ผลของอุณหภูมิการคั่วกระเทียม หอมแดง และพริกแห้ง ต่อฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *Aspergillus niger*

Effect of Roasting Temperatures of Garlic, Shallot and Dried Chili on Antifungal Activity of *Aspergillus niger*

สุนิดา เมืองโคตร,[1,2] ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล,[1] วาริช ศรีละออง,[1,2] เฉลิมชัย วงษ์อารี[1,2] และทรงศิลป์ พจน์ชนะชัย[1,2*]

[1]คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (บางขุนเทียน) กรุงเทพมหานคร 10150

[2]ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพมหานคร 10400

*Email: songsin.pho@kmutt.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของอุณหภูมิการคั่วต่อฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Aspergillus niger* ของสารสกัดจากกระเทียม (70 และ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที) และหอมแดง (70 และ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) และพริกแห้ง (90 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที) ด้วยปิโตรเลียม อีเทอร์ โดยทดสอบการยับยั้งการเจริญของเส้นใยด้วยวิธี agar dilution method และการงอกของสปอร์ด้วยวิธี broth dilution method (BDM) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1, 0.5 และ 1.0 (w/v) รวมทั้งการทดสอบค่า Minimum inhibitory concentration on spore germination (MIC) และ Minimum fungicidal concentration on spore germination (MFC) ด้วยวิธี BDM พบว่า เมื่ออุณหภูมิการคั่วเพิ่มขึ้นฤทธิ์ของสารสกัดกระเทียมและหอมแดงต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ลดลง ในขณะที่สารสกัดจากพริกแห้งสามารถยับยั้งได้เฉพาะการเจริญของเส้นใยเท่านั้น โดยสารสกัดจากพริกแห้งไม่คั่วยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าพริกแห้งคั่วอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้สารสกัดจากพริกแห้งไม่คั่วและคั่วมีค่า MIC (ร้อยละ 1.25 w/v) และ MFC (ร้อยละ 5.0 w/v) สูงที่สุด ซึ่งเท่ากับสารสกัดจากหอมแดงคั่วที่อุณหภูมิ 90 รองลงมาคือ สารสกัดจากหอมแดงคั่วที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (MIC = 0.312, MFC = 5.0); หอมแดงไม่คั่ว และกระเทียมคั่วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส (MIC = 0.312, MFC = 1.25); กระเทียมคั่วที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (MIC = 0.039, MFC = 0.312); และกระเทียมไม่คั่ว (MIC = 0.039, MFC = 0.078) ตามลำดับ

คำสำคัญ: การคั่ว, การต้านเชื้อรา, *Aspergillus niger*, ส่วนผสมของน้ำพริก, อุณหภูมิ

Abstract

This research was to study the effect of roasting temperatures of garlic (70 and 90°C for 10 min), shallot (70 and 90°C for 15 min), and dried chili (90°C for 25 min) extracted by petroleum ether on the antifungal activity of *Aspergillus niger.* The inhibition activities on mycelial growth by agar dilution method and spore germination by broth dilution method (BDM) were tested at the concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0% (w/v). The minimum inhibitory concentration in spore germination (MIC) and minimum fungicidal concentration on spore germination (MFC) by BDM were also investigated. The results showed that an increase in roasting temperature decreased the inhibitory efficacy of garlic and shallot extracts on the mycelial growth and spore germination of *A. niger.* Whereas, the dried chili extract inhibited only the mycelial growth. The non-roasted dried chili showed a greater significant antifungal activity than the roasted dried chili. The non-roasted and roasted dried chili had

the highest MIC (1.25% w/v) and MFC (5.0% w/v) as well as in roasted shallot at 90°C followed by roasted shallot at 70°C (MIC=0.312%, MFC=5.0%); non-roasted shallot and roasted garlic at 90°C (MIC=0.312%, MFC=1.25%); roasted garlic at 70°C (MIC=0.039%, MFC=0.312%); and non-roasted garlic (MIC=0.039%, MFC=0.078%), respectively.

Keywords: Roasting; Antifungal activity; *Aspergillus niger*; Thai chili paste ingredients; Temperatures

บทนำ

พืชสมุนไพร เช่น พริก หอมแดง กระเทียม ตะไคร้ กระชาย ขิง ข่า และใบมะกรูด เป็นส่วนประกอบของอาหารไทยที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย โดยทั่วไปสมุนไพรเหล่านี้มีฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัช สำหรับกระเทียม หอมแดง และพริก เป็นส่วนประกอบหลักสำคัญในน้ำพริกทุกชนิด โดยเฉพาะน้ำพริกพร้อมบริโภคมีส่วนประกอบของกระเทียมและหอมแดง ประมาณร้อยละ 25 และพริกแห้ง ประมาณร้อยละ 10 ซึ่งการทำน้ำพริกจะนำพืชสมุนไพรดังกล่าว มาผ่านความร้อนด้วยวิธีการต่างๆ เช่น คั่ว อบ เผา และทอด [1], [2] เพื่อปรับคุณลักษณะเบื้องต้นให้เหมาะสมกับการนำไปแปรรูปตามต้องการ แต่การแปรรูปวัตถุดิบด้วยความร้อนสูงและเป็นเวลานาน อาจทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพและเภสัชเปลี่ยนแปลงไป

กระเทียมและหอมแดงมีสารออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งอยู่ในกลุ่ม organosulfur, phenolic และ glycosides เป็นต้น [3]-[5] สารกลุ่ม organosulfur มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง โดยมีสารสำคัญ ได้แก่ dially thiosulfinate หรือ allicin [6], [7] ซึ่งสามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella enteritidis* และเชื้อรา เช่น *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* และ *Penicillium cyclopium* เป็นต้น [8] โดยออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรีย [9] นอกจากนี้ ในหอมหัวใหญ่ ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกันมี saponins เป็นสารกลุ่ม glycosides ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรากลุ่ม *A. niger*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp., *Alternaria alternate*, *Phomopsis* sp., *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum*, และ *Botrytis cinerea* [5]

พริกเป็นพืชสมุนไพรที่มีคุณลักษณะเด่นด้านความเผ็ด โดยมีสาร capsaicin ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Helicobacter pylori*, *Phoma exigua*, *F. nygamai* และ *Rhizoctonia solani* [10], [11] จากการสำรวจชนิดและปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารโดยเฉพาะน้ำพริกพร้อมบริโภค พบว่า ส่วนใหญ่ปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* sp., *Clostridium perfringens*, *S. aureus*, *Escherichia coli* และเชื้อรา เช่น *A. flavus*, *A. niger* และ *A. parasiticus* [12] ซึ่งสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อน คือ วัตถุดิบที่นำมาใช้ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา *A. niger* ซึ่งสร้างสปอร์สีดำแพร่กระจายบริเวณผิวของวัตถุดิบ เมื่อนำวัตถุดิบมาประกอบอาหารจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้ เชื้อรา *A. niger* บางสายพันธุ์สามารถสร้าง ochratoxin ซึ่งเป็นสารพิษปนเปื้อนในอาหารและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค [13] เชื้อรา *A. niger* เป็นเชื้อราที่ทนทานต่อสภาพแวดล้อมและพบปะปนอยู่ในอากาศ จึงมีโอกาสปนเปื้อนในระหว่างการแปรรูปและการวางจำหน่ายอาหารได้อีกด้วย

การให้ความร้อนกับวัตถุดิบก่อนการนำไปแปรรูป เป็นการปรับลักษณะทางกายภาพ กลิ่นรส อีกทั้งยังช่วยควบคุมหรือลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบ แต่วิธีการในการให้ความร้อน อุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนมีส่วนทำให้สารสำคัญบางชนิดเปลี่ยนรูปหรือสูญเสียคุณสมบัติ จึงทำให้ประสิทธิภาพหรือฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนไปเช่นกัน [14] มีรายงานว่าการนึ่งกระเทียมและหอมหัวใหญ่ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้ dially thiosulfinate เปลี่ยนไปเป็น diallyl disulfide, diallyl trisulfide, dimethyl trisulfide และ allyl methyl disulfide [6] ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ลดลง [15] เช่นเดียวกันกับการให้ความร้อนกระเทียมด้วยวิธีการนึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *A.*

niger, *A. flavus* และ *A. parasiticus* ลดลง เมื่อเทียบกับกระเทียมที่ให้ความร้อนด้วยวิธีการอบที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที [16] ในขณะที่ การให้ความร้อนแก่พริกแห้งด้วยการอบด้วยลมร้อน การต้มและการผึ่งแดด ไม่มีผลในการทำลายสาร capsaicin ที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger*, *R. solani*, *P. exigua* และ *F. nygamai* [17], [11] ซึ่งกระบวนการให้ความร้อนกับวัตถุดิบแต่ละชนิดแตกต่างกัน ตามชนิดของน้ำพริกที่ต้องการจะแปรรูป งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการคั่ว กระเทียม หอมแดง และพริกแห้ง ต่อฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger*

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดจากกระเทียม หอมแดง และพริกแห้ง

งานวิจัยนี้ใช้กระเทียม (*Allium sativum* L.) หอมแดง (*A. cepa* L. var. *aggregatum* G. Don) และพริกแห้ง (*Capsicum annuum* L.) จากอำเภอกันทรารมณ์ จังหวัดศรีสะเกษ โดยนำกระเทียมและหอมแดงมาปอกเปลือก ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ แล้วหั่นเป็นชิ้นขนาด 3-5 มิลลิเมตร ส่วนพริกแห้งเด็ดขั้วออกและคัดเลือกเฉพาะผลที่ไม่มีตำหนิ หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ชนิดละ 500 กรัม มาคั่วด้วยกระทะไฟฟ้า (HANABISHI Model No. HGP-14T, Thailand) โดยใช้อุณหภูมิและระยะเวลาในการคั่วซึ่งทำให้วัตถุดิบมีลักษณะที่ดีและเหมาะสมกับการนำไปแปรรูปเป็นน้ำพริกตามที่ผู้ประกอบการแนะนำและยอมรับ ได้แก่ กระเทียมและหอมแดงคั่วที่อุณหภูมิ 70±5 และ 90±5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 หรือ 15 นาที ตามลำดับ ส่วนพริกแห้งคั่วที่ 90±5 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที วัดอุณหภูมิของตัวอย่างในระหว่างการคั่วทุกๆ 2 นาที ด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิแบบอินฟราเรด (High Temperature IR Thermometer Model No. 42545, Extech, USA) โดยมีตัวอย่างที่ไม่คั่วเป็นชุดควบคุม จากนั้นทำการสกัดสารจากตัวอย่างที่คั่วและไม่คั่ว โดยนำมาแช่ในปิโตรเลียม อีเทอร์ (Zenith Science CO., LTD, Thailand) ความเข้มข้นร้อยละ 98.99 โดยมีอัตราส่วนของตัวอย่าง 1 กิโลกรัมต่อตัวทำละลาย 1 ลิตร แช่เป็นเวลา 7 วัน สำหรับตัวอย่างพริกแห้ง เมื่อคั่วแล้วจะบดแบบหยาบ (Blender Model No. BL3121AD; Tefal, China) ด้วยความเร็วเบอร์ 1 เป็นเวลา 1 นาที ก่อนแช่ในปิโตรเลียม อีเทอร์ จากนั้นนำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Model No. R-200, vacuum controller V-855, vacuum pump V-710, heating bath B-490, Buchi, Switzerland) หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO; Fisher Scientific, UK) ความเข้มข้นร้อยละ 99.90 โดยเตรียม stock solution ของสารสกัดแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นร้อยละ 50 (w/v) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การเตรียมเชื้อรา

เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ คือ *Aspergillus niger* ซึ่งได้จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ประจำภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (MIRCEN) โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA; Himedia, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India) ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ด้วยตู้บ่มเชื้อ (Memmert Model No. INE 110, Germany) เมื่อเส้นใยเชื้อราและสปอร์เจริญเต็มที่แล้วจึงตัดเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร นำไปเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้ง เพื่อเป็นการกระตุ้นให้เชื้อราเจริญได้ดีขึ้น จากนั้นนำเชื้อราที่กระตุ้นเรียบร้อยแล้ว มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในหลอดทดลอง เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 0.1, 0.5 และ 1.0 (w/v) โดยให้ความเข้มข้นของ DMSO ในอาหาร PDA มีค่าใกล้เคียงกันทุกจาน (ประมาณร้อยละ 0.1-1.0 w/v) จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำมาเทลงบนจานอาหารขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร) (NunclonTM, Danmark) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รอประมาณ 30 นาที จนกระทั่งอาหารแข็งตัว แล้วนำเส้นใยเชื้อรา *A. niger* ที่ตัดบริเวณขอบโคโลนีด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร มาวางบริเวณจุดกึ่งกลางของอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยมีชุดควบคุม คือ อาหาร PDA เป็นตัวควบคุมผลลบ (Negative control) และยาปฏิชีวนะ Carbendazim (methyl benzimidazol-2-ylcarbamate 50% WP) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (w/v) เป็นตัวควบคุมผลบวก (Positive control) ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มิลลิเมตร) รายงานผลการยับยั้งการเจริญของเส้นใย (%) โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (\%)} = \frac{(A-B)}{A} \times 100$$

A คือ ค่าเฉลี่ย (n=3) ของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อในชุดควบคุม (PDA)

B คือ ค่าเฉลี่ย (n=3) ของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัด

Table 1 Antifungal activity of non-roasted and roasted garlic at 70 and 90°C for 10 min

Treatments	Concentrations (%)	Mycelium inhibition (%)	Spore germination (%)	MIC (%)	MFC (%)
Positive control (Carbendazim)	0.01	71.25^{b}±1.30	0.00^{b}±0.00	NG	NG
Negative control (PDA)	0.00	0.00^{h}±0.00	100.00^{a}±0.00	NI	NI
Non-roasted	0.1	27.38^{d}±0.50	0.00^{b}±0.00		
	0.5	100.00^{a}±0.00	0.00^{b}±0.00	0.039^{b}±0.00	0.078^{c}±0.00
	1.0	100.00^{a}±0.00	0.00^{b}±0.00		
70±5°C	0.1	24.05^{e}±1.00	0.00^{b}±0.00		
	0.5	60.00^{c}±0.00	0.00^{b}±0.00	0.039^{b}±0.00	0.312^{b}±0.00
	1.0	100.00^{a}±0.00	0.00^{b}±0.00		
90±5°C	0.1	0.50^{h}±0.10	100.00^{a}±0.00		
	0.5	9.00^{g}±1.00	0.00^{b}±0.00	0.312^{a}±0.00	1.25^{a}±0.00
	1.0	17.00^{f}±1.00	0.00^{b}±0.00		

$^{a-h}$ Means with a different superscript within a column were significantly at $P \leq 0.05$

MIC = Minimum inhibitory concentration on spore germination; MFC = Minimum fungicidal concentration on spore germination; NG = No spore germination; NI = No inhibition

Table 2 Antifungal activity of non-roasted and roasted shallot at 70 and 90°C for 15 min

Treatments	Concentrations (%)	Mycelium inhibition (%)	Spore germination (%)	MIC (%)	MFC (%)
Positive control (Carbendazim)	0.01	71.25^{a}±1.30	0.00^{h}±0.00	NG	NG
Negative control (PDA)	0.00	0.00^{fg}±0.00	100.00^{a}±0.00	NI	NI
Non-roasted	0.1	2.00^{ef}±1.00	100.00^{a}±0.00	0.312^{b}±0.00	1.25^{b}±0.00
	0.5	7.33^{d}±1.10	81.20^{d}±1.10		
	1.0	16.85^{b}±0.70	30.00^{g}±0.00		
70±5°C	0.1	0.80^{fg}±0.20	100.00^{a}±0.00	0.312^{b}±0.00	5.0^{a}±0.00
	0.5	7.00^{d}±0.90	85.33^{c}±1.80		
	1.0	10.45^{c}±1.80	50.00^{f}±0.00		
90±5°C	0.1	0.30^{fg}±0.20	100.00^{a}±0.00	1.25^{a}±0.00	5.0^{a}±0.00
	0.5	2.66^{e}±1.10	90.00^{b}±0.00		
	1.0	9.60^{c}±0.60	54.54^{e}±0.00		

$^{a-h}$ Means with a different superscript within a column were significantly at $P \leq 0.05$

MIC = Minimum inhibitory concentration on spore germination; MFC = Minimum fungicidal concentration on spore germination; NG = No spore germination; NI = No inhibition

Table 3 Antifungal activity of non-roasted and roasted dried chili at 90°C for 25 min

Treatments	Concentrations (%)	Mycelium inhibition (%)	Spore germination (%)	MIC (%)	MFC (%)
Positive control (Carbendazim)	0.01	71.25^{a}±1.30	0.00^{b}±0.00	NG	NG
Negative control (PDA)	0.00	0.00^{f}±0.00	100.00^{a}±0.00	NI	NI
Non-roasted	0.1	4.00^{de}±2.00	100.00^{a}±0.00	1.25^{a}±0.00	5.0^{a}±0.00
	0.5	14.00^{c}±2.00	100.00^{a}±0.00		
	1.0	22.00^{b}±2.00	100.00^{a}±0.00		
90±5°C	0.1	2.66^{ef}±1.10	100.00^{a}±0.00	1.25^{a}±0.00	5.0^{a}±0.00
	0.5	6.66^{d}±2.30	100.00^{a}±0.00		
	1.0	16.66^{c}±3.00	100.00^{a}±0.00		

$^{a-f}$ Means with a different superscript within a column were significantly at $P \leq 0.05$

MIC = Minimum inhibitory concentration on spore germination; MFC = Minimum fungicidal concentration on spore germination; NG = No spore germination; NI = No inhibition

4. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์

เตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. niger* จากข้อ 2 โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติม tween-20 ประมาณ 1-2 หยด ชะล้างเอาสปอร์ออกจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และปรับให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอยปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB; Himedia, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., India) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยใช้สารสกัดความเข้มข้นเดียวกันกับการทดสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อรา นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่า (Model No. Innova 43/43R, USA) ที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำสารละลายสปอร์ที่ได้มาหยดลงในแผ่นสไลด์แบบ Haemacytometer สังเกตการงอกของสปอร์โดยการถ่ายภาพและนับจำนวนสปอร์ที่งอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Nikon Model No. ECLIPSE E200 microscope, Japan) กำลังขยาย 40 เท่า รายงานค่าร้อยละการงอกของสปอร์ โดยคำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{การงอกของสปอร์ (\%)} = \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่งอก}}{\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมดที่นับได้}} \times 100$$

5. การทดสอบค่า Minimum inhibitory concentration on spore germination (MIC) และ Minimum fungicidal concentration on spore germination (MFC) ของสารสกัด

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ผสมกับสารสกัดให้มีความเข้มข้นร้อยละ 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019, 0.009 (w/v) ตามลำดับ จากนั้นเติมสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา *A. niger* ความเข้มข้นประมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร บ่มตัวอย่างเช่นเดียวกันกับข้อ 4 เป็นเวลา 3 วัน และมีชุดควบคุมเช่นเดียวกันกับข้อ 3 ตรวจผลโดยสังเกตหลอดทดลองที่ใส ซึ่งแสดงว่าไม่มีการงอกของสปอร์ และรายงานผลเป็นค่า MIC จากนั้นนำหลอดทดลองที่ใสมาทดสอบหาค่า MFC ด้วยวิธีการขีดเชื้อ (streak plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และสังเกตการงอกของสปอร์เชื้อรา [18], [19]

6. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0 (SPSS, Inc., Chicago IL, USA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

1. ผลของสารสกัดต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. niger*

ความร้อนในการคั่วมีผลเชิงลบต่อประสิทธิภาพของสารสกัดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา โดยสารสกัดจากกระเทียมคั่วที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่ความเข้มข้นเดียวกันทำให้การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราลดลงตามลำดับ เมื่อเทียบกับกระเทียมไม่คั่ว โดยสารสกัดจากกระเทียมคั่วที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ไม่แตกต่างจากกระเทียมไม่คั่ว อย่างมีนัยสำคัญ (Table 1) สารสกัดจากหอมแดงให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกันกับกระเทียม โดยสารสกัดจากหอมแดงคั่วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหอมแดงคั่วที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และหอมแดงไม่คั่ว (Table 2) ในขณะที่ สารสกัดจากพริกแห้งคั่วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที ทำให้การยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราลดลงประมาณ 1 เท่า ซึ่งแตกต่างจากพริกแห้งที่ไม่คั่วอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3)

2. ผลของสารสกัดต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. niger*

สารสกัดจากกระเทียมคั่วทุกความเข้มข้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกันกับการใช้สาร Carbendazim ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (ชุดควบคุม) ยกเว้นสารสกัด

จากกระเทียมคั่วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อราได้ (Table 1 และ Figure 1) ส่วนสารสกัดจากหอมแดงคั่วและหอมแดงไม่คั่ว ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ โดยสปอร์งอกได้ทั้งหมด ซึ่งการคั่วที่อุณหภูมิสูงส่งผลให้ประสิทธิภาพของสารสกัดหอมแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Table 2 และ Figure 2) ส่วนสารสกัดจากพริกแห้งทั้งที่คั่วและไม่คั่วทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ (Table 3 และ Figure 3)

3. ค่า Minimum inhibitory concentration on spore germination (MIC) และ Minimum fungicidal concentration on spore germination (MFC) ของสารสกัด

สารสกัดจากกระเทียมคั่วที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่า MIC เท่ากับกระเทียมที่ไม่คั่ว (ร้อยละ 0.039) แต่มีค่าน้อยกว่าสารสกัดจากกระเทียมคั่วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ถึง 8 เท่า การคั่วกระเทียมที่อุณหภูมิ 70 และ 90 องศาเซลเซียส มีค่า MFC เพิ่มขึ้นเป็น 4 และ 16 เท่าของกระเทียมไม่คั่ว ตามลำดับ (Table 1) ส่วนสารสกัดจากหอมแดงคั่วที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่า MIC เท่ากับสารสกัดจากหอมแดงไม่คั่ว (ร้อยละ 0.312) ซึ่งน้อยกว่าสารสกัดจากหอมแดงคั่วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส (ร้อยละ 1.25) อย่างไรก็ตาม การคั่วหอมแดงทั้ง 2 อุณหภูมิ ให้ค่า MFC เท่ากัน (ร้อยละ 5.0) และมีค่าสูงกว่าหอมแดงไม่คั่วประมาณ 4 เท่า (Table 2) ในขณะที่สารสกัดจากพริกแห้งคั่ว ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ทำให้ค่า MIC และ MFC ไม่แตกต่างจากสารสกัดพริกแห้งที่ไม่คั่ว (Table 3) จากการทดลองนี้พบว่า สารสกัดจากกระเทียมไม่คั่ว มีค่า MIC และ MFC น้อยกว่าสารสกัดจาก หอมแดงและพริกแห้งที่ไม่คั่ว ตามลำดับ (Table 1-3)

อภิปรายผลการวิจัย

การให้ความร้อนในระหว่างการแปรรูป หรือการสกัดสารจากพืชส่งผลต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ โดยความร้อนทำให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดลดลง [3] จากการให้ความร้อนโดยการคั่ว พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการคั่ว (Table 1-3) การใช้อุณหภูมิในการคั่วกระเทียมที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการคั่วที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และการไม่คั่ว โดยมีค่า Minimum inhibitory concentration on spore germination (MIC) และ Minimum fungicidal concentration on spore germination (MFC) เพิ่มขึ้น (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Abubakar [20] ที่พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดกระเทียมลดลง เมื่อสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันกับ การสกัดสารจากกระเทียมด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Phoma exigua*, *Fusarium nygamai* และ *Rhizoctonia solani* น้อยกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง [11] สำหรับสารสกัดจากหอมแดงให้ผลเช่นเดียวกันกับกระเทียมโดยการคั่วที่อุณหภูมิสูงทำให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *A. niger* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า MIC และ MFC เพิ่มขึ้น (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับ Yin และ Tsao [15] พบว่า สารสกัดหอมแดงที่สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. niger* น้อยกว่าสารสกัดหอมแดงที่สกัดด้วยน้ำอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ เนื่องจากความร้อนทำให้สารออกฤทธิ์ต้านเชื้อราที่อยู่ในกระเทียมและหอมแดงระเหยและ/หรือเปลี่ยนรูปไประหว่างการคั่ว โดย Corzo-Martinez *et al.* [6] รายงานว่า สารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกระเทียมและหอมหัวใหญ่เป็นสารกลุ่ม phenolic, glycosides และกลุ่ม organosulfur ซึ่งสารกลุ่มหลังเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ แต่มีจุดเดือดต่ำ [5] ดังนั้น การให้ความร้อนในระหว่างการคั่วจึงทำให้สารในกลุ่ม organosulfur ระเหยออกไปตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Corzo-Martinez *et al.* [6] รายงานว่า การนึ่งกระเทียมและหอมหัวใหญ่ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ทำให้สารในกลุ่ม organosulfur บางชนิดเปลี่ยนรูปไป เช่น dially thiosulfinate หรือ allicin เปลี่ยนไปเป็น diallyl disulfide, diallyl trisulfide, dimethyl trisulfide และ allyl methyl disulfide ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่า ส่วนสารใน

กลุ่ม phenolic และ glycosides ถึงแม้ว่าจะทนความร้อนได้ดี แต่ก็มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าสารในกลุ่ม organosulfur ดังนั้น การคั่วกระเทียมและหอมแดงด้วยความร้อนสูงจึงส่งผลให้สารออกฤทธิ์เกิดการระเหยและเปลี่ยนรูป จึงเป็นเหตุให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ลดน้อยลง

ส่วนสารสกัดจากพริกแห้งคั่วและไม่คั่วพบว่าไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา โดยให้ค่า MIC และ MFC เท่ากัน แต่การคั่วทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Table 3) ทั้งนี้เนื่องจากพริกมีสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น capsaicin, cinnamic acid, o-coumaric dihydrocapsaicin และ m-coumaric acids [21], [22] ซึ่งมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนได้แตกต่างกัน และแม้ว่า capsaicin เป็นสารที่มีปริมาณมากในพริก มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีและทนต่อความร้อนได้ถึง 210-220 องศาเซลเซียส [23] แต่การคั่วอาจทำให้สารชนิดอื่นระเหยและ/หรือเปลี่ยนรูปไป ดังนั้น การคั่วพริกแห้งจึงทำให้ฤทธิ์ของสารสกัดลดลง ซึ่งสังเกตได้จากผลการทดสอบกับเส้นใยเชื้อรา (Table 3) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าการสกัดพริกด้วยน้ำ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. nygamai* และ *P. exigua* ไม่แตกต่างกัน [11] ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง วิธีการสกัด และชนิดของเชื้อราที่แตกต่างจากการทดลองนี้ ดังนั้น การให้ความร้อน และวิธีการสกัดที่ต่างกัน จึงน่าจะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารสกัดที่แตกต่างกัน

โดยทั่วไปสปอร์ของเชื้อราทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าเส้นใย จากการทดลองสารสกัดจากพริกไม่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ เมื่อเทียบกับเส้นใยเชื้อรา (Table 3) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการในการทดสอบที่แตกต่างกัน โดยสปอร์ทดสอบในอาหารเหลว (PDB) ซึ่งสปอร์สัมผัสกับสารสกัดโดยตรง ในขณะที่เส้นใยทดสอบบนอาหารแข็ง (PDA) และเจริญอยู่บนผิวหน้าอาหาร ซึ่งมีเพียงบางส่วนของเส้นใยสัมผัสกับอาหารที่ผสมสารสกัดโดยตรง ดังนั้น เชื้อราจึงมีโอกาสปรับตัวและเจริญได้บางส่วน

เมื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจะพบว่า สารสกัดจากกระเทียมและหอมแดงทั้งที่คั่วและไม่คั่ว (Table 1-2) ใช้ความเข้มข้นในการยับยั้งเชื้อราต่ำกว่าที่เคยมีรายงานที่ใช้สารสกัดจากกระเทียมและหอมหัวใหญ่ ความเข้มข้นร้อยละ 5.0 [24] และสารสกัดจากกระเทียมสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีค่า MIC และ MFC เท่ากับร้อยละ 1.0 และ 5.0 จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. niger* ได้ [16]

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารสกัดจากวัตถุดิบที่ไม่ผ่านการคั่ว พบว่า สารสกัดจากกระเทียมมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ดีกว่าสารสกัดจากหอมแดง (Table 1-2 และ Figure 1-2) เช่นเดียวกับ Benkeblia [24] Yin และ Tsao [15] ที่พบว่ากระเทียมมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *A. niger* ได้ดีกว่าหอมแดง หอมหัวใหญ่ และต้นหอมสด ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากกระเทียมมีปริมาณสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม organosulfur มากกว่าหอมหัวใหญ่ถึง 4 เท่า [25] และอาจมากกว่าหอมแดงด้วย

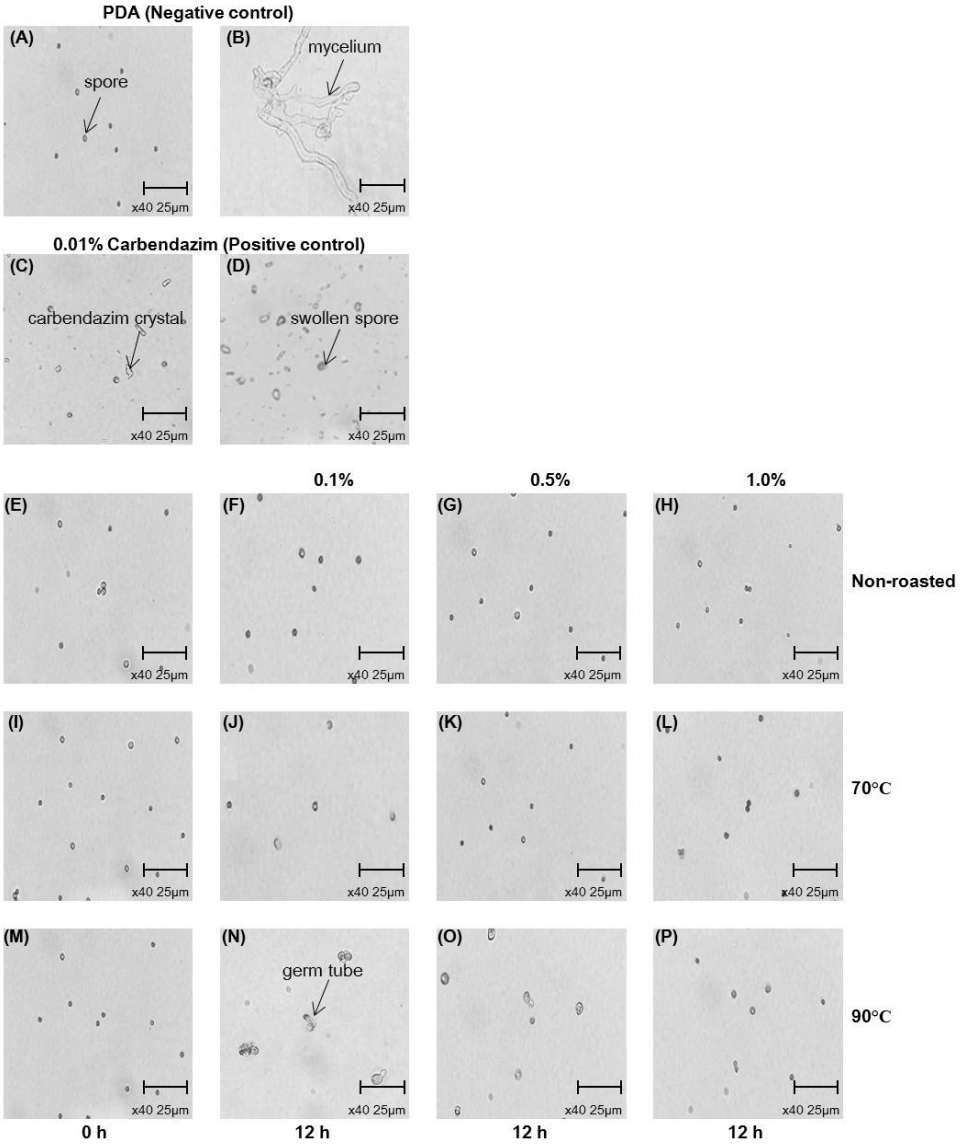

Figure 1 Spore germination of *A. niger* treated with garlic extract: (E-H) Non-roasted, (I-L) Roasted at 70°C and (M-P) Roasted at 90°C for 10 min incubated for 12 h. Each panel shows: (A-B) 0% of extract (Negative control); (C-D) 0.01% of carbendazim (Positive control); (F, J, N) 0.1% of extract; (G, K, O) 0.5% of extract; (H, L, P) 1.0% of extract

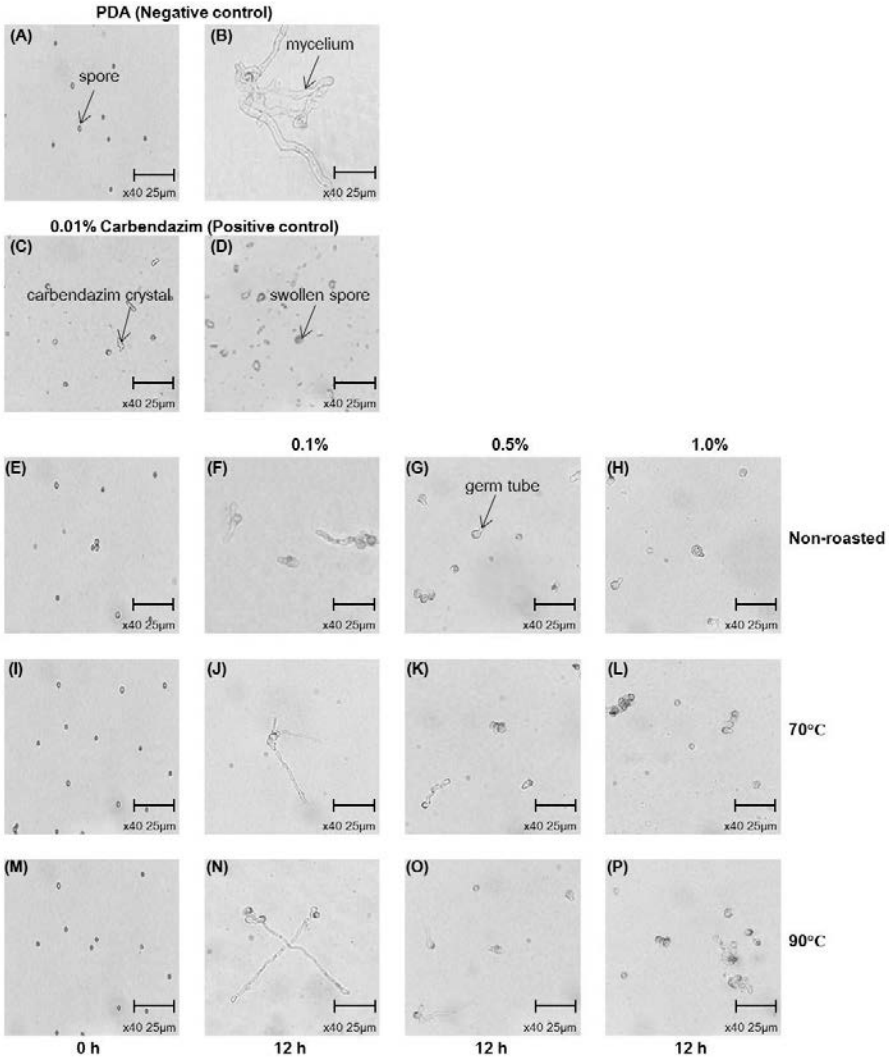

Figure 2 Spore germination of *A. niger* treated with shallot extract: (E-H) Non-roasted, (I-L) Roasted at 70°C and (M-P) Roasted at 90°C for 15 min incubated for 12 h. Each panel shows: (A-B) 0% of extract (Negative control); (C-D) 0.01% of carbendazim (Positive control); (F, J, N) 0.1% of extract; (G, K, O) 0.5% of extract; (H, L, P) 1.0% of extract

นอกจากนี้ ชนิดของสารออกฤทธิ์ของกระเทียม เช่น diallyl sulphide, diallyl disulphide, diallyl trisulphide และ dithiins มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่า mono sulphides, di sulphides, tri sulphides, thiophenes, zwiebelanes และ cepaenes ที่พบในหอมหัวใหญ่ [6] ส่วนสาเหตุที่สารสกัดจากพริกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อยกว่ากระเทียมและหอมแดง (Table 1-3) อาจเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่ในพริกเป็นกลุ่ม phenolic ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้น้อยกว่ากลุ่ม organosulfur [11] ดังนั้นจึงไม่พบการงอกของสปอร์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารสกัดจากกระเทียมที่ไม่ผ่านการคั่ว แต่พบการงอกของสปอร์ในหอมแดงและพริกแห้ง (Figure 1-3)

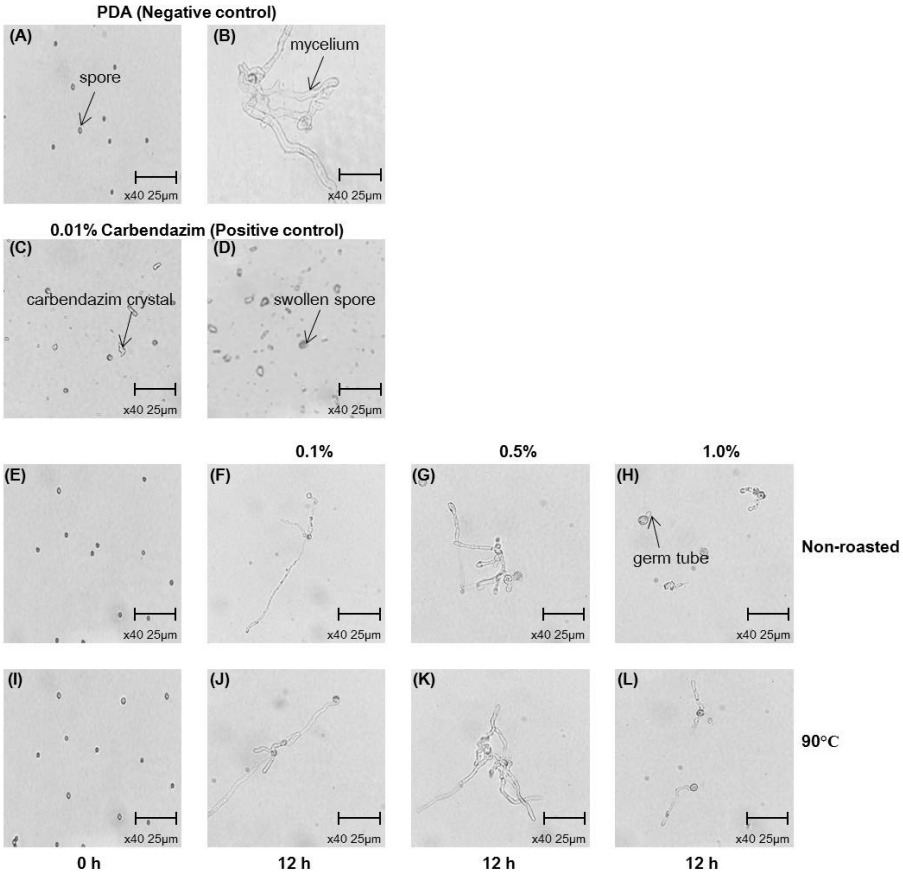

Figure 3 Spore germination of *A. niger* treated with dried chili extract: (E-H) Non-roasted and (I-L) Roasted at 90°C for 25 min incubated for 12 h. Each panel shows: (A-B) 0% of extract (Negative control); (C-D) 0.01% of carbendazim (Positive control); (F, J) 0.1% of extract; (G, K) 0.5% of extract; (H, L) 1.0% of extract

สรุปและเสนอแนะ

การคั่วเป็นขั้นตอนสำคัญในการเตรียมวัตถุดิบเพื่อผลิตน้ำพริกพร้อมบริโภค โดยผู้ประกอบการจะใช้ความร้อนค่อนข้างสูงในการคั่ว ซึ่งส่งผลต่อสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้ พบว่าการคั่วกระเทียม และหอมแดง ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 หรือ 15 นาที ตามลำดับ ทำให้วัตถุดิบมีลักษณะที่ดีสามารถนำไปแปรรูปเป็นน้ำพริกพร้อมบริโภคได้และยังคงมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus niger* ได้ดีกว่าการคั่วที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ซึ่งต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดมากกว่าโดยมีค่า MIC เท่ากับร้อยละ 0.312 สำหรับกระเทียม และ MIC เท่ากับร้อยละ 1.25 สำหรับหอมแดง จากค่า MIC ที่ได้สามารถนำไปใช้ในการคำนวณเพื่อปรับสัดส่วนของน้ำพริก ซึ่งจากผลการทดลองนี้ ผู้ประกอบการควรเพิ่มปริมาณของกระเทียม เพื่อเพิ่มฤทธิ์การต้านเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำพริก หรือทดลองใช้อุณหภูมิในการคั่วต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส แต่ใช้เวลานานขึ้น ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาน้ำพริกพร้อมบริโภคได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนผู้ช่วยวิจัยโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ประเภทร่วมให้ทุน คปก. ระหว่าง สกว. และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี รุ่นที่ 15 ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

[1] Polprasert, P., Narakorn, S. and Sawetwiwat, A. 2016. "The surveillance of the ready-to-eat dried chili paste in Bangkok". **FDA Journal**. January-April: 21-27.

[2] Toontom, N., Meenune, M. and Posri, W. 2008. "Effects of dry chili and garlic on sensory characteristics and consumer acceptance of Numprik Tadang product". **KKU Res J (GS)**. 8(1): 7-17.

[3] Kyung, K. H. 2012. "Antimicrobial properties of *Allium* species, Current Opinion". **Biotechnology**. 23: 142-147.

[4] Santas, J., Almajano, M.P. and Carbo, R. 2010. "Antimicrobial and antioxidant acrivity of crude onion (*Allium cepa* L.) extracts". **International Journal of Food Science & Technology**. 45: 403-409.

[5] Lanzotti, V., Romano, A., Lanzuise, S., Bonanomi, G. and Scala, F. 2012. "Antifungal saponins from bulbs of white onion, *Allium cepa* L." **Phytochemistry**. 74: 133-139.

[6] Corzo-Martinez, M. and Villamiel, M. 2007. "Biological properties of onions and garlic". **Food Science & Technology**. 18: 609-625.

[7] Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B. and Smith, B. 2002. "Onions a global benefit to health". **Phytotherapy Research**. 16: 603-615.

[8] Benkeblia, N. and Lanzotti, V. 2007. "Allium thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization". **Food Preservation**. 1(2): 193-201.

[9] Ankri, S. and Mirelman, D. 1999. "Antimicrobial Properties of Allicin from Garlic". **Journal of Microbes and Infection**. 2: 125-129.

[10] Jones, N.L., Shabib, S. and Sherman, P.M. 1997. "Capsaicin as an inhibitory the growth of gastric pathogen *Helicobacter pylori*". **FEMS Microbiology Letters**. 146: 227-233.

[11] Touba, E.P., Zakaria, M. and Tahereh, E. 2012. "Anti-fungal activity of cold and hot water extracts of spices against fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) in vitro". **Microbial Pathogenesis**. 52: 125-129.

[12] Stonsaovapak, S., Temmarate, P. and Vachanavinich, K. 1995. "Hygienic quality of ready-made chili paste". **Journal of Natural Sciences**. 29(4): 471-478.

[13] Soares, C., Calado, T. and Venancio, A. 2013. "Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions". **Revista Iberoamericana de Micología**. 30(1): 9-13.

[14] Sharma, K., Young Ko, E., Assefa, A.D., Ha, S., Nile, S.H., Lee, E.T. and Park, S.W. 2015. "Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties". **Journal of Food and Drug Analysis**. 23: 243-252.

[15] Yin, M.C. and Tsao, S.M. 1999. "Inhibitory effect of seven Allium plants upon three *Aspergillus* species". **International Journal of Food Microbiology**. 49: 49-56.

[16] Kim, J.Y., Lee, Y.C. and Kim, K.S. 2002. "Effect of heat treatments on the antimicrobial activities of garlic (*Allium sativum*)". **Journal**

of Microbiology and Biotechnology. 12(2): 331-335.

[17] Toontom, N., Meenune, M., Posri, W. and Lertsiri, S. 2012. "Effect of drying method on physical and chemical quality, hotness and volatile flavor characteristics of dried chili". **International Food Research Journal**. 19(3): 1023-1031.

[18] Suwanchatree, J., Khamtorn, N., Noodang, W. and Lertcanawanichakul, M. 2011. "Anti-*Candida albicans* activity of active substances derived from Morinda citrifolia fruit". **Journal of Medical Technology and Physical Therapy**. 23(1): 7-18.

[19] Lv, F., Liang, H., Yuan, Q. and Li, C. 2011. "In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms". **Food Research International**. 44: 3057-3064.

[20] Abubakar, E.M. 2009. "Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniea* and *Pseudomonas aeruginosa*". **Journal of Medicinal Plants Research**. 3: 179-185.

[21] Dorantes, L., Colmenero, R., Hernandez, H., Mota, L., Jaramillo, M.E., Fernandez, E. and Solano, C. 2000. "Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts, International". **Journal of Food Microbiology**. 57: 125-128.

[22] Cichewicz, R.H. and Thorpe, P.A. 1996. "The antimicrobial properties of chile peppers (*Capsaicum* species) and their uses in Mayan medicine". **Journal of Ethnopharmacology**. 52: 61-70.

[23] Reyes-Escogido, M.L., Gonzalez-Mondragon, E.G. and Vazquez-Tzompantzi, E. 2011. "Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin". **Molecules**. 16: 1253-1270.

[24] Benkeblia, N. 2004. "Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*)". **LWT- Food Science and Technology**. 37: 263-268.

[25] Sagdic, O. and Tornuk, F. 2012. "Antimicrobial properties of organosulfur compounds". **In Dietary Phytochemical and Microbes**. edited by Patra, A.K. 127-156.