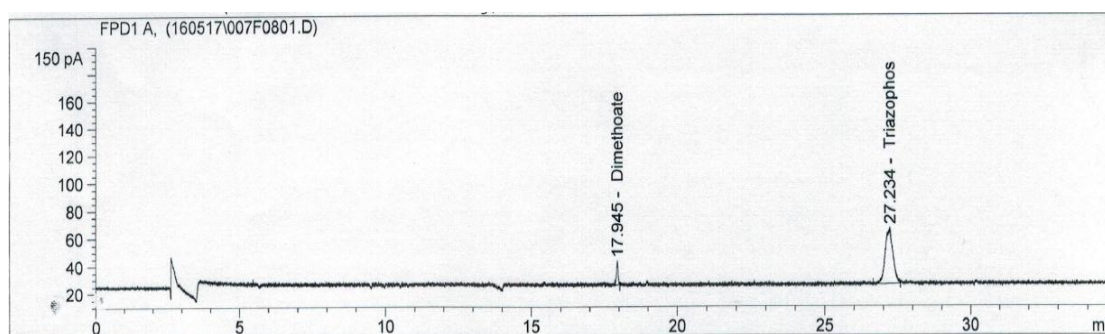
รูปที่ ข 3 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณ dimethoate ในข้าวที่ล้าง
ด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์



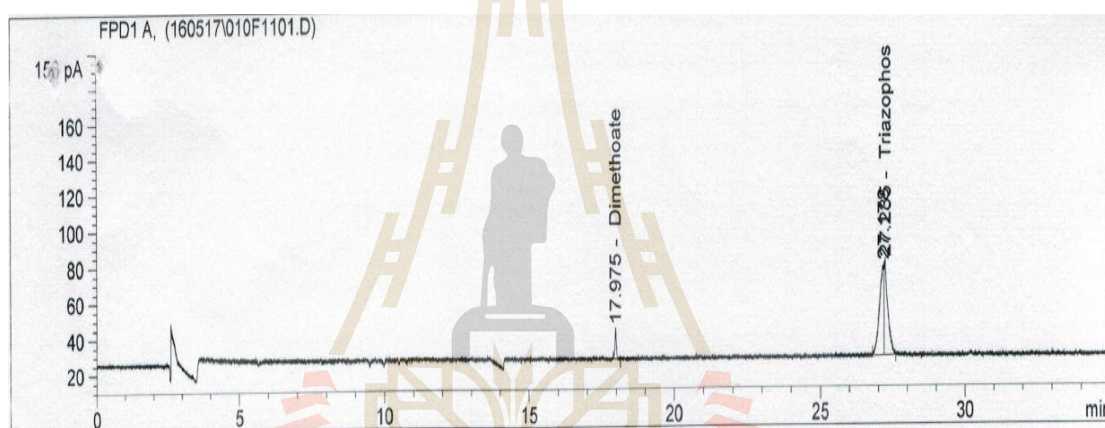
รูปที่ ข 4 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณ dimethoate ในข้าวที่ล้าง
ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 50 ppm



รูปที่ ข 5 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณ dimethoate ในข้าวที่ล้าง
ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 100 ppm

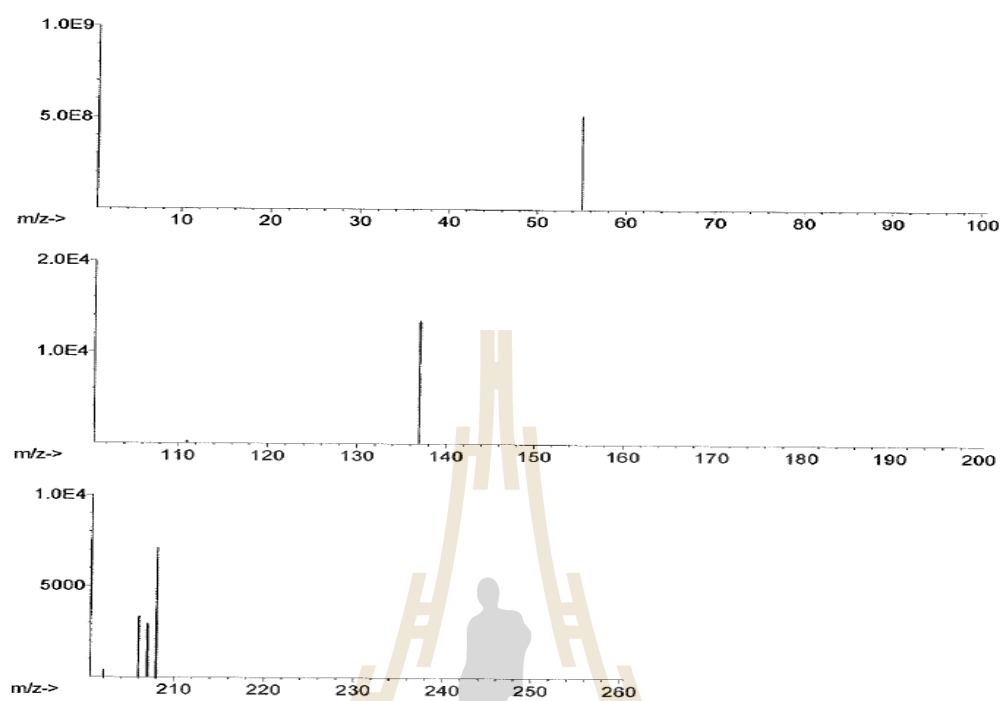


รูปที่ ข 6 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณ dimethoate ในข้าวที่ล้าง
ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 150 ppm

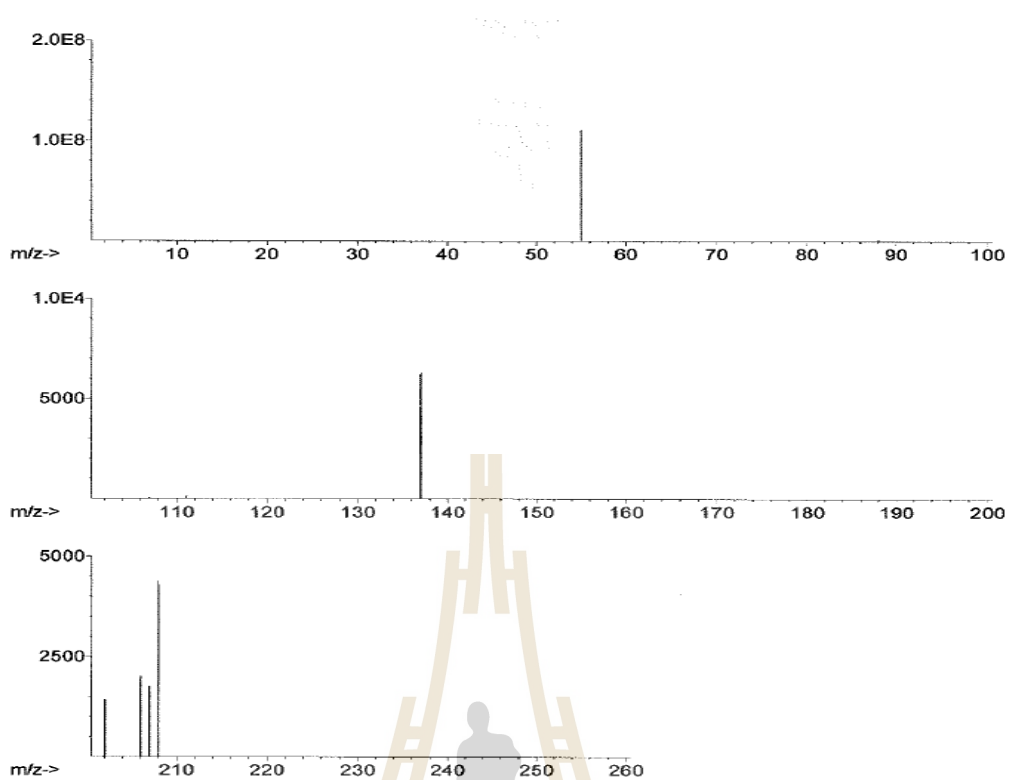


รูปที่ ข 7 โครมาโตแกรมการวิเคราะห์หาปริมาณสาร dimethoate ในข้าวที่ล้าง
ด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเข้มข้น 200 ppm

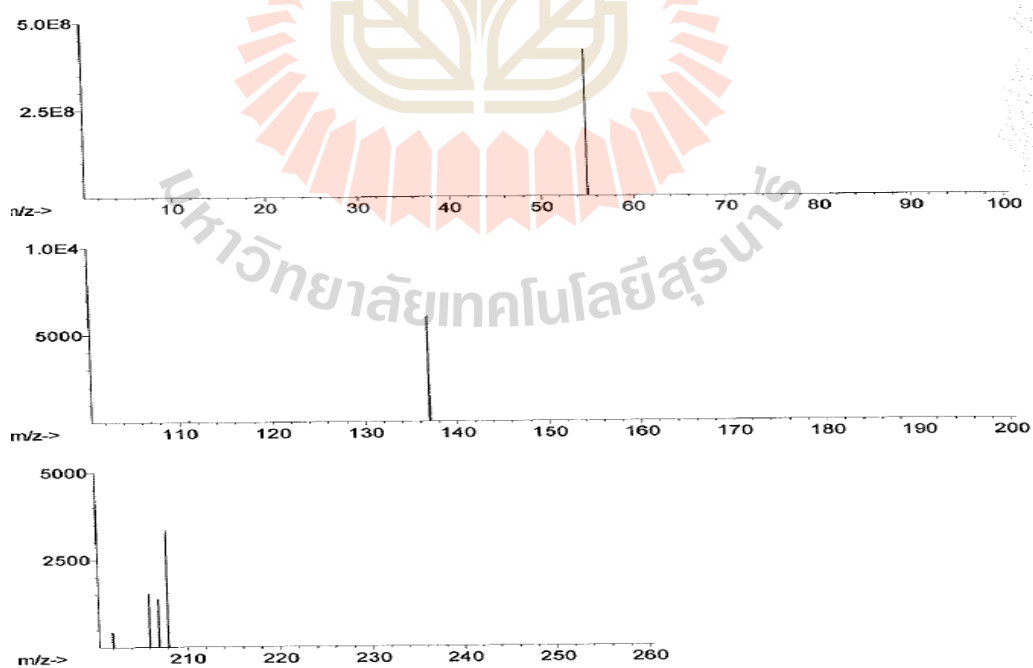
3. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณตะกั่วในข้าว ด้วย ICP-MS



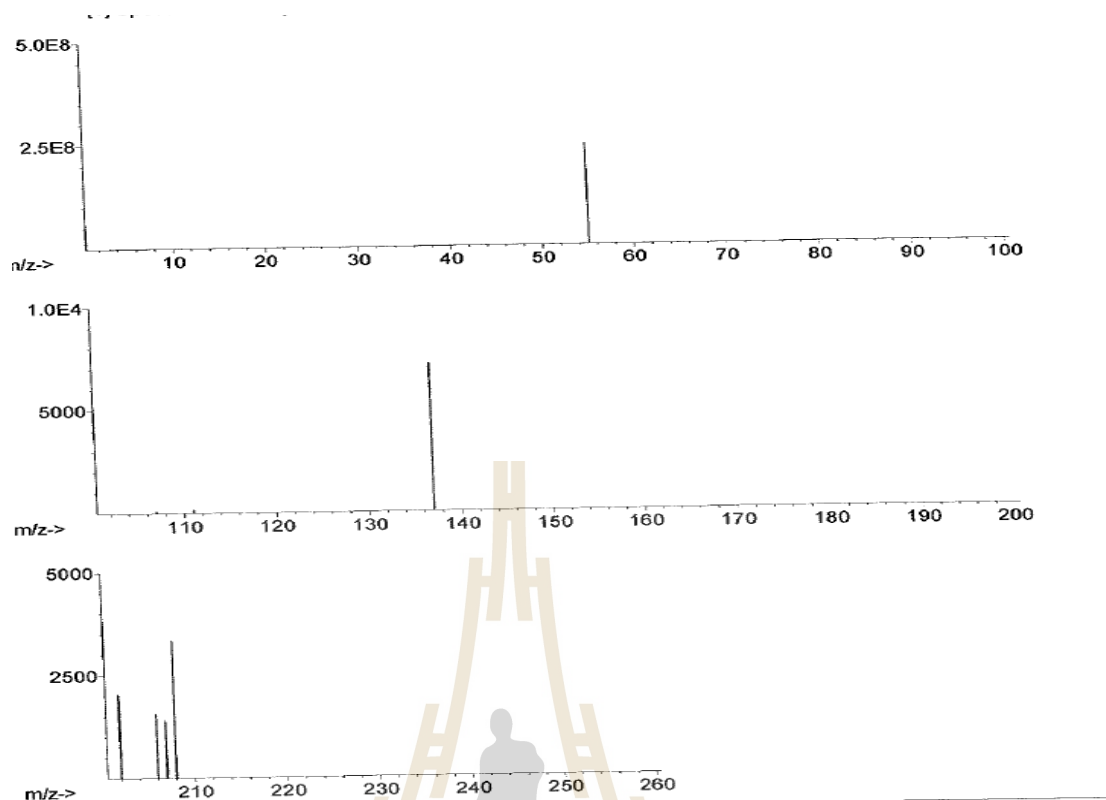
รูปที่ ข 8 Spectrum ของการหาปริมาณตะกั่วในข้าวที่ไม่ได้ล้าง



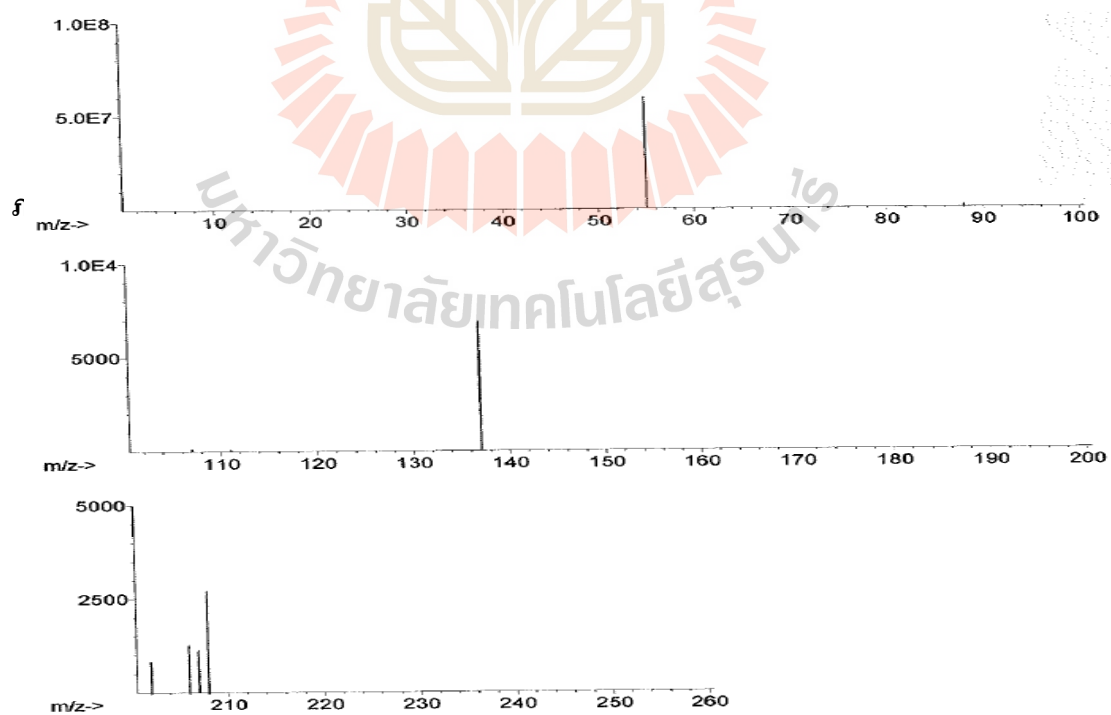
รูปที่ ข 9 Spectrum ของการหาปริมาณตะกั่วในข้าวที่ล้างด้วยน้ำปราศจากคลอรีน



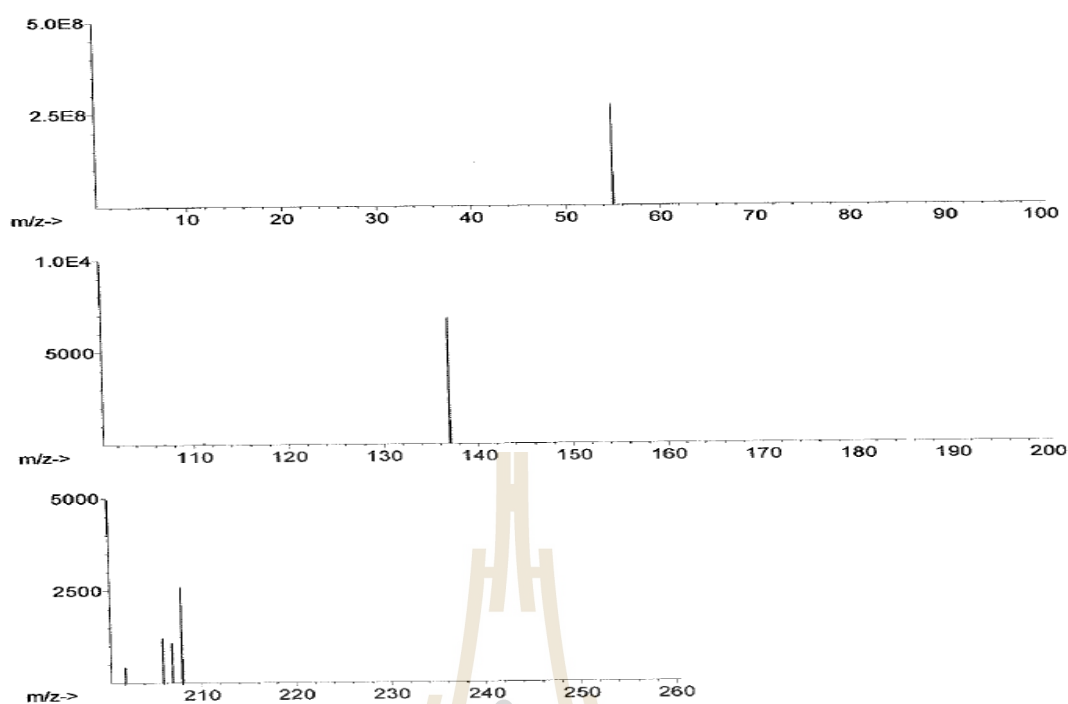
รูปที่ ข 10 Spectrum ของการหาปริมาณตะกั่วในข้าวที่ล้างด้วยสารละลายคลอรีนไดออกไซด์



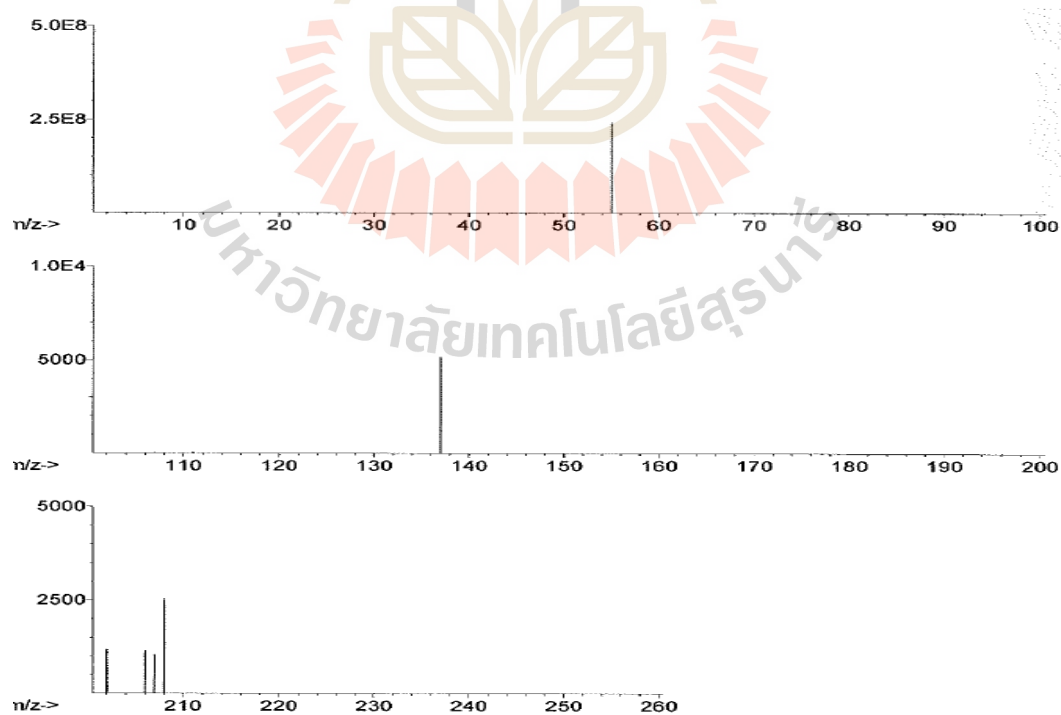
รูปที่ ข 11 Spectrum ของการหาปริมาณตะกั่วในน้ำที่ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 50 ppm



รูปที่ ข 12 Spectrum ของการหาปริมาณตะกั่วในน้ำที่ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 100 ppm



รูปที่ ข 13 Spectrum ของการหาปริมาณตะกั่วในน้ำที่ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 150 ppm



รูปที่ ข 14 Spectrum ของการหาปริมาณตะกั่วในน้ำที่ล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 200 ppm

ประวัติผู้เขียน

นางสาวปรีดา ลิทธิศาสตร์ เกิดเมื่อวันที่ 27 กันยายน 2531 ที่จังหวัดยโสธร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนอัสสัมชัญอุบลราชธานี ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนยโสธรพิทยาคม ในปีการศึกษา 2549 จากนั้นสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2553 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2555

ประสบการณ์ทำงาน

ผู้ช่วยสอนผู้ช่วยนักวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 2554 - 2555

ผลงานที่ได้รับระหว่างการศึกษ

1. ได้รับรางวัล Young Investigator Award ในการนำเสนอผลงานด้วยวาจา ในหัวข้อเรื่อง “Cleaning effectiveness of biosurfactant for *Sclerotium rolfsii* contamination level controlling of fresh cut *Alpinia* product” ปี 2558 ในงาน The 6th International Conference on Food Factors (ICoFF 2015) ที่จัดขึ้นในระหว่างวันที่ 20 - 25 พฤศจิกายน 2558 ที่ประเทศเกาหลี
2. ยื่นจดสิทธิบัตร เรื่อง กรรมวิธีการผลิตสารทำความสะอาดจากการหมักผลไม้ไทยรสเปรี้ยวเลขที่คำขอ 14001004175
3. ยื่นจดสิทธิบัตร เรื่อง ถังหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรเหลือใช้ เลขที่คำขอ 1501005215