ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2/695

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงในการยับยั้ง *staphylococcus aureus*
ที่ปนเปื้อนในไส้ครีมเอแคลร์

(Use of mango peel extracts to inhibit *Staphylococcus aureus* contaminated in Éclair cream)

จัดทำโดย

นางสาวณัฐนภัสถ์ โสภา		รหัสนักศึกษา 46040193
นางสาวภัทรี ตั้งมงคลเลิศ		รหัสนักศึกษา 46040230
นางสาวรัชนีวรรณ	วิภาคเบ็ญจานุภาพ	รหัสนักศึกษา 46040237

2/W
ด63897
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 96678
วัน,เดือน,ปี - 4 JUN 2009

.b 11278027
.i.....

เดรบการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 12 / ก.ค. / 2550 อาจารย์ที่

ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

( )

การใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงในการยับยั้ง *staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนในไส้ครีมเอแคลร์

(Use of mango peel extracts to inhibit *Staphylococcus aureus* contaminated in Éclair cream)

จัดทำโดย

นางสาวณัฐนภัสถ์ โสภา รหัสนักศึกษา 46040193

นางสาวภัทรี ตั้งมงคลเลิศ รหัสนักศึกษา 46040230

นางสาวรัชนีวรรณ วิภาคเบ็ญจานุภาพ รหัสนักศึกษา 46040237

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาปัญหาพิเศษ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่อง การใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ปนเปื้อนในไส้ครีมเอแคลร์ สามารถลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่าน ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมปัญหาพิเศษ รวมทั้งให้คำแนะนำ ให้ความรู้ ให้คำปรึกษาและตรวจสอบแก้ไขปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบปัญหาพิเศษ และให้คำแนะนำต่างๆ และขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้แนะนำแนวทางในการศึกษาข้อมูล รวมทั้งความรู้และคำแนะนำต่างๆ คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร พี่ น้อง และเพื่อน ๆ ปี 4 คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ของคณะผู้จัดทำทุกท่านที่ให้การสนับสนุนการเรียนและงบประมาณในทุกๆด้าน

หากปัญหาพิเศษฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด คณะผู้จัดทำต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้จัดทำ

11 กุมภาพันธ์ 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวณัฐนภัสถ์ โสภา , นางสาวภัทรี ตั้งมงคลเลิศ , นางสาวรัชนีวรรณ วิภาคเบ็ญจานุภาพ . 2549 : การใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์ (Use of mango peel extracts to inhibit *Staphylococcus aureus* in Éclair's cream)
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ , ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม

บทคัดย่อ

เอแคลร์เป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ชนิดหนึ่งที่มีปัญหาการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเอแคลร์มีส่วนผสมของไข่ซึ่งเป็นอาหารของจุลินทรีย์ และจากกระบวนการผลิตที่มีการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์หลังจากผ่านการให้ความร้อน จึงทำให้เอแคลร์สามารถพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ได้มาก สภาวะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ก็เป็นสิ่งสำคัญที่จะส่งผลต่อการเจริญของ *S. aureus* โดยที่ระยะเวลาเริ่มต้นที่ทำการตรวจสอบเอแคลร์หลังจากผลิตเสร็จพบเชื้อในปริมาณน้อย เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้องจะพบเชื้อมากขึ้น จะต่างจากเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ในอุณหภูมิตู้เย็นประมาณ 4-6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมงเท่ากัน จะพบเชื้อในปริมาณน้อยใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อในเวลาเริ่มต้น แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาและอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *S. aureus*

การเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์เอแคลร์ส่วนใหญ่เกิดจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *S .aureus* จึงได้มีการนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงมาใช้เพื่อยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และเนื่องจากว่ามีรายงานการศึกษาพบว่าในเปลือกมะม่วงมีสารประกอบพวกโพลีฟีนอลอยู่มากซึ่งมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัด และใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่ระดับความเข้มข้น 40, 45 และ 50 mg/ml ตามลำดับ มาทำการทดสอบโดยวิธี Sensitive test พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่ระดับความเข้มข้นที่ 50 mg/ml มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ clear zone มากที่สุด

ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงมีคุณสมบัติเป็น Bacteriostatic หรือ Bactericidal โดยใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วง ซึ่งมีpH ประมาณ 4.5 ที่ระดับความเข้มข้น 50 mg/ml เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB ด้วยวิธี spread plate พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงมีคุณสมบัติเป็น Bactericidal

ภัทรี	.....	12 ก.พ. 50
รัชนีวรรณ	.....	.....
ณัฐนภัสถ์	.....	.....
ลายมือนักศึกษา	**ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา**	**วัน/เดือน/ปี**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	3
คุณภาพอาหารทางจุลินทรีย์	3
จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวกำหนดคุณภาพอาหาร	4
มะม่วง	5
สารประกอบฟีนอลิก	6
Staphylococcus spp.	7
การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ (Sensitivity test)	10
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	24
บรรณานุกรม	26
ภาคผนวก ก	28
ภาคผนวก ข	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเปลือกมะม่วงดิบ 4 พันธุ์	8
2. ผลการทดลองการเจริญของเชื้อ S. *aureus* ที่เวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน	17
3. ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ Coagulase ของ S. *aureus*	19
4.ผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ S. *aureus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วง	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะของโคโลนีของเชื้อ S. *aureus*	18
2. ลักษณะของโคโลนีของเชื้อ S. *aureus*	18
3. การเกิดตะกอนจากการสร้างเอนไซม์ Coagulase ใน rabbit plasma	19
4.ลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นจากสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วง	21
5. ลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นจากสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วง	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันอาหารประเภทเบเกอรี่ จัดเป็นอาหารที่มีผู้นิยมบริโภคสูง เนื่องจากมีผู้ผลิตหลากหลาย ตั้งแต่ผลิตเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน อุตสาหกรรมขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ซึ่งเบเกอรี่เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำ น้ำตาล นม ไขมัน เนย ผลไม้ และแป้ง ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้ถูกปนเปื้อนจากเชื้อได้ง่าย ดังนั้นถ้าผู้ผลิตไม่ระวัง ไม่รักษาความสะอาด ผลิตไม่ถูกสุขลักษณะ จะทำให้อาหารมีการปนเปื้อนจากเชื้อและเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษได้ง่าย ซึ่ง *S. aureus* เป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษที่พบมากในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เช่น เอแคลร์ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่สัมผัสกับมือผู้ผลิตภายหลังจากการอบ และเชื้อ *S. aureus* นี้พบได้ทั่วไปทั้งจาก คน อากาศ ฝุ่นละออง ฯลฯ ดังนั้น ถ้าอาหารเกิดการปนเปื้อนของเชื้อนี้ จะบ่งบอกถึงการมีสุขลักษณะที่ไม่ดีของผู้ผลิตซึ่ง *S. aureus* สามารถเจริญและสร้างสารพิษได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 4 – 47 °C แต่เนื่องจากเชื้อนี้ไม่ทนความร้อนสูงนักการปนเปื้อนของเชื้อจึงมักเกิดหลังจากอาหารได้รับความร้อนแล้ว ซึ่งการเกิดโรคอาหารเป็นพิษจะเกิดจากสารพิษ Enterotoxin ที่มันสร้างขึ้น ซึ่งสามารถทนความร้อนสูง เมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีสารพิษนี้ จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน มีน้ำลายมาก วิงเวียนศีรษะ ปวดท้อง ท้องร่วง ซึ่งถ้าได้รับปริมาณมากๆอาจเสียชีวิตได้

จากสาเหตุดังกล่าวจึงได้มีการศึกษาวิจัยถึงสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าผู้บริโภคในหลายประเทศทั้งในทวีปยุโรปและอเมริการวมถึงเอเชีย เริ่มมีการต่อต้านการบริโภคอาหารที่มีสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้นปัจจุบันจึงเริ่มมีการหันมาใช้สารชีวภาพซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งสารชีวภาพที่ใช้ ได้แก่ สารสกัดสมุนไพรชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาสารสกัดจากพืชผักและผลไม้บางชนิด เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ โดยองค์ประกอบที่สำคัญของพืชที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียได้ คือ สารประกอบฟีนอลิค โดยมีรายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดมะม่วงซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิคอยู่ 79.5 มิลลิกรัม / 100 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้ (Toshihide และคณะ , 2000)

ประเทศไทยมีการเพาะปลูกมะม่วงได้หลายพันธุ์ ซึ่งมีทั้งพันธุ์ที่บริโภคสดและพันธุ์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ ส่วนเปลือกมะม่วง มีการนำมาใช้ประโยชน์น้อยมาก โดยส่วนใหญ่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์หรือทิ้งเป็นขยะ ซึ่งในส่วนของเปลือกนั้นพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิคอยู่เช่นเดียวกับส่วนของเมล็ด (Larrauri , 1998) จึงน่าจะนำมาใช้ให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์โดยการสกัดสารชีวภาพเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เอแคลร์ เนื่องจากเอแคลร์เป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ที่พบการปนเปื้อนจากเชื้อ *S. aureus* ได้มาก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงศึกษาสมบัติของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์

วัตถุประสงค์

1. ดูการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในผลิตภัณฑ์เอแคลร์
2. เปรียบเทียบอุณหภูมิในการขายเอแคลร์ระหว่างอุณหภูมิห้องเทียบกับอุณหภูมิ 4 °C ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*
3. ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่มีผลต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์เอแคลร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

คุณภาพอาหารทางจุลชีววิทยา (จรรยา และ รัติยา , 2546)

กระบวนการในการผลิตอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะมักเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารหรือโรคอาหารเป็นพิษต่อผู้บริโภคอันมีผลเนื่องมาจากมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์หรือสารพิษต่างๆที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นลงสู่อาหาร โดยที่เชื้อเหล่านี้อาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบหรือขณะทำการผลิตอาหาร

1. จุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงสุขลักษณะการผลิต (Indicator organism)

โดยปกติแล้ว จุลินทรีย์เหล่านี้เป็นพวกไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic organisms) แต่มักจะสัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค (pathogens) เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้จะเป็นเชื้อในลำไส้ที่ติดมากับอุจจาระ เช่น coliforms, faecal coliforms, *Escherichia coli* ซึ่งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคส่วนมากเป็นเชื้อโรคลำไส้ที่ติดมากับอุจจาระด้วยเช่นกัน ดังนั้น การตรวจหาเชื้อในกลุ่ม Indicator organism จึงเป็นการตรวจหาถึงอัตราการเสี่ยงและความเป็นไปได้ของการปนเปื้อนของเชื้อในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคกับมนุษย์ด้วย

2. จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Pathogenic organisms)

เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เมื่อผู้บริโภคได้บริโภคอาหารที่มีเชื้อเหล่านี้ปนเปื้อนอยู่จะทำให้เกิดโรคหรืออาการผิดปกติที่เกิดขึ้นกับร่างกาย ซึ่งมีหลายกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา ไวรัส พาราสิต เป็นต้น แต่ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยมีอาหารเป็นสื่อนำ แบ่งแบคทีเรียเหล่านี้ออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะการเกิดโรค ดังนี้

- **Bacterial food intoxication** หมายถึง แบคทีเรียที่ปนเปื้อนลงสู่อาหารแล้วสามารถเจริญและสร้างสารพิษออกมาในอาหาร เมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารที่มีสารพิษนี้อยู่ จะทำให้เกิดอาการผิดปกติต่อผู้บริโภคได้ เชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum* และในปัจจุบันยังพบว่าเชื้อ *Cl. perfringens* และ *Bacillus cereus* สามารถก่อให้เกิดโรคในลักษณะ food intoxication ได้ด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-Bacterial food infection หมายถึง เชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลงในอาหารแล้วเจริญในปริมาณที่มากพอจนก่อให้เกิดโรค ซึ่งเมื่อผู้บริโภครับประทานอาหารดังกล่าวแล้วเกิดอาการผิดปกติหรือเกิดการติดเชื้อขึ้น จากสารต่างๆที่เชื้อเหล่านี้ผลิตหรือหลั่งออกมาขณะอยู่ในลำไส้ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Salmonella, Shigella, enteropathogenic E. coli,* Vibrios เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวกำหนดคุณภาพอาหาร (จรรยา และ รัติยา , 2546)

โดยทั่วไปในการผลิตอาหารมักจะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในวัตถุดิบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียกลุ่มต่างๆข้างต้นในปริมาณสูง การใช้กระบวนการผลิตในรูปแบบต่างๆ เช่น การล้างทำความสะอาดวัตถุดิบ การแช่แข็ง การลวกต้ม การใช้ความร้อนในรูปแบบต่างๆ การทำแห้ง การฉายรังสี ฯลฯ จะช่วยยับยั้ง และทำลายเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ให้ลดลงหรือหมดไปได้ ซึ่งการใช้การใช้กระบวนการผลิตในรูปแบบต่างๆนั้น มักมุ่งเน้นไปถึงการทำลายจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสียในสภาพที่เก็บ ตามแต่ลักษณะของผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานขึ้น และผลิตภัณฑ์นั้นมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค การควบคุมการผลิตที่ไม่มีประสิทธิภาพหรือแหล่งผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ จะมีผลทำให้จุลินทรีย์ในกลุ่มต่างๆดังกล่าวกลับเข้าไปปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ได้อีก ดังนั้น ในการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา มักใช้จุลินทรีย์ที่จะกล่าวถึงเป็นดัชนีบ่งชี้สิ่งต่างๆดังต่อไปนี้

1. *Enterobacteriaceae* และ *coliforms*

ถ้าพบเชื้อในกลุ่มนี้ในปริมาณสูงแสดงว่า การปฏิบัติในกระบวนการผลิตไม่เพียงพอที่จะทำลายเชื้อในกลุ่มนี้ให้หมดไปได้ เช่น ให้ความร้อนไม่เพียงพอ วัตถุดิบมีเชื้อปนเปื้อนในปริมาณสูง หรืออาจมีการปนเปื้อนภายหลังโดยเฉพาะอย่างยิ่ง จากแหล่งผลิตที่มีสุขลักษณะส่วนบุคคลและโรงงานไม่ดีเกิดการปนเปื้อนจากอุปกรณ์ที่ล้างไม่สะอาด เกิด food handling จากมือของผู้สัมผัสอาหาร เป็นต้น นอกจากนี้การตรวจพบเชื้อดังกล่าวในอาหาร ยังแสดงถึงอัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคทางเดินอาหารจากจุลินทรีย์ทั้งในแบบ food infection และ food intoxication กับผู้บริโภคอาหารด้วย

2. *Escherichia coli*

เป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระเพราะเชื้อดังกล่าวพบมากในลำไส้ของคนและสัตว์ การตรวจพบเชื้อนี้แสดงให้เห็นถึงสุขลักษณะของการผลิตที่ไม่ดี นอกจากนี้ การตรวจพบเชื้อ*E. coli* ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงโอกาสที่จะมีการปนเปื้อนของเชื้อโรคทางเดินอาหารอื่นๆ เช่น *Salmonellae, Shigellae* เป็นต้น ซึ่งเป็นเชื้อที่พบในลำไส้ของคนและสัตว์ด้วยเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Coagulase positive staphylococci

บ่งชี้ถึงว่าโรงงานผลิตมีสุขลักษณะส่วนบุคคลในการผลิตที่ไม่ดีเกิด food handling ในระหว่างการผลิตอาหาร เพราะเชื้อนี้พบมากตามผิวหนัง จมูก ลำคอ ของมนุษย์ จัดว่าเป็น skin index microorganism คือ ถ้าพบเชื้อนี้ในอาหารมักจะบอกได้ว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจากผู้สัมผัสอาหารในขณะผลิต นอกจากนี้ ถ้าตรวจพบเชื้อนี้ในปริมาณมากในอาหาร ผู้บริโภคอาจเกิดโรคอาหารเป็นพิษในแบบ food intoxication ได้ เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้จะผลิตสารพิษที่เรียกว่า enteroxin ขณะที่เจริญในอาหาร

มะม่วง (Mango) (นภชลัช ยอดพรม , 2549)

มะม่วง (*Mangifera* L.) เป็นไม้ยืนต้นชื่อสามัญ แมงโก้ (Mango) อยู่ในวงศ์อนาคาร์ดิอาซีอี (Anacardiaceae) เป็นพืช ใบเลี้ยงคู่ ลำต้นตรง มีกิ่งก้านแผ่ออกเป็นทรงพุ่มที่แน่นทึบ ไม่ผลัดใบ มีอายุยืนมากกว่า 100 ปี ที่พบในประเทศไทยมีหลายชนิด เช่น มะม่วงขี้ยา (*Mangifera duperreana* Pierre.) มะม่วงแป๊บ *(M. flave* Evrard.) มะม่วงช้างเหยียบ (*M. sylvatica* Roxb.) มะม่วงป่า *(M. longipetiolata* King.) มะม่วงกะเลง (*M. longipes* Griff) มะม่วงกะล่อน (*M. Caloneura* Kurz.) มะม่วงคัน *(M. quadrifida* Jack) มะม่วงซัน *(M. gracilipes* Hook. F.) มะม่วงจิ๋งหรีด *(M. odorata* Griff) มะม่วงบาป *(M. camptosperma* Pierre.) เป็นต้น แต่ละชนิดที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายและเป็นการค้าคือมะม่วงบ้าน *(Mangifera indica* L.) (วิจิตร วังใน, 2533) ซึ่งพบในอินเดียมากกว่า 4000 ปีและแพร่กระจายไปยังภูมิภาคเอเชียใต้ แอฟริกา และอเมริกาใต้ ปัจจุบันปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วไปในเขตร้อนและร้อนชื้น อินเดียเป็นประเทศที่มีการปลูกมากที่สุดให้ผลผลิตประมาณ 9 ล้านตันต่อพื้นที่ 1 ล้านแฮกเตอร์ (6.25 ล้านไร่) ประเทศผู้นำในการส่งออกมะม่วงได้แก่ แม็กซิโก และ มาลี (Mali, แอฟริกาตะวันตก) มะม่วงจัดเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากปลูกง่ายโตเร็ว นอกจากนี้การรับประทานมะม่วงยังเป็นประโยชน์ให้คุณค่าทางอาหารแก่ร่างกาย เนื่องจากเนื้อมะม่วงประกอบด้วยน้ำตาล 15 % โปรตีน 0.5 % และอุดมไปด้วยวิตามิน เอ บี และซี (Huxley et al., 1997)

การใช้ประโยชน์ รับประทานผลดิบและผลสุก และแปรรูปเป็น มะม่วงกวน มะม่วงดอง มะม่วงแช่อิ่ม มะม่วงเค็ม น้ำมะม่วง แยม เป็นต้น พันธุ์มะม่วงการะเกด แก้มขาว เขียวไข่กา เจ้าพระยา นวลจันทร์ หัวช้าง เป็นต้น และมีพันธุ์ส่งเสริม แยกตามลักษณะการรับประทานดังนี้ พันธุ์รับประทานสุก ได้แก่ น้ำดอกไม้ หนังกลางวัน อกร่อง พันธุ์รับประทานดิบ ได้แก่ ทองดำ ฟ้าลั่น เขียวเสวย พันธุ์แปรรูป ได้แก่ แก้ว สามปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) (ชุลีกร สินธพรัตนะ , 2548)

สารประกอบฟีนอลิก เป็นสารในกลุ่ม secondary metabolite ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด โดยทั่วไปมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) มากกว่าหรือเท่ากับ 1 หมู่เกาะกับวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) สารประกอบฟีนอลที่มีหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่า 1 หมู่นิยมเรียกว่า สารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenol) โดยส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่ละลายน้ำ มักพบรวมอยู่กับน้ำตาลในรูปไกลโคไซด์ โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ก็ได้ แต่น้ำตาลที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ กลูโคส (glucose) ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นที่พบได้แก่ กาแลกโตส (galactose) แรมโนส (rhamnose) ไซโรส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) และอนุพันธ์ของน้ำตาลเหล่านี้ เช่น กรดกลูโคโรนิก (glucoronic acid) กดกาแลกตูโรนิก (galacturonic acid) และอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิกด้วยกันเอง หรือ สารประกอบฟีนอลิกกับสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิก (carboxylic acids) กรดอินทรีย์ (organic acids) อะมีน (amines) และไขมัน (Bravo , 1998) การสร้างสารประกอบฟีนอลิกของพืชจะมีทั้งปัจจัยทางด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีการเพาะปลูก ระดับความสุก กระบวนการแปรรูป หรือแม้แต่วิธีการเก็บรักษาก็ล้วนมีผลต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งสิ้น

สารประกอบโพลีฟีนอลแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และ นอนฟลาโวนอยด์ (non-flavonoids) (Burns และคณะ,2000)

1. ฟลาโวนอยด์ มี 12 กลุ่มย่อย ได้แก่ ฟลาโวน (flavone) ไอโซฟลาโวน (isoflavone) ฟลาโวนอล (flavanol) ลูโคแอนโธไซยานิน (lucoanthocyanin) แอนโธไซยานิน (anthocyanin) ชาลโคน (chalcone) ไดไฮโดรชาลโคน (dihydrochalcone) ออโรน (aurone) และ แซนโธน (xanthone)
2. นอนฟลาโวนอยด์ ที่สำคัญได้แก่ กรดฟีนอลิก (phenolic acid) ตัวอย่างของกรดฟีนอลิกที่พบมากในผลไม้ทั่วไป คือ กรดแกลลิก (gallic acid) กรดโปรโตเคทิชิวอิก (protocatechuic acid) กรดวานิลิก (vanillic acid) กรดพาราคูมาริก (p-coumaric acid) กรดเฟอรูลิก (ferulic acid) เป็นต้น นอกจากนี้ นอนฟลาโวนอยด์ ชนิดอื่นๆ ได้แก่ ไฮดรอกซีซินนาเมต (hydroxycinnamate) สติลบิเนส (stibinase)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

***Staphylococcus* spp.** (ธรรมธัช และ ธาริณี , 2546)

เป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน S. *aureus* มีการสร้างสารพิษ enterotoxin ในเนื้อสัตว์ ซึ่งถ้าหากบริโภคเข้าไปจะมีผลทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษและยังพบว่า S. *aureus* เป็นเชื้อที่ทนต่อความแห้งได้ดี การปนเปื้อนของเชื้อมีดังนี้ คือจากสิ่งแวดล้อม (อากาศ ฝุ่น น้ำ อาหาร แลอุจจาระ) มักพบเชื้อนี้บริเวณ เยื่อบุของจมูก คอหอยและผิวหนังของมนุษย์ อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่การผลิตสารพิษอยู่ในช่วง 15.6-46.1 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 40องศาเซลเซียส เชื้อ *Staphylococcus* spp. สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 35-37 องศาเซลเซียส เนื่องจากเชื้อนี้เป็นพวกไม่สร้างสปอร์ ดังนั้นมักถูกทำลายในขบวนการผลิตใช้ความร้อนหรือถูกทำลายที่อุณหภูมิระหว่างการประกอบอาหาร ค่าpH ที่เหมาะสมที่เชื้อ *Staphylococcus* spp. สามารถเจริญได้ในค่า pH ที่กว้างใหญ่จะเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งที่ค่า pH 9 บางสายพันธุ์ยังสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรดจะสามารถยับยั้งเชื้อนี้ได้

1. *Staphylococcus aureus* ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่

ปัจจุบันอาหารประเภทเบเกอรี่ จัดเป็นอาหารที่มีผู้นิยมบริโภคสูงตั้งแต่วัยเด็กจนถึงผู้ใหญ่ และเนื่องจากมีผู้ผลิตหลากหลาย ทำให้หน่วยงานของราชการที่ทำหน้าที่ดูแลคุ้มครองความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคไม่สามารถเข้าไปดูแลได้อย่างทั่วถึง ที่สำคัญเบเกอรี่เป็นอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาล น้ำไขมัน เนย แป้ง และผลไม้ ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้ถูกปนเปื้อนจากเชื้อได้ง่าย ดังนั้นถ้าผู้ผลิตไม่ระวังไม่รักษาความสะอาด ผลิตไม่ถูกสุขลักษณะ จะทำให้อาหารดังกล่าวมีการปนเปื้อนของเชื้อและเกิดการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษได้ง่าย เช่น เอแคลร์ เนื่องจากเอแคลร์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องทำการใส่ไส้หลังจากกระบวนการอบเพื่อทำให้สุกแล้ว

Staphylococcus aureus เป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษชนิดหนึ่ง และเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วๆไปในอวัยวะส่วนต่างๆของคน โดยเฉพาะส่วนที่มีบาดแผล ดังนั้น ถ้ามีการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ จะบ่งบอกถึงการมีสุขลักษณะที่ไม่ดีของผู้ผลิต *S. aureus* ที่มีผลต่อทางเดินอาหารของคนโดยมากเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษได้ (enterotoxin) และเป็นพวกที่ทำให้พลาสมาแข็งตัวได้ (Coagulation Blood Plasma) เชื้อชนิดนี้สามารถเจริญและสร้างสารพิษได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 4-47 °C ดังนั้น จึงง่ายต่อการปนเปื้อนในอาหารหลายประเภท แต่เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถทนความร้อนได้ การปนเปื้อนของเชื้อจึงมักเกิดขึ้นหลังจากอาหารได้ผ่านความร้อนแล้ว(post processing contamination)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิดโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากการกินอาหารที่มีสารพิษของ *S. aureus* เรียกว่า สตาฟิโลคอคคัส อินทอกซิเคชั่น (Staphylococcus intoxication) ซึ่งโดยทั่วไปเชื้อจะสามารถสร้างสารพิษได้ต้องมีจำนวนไม่ต่ำกว่า 10^6 โคโลนีต่อกรัมของอาหาร จึงทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ อาการป่วยที่พบโดยทั่วไป คือ มีน้ำลายมาก วิงเวียนศีรษะ อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วงอาจมีมูกเลือดปน

2. ผลของสารสกัดโพลีฟีนอลจากมะม่วงในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

จากรายงานผลการวิจัยของ Toshihide และคณะ (2000) พบว่าสารประกอบโพลีฟีนอลจากเมล็ดมะม่วงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดนี้ ได้คือ 50 ppm สารสกัดจากเปลือกมะม่วงสามารถยับยั้ง *S.aureus* A type ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ใช้ในการยับยั้ง (MIC) คือ 1000 ppm *S.aureus* B type โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 ppm *S.aureus* C type โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 ppm *S.aureus* D type โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 ppm *S.aureus* E type โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 ppm *S.aureus* TSST-1 โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 ppm *S.aureus* (MRSA) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 50 ppm

จากรายงานผลการวิจัยของ นภชลัช ยอดพรม (2549) ได้ศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่างๆ ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 2.1 แสดงผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในเปลือกมะม่วงดิบ 4 พันธุ์

เปลือกมะม่วง	ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบ (มิลลิกรัมกรดแกลลิค/กรัม สารสกัด)
มะม่วงฟ้าลั่น	143.26±2.32
มะม่วงเขียวเสวย	167.77±1.42
มะม่วงน้ำดอกไม้	213.11±2.22
มะม่วงแก้ว	220.80±4.80

ที่มา: นภชลัช ยอดพรม (2549)

จากรายงานการวิจัยดังกล่าวจึงใช้มะม่วงน้ำดอกไม้ในการทดลอง เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลในปริมาณที่สูง ราคาปานกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กลไลการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ (นภชลัช ยอดพรม , 2549)

สารต้านแบคทีเรียมีคุณสมบัติ ขอบข่าย และการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้ง หรือทำลายแบคทีเรีย โดยการขัดขวางการสร้างส่วนต่างๆของเซลล์ คือ ออกฤทธิ์ที่ระดับผนังเซลล์ ระดับเยื่อหุ้มเซลล์และสุดท้ายออกฤทธิ์ที่ระดับการสังเคราะห์ไซโตพลาสซึม (มาลิน จูลศิริ, 2540)

3.1 การออกฤทธิ์ที่ระดับผนังเซลล์

โดยทั่วไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ทั้งนี้แบคทีเรียและราต่างมีผนังเซลล์ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเซลล์ เป็นชั้นที่แข็งแรงคงทนเพื่อทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์ แต่ลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของกลุ่มเชื้อทั้งสองต่างกัน สำหรับแบคทีเรียผนังเซลล์เป็นโครงสร้างสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามลักษณะการติดสีแกรม (gram-stain) การติดสีแบบแอซิดฟาส์ท (acid-fast) การย้อมแบคทีเรียด้วยวิธีแบบแรก ทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียเป็นสองพวกคือ พวกแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียทั้งสองพวกนี้มีโครงสร้างพื้นฐานของผนังเซลล์เป็นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) แบคทีเรียแกรมบวก มีส่วนนี้หนามากกว่าพวกแกรมลบ แต่พวกแกรมลบมีส่วนของ ไลโพโพลีแซคคาร์ไรด์ (lipopolysaccharide) หุ้มรอบอีกชั้นหนึ่ง สารต้านจุลินทรีย์ชนิดที่มีกลไลการออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ส่วนใหญ่เป็นพวกที่ยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ไม่แข็งแรง แบคทีเรียแบ่งตัวไม่ได้ ได้แต่ยืดออก และเกิดรูที่ผนังเซลล์ ทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ไหลออกมาภายนอก และแตกในที่สุด

3.2 ออกฤทธิ์ที่ระดับเยื่อหุ้มเซลล์

โดยสารต้านแบคทีเรียจะไปรบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ลัดจากผนังเซลล์เข้ามา หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยทั่วไปคือเป็น osmotic barrier ที่ช่วยป้องกันไม่ให้สารต่างๆเข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป อีกทั้งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ electron transport และ oxidative phosphorylation ทำให้ตัวเซลล์แบคทีเรียถูกปล่อยออกมาน้อยลง นอกจากนี้ จะเข้าไปแทรกระหว่างโปรตีนและไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาด เป็นผลให้สารในไซโตพลาสซึมไหลออกมา ทำให้เซลล์ตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การออกฤทธิ์ที่ระดับการสังเคราะห์ไซโตพลาสซึม

โดยทั่วไปยับยั้งการนำไทมีน (thymine) เข้าจับกับนิวคลีโอไทด์ตัวอื่นๆทำให้การสร้าง DNA ไม่สมบูรณ์ และไปยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยไปทำให้กรดอะมิโน ไม่สามารถต่อกันเป็นโพลีเปปไทด์จึงไม่สามารถสร้างโปรตีนได้

Cowan (1999) ได้ศึกษาผลของสารประกอบโพลีฟีนอลที่สกัดได้จากพืชชนิดต่างๆต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่า สารประกอบโพลีฟีนอลในพืช ได้แก่ กรดไฮดรอกซีซินนามิค (hydroxycinnamic acid) , เฟลโวนอยด์ (flavonoids) , โปรเอนโทรไซยานิดิน (proanthocyanidins:tannins) , เอนโทรไซยานิน (anthocyanins) , เฟลโวน (flavons) , เฟลโวนอล (flavonols) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยกลไลการออกฤทธิ์ของสารประกอบโพลีฟีนอลต่อแบคทีเรียก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับ การยับยั้งการทำงานของไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzymes) ได้แก่ โปรติเอส (protease) และคาร์โบไฮโดรเลส (carbohydrolases) จึงมีผลต่อการทำงานของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรคทำให้สภาวะการเกาะติดเสียสภาพไป และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด

การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ (Sensitivity test) (นภชลัช ยอดพรม , 2549)

วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบ คือการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น (agar diffusion method) การแปรผลเบื้องต้นดูจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่าสารตัวอย่างที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านเชื้อ และถ้าไม่เกิดแสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเบื้องต้นของสารที่สงสัยมักใช้ วิธีดิสค์ – ดิฟฟิวชัน (disc diffusion method) เพราะไม่ต้องพะวงถึงตัวทำละลายที่จะใช้ในการละลายสารว่ามีผลกระทบต่อผลการทดสอบหรือไม่ ในการละลายให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่าที่ทำได้ บางทีแนะนำให้เตรียม 20% จากนั้นหยดสารละลายนี้ บนแผ่นซับกลม (paper disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร แล้วตั้งทิ้งไว้หรือเป่าให้ตัวทำละลายระเหยออกก่อนนำไปวางบนอาหารวุ้นที่เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบไว้ ภายหลังการบ่มเพาะตรวจสอบว่ามีบริเวณใสเกิดขึ้นหรือไม่ ถ้ามีให้เจือจางสารและดำเนินการทดสอบต่อโดยวิธีเดิมหรือใช้วิธีเจือจางในอาหารเหลว เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) ถ้าไม่มีบริเวณใสเกิดขึ้นก็อาจหยุดการทดสอบเพียงเท่านี้ แต่ถ้ายังสงสัยว่าสารที่ไม่ก่อให้เกิดบริเวณใสนี้น่าจะมีฤทธิ์ ก็อาจเปลี่ยนใช้วิธีเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดเหลวแทน เพราะสารออกฤทธิ์บางชนิดอาจไม่สามารถแพร่ในอาหารวุ้นได้ การทดสอบทุกครั้งต้องมีตัวทำละลาย (solvent control) และตัวยาที่รู้ประสิทธิผล (positive control) ทำควบคู่เสมอ

การทดสอบสารสกัดจากพืชซึ่งมักมีสีเข้ม ถ้าใช้วิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น ไม่ค่อยมีปัญหาจากเรื่องของตัวทำละลายที่อาจมีฤทธิ์ต้านเชื้อและการอ่านผล แต่ถ้าใช้วิธีเจือจางในอาหารเหลว อาจเกิดปัญหาทั้งสองอย่างได้โดยสีของสารสกัดอาจมีผลต่อการอ่านผลและตัวทำละลายอาจมีฤทธิ์ต้านเชื้อ เนื่องจากไม่สามารถระเหยตัวทำละลายออกไปได้อย่างเช่นการใช้วิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้นโดยผ่านแผ่นกระดาษซับกลม การแก้ปัญหาของตัวทำละลายที่อาจมีฤทธิ์ต้านเชื้อคือ หลังจากเจือจางด้วยตัวทำละลายนี้แล้ว ให้เจือจางต่อด้วยน้ำ ซึ่งตัวทำละลายที่ต้องทำควบคู่ก็ให้เจือจางในลักษณะเดียวกัน ส่วนการอ่านผลอาจต้องใช้วิธีหาค่า MBC แทน MIC เพราะสารสกัดที่มีสีเข้มหรือขุ่นจะทำให้อ่านผลยากแม้ใช้เครื่องมือช่วยก็อาจผิดพลาดได้ แต่ถ้ายังต้องการหาค่า MIC ให้เลือกใช้วิธีเจือจางในอาหารวุ้นการใช้วิธีนี้ปริมาณสารสกัดต้องมากพอเพราะ อัตราการเจือจางจะสูงกว่าวิธีเจือจางในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมีและวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

- เครื่องระเหยแบบหมุน (Model-R-200, BUCHI Labortechnik AG, Switzerland)
- ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, German)
- หม้อนึ่งความดัน (Model-Autoclave ss-245, Tomy SEIKO Co.,Ltd.,Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Memmert, German)
- เครื่องชั่งอิเลคทรอนิค (Model-DRAGON 3002, Mette tolado, Switzerland)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Model-CLF 460 EC,WOERDEN,Belgium)
- Autopipette (Eppendorf AG, German)
- เครื่องปั่น (Model-twist HR 1707, Philips, Indonesia)
- Paper disc (Schleicher&Schuell Microscience GmbH, German)
  เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
- UV Spectrophotometer (Shimadsu, Japan)
- Freeze drier&Lyophilizer (Labconco Corporation Kansas City, Missoues 64132)

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 95% Ethanol (Merck KGaA , Germany)
- Brain Heart Infusion (BHI) Broth (Criterion Dehydrated Culture Media)
- Baird – Parker medium (Merck KGaA , Germany)
- Rabbit plasma (Merck KGaA , Germany)
- Trypticase Soy Broth (Merck KGaA , Germany)
- Yeast Extract (Scharlau, German)
- NaCl (Lab-Scan Analytical Science)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาต้านจุลินทรีย์

Chloramphenicol (Oxoid, England)

วัตถุดิบ

- ตัวอย่างเอแคลร์จากร้านเบเกอรี่บริเวณ โชคชัย 4 ตลาดบางกะปิ ลาดพร้าว อนุเสาวรีย์ชัยสมรภูมิ
- เปลือกมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้ (ดิบ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การตรวจนับเชื้อ *S. aureus* ในเอแคลร์

ซื้อตัวอย่างเอแคลร์ในช่วงเช้าที่ร้านค้าเริ่มผลิตเพื่อจำหน่ายจากร้านเบเกอรี่บริเวณ โชคชัย 4 และตลาดบางกะปิบริเวณละ 1 ร้าน จากที่ลาดพร้าวและอนุสาวรีย์ชัยสมรภูมิบริเวณละ 2 ร้าน จากนั้นแบ่งเก็บตัวอย่างเอแคลร์เป็น 2 ส่วน คือส่วนแรกเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง และส่วนที่สองเก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น มาดำเนินการตรวจหาเชื้อ *S. aureus* จากเอแคลร์ทั้ง 2 อุณหภูมิที่เวลา 0 และ 6 ชั่วโมง โดยทำการทดสอบดังนี้

3.1.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ

3.1.2 เทน้ำยาเจือจาง (0.02 M phosphate-saline buffer ที่มี 1 % NaCl) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher

3.1.3 ทำการเจือจางตัวอย่างเพิ่มขึ้นอีก 1-2 ระดับ ตามความเหมาะสม โดยใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 ในขั้นต้น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดหรือขวดบรรจุน้ำยาสำหรับเจือจาง 9 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่าหลอดหรือขวดด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้า (mixer) หรือใช้มือเขย่าขึ้นลง อย่างแรง 25 ครั้ง ตัวอย่างอาหารในขั้นนี้จะมีความเจือจาง 1:100 (10^{-2}) ถ้าต้องการเตรียมตัวอย่างให้เจือจางในระดับต่อไปคือ 1:1000 (10^{-3}), 1:10000 (10^{-4}) เรื่อยไปตามลำดับ

3.1.4 ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนอาหาร Baird-Parker ระดับความเจือจางละ 2 จาน จานละ 0.1 มิลลิลิตร

3.1.5 ใช้แท่งแก้วรูปตัว L ทำการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่วตามวิธี spread plate ให้ครบทุกระดับความเจือจางที่ต้องการแล้วกลับจานเพาะเชื้อคว่ำลง นำเข้าบ่มเชื้อที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.1.6 ตรวจนับเฉพาะโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* โดยโคโลนีของเชื้อ *S. aureus* มีลักษณะกลมนูน สีดำเป็นมัน ผิวเรียบ ขอบขาว มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร มีตะกอนขุ่นรอบๆโคโลนี ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ lecithinase ทำปฏิกิริยากับเลซิทินในไข่แดงที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดตะกอนของเกลือฟอสเฟต เห็นเป็นตะกอนขุ่นที่เรียกว่า opaque หรือ creamy zone และมักพบโซนใสในอาหารเลี้ยงเชื้อถัดจาก opaque zone ในตัวอย่างอาหารแช่แข็งและอาหารแห้งโคโลนีของเชื้ออาจเกิดสีดำช้ากว่าปกติและขอบไม่เรียบได้

3.1.7ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อเขี่ยโคโลนีจากแต่ละจานเพาะเชื้อที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* เพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดที่มี BHI broth และหลอดอาหาร TSA slant (สำหรับทำการทดสอบซ้ำ) เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ของ *S. aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.8 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Coagulase ของ *S. aureus*

3.1.8.1 เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลงในหลอดทดลองปราศจากเชื้อขนาด 13 x 100 mm. หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร

3.1.8.2 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่ปราศจากเชื้อเขี่ยโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* เพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดที่มี BHI broth และหลอดอาหาร TSA slant (สำหรับทำการทดสอบซ้ำ) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.1.8.3 ดูด coagulase plasma with EDTA ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเชื้อ BHI broth บ่มเพาะเชื้อในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง

3.1.8.4 อ่านผล โดยดูการแข็งตัวของ plasma อันเนื่องจากเอนไซม์ coagulase ที่เชื้อ *S. aureus* สร้างขึ้น

3.2 การสกัดสารโพลีฟีนอลจากเปลือกมะม่วง

นำมะม่วงน้ำดอกไม้ดิบมาล้างให้สะอาดและปอกเปลือกด้วยมีด 2 คม นำเปลือกที่ได้มานึ่งเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและหั่นเป็นชิ้นขนาด 1x2 เซนติเมตร นำเปลือกมะม่วงที่หั่นเป็นชิ้น 40 กรัม ผสมกับ 95 % เอธานอล ปริมาตร 400 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ตีปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที นำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman No. 2 ระเหยตัวทำละลายออกเพื่อให้ได้สารสกัดเข้มข้นโดยเครื่องระเหยหมุนภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการระเหยตัวทำละลายออกให้หมดโดยการเติมน้ำกลั่นลงไปเป็นระยะ เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดแก้วสีชาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส นำไปทำแห้งด้วยวิธี Freeze drier&Lyophilizer

3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

3.3.1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ S. *aureus* ในอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB ที่ไม่เติมสารสกัดจากเปลือกมะม่วง เปรียบเทียบกับ TSB ที่เติมสารสกัดจากเปลือกมะม่วงโดยคำนวณให้มีสารสกัดในปริมาณ 40, 45 และ 50 mg/ml ตามลำดับ โดยหยดสารสกัดลงใน paper disc แล้วมี chloramphenicol เป็น Positive control และให้มีเชื้อเริ่มต้นใน ปริมาณ 10^5 cfu/ml

3.3.2 นำไปบ่มเพาะเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 ตรวจผลโดยการวัด clear zone รอบ paper disc ที่ระดับความเข้มข้นที่มี clear zone มาก จะนำระดับความเข้มข้นนี้มาใช้ยืนยันผลอีกครั้ง โดยการ spread plate

3.4 การตรวจสอบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงเป็นชนิด Bacteriostatic หรือ Bactericidal

3.4.1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากเอแคลร์ลงในอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เป็นสารแขวนลอยของเชื้อ

3.4.2 นำสารแขวนลอยของเชื้อที่ได้มาใส่ในอาหารเหลวเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB โดยให้มีเชื้อ *S. aureus* เริ่มต้นที่ 10^6 cfu/ml พร้อมกับใส่สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่มี clear zone มากที่สุดลงไป โดยเปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อ *S. aureus* เทียบกับหลอด TSB ควบคุมที่มีเชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml แต่ไม่เติมสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

3.4.3 ทำการ spread plate บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB โดยทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^6 cfu/ml ทำการspread plate ทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง โดย spread plate เปรียบเทียบระหว่าง TSB ที่เติมสารสกัดกับ TSB ที่ไม่เติมสารสกัด

3.4.4 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.5 นับจำนวนโคโลนีที่ได้ในแต่ละเวลา แล้วนำไป plot กราฟ ดูการเจริญของเชื้อ *S. aureus* จากทั้งหลอด TSB ที่มีการเติมสารสกัดจากเปลือกมะม่วงเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่เติมสารสกัดมะม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาปริมาณเชื้อ *S. aureus* ในไส้ครีมเอแคลร์โดยการเปรียบเทียบอุณหภูมิในการขายเอแคลร์ระหว่างอุณหภูมิห้องกับอุณหภูมิตู้เย็น(องศาเซลเซียส)

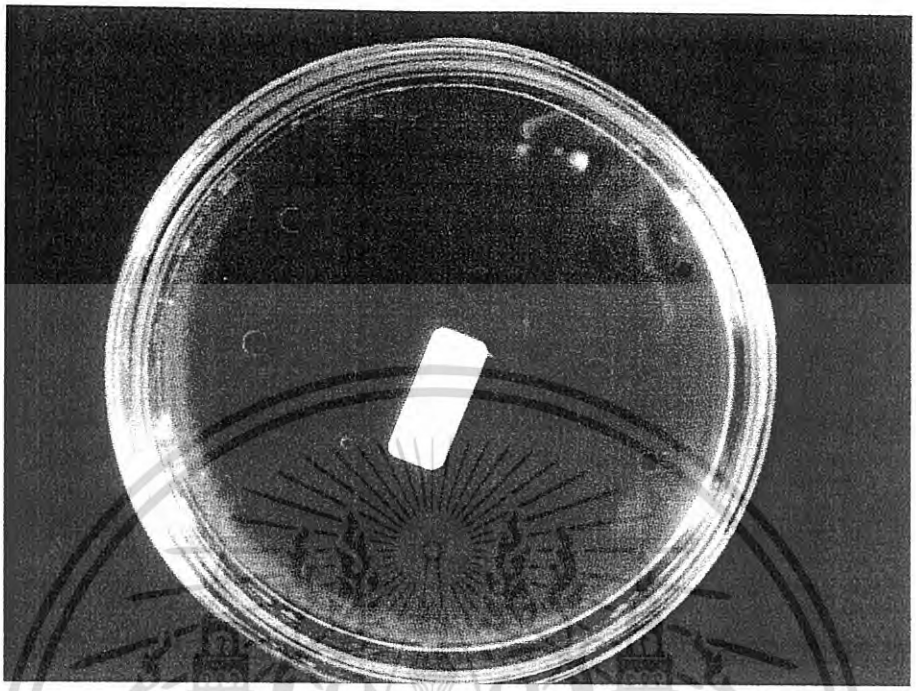
จากการสุ่มตัวอย่างเอแคลร์ในช่วงเช้าหลังการผลิตจากร้านเบเกอรี่บริเวณ โชคชัย 4 และตลาดบางกะปิบริเวณละ 1 ร้าน จากที่ลาดพร้าวและอนุสาวรีย์ชัยสมรภูมิบริเวณละ 2 ร้าน แล้วนำตัวอย่างเอแคลร์ทั้งหมดมาเก็บที่ห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ30 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น (ประมาณ 4-6 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้วทำการตรวจหาปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่เพิ่มขึ้นจากการเก็บที่ 2 อุณหภูมิ พบว่าที่อุณหภูมิและเวลาที่แตกต่างกันนั้นมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *S. aureus* พบว่าที่เวลาเริ่มต้นการเจริญของเชื้อ *S. aureus* จะยังไม่มาก แต่เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมงการเจริญของเชื้อจะมากขึ้นเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้องแต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นการเจริญของเชื้อจะคงที่หรือใกล้เคียงกับการเจริญของเชื้อที่เวลาเริ่มต้น ซึ่งเชื้อ *S. aureus* ที่พบจากเอแคลร์ทั้งหมดเมื่อนำไปทดสอบการหาเอนไซม์ Coagulase พบว่าทุกเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างเอแคลร์ทั้งหมดเป็นสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ Coagulase ได้ทั้งสิ้น จึงเป็นข้อมูลที่น่าเตือนให้ผู้จำหน่ายเอแคลร์ระมัดระวังในการจำหน่ายผลิตภัณฑ์ดังกล่าวว่า ควรเก็บเอแคลร์ไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็นหลังจากการผลิตซึ่งจะทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเอแคลร์ได้นานขึ้น

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ที่เวลาและอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

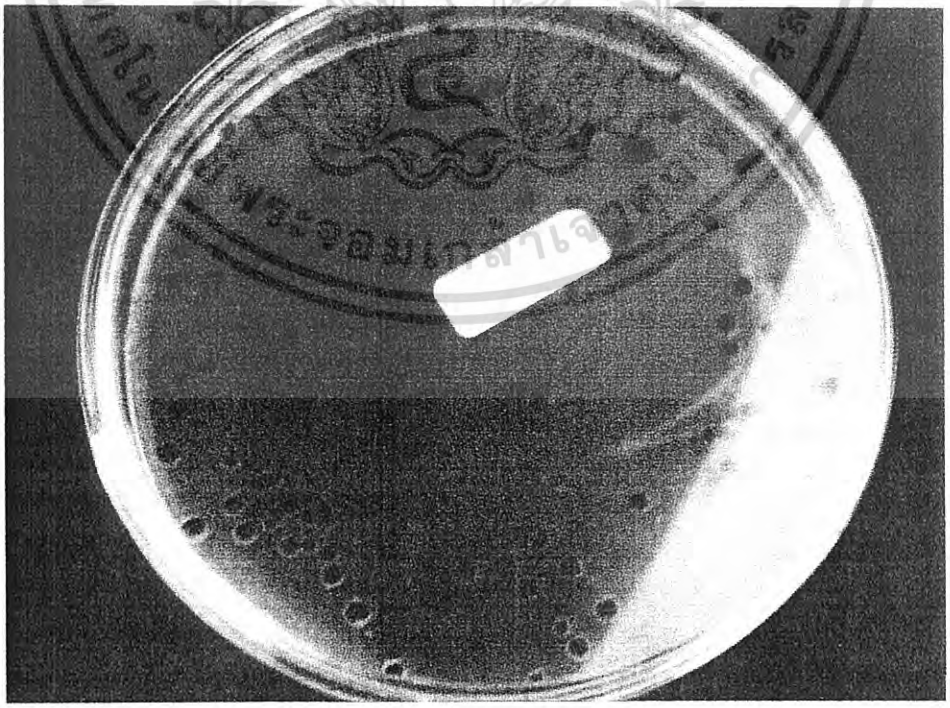
เวลา / อุณหภูมิ	จำนวนโคโลนี (CFU/กรัม)					
	ร้านที่ 1	ร้านที่ 2	ร้านที่ 3	ร้านที่ 4	ร้านที่ 5	ร้านที่ 6
0 ชั่วโมง/ อุณหภูมิห้อง	$<1x10^1$	$8.15x10^1$	$1.48x10^2$	$7.95x10^3$	$9.05x10^1$	$5.5x10^3$
6ชั่วโมง/ อุณหภูมิห้อง	$1.25x10^5$	$2.08x10^5$	$1.50x10^4$	$1.36x10^6$	$2.53x10^5$	$6.00x10^5$
6 ชั่วโมง/ อุณหภูมิตู้เย็น	$6.25x10^1$	$3.12x10^2$	$2.26x10^2$	$6.2x10^2$	$5.95x10^2$	$8.05x10^3$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96678



ภาพที่1 แสดงลักษณะของโคโลนีของเชื้อ S. *aureus*



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของโคโลนีของเชื้อ S. *aureus*

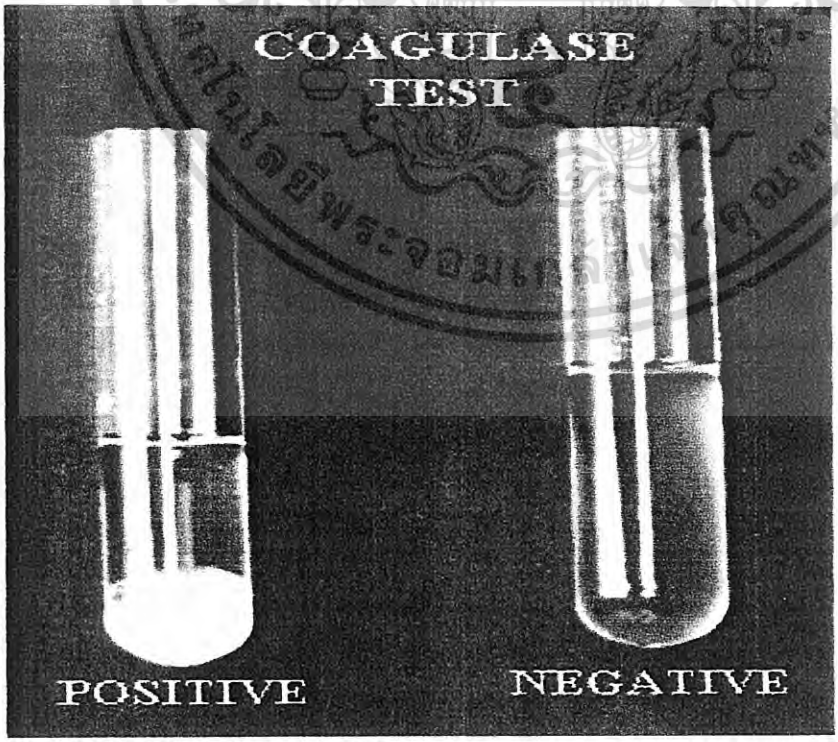
เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Coagulase ของ *S. aureus*

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Coagulase อาศัยหลักการที่ว่า Plasma กระต่ายที่นำมาใช้ในการทดสอบยังมีองค์ประกอบของ fibrin และ fibrinogen อยู่ เมื่อเชื้อ *S. aureus* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการสร้างเอนไซม์ Coagulase ออกมา เมื่อทำการเติม rabbit plasma ลงในหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อ Coagulase ในหลอดเพาะเลี้ยงเชื้อจะทำปฏิกิริยากับ fibrin และ fibrinogen ใน plasma แล้วเกิดการรวมตัวของ fibrin และ fibrinogen เกิดการแข็งตัว (clot) ขึ้น

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ Coagulase ของ S. *aureus*

ร้านค้าที่ทำการทดลอง	การสร้างเอนไซม์ Coagulase ของ *S. aureus*
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+



ภาพที่ 3 แสดงการเกิดตะกอนจากการสร้างเอนไซม์ Coagulase ใน rabbit plasma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

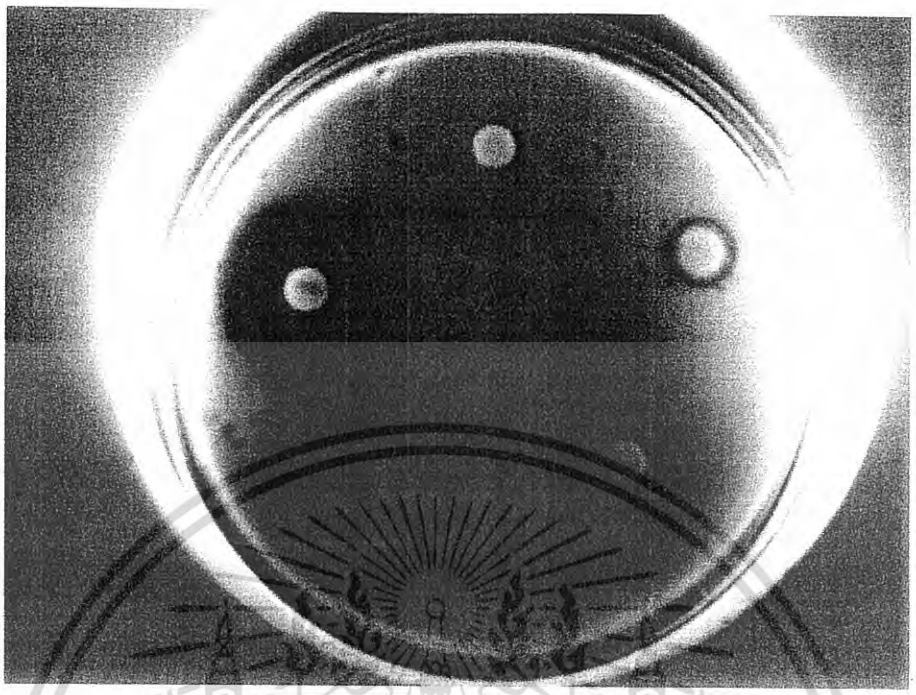
4.2 การศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

การประเมินสมบัติการต้านการเจริญของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง จะใช้การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธีให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น (agar disc diffusion method) ซึ่งการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ทั้งชนิดต้านการเจริญ (bacteriostatic) และทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) จะก่อให้เกิดวงใส (clear zone) รอบแผ่นกระดาษซับกลม (paper disc) ทดสอบโดยเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ดังนี้ คือ 40, 45, 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบกับแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในที่นี้คือ *S. aureus* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่น

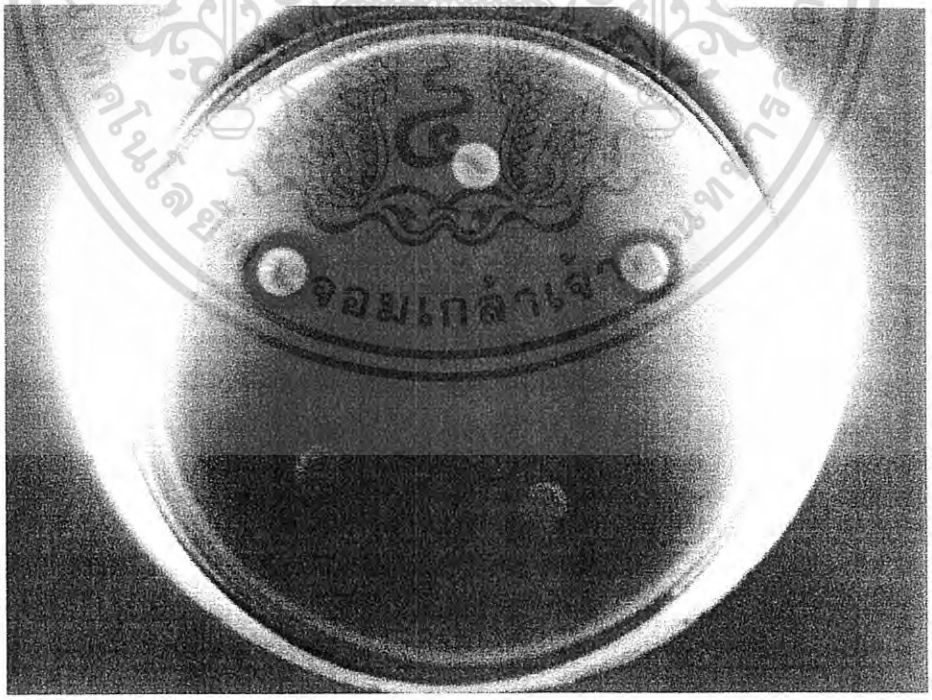
ตารางที่ 4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ *S. aureus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

ความเข้มข้นที่ทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร)								
	ร้านที่1			ร้านที่ 2			ร้านที่ 3		
40 mg/ml	0.30	0.40	0.40	0.40	0.40	0.35	0.40	0.50	0.40
45 mg/ml	0.40	0.40	0.40	0.40	0.45	0.40	0.40	0.55	0.45
50mg/ml	0.40	0.50	0.40	0.50	0.50	0.45	0.60	0.60	0.50
Solvent control (น้ำกลั่น)	0.10	0.20	0.10	0.20	0.10	0.10	0.20	0.10	0.10
Positive control (Chloramphinicol)	1.80	1.80	1.90	2.10	2.20	2.10	0.50	0.50	0.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นจากสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วง



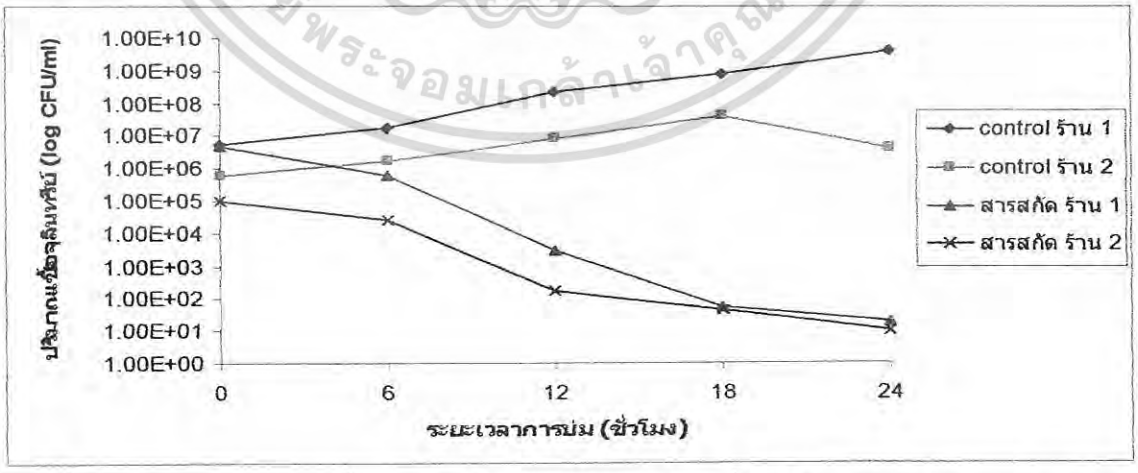
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของวงใสที่เกิดขึ้นจากสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การศึกษาสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้านการเจริญ (bacteriostatic) และทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal)

จากการนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมาใช้ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB Broth ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงให้ผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ โดยที่ ร้านที่1 ระยะการบ่มที่ชั่วโมงเริ่มต้นจากปริมาณเชื้อ 5.78log CFU/ml. เมื่อผ่านไป 24 ชั่วโมงพบเชื้อที่1.29 logCFU/ml. ร้านที่ 2 ระยะการบ่มที่ชั่วโมงเริ่มต้นจากปริมาณเชื้อ 5log CFU/ml. เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบเชื้อ 1log CFU/ml ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.1 เมื่อเปรียบเทียบ จุดควบคุม คือ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ + เชื้อ *S. aureus* 5.78และ 5 log CFU/ml. และจุดทดสอบ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ + เชื้อ *S. aureus* + สารสกัดจากเปลือกมะม่วง ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การตรวจสอบว่าสารสกัดมีสมบัติเป็นสารชนิดต้านการเจริญ (bacteriostatic) และทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) ทำโดยตรวจหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตอยู่ทุกๆ 6 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง พล็อตกราฟระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (log CFU/ml) กับระยะเวลา ถ้าสารสกัดเป็นชนิดต้านจุลินทรีย์ กราฟปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตที่ได้จะลดลงหรือคงที่ในช่วงการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง กรณีสารสกัดเป็นชนิดทำลายจุลินทรีย์ลักษณะของกราฟปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตได้ จะมีลักษณะลดลงจนไม่มีการเจริญของเชื้อในระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง จากกราฟภาพที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าสมบัติของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง เป็นชนิดทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) โดยพิจารณาจากกราฟปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ พบว่าลดลงจนไม่มีการเจริญของเชื้อในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่สามารถทำลาย S. *aureus* ได้คือ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ภาพที่ 4.1 ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง ที่มีต่ออัตราการเจริญของ *S. aureus* ภายใน 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบเชื้อ *S. aureus* ที่แยกได้จากร้านเบเกอรี่จาก2 แหล่ง ที่พบว่ามีการปนเปื้อนมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการที่สารสกัดจากเปลือกมะม่วงไม่สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* ให้หมดไปในเวลา 24 ชั่วโมง อาจเป็นเพราะ ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่ใช้ในการทดลองอาจจะไม่เหมาะสมที่จะไปทำลายเชื้อ *S. aureus* ได้หมด ดังนั้นอาจใช้สารสกัดที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นเพื่อใช้ในการทำลายเชื้อ *S. aureus* ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป และเนื่องจากการทดลองนี้เป็นการทดลองด้วยวิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น ซึ่งมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งวิธีการทดสอบเป็นการหยดสารสกัดลงบนแผ่นกระดาษซับกลม และมีการทิ้งให้แห้ง จึงอาจมีผลต่อคุณภาพของสารสกัดได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาและทดลองให้ใส่สารสกัดลงในไส้ครีมเอแคลร์เลย แล้วจึงนำไปทำการตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จันทิมา จาปะเกษตร์ และ สร้อยทอง สายหยุดทอง.2543. *รายงาน*ผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ **การปนเปื้อนของ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* ในไอศกรีมและเบเกอรี่** สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จรรยา นาคินทร์ และ รัติยา ไกรสัย 2546. ปัญหาพิเศษเรื่อง **การสกัดพริกยับยั้งเชื้อ *Staphyloccus aureus* และ *Salmonella anatum*** . สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร .

ชุลีกร สินธพรัตนะ 2548. สัมมนาปริญญาโท2 เรื่อง **การเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดและสมบัติการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารสกัดจากเนื้อและเปลือกกล้วยน้ำว้าที่ระดับความสุกต่างกัน.**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร

ธรรมธัช ศิริวังชัย และธาริณี อัมพุประภา.2546. ปัญหาพิเศษ เรื่อง **ผลของการใช้ Pediocin กับ กรดแลคติกในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในเนื้อ.**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. หน้า: 11-13

นภชลัช ยอดพรหม 2549. วิทยานิพนธ์เรื่อง **สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร .

พรรณ์วลัย. 2548. **การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตไส้ครีมเอแคลร์.**ภาควิชาอุสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, 30 น.

มาลิน จุลศิริ. 2540. **ยาต้านจุลชีพ.** สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน. กรุงเทพมหานคร.

วิจิตร วังใน. 2533. **การทำสวนมะม่วง.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

อดิศร เสวตวิวัฒน์, บุญเทียม พันธุ์เพ็งและ สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา, 2548. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยา** สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. Nutrition Reviews . 56: 317-333

Burns, J., Gardner, P.T., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., Mcphail, D.B. 2000. **Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity and phenolic content of red wines.** Agric Food Chem. 48:220-230.

Cowan, M.M. 1999. **Plants products as antimicrobial agents.** Clinical Microbiology Review.12:564-582

Huxley, A., Griffiths, M. and Levy, M. 1997. **The New Royal horticultural Society Dictionary of Gardening,** volume 3 L to Q. New york : The Stockton Press.

Larrauri, J. A. 1998. **High Dietary Fiber Powders With Associated Polyphenols.** [Online], available World wide Web, URL:http://ecsoc2.hcc.ru/DP_TOP1/dp032/dp032. htm.

Toshihide, K., Hadjime, N., Megumi, A., Shigeko, U., Yoshiharu, K., Shun'ichi, D. 2000. **Charaterization of Novel Antimicrobial Compounds from Mango (Mangifera indica L.) Kernel Seeds.** Journal Food Chemistry. 71:61-66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA

Peptone from casein (Tryptone)	15 กรัม
Peptone from soymeal (Soytone)	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

สารแขวนลอย 40 กรัม/ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.3±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วย NaCl , H_2SO_4 1 N. นำไป clave ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

Trypticase peptone	17 กรัม
NaCl	5 กรัม
Glucose	2.5 กรัม
Phytone peptone	3 กรัม
K_2HPO_4	2.5 กรัม
D.W.	1 กรัม

อุ่นละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายอาหารปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์หรือขวดที่มีจุก สำลี หรือฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker medium

1.1 Base medium

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	1 กรัม
Glycine	12 กรัม
Agar	15 กรัม
Beef extract	1 กรัม
Sodium pyruvate	10 กรัม
Lithium chloride.$6H_2O$	5 กรัม
D.W.	900 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Final pH 7.0±0.2

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลาย ปรับพีเอช เทสารละลายที่ได้ลงในฟลาสก์ 500 มิลลิลิตร ให้ได้ฟลาสก์ละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สารละลาย 1% Potassium tellurite

Potassium tellurite	1 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ละลาย Potassium tellurite ในน้ำกลั่น กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.3 Egg yolk-tellurite emulsion

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไข่ไก่ไว้ใน 0.1% $HgCl_2$ เป็นเวลาประมาณ 1 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาวโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มีจีดบอกปริมาตร ผสมไข่แดงและน้ำเกลือ 0.85% (normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมในอัตราส่วน น้ำเกลือ 0.85% 7 ส่วน+ ไข่แดง 3 ส่วน จากนั้นนำ Egg yolk emulsion ที่ได้จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย 1% Potassium tellurite ที่กรองปลอดเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์โดยวิธี viable plate count

1.หลักการ

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์โดยวิธี viable plate count เป็นการนับจำนวนจุลินทรีย์เฉพาะที่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถเพิ่มจำนวนเป็นโคโลนีได้บนอาหารวุ้น (agar medium) โดยถือหลักการที่ว่าเซลล์หนึ่งเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ที่อยู่ใกล้ๆกันจะเพิ่มจำนวนทับถมกันเป็น 1 โคโลนี

การตรวจนับจะให้ความแม่นยำที่สุดเมื่อ

1.1 ตัวอย่างมีความเจือจางพอเหมาะ คือ มีปริมาณจุลินทรีย์ในระดับที่เมื่อเจริญในอาหาร วุ้นแล้วมีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ

1.2 จุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารมีการกระจายดี และกาะกลุ่มกันน้อยที่สุด

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสม

1.4 อุณหภูมิและสภาพแวดล้อมอื่นๆเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์

2. การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate or surface plate)

เทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSA ลงในจานเพาะเชื้อทิ้งไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมงเพื่อให้ผิวหน้าแห้ง ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ต้องการปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วรูปตัว L (spreader) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ ลนไฟแล้วทิ้งให้เย็นในอากาศ เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายไปทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งทำได้โดยใช้มือช่วยหมุนจานเพาะเชื้อ กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีในระดับความเจือจางที่เหมาะสมได้ประมาณ 30-300 โคโลนี คำนวณจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิกรัมของตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เอแคลร์เป็นผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ชนิดหนึ่งที่พบปัญหาการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ เนื่องจากเอแคลร์มีส่วนผสมของไข่ในปริมาณมาก ซึ่งเป็นอาหารของจุลินทรีย์ และจากกระบวนการผลิตที่มีการสัมผัสกับมือผู้ผลิตภายหลังจากผ่านการให้ความร้อน จึงทำให้เอแคลร์สามารถพบเชื้อ *S .aureus* ได้ ในการทดลองจะทำการศึกษาถึงผลกระทบของ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เอแคลร์ โดยทำการสุ่มตัวอย่างจากร้านเบเกอรี่บริเวณต่างๆดังนี้ โชคชัย 4 ตลาดบางกะปิ ลาดพร้าว และอนุเสาวรีย์ชัยสมรภูมิ ทำการทดสอบโดยนำผลิตภัณฑ์เอแคลร์เฉพาะส่วนไส้ไปทำการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ พบว่าการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *S. aureus* ซึ่งได้มีการนำเชื้อ *S.aureus* ที่ได้จากไส้ครีมเอแคลร์ไปทำการยืนยันผลโดยทดสอบการเอนไซม์ Coagulase พบว่า *S. aureus* ที่ได้จากร้านเบเกอรี่ทุกร้านที่ทำการทดลองให้ผลในการทดสอบการสร้างเอนไซม์เป็นบวก แสดงว่า เชื้อที่ได้เป็น *S. aureus* จริง นอกจากนี้ยังพบว่าเอแคลร์ที่เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจะมีการเจริญของเชื้อคงที่หรือใกล้เคียงกับการเจริญของเชื้อที่เวลาเริ่มต้น แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจะพบการเจริญของเชื้อมาก ซึ่งแสดงว่าอุณหภูมิการเก็บรักษาในระหว่างการขายนั้นมีผลต่อการเสื่อมเสียของเอแคลร์ ดังนั้นผู้ผลิตหรือผู้จำหน่าย ควรเก็บผลิตภัณฑ์ระหว่างที่รอการจำหน่ายไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น เพื่อเป็นการยืดอายุการเก็บรักษา

จากรายงานการศึกษาของ (Toshihide และคณะ , 2000) พบว่าในเปลือกมะม่วงมีสารประกอบประเภทโพลีฟีนอลอยู่มาก ซึ่งสารประกอบนี้มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การทดลองนี้จึงนำเปลือกมะม่วงมาสกัดเอาสารโพลีฟีนอลเหล่านี้ออกมาเพื่อนำมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.aureus* จะทำการทดลองโดยใช้ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 40 , 45 และ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาทำการทดสอบด้วยวิธี Sensitive test พบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *S.aureus* ดีที่สุดโดยวัดจากความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสจะมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นๆ จึงได้นำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่ระดับความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาทำการศึกษาสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้านการเจริญ (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) โดยนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงมาใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ TSB broth ที่มีเชื้อ *S. aureus* อยู่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการตรวจหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตอยู่ทุก 6 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี Spread plate จากนั้นนำจำนวนเชื้อที่ตรวจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นับได้มา plot กราฟระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (log CFU/ml.) กับระยะเวลา พบว่าลักษณะของกราฟปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตนั้นมีลักษณะลดลงเรื่อยๆ โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้โดยร้านที่ 1 ระยะการบ่มที่ชั่วโมงเริ่มต้นจากปริมาณเชื้อ 5.78 log CFU/ml. เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบเชื้อ 1.29 log CFU/ml.ร้านที่ 2 ระยะการบ่มที่ชั่วโมงเริ่มต้นจากปริมาณเชื้อ 5 log CFU/ml. เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง พบเชื้อ 1 log CFU/ml แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงมีคุณสมบัติเป็น Bactericidal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้