สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MANGO PEEL EXTRACTS AGAINST CONTAMINATED PATHOGENS OPPORTUNISTICALLY FOUND IN YOGHURT

นภชลัช ยอดพรหม
NAPACHALUCH YODPROM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2423-5

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MANGO PEEL EXTRACTS AGAINST CONTAMINATED PATHOGENS OPPORTUNISTICALLY FOUND IN YOGHURT

นภชลัช ยอดพรหม

NAPACHALUCH YODPROM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2428-5

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF MANGO PEEL EXTRACTS AGAINST CONTAMINATED PATHOGENS OPPORTUNISTICALLY FOUND IN YOGHURT

NAPACHALUCH YODPROM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FOOD SANITATION

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2006

ISBN 974-15-2428-5

COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต
นักศึกษา	นางสาวนภชลัช ยอดพรหม
รหัสประจำตัว	46067912
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด ในสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบ (*Mangifera indica* L.) 4 พันธุ์ คือ มะม่วงแก้ว มะม่วงน้ำดอกไม้ มะม่วงเขียวเสวย และมะม่วงฟ้าลั่น พบว่า มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ 220.80 ± 4.80, 213.10 ± 2.22, 167.77 ± 1.42 และ 143.26 ± 2.32 มิลลิกรัม กรดแกลลิค/กรัม สารสกัด ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงทั้ง 4 พันธุ์ มาศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ (*E. coli, S.* Anatum, *Staph. aureus, L. innocua*) และแบคทีเรียแลคติค 2 สายพันธุ์ (*L. plantarum, P. pentosaceus*) ด้วยวิธีการให้สารที่ทดสอบแพร่ในอาหารวุ้น (agar disc diffusion method) พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงทั้ง 4 พันธุ์ ให้ผลการยับยั้ง *Staph. aureus* เพียงสายพันธุ์เดียว โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วให้ผลการยับยั้งดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์อื่น ๆ ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้สมบัติการต้าน *Staph. aureus* ยังมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตาม ($r^2 = 0.8082$, $r = 0.8990$) กับปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดที่มีในสารสกัดที่ทดสอบ โดยความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญ (minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลาย (minimum bactericidal concentration, MBC) *Staph. aureus* ภายใน 24 และ 6 ชั่วโมง ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว คือ 12.5, 45 และ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วมีความเสถียรที่ pH ในช่วง 4-6 โดยยังสามารถยับยั้ง *Staph. aureus* ได้ดี เมื่อทดสอบผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการเจริญของ *Staph. aureus* ในระหว่างการหมักโยเกิร์ต พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วสามารถลดปริมาณของ *Staph. aureus* ได้ 5.88 log CFU/ml ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดังกล่าว มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียแลคติคที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตโยเกิร์ตด้วย ซึ่งส่งผลให้การเซทตัวของโยเกิร์ตเกิดได้ไม่สมบูรณ์ ผลการทดลองดังกล่าวแสดง

ให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่ระดับความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาติเพื่อยับยั้ง *Staph. aureus* ได้ดี แต่อาจไม่เหมาะสมกับการใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

Thesis	Antimicrobial Activity of Mango Peel Extracts Against Contaminated Pathogens Opportunistically Found in Yoghurt
Student	Miss Napachaluch Yodprom
Student ID	46067912
Degree	Master of Science
Programme	Food Sanitation
Year	2006
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Praphan Pinsirodom

ABSTRACT

Total polyphenol contents in the ethanolic extracts of 4 varieties of mango peel, including Kaeo, Namdokmai, Khiaosawoey and Falan, were analyzed and the contents were 220.80 ± 4.80, 213.10 ± 2.22, 167.77 ± 1.42 and 143.26 ± 2.32 mg gallic acid/g extract, respectively. Antimicrobial properties of the four mango peel extracts were investigated against 4 species of food-borne pathogen (*E. coli, S.* Anatum, *Staph. aureus, L. innocua*) and 2 species of lactic acid bacteria (*L. plantarum, P. pentosaceus)* using agar disc diffusion method. All mango peel extracts showed positive inhibition only for *Staph. aureus*. Total polyphenol contents of the mango peel extracts and antimicrobial activity against *Staph. aureus* showed a linear correlation with $r^2 =$ 0.8082 and $r = 0.8990$. Further studies were done for the extract from the peel of Kaeo on minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) in 24 and 6 hours against *Staph. aureus*, the results were 12.5, 45 and 90 mg/ml, respectively. In addition, antimicrobial activity of the extract against *Staph. aureus* was stable under the pH 4 to 6. The mango peel extract at the concentration of 90 mg/ml was then used to test its ability to inhibit *Staph. aureus* during a model yoghurt fermentation. The extract could reduce counts of the *Staph. aureus* by 5.88 log CFU/ml. However, lactic acid bacteria used as starter culture in the yoghurt were also inhibited by the mango peel extract at the concentration used, which resulted in incomplete curd setting of yoghurt. The results indicated that the mango peel extract at the concentration of 90 mg/ml can potentially be used as natural antimicrobial agent against *Staph. aureus*, yet may not be appropriate for yoghurt.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม ที่ให้เกียรติเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รวมทั้งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ผู้ซึ่งให้คำแนะนำด้านจุลชีววิทยา รวมทั้งให้เกียรติเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในสาขาวิชาสุขาภิบาลอาหารและสาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร ทุกท่านที่ได้แนะนำแนวทางในการศึกษาข้อมูล การนำเสนอวิทยานิพนธ์ รวมทั้งความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร พี่ น้อง และเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท สาขาสุขาภิบาลอาหาร และสาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ที่ให้กำลังใจและให้การช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณคุณสุชาติ ภูษณะดิลก ที่ได้ให้ความรู้ และคำแนะนำต่าง ๆ

ท้ายสุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อประจำและคุณแม่เพ็ญศรีที่ให้การสนับสนุนการเรียนในทุก ๆ ด้าน ขอขอบคุณ พี่หนึ่ง น้องต้นและน้องตีตี้ ที่เป็นกำลังใจตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ครูบาอาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน หากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ข้าพเจ้าขอน้อมรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

นภชลัช ยอดพรหม

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....VIII

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 มะม่วง (Mango).....3

2.2 โยเกิร์ต (Yoghurt).....9

2.3 สารประกอบฟีนอลิค (Phenolic compounds).....18

2.4 การใช้สารประกอบฟีนอลิคในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค.....21

2.5 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ (Sensitivity Test).....24

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....26

3.1 วัตถุดิบ.....26

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์.....27

3.3 สถานที่ดำเนินงาน.....27

3.4 วิธีการทดลอง.....27

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....33

4.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenols) ในสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่าง ๆ.....33

สารบัญ (ต่อ)

4.2 การศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่าง ๆ 34

4.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) และสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้าน (bacteriostatic)หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) 41

4.4 ผลของ pH ต่อความเสถียรของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว 45

4.5 การศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มี โอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต 48

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 52

5.1 สรุปผลการทดลอง 52

5.2 ข้อเสนอแนะ 53

บรรณานุกรม 54

ภาคผนวก 58

ภาคผนวก ก 59

ภาคผนวก ข 62

ภาคผนวก ค 64

ภาคผนวก ง 67

ประวัติผู้เขียน 68

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 การจำแนกกลุ่มพันธุ์มะม่วงต่าง ๆ 4

2.2 องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกมะม่วงสุก....6

2.3 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในเปลือกมะม่วงสุก พันธุ์ทอมมี่ แอทกินส์ (Tommy Atkins)....7

2.4 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดมะม่วง....8

2.5 องค์ประกอบสำคัญที่มีในโยเกิร์ต....11

2.6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนน้ำนมสำหรับการผลิตโยเกิร์ต....13

2.7 โครงสร้างหลักของสารประกอบฟีนอลิคกลุ่มต่าง ๆ ในพืช....20

4.1 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในเปลือกมะม่วงดิบ 4 พันธุ์....34

4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่าง ๆ 39

4.3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นเมื่อปรับ pH ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในการทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียแลคติค....47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กระบวนการผลิต Set yoghurt และ Stirred yoghurt	17
4.1	กราฟมาตรฐานกรดแกลลิคสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด	33
4.2	ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *E. coli* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ	35
4.3	ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *S.* Anatum โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ	36
4.4	ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *L. innocua* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ	36
4.5	ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ	37
4.6	ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *L. plantarum* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ	37
4.7	ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *P. pentosaceus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ	38
4.8	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดบนแผ่นกระดาษซับกลมและขนาดวงใสที่เกิดขึ้น ในการทดสอบสมบัติการต้าน *Staph. aureus* ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ	40
4.9	ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ภายใน 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 3.125 – 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	42
4.10	ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ภายใน 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 25 – 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	43
4.11	ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ภายใน 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 50 – 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร	44
4.12	ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่มีการปรับให้มี pH ต่าง ๆ กัน	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

4.13 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *L. plantarum* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่มีการปรับให้มี pH ต่าง ๆ กัน....46

4.14 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *P. pentosaceus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่มีการปรับให้มี pH ต่าง ๆ กัน....47

4.15 ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในโยเกิร์ต ที่มีต่ออัตราการ เจริญของ *Staph. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในระยะเวลาการบ่มโยเกิร์ต 6 ชั่วโมง....48

4.16 ผลการยับยั้ง *L. bugaricus* ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในระหว่างการหมักโยเกิร์ต....50

4.17 ผลการยับยั้ง *S. thermophillus* ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในระหว่างการหมักโยเกิร์ต....50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

จุลินทรีย์ในอาหารมีทั้งชนิดที่เป็นคุณและเป็นโทษ จุลินทรีย์ที่เป็นคุณนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ตัวอย่างเช่น การใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตอาหาร ได้แก่ แบคทีเรียแลคติค (Lactic acid bacteria : LAB) ใช้ในการผลิตโยเกิร์ตรวมทั้งผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่น ๆ การใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะ ชีวสารต่าง ๆ ใช้ในทางพันธุกรรม และย่อยสารต่าง ๆ เป็นต้นสำหรับจุลินทรีย์ในอาหารที่เป็นโทษ ซึ่งไม่เพียงแต่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือเสื่อมคุณภาพเท่านั้น จุลินทรีย์หลายชนิดยังทำให้เกิดโรคกับมนุษย์โดยเฉพาะแบคทีเรีย ซึ่งเป็นตัวการสำคัญถือเป็นความเสี่ยงสูงสุดที่ผู้ผลิตจะต้องกำจัดออกไปจากห่วงโซ่อาหารเป็นลำดับแรก อันตรายของแบคทีเรียก่อโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายอย่าง ได้แก่ ชนิดและปริมาณของเชื้อที่ได้รับรวมทั้งระบบภูมิต้านทานของร่างกาย ในคนที่มีสุขภาพอ่อนแออาจก่อให้เกิดโรครุนแรงถึงชีวิต สำหรับคนที่มีสุขภาพแข็งแรงอาจมีอาการเล็กน้อยจนถึงขั้นไม่มีการแสดงอาการใด ๆ ในอดีตมีการใช้สารเคมีสังเคราะห์หลายชนิด ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งในปัจจุบันพบว่าผู้บริโภคในหลายประเทศทั้งในทวีปยุโรปและอเมริการวมถึงเอเชีย เริ่มมีการต่อต้านการบริโภคอาหารที่มีสารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้เกิดปัญหาแก่ผู้ผลิตอาหารรายใหญ่ของโลกอย่างประเทศไทยเป็นอย่างมาก ซึ่งส่วนใหญ่ได้มีการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อใช้ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ดังนั้นปัจจุบันจึงเริ่มมีการหันมาใช้สารชีวภาพซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งสารชีวภาพที่ใช้ ได้แก่ สารสกัดจากสมุนไพรชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาสารสกัดจากพืชผักและผลไม้บางชนิด เพื่อนำมาใช้ประโยชน์โดยองค์ประกอบที่สำคัญของพืชที่มีผลยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิคโดยมีรายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดและกากองุ่นซึ่งมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิคอยู่ประมาณ 667.87 และ 45.44 มิลลิกรัม สมมูลของกรดแกลลิค/กรัม ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้ (Nilgun *et al.*, 2003) นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดมะม่วงซึ่งมีสารประกอบฟีนอลิคอยู่ 79.5 มิลลิกรัม/100 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้เช่นเดียวกัน (Toshihide *et al.*, 2000) ประเทศไทยมีการเพาะปลูกมะม่วงได้หลายพันธุ์ ซึ่งมีทั้งพันธุ์ที่บริโภคสดและพันธุ์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่าง ๆ ส่วนของเปลือก

มะม่วง มีการนำมาใช้ประโยชน์น้อยมาก โดยส่วนใหญ่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์หรือทิ้งเป็นขยะ ซึ่งในส่วนของเปลือกนั้นพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิคอยู่เช่นเดียวกันกับส่วนของเมล็ด (Larrauri, 1998) จึงน่าจะนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์โดยการสกัดสารชีวภาพเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น โยเกิร์ต เนื่องจากมีรายงานพบว่าสารสกัดจากเมล็ดของมะม่วงไม่มีผลยับยั้ง แบคทีเรียแลคติค (Toshihide *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสำคัญของการผลิตโยเกิร์ต โดยสารสกัดจากส่วนของเปลือกก็น่าจะมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับส่วนของเมล็ด ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงศึกษาสมบัติของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยเฉพาะกลุ่มที่มีโอกาสพบในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ

1.2.2 ศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุด ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) และศึกษาสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้าน (bacteriostatic) หรือ ทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal)

1.2.3 ศึกษาผลของการใช้สารสกัดที่ได้จากเปลือกมะม่วง ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดที่มีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาผลของการใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่มีสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรคในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับเลือกระดับความเข้มข้นของสารสกัดไปใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการนำสารสกัดจากพืชมาใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติ เพื่อทดแทนการใช้สารต้านจุลินทรีย์สังเคราะห์

บทที่ 2

ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 มะม่วง (Mango)

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.) มะม่วงไขแลนหรือกิเลน (*M. cochichinensis* Engl.) มะม่วงป้อม (*M. lagenifera* Griff.) มะม่วงกะล่อน (*M. caloneura* Kurz.) มะม่วงคัน (*M. quadrifida* Jack.) มะม่วงชัน (*M. gracilipes* Hook. f.) มะม่วงจิ้งหรีด (*M. odorata* Griff.) มะม่วงบาป (*M. camptosperma* Pierre.) เป็นต้น แต่ชนิดที่นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายและเป็นการค้าคือ มะม่วงบ้าน (*Mangifera indica* L.) (วิจิตร, 2533) ซึ่งพบในอินเดียมากกว่า 4,000 ปี และแพร่กระจายไปยังภูมิภาคเอเชียใต้ แอฟริกา และอเมริกาใต้ ปัจจุบันปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วไปในเขตร้อนและร้อนชื้น อินเดียเป็นประเทศที่มีการปลูกมากที่สุดให้ผลผลิตประมาณ 9 ล้านตันต่อพื้นที่ 1 ล้านแฮกแตร์ (6.25 ล้านไร่) ประเทศผู้นำในการส่งออกมะม่วง ได้แก่ แม็กซิโก และมาลี (Mali, แอฟริกาตะวันตก) มะม่วงจัดเป็นไม้ผลเศรษกิจที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากปลูกง่ายโตเร็ว นอกจากนี้การรับประทานมะม่วงยังเป็นประโยชน์ให้คุณค่าทางอาหารแก่ร่างกาย เนื่องจากเนื้อมะม่วงประกอบด้วยน้ำตาล 15 % โปรตีน 0.5 % และอุดมไปด้วยวิตามิน เอ บี และซี (Huxley *et al.*, 1997)

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

การจัดแบ่งกลุ่มมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้ลักษณะใบและทรงผลเป็นหลักรวมถึงลักษณะอื่น ๆ ภายนอก เช่น ทรงพุ่มต้น ช่อดอก เป็นองค์ประกอบ ทำให้สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์มะม่วงได้ 8 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การจำแนกกลุ่มพันธุ์มะม่วงต่าง ๆ

ชื่อกลุ่มพันธุ์มะม่วง	ลักษณะทรงผล (fruit shape)	ลักษณะทรงใบ (leaf shape)	ลักษณะปลายใบ (leaf apex)	ลักษณะฐานใบ (leaf base)	ลักษณะขอบใบ (leaf margin)
1. กลุ่มแก้ว เช่น แก้วขาว แก้วเขียว แก้วจุก หนองแซง	รูปไข่กลับ (obovate)	ป้อมโคนใบ (lanceolate)	สอบเรียว (attenuate)	แหลม (acute)	เรียบ (entire)
2. กลุ่มเขียวเสวย เช่น เขียวเสวย ทองดำ ลิ้นงูเห่า ฟ้าลั่น ขุนทิพย์	รูปขอบขนาน (oblong)	ขอบขนาน (oblong)	สอบเรียว (attenuate)	สอบเรียว (attenuate)	เรียบ (entire)
3. กลุ่มน้ำดอกไม้ เช่น น้ำดอกไม้ น้ำดอกไม้ทวาย น้ำดอกไม้สีทอง	ทรงกระบอก (cylindrical)	ขอบขนาน (oblong)	สอบเรียว (attenuate)	-	เรียบ (entire)
4.กลุ่มหนังกลางวัน เช่น หนังกลางวัน	ทรงกระบอก (cylindrical)	ขอบขนาน (oblong)	สอบเรียว (attenuate)	-	เรียบ (entire)
5. กลุ่มอกร่อง เช่น อกร่องเขียว อกร่องทอง พิมเสนเปรี้ยว	ทรงรี (elliptical)	ป้อมโคนใบ (lanceolate)	เรียวแหลม (acuminate)	แหลม (acute)	เรียบ (entire)
6.กลุ่มพราหมณ์ เช่น พราหมณ์เนื้อเหลือง มะปราง	รูปไข่ (ovate)	ป้อมกลางใบ (elliptical)	เรียวแหลม (acuminate)	แหลม (acute)	เรียบ (entire)
7. กลุ่มผลกลม เช่น ตลับนาค อินทรชิต	กลม (roundish)	ป้อมกลางใบ (elliptical)	สอบเรียว (attenuate)	แหลม (acute)	เรียบ (entire)
8.กลุ่มเบ็ดเตล็ด เช่น เงาะ มันทะฟ้า มันหมู พระยาเสวย	ไม่สามารถจัดกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งได้	ไม่อยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง	ไม่อยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง อาจมีลักษณะกลุ่มหนึ่งปนกับอีกกลุ่มหนึ่ง	ไม่อยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง อาจมีลักษณะกลุ่มหนึ่งปนกับลักษณะอีกกลุ่มหนึ่ง	ไม่อยู่ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง อาจมีลักษณะกลุ่มหนึ่งปนกับลักษณะอีกกลุ่มหนึ่ง

ที่มา : กรมวิชาการเกษตร (2546)

สำหรับลักษณะโดยทั่วไปของมะม่วงมีดังนี้ (เฉลิมชัย แก้ววรชาติ, 2539)

ราก มะม่วงมีระบบรากเป็นรากแก้ว สามารถไชชอนลงสู่ใต้ดินได้ลึกพอสมควร ซึ่งอาจลึกได้ถึง 6 เมตร สำหรับรากดูดซึมอาหารจะอยู่หนาแน่นที่บริเวณผิวดินลึกประมาณ 30-60 เมตร และจะแผ่กว้างออกเป็นรัศมีประมาณ 750 เซนติเมตร โดยรอบลำต้น ในบางครั้งอาจเห็นรากมะม่วงเจริญโผล่ขึ้นมาบนดินให้เห็นหากขาดการพูนโคนเป็นเวลานาน

ลำต้น ลักษณะลำต้นตรง สูงประมาณ 10-14 เมตร มีสีน้ำตาลเทาหรือเกือบดำ ขนาดของลำต้นขึ้นอยู่กับพันธุ์และอายุของต้นมะม่วง เปลือกและลำต้นแข็ง มีลักษณะขรุขระและมีเกล็ดมาก เปลือกอ่อนสีเขียวแต่เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เนื้อไม้เมื่ออายุน้อยจะมีสีเขียว เมื่อแก่มีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแกมแดง ซึ่งสามารถนำมาแปรรูปใช้ในการก่อสร้างได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะเครื่องเรือนที่อยู่ในร่ม มีกิ่งก้านสาขาใหญ่และแข็งแรงลักษณะทรงพุ่มเป็นรูปครึ่งวงกลม หรือรูปไข่ หรือรูปไข่ค่อนข้างยาว

ใบ ใบมะม่วงเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวสลับกันทำให้มีลักษณะใบเรียงตัวเป็นเกลียว ใบไม่มีขน ไม่มีหูใบ ผลิใบออกมาเป็นระยะ ๆ ใบอ่อนมักมีสีออกแดง เมื่อใบแก่เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ผิวใบเป็นมัน ก้านใบยาว 1-10 เมตร แผ่นใบยาว 8-40 เซนติเมตร กว้าง 2-10 เซนติเมตร ใบมีรูปร่างแบบรูปโล่ห์ รูปไข่และเรียงยาว ฐานใบแคบและค่อย ๆ กว้างออกคล้ายรูปลิ่มแหลม ปลายใบแหลม เส้นกลางใบเด่นชัด ปากใบอยู่ที่ผิวใบทั้ง 2 ด้าน แต่ผิวใบด้านล่างมีจำนวนปากใบมากกว่าผิวใบด้านบน ใบมะม่วงมีอายุประมาณ 1 ปีหรือมากกว่านั้น

ช่อดอกและดอก มะม่วงจะออกดอกที่ปลายกิ่งหรือตาตามกิ่ง ช่อดอกยาวประมาณ 10-16 เซนติเมตร ในแต่ละช่อจะมีดอกประมาณ 1,000-6,000 ดอก ก้านช่อดอกมักเจือสีแดงและมักมีขน ในแต่ละช่อดอกมีดอก 2 ชนิด คือ ดอกตัวผู้และดอกสมบูรณ์เพศ ปกติจะมีดอกสมบูรณ์เพศอยู่เพียง 1-30 เปอร์เซ็นของจำนวนดอกทั้งหมด ซึ่งจะมีมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ปริมาณแสงสว่างและฤดูกาล

ดอกมะม่วง เรียงตัวเป็นช่อดอกย่อยแบบ Cyme มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-8 มิลลิเมตร ก้านดอกสั้นมาก มีกลิ่นหอม มีหลายสีแตกต่างกัน เช่น แดง ชมพูหรือขาว กลีบเลี้ยงมักมี 5 กลีบแยกกัน กลีบเลี้ยงมีลักษณะโค้งนูนสีเขียวอมเหลือง มีขนแข็งยาวๆ ปกคลุมอยู่ กลีบดอกมักมี 5 กลีบ กลีบดอกยาวเป็น 2 เท่าของกลีบเลี้ยง ระหว่างชั้นกลีบดอกและอับเกสรตัวผู้มีแผ่นจานวงกลม 5 พูคั่นอยู่ มีเกสรตัวผู้แทรกอยู่ที่ขอบด้านนอกของจานวงกลม 5 อัน เกสรตัวผู้ที่ทำงานได้มีจำนวนเพียง 1 อัน หรือไม่เกิน 2 อัน เกสรตัวผู้ที่เหลือจะไม่ทำงาน เกสรตัวผู้ยาว 2 มิลลิเมตร มีสี

ชมพูเมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงในดอกตัวผู้ เกสรตัวเมียจะฝ่อไป ส่วนในดอกสมบูรณ์เพศจะมีรังไข่ 1 ช่อง รูปร่างเบี้ยว ไม่มีก้าน ก้านเกสรตัวเมียและยอดเกสรตัวเมียมีขนาดเล็ก ไข่มีจำนวน 1 ฟอง

ผล ผลมะม่วงมีความแตกต่างกันมากในเรื่องของขนาด รูปร่าง สี ปริมาณเสี้ยน รสชาติและกลิ่น ผิวผลเรียบ ความยาวของผลมีตั้งแต่ 2.5-30 เซนติเมตร กว้าง 1.5-10 เซนติเมตร รูปร่างของผลมีตั้งแต่กลมไปจนถึงรูปไข่ค่อนข้างยาว ผลมักจะแบนด้านข้าง รูปร่างของผลอาจแตกต่างกันในส่วนของแก้ม ไหล่ หลัง ปลาย คางและจะงอย สีของผลประกอบด้วยส่วนผสมของสีต่าง ๆ เช่น สีเขียว เหลืองและแดง รสชาติมีตั้งแต่หวานและฉ่ำน้ำมากไปจนถึงเปรี้ยวและค่อนข้างแข็ง กลิ่นมีตั้งแต่กลิ่นอ่อนไปจนถึงกลิ่นรุนแรง ผลจะแก่ภายใน 3-4 เดือนหลังจากดอกบาน สำหรับความหนาของเนื้อมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับพันธุ์

เปลือก เปลือกมะม่วงมีความแตกต่างกันในเรื่องของความหนาของเปลือก สีของเปลือกดิบและเปลือกสุก โดยความหนาของเปลือกมีขนาดตั้งแต่ 0.09-0.25 เซนติเมตร สี มีสีต่าง ๆ เช่น สีเขียว เหลืองและแดง ทั้งนี้เปลือกนั้นพบว่าเป็นแหล่งของ น้ำตาล (sugars) เพกติน (pectin) โปรตีน (protein) และเส้นใย (fiber) ดังแสดงในตารางที่ 2.2 โดยเพกตินจากเปลือกมะม่วงนั้น จัดเป็นเพกติน ที่มีคุณภาพดีเหมาะสำหรับนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแยม เยลลี่ มาร์มาเลด นอกจากนั้นในเปลือกมะม่วงยังมีสารประกอบฟีนอลิค ดังแสดงในตารางที่ 2.3 ซึ่งสารประกอบในกลุ่มนี้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกมะม่วงสุก

องค์ประกอบทางเคมี	น้ำหนักแห้ง (%)
น้ำตาล (total sugars)	48.1
น้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugars)	40.8
แป้ง (starch)	2.9
เพกติน (pectin)	12.9
โปรตีน (protein)	3.9
เส้นใย (crude fiber)	8.4
แทนนิน (tannins)	2.3
เถ้า (ash)	2.9
ไขมัน (fat)	-

ที่มา : Beerh (1976)

ตารางที่ 2.3 ชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคที่พบในเปลือกมะม่วงสุก พันธุ์ทอมมี่ แอทกินส์ (Tommy Atkins)

ชนิดของสารประกอบฟีนอลิค	ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิคในเปลือกมะม่วง (มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง)
Mangiferin	75.1±1.3
Isomangiferin	3.0±0.1
Mangiferin gallate	7.6±0.5
Isomangiferin gallate	2.4±0.3
Quercetin 3-*O*-glucoside	1.8±0.2
Rhamnetin 3-*O*-galactoside/glucoside	0.2±0.0
Quercetin	2.7±0.1
Ellagic acid	36.6±1.3
Total	129.4±2.0

ที่มา : Beradini และคณะ (2005)

เมล็ด · เมล็ดที่อยู่ถัดจากเปลือกชั้นในเข้าไป มีขนาดแตกต่างกันไปตั้งแต่ขนาดใหญ่ไปจนถึงเกือบไม่มีเมล็ดหรือเมล็ดลีบ เปลือกหุ้มเมล็ดมีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นใน มีใบเลี้ยง 2 อัน อาหารเลี้ยงตัพภะไม่อยู่ในใบเลี้ยง เมล็ดมะม่วงพบเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไนโตรเจน (nitrogen) ไขมัน (fat) และสารประกอบฟีนอลิค ดังแสดงในตารางที่ 2.4 ซึ่งสารประกอบฟีนอลิค จากเมล็ดมะม่วงนั้น พบว่า สามารถนำไปใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด (Toshihide *et al.*, 2000)

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดมะม่วง

องค์ประกอบทางเคมี	น้ำหนัก (มิลลิกรัม/100 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง)
คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)	21.7
ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)	3.1
เถ้า (ash)	1.6
ไขมัน (fat)	0.5
สารประกอบฟีนอลิค (phenolic compounds)	79.5

ที่มา : Toshihide และคณะ (2000)

ลักษณะประจำพันธุ์ของมะม่วงที่นิยมปลูกในปัจจุบันมีดังนี้ (เฉลิมชัย แก้ววรชาติ, 2539)

1. น้ำดอกไม้ เป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกกันทั่วไป ระยะตั้งแต่ออกดอกจนกระทั่งผลแก่ ใช้เวลาประมาณ 115 วัน ทรงผลค่อนข้างกลมยาว มีขนาดปานกลาง ขนาดผลเฉลี่ยยาว 16 เซนติเมตร กว้าง 7.2 เซนติเมตร และหนา 6.9 เซนติเมตร น้ำหนักต่อผลประมาณ 330 กรัม ผลแก่มีเปลือกสีเขียวอ่อนนวล เนื้อแน่น หนา สีขาว รสเปรี้ยวจัด เมื่อแก่มีรสมัน เมื่อผลสุกเปลือกมีสีเหลืองอมเขียวจนถึงเหลืองเปลือกค่อนข้างบางช้ำง่าย รสหวานไม่จัด กลิ่นหอม เมล็ดแบน มีเนื้อในเมล็ดเล็ก

2. เขียวเสวย เป็นพันธุ์ที่รู้จักกันมานานของชาวอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม นิยมปลูกกันมากเพราะขายได้ราคาดีเมื่อเทียบกับมะม่วงพันธุ์อื่น ๆ การเจริญเติบโตและการแตกกิ่งของมะม่วงพันธุ์นี้ค่อนข้างช้า มักออกดอกติดผลยากในสภาพการปลูกทั่ว ๆ ไป ระยะตั้งแต่ออกดอกจนกระทั่งผลแก่ใช้เวลาประมาณ 105 วัน ผลมีขนาดปานกลาง ขนาดผลเฉลี่ย 14.7 เซนติเมตร กว้าง 6.9 เซนติเมตร และหนา 6.4 เซนติเมตร ทรงผลยาว น้ำหนักต่อผลประมาณ 335 กรัม เปลือกหนาและเหนียว เนื้อสีขาวอมเหลือง เนื้อผลดิบมีรสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย มันกรอบ ผลสุกผิวของเปลือกสีเขียวปนเหลือง สีของเนื้อเหลือง ลักษณะเนื้อละเอียด มีเสี้ยนน้อย รสหวานอร่อย เมล็ดทั้งเปลือกหุ้มค่อนข้างยาวแบน เนื้อเมล็ดค่อนข้างเต็ม มีเสี้ยนติดกับเมล็ดน้อยเมื่อเพาะมีต้นอ่อนขึ้นหลายต้นจากเมล็ดเดียว

3. แก้ว แบ่งออกได้ 3 พันธุ์ ด้วยกันคือ แก้วขาวหรือแก้วทอง แก้วดำหรือแก้วแดง และแก้วจุก มะม่วงแก้วออกดอกติดผลอย่างสม่ำเสมอผลมีขนาดกลางขนาดผลเฉลี่ยยาว 9 เซนติเมตร กว้าง 6.10 เซนติเมตร และหนา 5.50 เซนติเมตร มีน้ำหนักต่อผลประมาณ 160 – 200 กรัม ผลมีลักษณะกลม ผิวผลสีเขียวเข้ม เปลือกหนาปานกลาง เนื้อผลหยาบมีแป้งมาก มีรสหวานอมเปรี้ยว ผลสุกผิวสีเหลืองเข้ม เนื้อผลมีสีเหลืองเข้ม เนื้อแน่น รสหวาน เมล็ดค่อนข้างใหญ่

4. พิมเสนมัน เป็นพันธุ์ดังเดิมของฝั่งธนบุรี กรุงเทพมหานคร ผลมีขนาดกลางถึงค่อนข้างใหญ่ ทรงผลค่อนข้างแบนไม่ยาวนัก ส่วนขั้วผลใหญ่ ปลายผลเรียว ผิวหยาบมีจุดโตเด่นชัด น้ำหนักต่อผลประมาณ 245 กรัม เปลือกหนาผลดิบผิวสีเขียวแก่ เนื้อหนา เนื้อสีขาวอมเหลือง เนื้อค่อนข้างหยาบ กรอบมีเสี้ยนมากเมื่อแก่จัดรสอมเปรี้ยวเล็กน้อย ซึ่งนิยมปลูกเพื่อรับประทานผลดิบ ผลสุกผิวสีเหลืองอ่อน เนื้อมีลักษณะเป็น 2 ชั้นคือ ส่วนใกล้ ๆ เปลือกจะแข็งกรอบ มีสีเหลือง ๆ ส่วนเนื้อที่ถัดเข้าไปจนถึงเมล็ดจะอ่อนนุ่มสีออกส้มอ่อน ๆ ซึ่งลักษณะนี้จะหมดไป เมื่อมะม่วงงอมมากแล้ว รสชาติหวานมัน รูปร่างค่อนข้างยาว แบน สีเสี้ยนติดกับเมล็ดมาก มีเมล็ดในเต็มอยู่ในเปลือกแข็ง

5. หนองแสง ผลมีรูปร่างคล้ายผลมะม่วงพิมเสนแดงแต่หนากว่า ผลดิบผิวสีเหลือง เนื้อสีเหลือง เนื้อละเอียด มีเสี้ยนน้อย ผลแก่จัดรสมันกรอบ ผลสุกผิวสีเหลือง เนื้อสีเหลือง เนื้อละเอียด รสหวานชืด เป็นพันธุ์ที่ไม่ทนต่อสภาพถูกน้ำท่วงขัง หากถูกน้ำท่วงเพียง 3 วันเท่านั้นต้นก็จะเหี่ยวเฉาและตายไปในที่สุด

6. ฟ้าลั่น เป็นมะม่วงที่รับประทานดิบ ตั้งแต่ผลอ่อนรสมันจืด ผลแก่รสมันหวาน กรอบช่วงระยะเวลา จำหน่าย ผลน้ำหนักเฉลี่ย 250 กรัม อายุตั้งแต่ดอกบานถึงเก็บผล 60-80 วัน

2.2 โยเกิร์ต (Yoghurt)

โยเกิร์ต เป็นผลิตภัณฑ์นมหมักเตรียมได้จากนม (whole milk) นมพร่องไขมัน นมคืนรูปพร่องไขมัน นมข้น หรือผลิตภัณฑ์นมอื่น ๆ หรือส่วนผสมของนมเหล่านี้ผสมเข้าด้วยกันเพื่อให้ได้สัดส่วนขององค์ประกอบที่ถูกต้องสำหรับโยเกิร์ตชนิดหนึ่ง ๆ โดยอาศัยการเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตส (lactose) เป็นกรดแลคติค (lactic acid) ของเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ซึ่งช่วยในการรักษาน้ำนมไปในตัว เพราะกรดที่เกิดขึ้นทำให้นมมีความเป็นกรดสูงขึ้นมีผลให้จุลินทรีย์ที่จะทำให้นมเสื่อมคุณภาพเจริญเติบโตไม่ได้ จึงสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตไว้ได้นานขึ้น (วราวุฒิ และ รุ่งนภา, 2532)

2.2.1 การแบ่งประเภทของโยเกิร์ต

2.2.1.1 แบ่งตามมาตรฐานกฎหมาย (legal standards)

มาตรฐานกฎหมายของโยเกิร์ต ขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ เช่น เปอร์เซ็นต์ไขมัน ปริมาณของแข็งที่ไม่ใช่ไขมัน (solid not fat หรือ SNF) หรือปริมาณของแข็งทั้งหมด ตามมาตรฐานของ FAO/WHO กำหนดให้แบ่งชนิดของโยเกิร์ตตามปริมาณไขมันดังนี้

"full" สูงกว่า 3 เปอร์เซ็นต์

"medium " ประมาณ 3-0.5 เปอร์เซ็นต์

"low" ต่ำกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์

2.2.1.2 แบ่งตามวิธีการผลิต

1) **Set yoghurt**

Set yoghurt เป็นโยเกิร์ตที่บรรจุทันทีหลังจากมีการเติมจุลินทรีย์ แล้วให้จุลินทรีย์ทำปฏิกิริยากันในขณะที่อยู่ในภาชนะที่บรรจุ ลักษณะมวลที่ตกตะกอน (coagulum) ที่ได้มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว พอได้ที่แล้วทำให้เย็นพร้อมที่จะจัดจำหน่าย

2) **Stirred yoghurt**

Stirred yoghurt เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักในถังจนได้ที่ จากนั้นนำมาทำให้มวลที่ตกตะกอน (coagulum) แตกหรือแยกกันก่อนที่จะทำให้เย็นแล้วบรรจุ

2.2.1.3 แบ่งตามลักษณะกลิ่นรส

โยเกิร์ตชนิดธรรมดา (plain หรือ natural yoghurt) เป็นโยเกิร์ตที่ผลิตได้ตามวิธีดั้งเดิม มีรสเปรี้ยว เป็นโยเกิร์ตธรรมดาที่ไม่มีการเติมกลิ่นรสหรือผลไม้ลงไป

โยเกิร์ตที่ปรุงแต่งด้วยผลไม้ (fruit yoghurt) โยเกิร์ตชนิดนี้จะได้จากการเติมผลไม้ต่างๆ และสารให้ความหวานลงไปใน natural yoghurt

โยเกิร์ตที่ปรุงแต่งด้วยสารสังเคราะห์ (flavoured yoghurt) ได้จากการเติมกลิ่นรสและสีแทนส่วนของผลไม้ ซึ่งอาจแบ่งได้อีก 2 แบบ คือ แบบสวิสซึ่งเป็นโยเกิร์ตที่มีเนื้อผลไม้ผสมรวมกระจายอยู่ในเนื้อโยเกิร์ต มีการปรุงแต่งสี เนื้อ ให้เกิดรสชาติที่ดีและสวยงาม และแบบซันเด จะมีเนื้อผลไม้อยู่บริเวณก้นภาชนะ เช่น ส้ม สับปะรด สตรอเบอรี่ ลิ้นจี่ แอปเปิ้ล ลูกพีช เวลารับประทานจะต้องคนให้เนื้อผลไม้และโยเกิร์ตเข้ากันเสียก่อน

2.2.2 กระบวนการผลิตโยเกิร์ต

กระบวนการผลิตโยเกิร์ตโดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ คือ การเตรียมส่วนผสม การทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน การให้ความร้อน การเติมหัวเชื้อโยเกิร์ต การทำให้เย็น และการเก็บรักษาคุณภาพโยเกิร์ต (กระบวนการผลิต แสดงดังภาพที่ 2.1) โดยมีรายละเอียดดังนี้ (Robinson และ Tamime, 1993)

2.2.2.1 การเตรียมส่วนผสม (preparation of the basic mix)

โยเกิร์ตเตรียมได้จากนมอุดมไขมัน นมพร่องมันเนย นมเข้มข้น หรือนมชนิดอื่น ๆ หรือส่วนผสมของนมดังกล่าวผสมเข้าด้วยกัน อาจมีการเติมสเตบิไลเซอร์ (stabilisers) เช่น เพกติน (pectins) หรือเจลาติน (gelatine) เพื่อเพิ่มความหนืดให้กับโยเกิร์ต ทั้งนี้การเติมสิ่งใดต้องไม่ขัดต่อกฎหมาย โดยองค์ประกอบสำคัญที่มีในโยเกิร์ตแสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบสำคัญที่มีในโยเกิร์ต

องค์ประกอบ (compenent)	โยเกิร์ตรสธรรมชาติ (natural yoghurt) (กรัม/100 กรัม)	
	ไขมันเต็ม (full fat)	ไขมันต่ำ (low fat)
โปรตีน (protein)	3.9	5.0
ไขมัน (fat)	3.4	0.5
คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)	4.9	6.5

ที่มา: Deeth และ Tamime (1981)

2.2.2.2 การทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization)

หลังจากการเตรียมส่วนผสมโดยมีการปรับส่วนผสมให้ได้ตามมาตรฐาน เพื่อให้ได้โยเกิร์ตที่มีคุณภาพตามต้องการแล้วจะมีการนำนมมาผ่านกระบวนการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) ซึ่งจะช่วยป้องกันการแยกชั้นของนมระหว่างการหมัก โดยการทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน จะทำได้โดยการให้นมผ่านเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ด้วยความเร็วสูงโดยผ่านช่องเปิดขนาดเล็ก ภายใต้ความดัน 15-18 เมกะปาสคาล (MPa) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เส้นผ่านศูนย์กลางของไขมันหลังผ่านเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ควร น้อยกว่า 0.2 ไมโครเมตร (Tamime and Robinson, 1993) โดยขนาดเม็ดไขมันที่เล็กลงนอกจากจะช่วยป้องกันการเกิดครีมที่ผิวหน้าแล้วยังช่วยให้เกิดการสะท้อนของแสงมากขึ้น ทำให้เกิดเป็นลักษณะปรากฏที่ดี

2.2.2.3 การให้ความร้อน (heat treatment of the milk)

การให้ความร้อน เป็นขั้นตอนที่สำคัญมีประโยชน์ดังนี้คือ

1) ทำลายจุลินทรีย์ ที่ก่อให้เกิดโรค ความร้อนที่ใช้จะสามารถทำลายเซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในนมแต่สปอร์หรือเอนไซม์ทนความร้อนได้ ยังคงมีอยู่ในนมดังนั้นจึงควรระมัดระวังหลีกเลี่ยงความเสี่ยงใด ๆ อันจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สร้างสปอร์ รวมทั้งยีสต์และรา อันเป็นสาเหตุให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเสื่อมเสียได้

2) กำจัดออกซิเจนในนม เพื่อป้องกันแบคทีเรียที่ต้องการอากาศไม่ให้เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้

3) ทำลายโปรตีนของหางนม (whey proteins) ความร้อนจะทำให้ เบต้า-แลคโตโกลบูลิน (ß-lactoglobulin) และ อัลฟา-แลคโตอัลบูลิน (α- lactoalbulin) เสียสภาพ (denatured) และตกตะกอนเกิดการรวมตัวกับเคซีนทำให้โยเกิร์ตมีความหนืด (viscosity) มากขึ้น โดยระดับความร้อนที่ควรใช้คืออุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (Tamime and Robinson, 1985) ซึ่งเป็นอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิตในระดับเล็ก (small – scale production) กรณีอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ควรใช้อุณหภูมิและเวลาที่สั้น ระดับอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการให้ความร้อนน้ำนมสำหรับการผลิตโยเกิร์ต

เวลา	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กระบวนการ	ผลรับที่ได้
2-3 วินาที	≤ 65	thermisation	ทำลาย psychotropic bacteria
30 นาที	65	batch pasteurization	ทำลาย จุลินทรีย์ก่อโรค แต่ไม่ทำลาย vegetative cells
15 วินาที	72	pasteurization	
4-20 วินาที	85	high pasteurization	ทำลาย vegetative cells แต่ไม่ทำลายสปอร์
30 นาที	85		
5 นาที	90-95		
40-20 นาที	110-120	In-container sterilization and autoclaving	ทำลายเซลล์ และสปอร์ได้ทั้งหมด
20-2 วินาที	135-150	UHT	

ที่มา: Tamimme และ Robinson (1985)

2.2.2.4 การเติมหัวเชื้อโยเกิร์ต (inoculation with a starter culture)

หัวเชื้อ เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิตโยเกิร์ต ลักษณะที่ต้องการของหัวเชื้อโยเกิร์ต คือ ปลอดจากการปนเปื้อน เจริญได้ดีในส่วนผสมของนมที่ใช้เตรียมโยเกิร์ต ให้กลิ่นรสที่ต้องการ โครงสร้างลักษณะเนื้อดี และต้านทานต่อการเกิด phages และสารปฏิชีวนะ ในการสร้างกลิ่นรส (flavor) และลักษณะของเนื้อสัมผัส (texure) ต้องใช้หัวเชื้อผสมของ *Lactobacillus bulgaricus* และเชื้อ *Streptococcus thermophilus* โดยทั่วไปจะใช้หัวเชื้อทั้งสองชนิดในอัตราส่วนที่เท่ากัน เชื้อ *Streptococcus thermophilus* เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดไดอะเซตัล (diacetyl) และสารประกอบที่คล้ายกันซึ่งมีผลต่อกลิ่นรสของครีมเนย (creamy/buttery) ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายเชื้อ *Streptococcus thermophilus* นี้จะช่วยกำจัดออกซิเจนออกจากนม ซึ่งถ้าหากเหลืออยู่ อาจก่อให้เกิดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ การเจริญจะดำเนินต่อไปจนกระทั่งความเป็นกรดถึง pH 5.5 จะมีสารอาหารที่เหมาะสม สำหรับการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* ต่อไป

เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญที่ 45 องศาเซลเซียส และยังให้ปริมาณกรดแลคติคที่มากพอที่จะสร้างอะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ซึ่งให้กลิ่นรสเฉพาะของโยเกิร์ตได้ ในกรณีของโยเกิร์ตที่มีกลิ่นรสดีมากจะมีปริมาณอะซิตัลดีไฮด์อยู่ 23-41 ppm คิดเป็นสัดส่วนของสารประกอบที่ให้กลิ่น (volatile flavour compound) ถึง 90 % นอกจากนี้แล้วเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* จะปล่อยกรดอะมิโนบางตัว ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Streptococcus thermophilus* อีกด้วย หลังการหมักเสร็จสิ้นแล้ว โยเกิร์ตที่ได้จะมีลักษณะเนื้อที่แน่นขึ้นที่เรียกว่า thickened yoghurt ซึ่งจะถูกทำให้เย็นลงเป็น 4.5 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่อุณหภูมินี้ตลอดระยะเวลาการจำหน่าย ณ อุณหภูมินี้แบคทีเรียยังคงมีชีวิตอยู่ แต่กิจกรรมค่อนข้างจำกัด ทำให้การแบ่งตัวและการสร้างกรด จะช้าลงมากในการสร้างสารให้กลิ่นรสของโยเกิร์ต โดยหัวเชื้อสายพันธุ์ผสม พบว่า เชื้อ *Streptococcus thermophilus* จะสร้างกรดฟอร์มิคออกมา ซึ่งเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* จะนำกรดฟอร์มิคนี้ไปใช้ในการสร้างสารที่ให้กลิ่นรสรวมทั้ง อะซิตัลดีไฮด์ ออกมาด้วย ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* นี้เป็นตัวการสำคัญในการสร้างสารที่ให้กลิ่นรสในโยเกิร์ต แต่อย่างไรก็ตามเชื้อ *Streptococcus thermophilus* ก็สามารถสร้างสารให้กลิ่นรสพวกอะซิตัลดีไฮด์ ได้ด้วย แต่ปริมาณของอะซิตัลดีไฮด์ ที่ได้จากเชื้อ *Streptococcus thermophilus* จะน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณของสารดังกล่าวที่ได้จากเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* เมื่อการเปลี่ยนแปลงของสารเกิดขึ้นที่อุณหภูมิการหมักปกติประมาณ 40 องศาเซลเซียส ในระหว่างการหมัก อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเชื้อสายพันธุ์ผสมจะเท่ากับ 40-42 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมินี้หัวเชื้อโยเกิร์ตที่ผสมกันสามารถมีกิจกรรมร่วมกันได้สูงสุด เนื่องจากหัวเชื้อทั้งสองชนิดมีอุณหภูมิการหมักที่เหมาะสม สำหรับแต่ละสายพันธุ์แตกต่างกันคือ ที่อุณหภูมิการหมักเป็น 45 องศาเซลเซียส จะเหมาะสำหรับการสร้างกรดของเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus bulgaricus* และที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จะเหมาะสำหรับการสร้างกรดของเชื้อสายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus*

สรุปลักษณะของหัวเชื้อโยเกิร์ตได้ดังนี้

1. เชื้อ *Streptococcus thermophilus* จะมีกิจกรรมสูงในการปล่อยกรดแลคติคในช่วงแรกของการหมัก ดังนั้นถ้าสามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์นี้ให้สามารถสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว จะทำให้สามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการหมักให้น้อยลง

2. สารอื่น ๆ ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงของเชื้อ นอกจากกรดแลคติคแล้วยังมีสารที่มีความสำคัญต่อการสร้างกลิ่นรส (aroma and flavor) ของโยเกิร์ตซึ่งสารประกอบเหล่านี้ ได้จากหัวเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ จึงจำเป็นต้องให้เชื้อทั้งสองชนิดนี้เจริญในสัดส่วนที่สมดุลกัน ดังนั้น สิ่งที่สำคัญในหัวเชื้อโยเกิร์ต นอกจากจะให้แบคทีเรียที่มีชีวิตจำนวนมากแล้ว หัวเชื้อยังจำเป็นต้องมี

จำนวนเซลล์ที่สมดุลกันอีกด้วย อัตราการถ่ายเชื้อโดยทั่วไปจะใช้ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (2/2) ซึ่งสามารถทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 4 ชั่วโมง เพื่อให้นมมีจำนวนเชื้อแลคติค 3-4 x 10^7 CFU/ml การเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดแยกกันจะเจริญได้ดีที่สุด แล้วจึงผสมกันเป็นหัวเชื้อก่อนการใช้ แต่ในทางปฏิบัติจะนิยมใช้หัวเชื้อผสมที่มีอัตราส่วนระหว่างเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* เท่ากัน อย่างไรก็ตาม แม้ว่าอัตราส่วนระหว่างจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดเริ่มต้นจะเท่ากับ 1:1 แต่อัตราส่วนนี้จะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อเชื้อ *Streptococcus thermophilus* เริ่มเข้าสู่การเจริญในระยะ logarithmic phase และจะมีเพียงกรดแลคติคที่สะสมอยู่ในนมเท่านั้น หลังจากนี้เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* จะเจริญเป็นเชื้อที่เด่นขึ้นมา เมื่อสิ้นสุดการหมักจะมีระดับกรดแลคติคประมาณ 0.90-0.95 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนเซลล์ในหัวเชื้อจะกลับมาสมดุลอีกครั้งหนึ่ง ปริมาณเซลล์ทั้งหมด (total colony count) ของเชื้อแลคติคอาจเกิด 2 x 10^9 CFU/ml ซึ่งมีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัส (organoleptic quality) นอกจากนี้หัวเชื้อที่จะถ่ายลงสู่ถังหมักยังจำเป็นต้องระมัดระวังในเรื่องของสารปฏิชีวนะที่ตกค้าง รวมทั้งสายพันธุ์ของเชื้อที่เข้ากันไม่ได้หรือไม่สมดุลกัน การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของการหมักโยเกิร์ต (biochemistry of yoghurt fermentation) แนวทางการเปลี่ยนแปลง (metabolic pathway) ที่เกิดขึ้นในจุลินทรีย์ ประกอบด้วยปฏิกิริยาหลายชนิด ซึ่งควบคุมโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆ กัน การย่อยสลายสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และสารอื่นๆ ให้มีโมเลกุลที่เล็กลง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีส่วนสำคัญต่อการเจริญและแบ่งตัวของหัวเชื้อ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* รวมทั้งกลิ่นรสและคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ได้

2.2.2.5 การทำให้เย็น (cooling)

การทำให้เย็นทำได้โดยการลดอุณหภูมิจาก 30 – 45 องศาเซลเซียส ให้ได้อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียสทันที วัตถุประสงค์เพื่อควบคุมความเป็นกรดให้ได้ pH ประมาณ 4.6 หรือความเข้มข้นของกรดแลคติคประมาณ 0.9 % โดยการลดอุณหภูมิไปที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ทันที จะไปยับยั้งกิจกรรมของเชื้อโยเกิร์ตได้

2.2.2.6 การเก็บรักษาคุณภาพโยเกิร์ต (keeping qualities)

ปกติโยเกิร์ตจะมีอายุการเก็บประมาณ 10 วัน เมื่อเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นปริมาณกรดในโยเกิร์ตจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเนื่องจากกิจกรรมของหัวเชื้อที่มีอยู่ในโยเกิร์ตนั่นเอง แม้ว่ากิจกรรมของหัวเชื้อดังกล่าวจะต่ำมากก็ตาม ปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นนี้ทำให้กลิ่นรสของโยเกิร์ตเปลี่ยนแปลงไปและไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค สุดท้ายหัวเชื้อแบคทีเรียจะถูกทำลายและโยเกิร์ตจะเกิดการแยกชั้นของลิ่มนม (curd) และ น้ำเวย์ (whey) ซึ่งมีผลทำให้เชื้อ

จุลินทรีย์อื่นๆ เช่น ยีสต์และราเจริญได้ ดังนั้นในการผลิตจึงควรระมัดระวังในเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อราและยีสต์ในหัวเชื้อโยเกิร์ต รวมทั้งในระหว่างการบรรจุด้วย ในปัจจุบันโยเกิร์ตที่ผลิตขึ้นล้วนมีการพัฒนาปรับปรุงรสชาติ และเนื้อสัมผัสเพื่อให้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น ดังนั้นการใช้วัตถุดิบต่างๆที่มีคุณภาพ การควบคุมกรรมวิธีการผลิตให้เป็นไปตามที่ตั้งไว้ รวมทั้งการใช้หัวเชื้อที่มีคุณภาพ ล้วนแต่มีผลให้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่ได้เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและยังเป็นการเพิ่มความนิยมในผลิตภัณฑ์ประเภทนี้อีกด้วย

2.2.3 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในโยเกิร์ต

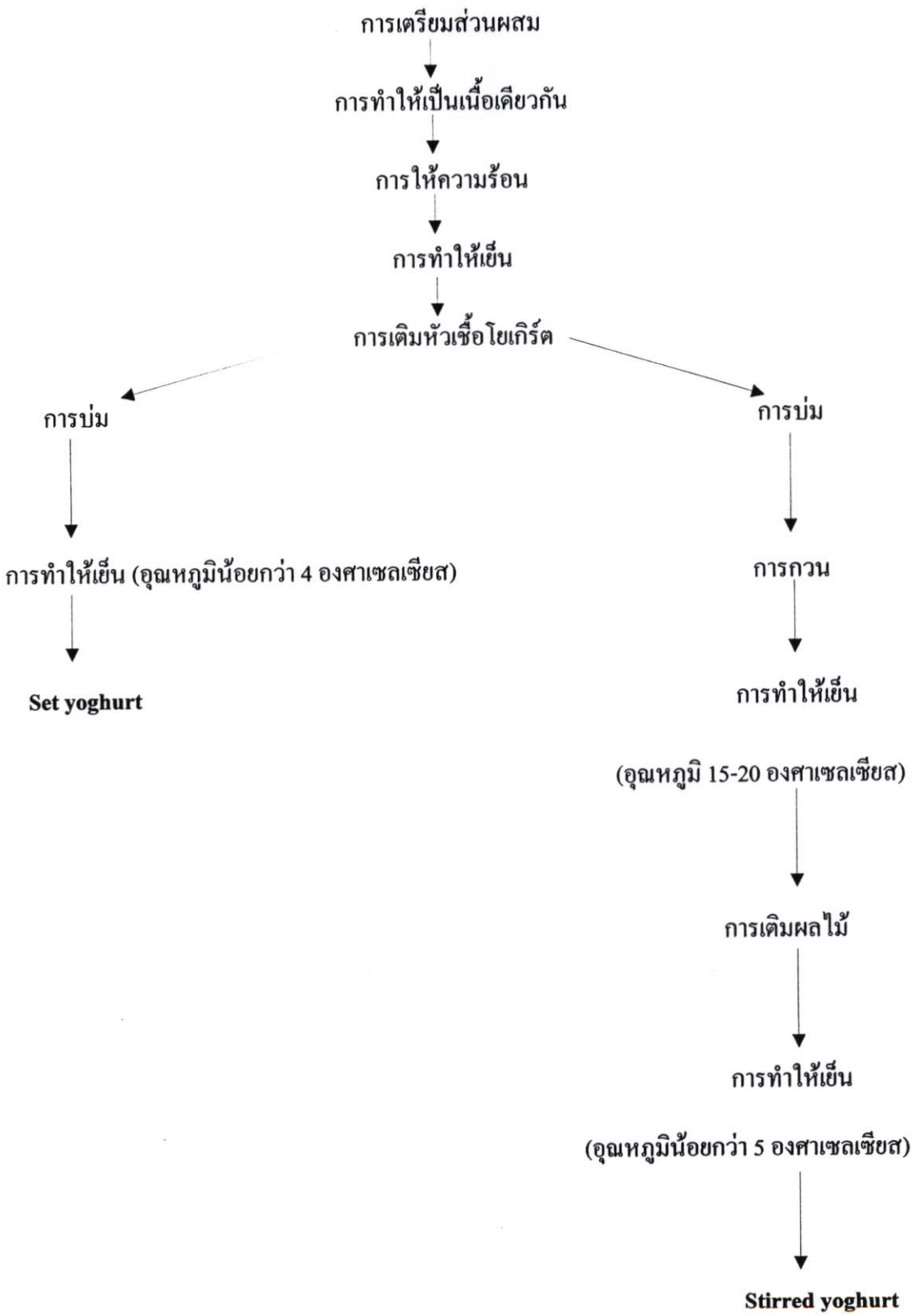
2.2.3.1 การปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* ในโยเกิร์ต

สถาบัน Notiziario *dell'lstituto Superiore di Sanita* ได้รับรายรายงานจากประเทศอิตาลีพบว่า เชื้อ *E. coli* O157:H7 สามารถมีชีวิตรอดได้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความเป็นกรดสูง (high-acid food) เช่น โยเกิร์ต โดยสาเหตุการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* O157:H7 ได้แก่ ระบบการพาสเจอร์ไรส์ (pasteurization) ที่ไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อ *E. coli* O157:H7 นอกจากนี้อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อหลังการพาสเจอร์ไรส์ รวมทั้งระบบการทำความสะอาดที่ไม่ดี ทำให้เกิดการปนเปื้อนในระหว่างการผลิตได้ ในระหว่างวันที่ 1 กันยายน ถึงวันที่ 1 พฤศจิกายน 2534 Public health Laboratory Service, Commumunicable Disease Surveillance Centre, London แห่งประเทศอังกฤษได้รายงานว่าพบผู้ได้รับสารพิษ Verotoxin ซึ่งผลิตโดย *E. coli* (VTEC) O157:H7 จำนวน 16 คน ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากการบริโภคโยเกิร์ต ซึ่งครั้งนี้พบว่าเป็นครั้งแรกที่พบการระบาดของ *E. coli* (VTEC) O157:H7 ในโยเกิร์ต (www. iss.it, 1997)

2.2.3.2 การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในโยเกิร์ต

ในเดือนกรกฎาคม 2538 Department of Public Health Medicine, South Glamorgan Health Authority, Cardiff แห่งสหราชอาณาจักร ได้พบการระบาดของเชื้อ *Salmonella* Typhimurium definitive type (DT) 170 โดยสาเหตุการปนเปื้อนพบว่าเกิดจากการซิลปากถ้วยโยเกิร์ตที่ไม่ดี และร้านขายส่งได้มีการนำไปเก็บไว้ใต้ชั้นวางซึ่งชั้นบนมีการวางเนื้อแกะดิบอยู่จึงเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนข้าม (www.ncbi.nlm.gov, 2005)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิต Set yoghurt และ Stirred yoghurt

ที่มา : Robinson (1993)

63254

2.2.3.3 การปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในโยเกิร์ต

ในประเทศนิวซีแลนด์เดือน พฤษภาคม 2544 ESR Ltd. ได้รายงานต่อกระทรวงสาธารณสุขของประเทศนิวซีแลนด์ ว่าพบการระบาดของ *Staph. aureus* ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตทั้งนี้สาเหตุการปนเปื้อนเกิดจากบุคลากรที่ทำหน้าที่การผลิต และมีการเจริญเติบโตของหัวเชื้อ (starter culture) ช้าเนื่องมาจากอุณหภูมิที่ใช้บ่มไม่เหมาะสม จึงทำให้เชื้อ *Staph. aureus* เจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ (www.nzfsa.govt.nz, 2001)

2.2.3.4 การปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในโยเกิร์ต

จากรายงานของ Medic 8 Family Health Guider พบว่า *Listeria monocytogenes* เกิดการระบาดครั้งใหญ่ในสหรัฐอเมริกาในปี พ.ศ. 2528 โดยพบในซอฟ ชีส (soft cheese) ซึ่งการระบาดครั้งนี้มีผลทำให้ผู้บริโภคเสียชีวิตถึง 48 คน โดยทางสหรัฐอเมริกาได้ประมาณการถึงความเสียหายจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* ว่ามีประชาชนได้รับความเจ็บป่วยจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* มากว่า 1,000 คน และตายถึง 250 คน ทั้งนี้เกิดการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเชื้อเข้าไป โดยอาหารที่มีการปนเปื้อนได้แก่ ซอฟ ชีส (soft cheese), โพรเซส ชีส (processed cheese) เช่น เชดด้า (cheddar), ครีม ชีส (cream cheese), คอทเทจ ชีส (cottage cheese) และโยเกิร์ต (yoghurt) (www.medic8.com. healthguide/articles/listeria.html, 2005)

2.3 สารประกอบฟีนอลิค (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิค เป็นสารในกลุ่ม secondary metabolite ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อประโยชน์ในกระบวนการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด ดังนั้นรูปแบบของสารประกอบฟีนอลิคในพืชแต่ละชนิด จึงมีความแตกต่างกันออกไป ในปัจจุบันพบว่ามีสารประกอบฟีนอลิคที่ทราบโครงสร้างอย่างง่าย เช่น กรดฟีนอลิค (phenollic acid) ไปจนถึงกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นโพลิเมอร์ เช่น แทนนิน (tannins) ในธรรมชาติสารประกอบฟีนอลิคจะมีโครงสร้างจับอยู่กับโมเลกุลน้ำตาลตั้งแต่ 1 โมเลกุลขึ้นไปที่หมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) โดยน้ำตาลดังกล่าวอาจจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) น้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) หรือโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ก็ได้แต่น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอลิค คือ กลูโคส (glucose) ส่วนน้ำตาลชนิดอื่นที่พบได้แก่ กาแลคโตส (galactose) แรมโนส (rhamnose) ไซโรส (xylose) อะราบิโนส (arabinose) และอนุพันธุ์ของน้ำตาลเหล่านี้ เช่น กรดกลูโคโรนิค (glucoronic acid) กรดกาแลกทิวโรนิค (galacturonic acid) และอื่น ๆ นอกจากนี้

ยังพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลิคกับ สารประกอบฟีนอลิคด้วยกันเองหรือสารประกอบฟีนอลิคกับสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดคาร์บอกซิลิค (carboxylic acids) กรดอินทรีย์ (organic acids) อะมีน (amins) และไขมันอีกด้วย โครงสร้างหลักของสารประกอบฟีนอลิคกลุ่มต่าง ๆ ในพืช ดังแสดงในตารางที่ 2.7

สารประกอบฟีนอลิค แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Chi-Tang Ho, 1992) ได้แก่

2.3.1 สารประกอบฟีนอลอย่างง่ายและกรดฟีนอลิค (simple phenols and phenolic acids)

สารประกอบฟีนอลอย่างง่าย (simple phenols) ประกอบไปด้วย โมโนฟีนอล (monophenols) ได้แก่ พารา-คีซอล (*p*-cresol) ซึ่งพบทั่วไปในผลไม้ เช่น ราสเบอรี่ (raspberry), แบล็คเบอรี่ (blackberry) ไดฟีนอล (diphenols) ได้แก่ ไฮโดรควิโนน (hydroquinone) และอนุพันธุ์ ไตรฟีนอล (triphenols) ได้แก่ กรดแกลลิค (gallic acid)

2.3.2 กรดไฮดรอกซีซินนามิค และอนุพันธุ์ (hydroxycinnamic acid and derivative)

กรดไฮดรอกซีซินนามิค (hydroxycinnamic acid) ได้แก่ กรดพารา-คูมาริค (p-cumaric acid), กรดคาเฟอิค (caffeic acid), กรดเฟอรูลิค (ferulic acid), กรดไซแนปิค (sinapic acid)

2.3.3 เฟลโวนอยด์ (flavonoids)

เฟลโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารประกอบฟีนอลิคที่พบมากที่สุดในบรรดาสารประกอบฟีนอลิคจากพืชทั้งหมด สารประกอบในกลุ่มนี้ ได้แก่ คาเตชิน (catechins), โปรเอน-โทรไซยานิดิน (proanthocyanidins), เอนโทรไซยานิดิน (anthocyanidins), เฟลโวน (flavons), เฟลโวนอล (flavonols) และ กลัยโคไซด์ (glycosides) ของทั้งสอง

ตารางที่ 2.7 โครงสร้างหลักของสารประกอบฟีนอลิคกลุ่มต่าง ๆ ในพืช

Number of carbon atoms	Basic skeleton	Class	Examples
6	C6	Simple phenols	Catechol, hydroquinone
		Benzoquinones	2,6-Dimethoxybenzoquinone
7	C6-C1	Phenolic acids	Gallic, salicylic
8	C6-C2	Acetophenones	3-Acetyl-6-methoxybenzaldehyde
		Tyrosine derivatives	Tyrosol
		Phenylacetic acids	p-Hydroxyphenylacetic
9	C6-C3	Hydroxycinnamic acids	Caffeic, ferulic
		Phenylpropenes	Myristicin, eugenol
		Coumarins	Umbelliferone, aesculetin
		Isocoumarins	Bergenon
		Chromones	Eugenin
10	C6-C4	Naphthoquinones	Juglone, plumbagin
13	C6-C1-C6	Xanthones	Mangiferin
14	C6-C2-C6	Stilbenes	Resveratrol
		Anthraquinones	Emodin
15	C6-C3-C6	Flavonoids	Quercetin, cyanidin
		Isoflavonoids	Genistein
18	(C6-C3)2	Lignans	Pinoresinol
		Neolignans	Eusiderin
30	(C6-C3-C6)2	Biflavonoids	Amentoflavone
n	(C6-C3)n	Lignins	
	(C6)n	Catechol melanins	
	(C6-C3-C6)n	Flavolans (Condensed Tannins)	

ที่มา : Harborne (1980)

2.4 การใช้สารประกอบฟีนอลิคในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

2.4.1 ผลของการใช้สารประกอบฟีนอลิคในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

Karou และคณะ (2005) ได้ทดสอบผลของพืชสมุนไพร 3 ชนิดได้แก่ *Combretum micranthum, Khaya senegalensis,* และ *Sida acuta* ต่อการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidant) และการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial) พบว่าสารสกัดจากพืชสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ในรูปของไลโอฟีไลซ์ (lyophilized extract) ซึ่งมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด 10 – 37 % มีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค โดยความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลาย *Staph. aureus* ของ *Sida acuta* คือ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร , *Khaya senegalensis* คือ 240 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ *Combretum micranthum* คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Cvetnic และ Knezevic (2004) ศึกษาผลของสารสกัดผสมระหว่างเมล็ดและเนื้อของส้มโอ (*Citrus paradisi* Macf., *Rutaceae*) ที่อัตราส่วน 1:4 ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 20 สายพันธุ์และยีสต์ 10 สายพันธุ์ โดยการทดสอบด้วยวิธีการให้สารทดสอบแพร่ในอาหารวุ้น (agar diffusion method) และหาความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญเติบโต (MIC) ด้วยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) พบว่า สารสกัดจากเมล็ดและเนื้อของส้มโอสามารถยับยั้ง *Salmonella* Enteritidis ได้โดยความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งได้คือ 2.06 % น้ำหนักต่อปริมาตร สำหรับแบคทีเรียและยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ สามารถยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้น 4.13 % ถึง 16.50 % น้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenols) ของสารสกัดผสมระหว่างเมล็ดและเนื้อของส้มโอ (*Citrus paradisi* Macf., *Rutaceae*) ที่อัตราส่วน 1:4 พบว่า มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด 3.92 % โดยมี เฟลโวนอยด์ (flavonoids) อยู่ 0.11 %

Sakanaka และคณะ (2004) ศึกษาผลของสารประกอบโพลีฟีนอลจากชาเขียว ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย 2 ชนิดที่สร้างสปอร์ ได้แก่ *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่ทนอุณหภูมิสูง (spore-forming bacterium) และ *Clostridium thermoaceticum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic spore-forming bacterium) พบว่าสารประกอบโพลีฟีนอลจากชาเขียวที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบโดยใช้เวลาในการทำลายสปอร์ 15 นาที อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส สามารถทำลายสปอร์ *Bacillus stearothermophilus* ให้ลดลงเหลือน้อยกว่า 10 CFU/ml เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันยังพบสปอร์ที่ 10^3 CFU/ml สำหรับ *Clostridium thermoaceticum* ที่

ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทดสอบโดยใช้เวลาในการทำลายสปอร์ 50 นาที อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส สามารถทำลายสปอร์ให้เหลือ 10 CFU/ml เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันยังพบสปอร์ที่ 10^6 CFU/ml

Lu และคณะ (2004) ศึกษาผลของสารสกัดจากโพรโพลิสด้วยเอธานอล (ethanolic extract of propolis; EEP) จาก 3 แหล่งในประเทศไต้หวัน ได้แก่ ไทเป (Taipei; ตอนเหนือ) มิงเก-เฮียน (Mingehien; ตอนกลาง) และ แฟงเลีย (Fanglia; ตอนใต้) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staph. aureus* จากผลการศึกษาพบว่า สารสกัดทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staph. aureus* ได้ โดยความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญเติบโต (MIC) อยู่ในช่วง 3.75 – 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลาย (MBC) *Staph. aureus* ได้ คือ 7.5 – 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเมื่อศึกษาผลของสารสกัดต่อกราฟการเจริญเติบโต (growth curve) พบว่ามีผลต่อเซลล์ ของ *Staph. aureus* ในช่วงสุดท้ายของระยะที่ 2 (late – exponential phase) มากที่สุด

Lin และคณะ (2005) ศึกษาสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ของสารประกอบฟีนอลิค จากโอริกาโน่ (oregano) และแคนเบอร์รี่ (cranberry) ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Vibrio parahaemolyticus* ทำการทดสอบโดยใช้สารสกัดโอริกาโน่ และแคนเบอร์รี่ ในรูปผง จากบริษัท Barrington Chemicals (NY) และจาก Decas Cranberry Products (Wareham, MA) ตามลำดับ ผสมกันในอัตราส่วนต่าง ๆ ให้ได้ 10 กรัม ต่อ น้ำ 90 มิลลิลิตร นำไปกรองให้ปลอดเชื้อก่อนนำไปใช้ทดสอบด้วยวิธีการให้สารทดสอบแพร่ในอาหารวุ้น (agar diffusion method) ผลการทดสอบพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิคจากสารสกัดทั้ง 2 ชนิดที่ 0.1 มิลลิกรัมต่อแผ่นกระดาษซับกลม คือปริมาณที่เหมาะสมต่อการยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus* โดยอัตราส่วนของสารสกัดโอริกาโน่ต่อแคนเบอร์รี่ที่ 50% : 50% ให้วงใสที่กว้างที่สุดคือ 20 มิลลิเมตร โดยมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิค 14.1 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัดแห้ง (ที่อัตราส่วนของสารสกัดโอริกาโน่ต่อแคนเบอร์รี่ที่ 1:1)

2.4.2 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์

สารต้านแบคทีเรียมีคุณสมบัติ ขอบข่าย และการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้ง หรือทำลายแบคทีเรีย โดยการขัดขวางการสร้างส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ คือ ออกฤทธิ์ที่ระดับผนังเซลล์ ระดับเยื่อหุ้มเซลล์และสุดท้ายออกฤทธิ์ที่ระดับการสังเคราะห์ไซโตพลาสซึม (มาลิน, 2540)

2.4.2.1. การออกฤทธิ์ที่ระดับผนังเซลล์

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

2.4.2.2 ออกฤทธิ์ที่ระดับเยื่อหุ้มเซลล์

โดยสารต้านแบคทีเรียจะไปรบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ เยื้อหุ้มเซลล์เป็นส่วนที่ถัดจากผนังเซลล์เข้ามา หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยทั่วไปคือเป็น osmotic barrier ที่ช่วยป้องกันไม่ให้สารต่าง ๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป อีกทั้งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ electron transport และ oxidative phosphorylation ทำให้ตัวเซลล์แบคทีเรียถูกปล่อยออกมาน้อยลง นอกจากนี้ จะเข้าไปแทรกระหว่างโปรตีนและไลปิดของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาด เป็นผลให้สารในไซโตพลาสซึมไหลออกมา ทำให้เซลล์ตาย

2.4.2.3 การออกฤทธิ์ที่ระดับการสังเคราะห์ไซโตพลาสซึม

โดยไปยับยั้งการนำไทมีน (thymine) เข้าจับกับนิวคลีโอไทด์ ตัวอื่น ๆ ทำให้การสร้าง DNA ไม่สมบูรณ์ และไปยับยั้งการสร้างโปรตีนโดยไปทำให้กรดอะมิโน ไม่สามารถต่อกันเป็นโพลีเปปไทด์ได้ จึงไม่สามารถสร้างโปรตีนได้

Cowan (1999) ได้ศึกษาผลของสารประกอบโพลีฟีนอลที่สกัดได้จากพืชชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่า สารประกอบโพลีฟีนอลในพืช ได้แก่ กรดไฮดรอกซีซินนามิค (hydroxycinnamic acid), เฟลโวนอยด์ (flavonoids), โปรเอนโทรไซยานิดิน (proanthocyanidins : tannins), เอนโทรไซยานิน (anthocyanins), เฟลโวน (flavons), เฟลโวนอล

(flavonols) มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยกลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบโพลีฟีนอลต่อแบคทีเรียก่อโรค เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของ ไฮโดรไลติก เอนไซม์ (hydrolytic enzymes) ได้แก่ โปรติเอส (proteases) และ คาร์โบไฮโดรเลส (carbohydrolases) จึงมีผลต่อทำงานของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรคทำให้สภาวะการเกาะติดเสียสภาพไป และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ทำให้แบคทีเรียตายในที่สุด

2.5 การทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ (Sensitivity test)

วิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารต้านจุลินทรีย์ วิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบ คือ การให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น (agar diffusion method) การแปรผลเบื้องต้นดูจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ถ้าเกิดบริเวณใสแสดงว่าสารตัวอย่างที่ทดสอบมีฤทธิ์ต้านเชื้อ และถ้าไม่เกิดแสดงว่าไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อเบื้องต้นของสารที่สงสัย มักใช้ วิธีดิสค์ - ดิฟฟิวชัน (disc diffusion method) เพราะไม่ต้องพะวงถึงตัวทำละลายที่จะใช้ในการละลายสารว่ามีผลกระทบต่อผลการทดสอบหรือไม่ ในการละลายควรละลายให้ได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่าที่ทำได้ บางที่อาจแนะนำให้เตรียม 20 % จากนั้นหยดสารละลายนี้ บนแผ่นกระดาษซับกลม (paper disc) ขนาด 6 มิลลิเมตร แล้วตั้งทิ้งไว้หรือเป่าให้ตัวทำละลายระเหยออกก่อนนำไปวางบนอาหารวุ้นที่เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบไว้ ภายหลังการบ่มเพาะตรวจสอบว่ามีบริเวณใสเกิดขึ้นหรือไม่ ถ้ามีให้เจือจางสารและดำเนินการทดสอบต่อโดยวิธีเดิมหรือใช้วิธีเจือจางในอาหารเหลว เพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) หรือความเข้มข้นต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) ถ้าไม่มีบริเวณใสเกิดขึ้นก็อาจหยุดการทดสอบเพียงเท่านั้น แต่ถ้ายังสงสัยว่าสารที่ไม่ก่อให้เกิดบริเวณใสนี้น่าจะมีฤทธิ์ ก็อาจเปลี่ยนใช้วิธีเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวแทน เพราะสารออกฤทธิ์บางชนิดอาจไม่สามารถแพร่ในอาหารวุ้นได้ การทดสอบทุกครั้งต้องมีตัวทำละลาย (solvent control) และตัวยาที่รู้ประสิทธิผล (positive control) ทำควบคู่เสมอ

การทดสอบสารสกัดจากพืชซึ่งมักมีสีเข้ม ถ้าใช้วิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น ไม่ค่อยมีปัญหาจากเรื่องของตัวทำละลายที่อาจมีฤทธิ์ต้านเชื้อและการอ่านผล แต่ถ้าใช้วิธีเจือจางในอาหารเหลว อาจเกิดปัญหาทั้งสองอย่างได้โดยสีของสารสกัดอาจมีผลต่อการอ่านผลและตัวทำละลายอาจมีฤทธิ์ต้านเชื้อ เนื่องจากไม่สามารถระเหยตัวทำละลายออกไปได้อย่างเช่นการใช้วิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้นโดยผ่านกระดาษซับกลม การแก้ปัญหาของตัวทำละลายที่อาจมีฤทธิ์

ต้านเชื้อ คือหลังจากเจือจางด้วยตัวทำละลายนี้แล้ว ให้เจือจางต่อด้วยน้ำ ซึ่งตัวทำละลายที่ต้องทำควบคู่ก็ให้เจือจางในลักษณะเดียวกัน ส่วนการอ่านผลอาจต้องใช้วิธีหาค่า MBC แทน MIC เพราะสารสกัดที่มีสีเข้มหรือขุ่นจะทำให้อ่านผลยากแม้ใช้เครื่องมือช่วยก็อาจผิดพลาดได้ แต่ถ้ายังต้องการหาค่า MIC ให้เลือกใช้วิธีเจือจางในอาหารวุ้นการใช้วิธีนี้ปริมาณสารสกัดต้องมากพอเพราะ อัตราการเจือจางจะสูงกว่าวิธีเจือจางในอาหารเหลว

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 มะม่วงดิบเปลือกเขียว พันธุ์น้ำดอกไม้ เขียวเสวย ฟ้าลั่น และแก้ว โดยซื้อมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ จากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง และจากสวนมะม่วง อำเภอเมือง จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

- *Escherichia coli* JCM 109
- *Salmonella* Anatum (WHO Salmonella-Shigilla Center กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 12600
- *Listeria innocua* ATCC 33090
- *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917
- *Pediococcus pentosaceus* JCM 5890

3.1.3 เชื้อโยเกิร์ต เชื้อสำเร็จรูป Freeze-dried (DVS) YC – 380 ประกอบด้วยเชื้อผสม 2 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Steptococcus thermophillus*

3.1.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- 95 % Ethanol	(Merck, Germany)
- Gallic acid	(Sigma Chemical Co., USA)
- Folin-Ciocalteau	(Sigma Chemical Co., USA)
- Sodium carbonate	(Sigma Chemical Co., USA)

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

- Trypticase Soy Broth	(Merck, German)
- Yeast Extract	(Scharlau, German)
- MRS Broth	(Scharlau, German)
- M-17	(Scharlau, German)
- Agar	(Merck, German)
- Baird-Parker medium	(Merck, German)

3.1.6 ยาต้านจุลชีพ

- Chloramphenicol (Oxoid, England)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

- เครื่องระเหยแบบหมุน (Model - R–200, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland)
- UV Spectrophotometer (Shimadsu, Japan)
- หม้อนึ่งความดัน (Model - Autoclave ss-245, Tomy SEIKO Co.,Ltd., Japan)
- ตู้อบลมร้อน (Memmert, German)
- ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, German)
- เครื่องชั่งอิเลคทรอนิค (Model - DRAGON 3002, Mettle tolado, Switzerland)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Model - CLF 460 EC, WOERDEN, Belgium)
- Autopipette (Eppendorf AG, German)
- เครื่องปั่น (Model - twist HR1707, Philips, Indonesia)
- Paper disc (Schleicher&Schuell Microscience GmbH, German)
  เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.3 สถานที่ดำเนินงาน

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่างเปลือกมะม่วง

นำมะม่วงดิบเปลือกเขียวพันธุ์ต่าง ๆ คือ น้ำดอกไม้ เขียวเสวย ฟ้าลั่น และแก้ว มาล้างให้สะอาดและปอกเปลือกโดยใช้มีด 2 คม นำเปลือกที่ได้ แต่ละพันธุ์มานึ่งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นและหั่นเป็นชิ้นขนาด 1x2 เซนติเมตร

3.4.2 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

การเตรียมสารสกัดจากเปลือกมะม่วง ดัดแปลงจากวิธีของ Toshihide และคณะ (2000) นำเปลือกมะม่วงที่หั่นเป็นชิ้น 40 กรัม ผสมกับ 95 % เอธานอล ปริมาตร 400 มิลลิเมตร (อัตราส่วน 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ตีปั่นให้เข้ากัน ด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็น

เวลา 2 นาที หลังจากนั้นใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิเมตร เขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 2 ระเหยตัวทำละลายออกเพื่อให้ได้สารสกัดเข้มข้น โดยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เก็บสารสกัดที่ได้ในขวดแก้วสีชาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenol contents) ในตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ

ใช้วิธีของ Singleton และRossi (1965) โดยหลักการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด จะอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบโพลีฟีนอลกับ Folin-Ciocalteau ซึ่งให้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินที่ดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร และใช้กรดแกลลิคเป็นสารประกอบฟีนอลมาตรฐาน รายละเอียดการวิเคราะห์ดูได้จาก ภาคผนวก ง

3.4.4 การเตรียมเชื้อตั้งต้นเพื่อใช้ในการทดสอบ

ถ่ายเชื้อแต่ละชนิดจาก Stock culture ได้แก่ *Escherichia coli, Salmonella* Anatum, *Staphylococcus aureus, Listeria innocua* โดยการถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงใน อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth + 0.6 % Yeast Extract (TSB-YE) สำหรับ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ถ่ายเชื้อลงใน อาหาร de Man Rogosa Sharpe Broth (MRSB) บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อต่อโดยถ่ายเชื้อ 1 ลูป ลงใน TSB-YE และ MRSB เช่นเดิมนำมาบ่มในตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญในช่วงการบ่มที่เวลา 18-24 ชั่วโมง เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไป

3.4.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

เตรียมจานเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบโดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ 2 ชั้น อาหารเลี้ยงเชื้อ TSA-YE สำหรับ *Escherichia coli, Salmonella* Anatum, *Staphylococcus aureus, Listeria innocua* และอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar สำหรับ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentosaceus* ชั้นล่างใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 15 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง ทิ้งให้วุ้นแข็ง ชั้นบนเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร หลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อทดสอบ 20 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมแล้วเททับลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ รอให้อาหารแข็ง นำแผ่นกระดาษซับกลม (paper disc) ที่ปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร มาหยดสารสกัดจากเปลือกมะม่วงในตัวทำละลาย 40 % เอธานอล อย่างละ 1 แผ่น โดยหยดด้วย ออโท-

ปิเปต (autopipette) ครั้งละ 40 ไมโครลิตร ปล่อยให้แห้งแล้วจึงหยดอีก 1 ครั้งจะได้แผ่นกระดาษซับกลม ที่มีสารสกัดปริมาตร 80 ไมโครลิตร นำไปวางบนผิวหน้าวุ้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ใช้คลอแรมเฟนนิคอล (chloramphenicol) 30 ไมโครกรัม/แผ่นกระดาษซับกลมเป็น Positive control และ ใช้ 40 % เอธานอล 80 ไมโครลิตร ในแผ่นกระดาษซับกลม เป็น Solvent control ทำการทดสอบ 5 ซ้ำ บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งเชื้อ ซึ่งสังเกตได้จากวงใสรอบแผ่นกระดาษซับกลม ซึ่งจะต้องมีลักษณะใสเช่นเดียวกับลักษณะของคลอแรมเฟนนิคอล (chloramphenicol) ที่ใช้เป็น Positive control การบันทึกผลจะทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสรอบแผ่นกระดาษซับกลม 4 ตำแหน่งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย คัดเลือกสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ที่มีแนวโน้มยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุด ร่วมกับการพิจารณาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอล ที่มีในสารสกัดสำหรับการศึกษาในหัวข้อต่อไป

3.4.6 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) และศึกษาสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้าน (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal)

การวิเคราะห์หา MIC ใช้วิธีที่ ดัดแปลงจากวิธีของ Sydney และ Ellen (1986) โดยนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วง มาเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) ให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ภายหลังการบ่มสังเกตความขุ่นใสในอาหารเหลว ดูความเข้มข้นใดที่ต่ำที่สุด (ซึ่งมาจากการเจือจางสูงที่สุด) ที่ไม่มีเชื้อเจริญค่าที่ได้ถือว่าเป็นค่า MIC สำหรับการตรวจสอบสารสกัดว่ามีสมบัติเป็นสารชนิดต้าน (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) ทำการทดสอบโดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) ใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ตรวจหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตอยู่ในหลอดทดลองทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง นำค่าที่ได้มาพล็อตกราฟเพื่อแปรผลการทดสอบ

3.4.6.1 การเตรียมสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

สุ่มเลือกช่วงความเข้มข้นของสารสกัดที่ควรให้ผลเชิงบวก (positive) จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (ในข้อ 3.4.5) โดยแบ่งสารสกัดที่เหมาะสมมาเจือจางในอัตราส่วน 1:2 (2-fold dilution) ด้วยอาหารเหลว (broth media) จนได้ลำดับความเข้มข้น 6 ลำดับความเข้มข้น มีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีปริมาตรของอาหารเหลว (broth media) รวมกับสารละลายสารสกัดที่ทดสอบเท่ากับ 2 มิลลิลิตร

3.4.6.2 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบ

การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.4.4 ในการทดสอบใส่สารแขวนลอยของจุลินทรีย์โดยให้มีจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบเริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.4.6.3 การเตรียมหลอดทดลองในการหาค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

ชุดควบคุม (control)

- อาหารเหลว
- อาหารเหลว + เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค
- อาหารเหลว + สารละลายสารสกัดที่ทดสอบตามลำดับความเข้มข้น

ชุดทดสอบ (test sample)

- อาหารเหลว + เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค + สารละลายสารสกัดที่ทดสอบตามลำดับความเข้มข้น

ทำการทดลอง 5 ซ้ำ สำหรับแต่ละความเข้มข้น ของสารละลายสารสกัดที่ทดสอบต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดต่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ ระหว่างการบ่มจนครบ 24 ชั่วโมง โดยสุ่มตรวจทุก 3 ชั่วโมง ทำการตรวจผลการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการสังเกตความขุ่นภายในหลอดด้วยสายตา

3.4.6.4 การแปรผลทดสอบหาค่า MIC และ bacteriostatic หรือ bactericidal ของสารสกัด

ตรวจผลการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการสังเกตความขุ่นภายในหลอดด้วยสายตา หลอดที่ใสเกิดขึ้นตรงกับความเข้มข้นใด ถือว่าเป็นค่า MIC การตรวจสอบว่าสารสกัด มีสมบัติเป็นสารชนิดต้าน (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) ทำได้โดยตรวจหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตอยู่ทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง พล็อตกราฟระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (log CFU/ml) กับระยะเวลา เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของสารสกัด ถ้าสารสกัดเป็นชนิดต้านจุลินทรีย์ กราฟปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตที่ได้จะลดลงหรือคงที่ในช่วงการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง กรณีสารสกัดเป็นชนิดทำลายจุลินทรีย์ กราฟปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตที่ได้จะลดลงจนไม่มีการเจริญของเชื้อในระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง

3.4.7 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง ภายใน 6 ชั่วโมง

จากผลการทดลอง ข้อ 3.4.6 ทำให้สามารถเลือกรูปแบบและปริมาณของสารสกัดที่ได้จากเปลือกมะม่วง ที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคภายใน 6 ชั่วโมง

นำมาใช้ในการทดลอง โดยเตรียมการทดลองเช่นเดียวกัน ตรวจหาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตอยู่ทุก ๆ 2 ชั่วโมง จนครบ 6 ชั่วโมง พล็อตกราฟระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (log CFU/ml) กับระยะเวลา เลือกปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดที่ให้ผลทำลายภายใน 6 ชั่วโมง ไปใช้ในศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ที่มีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ตต่อไป

3.4.8 ศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียร (stability) ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และแบคทีเรียแลคติค ด้วยวิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น โดยเตรียมจานเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบโดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ 2 ชั้น เช่นเดียวกับข้อ 3.4.5 ทำการปรับ pH ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบจาก pH เริ่มต้น ให้ได้เท่ากับ 4.00, 5.00 และ 6.00 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำการทดสอบ 5 ซ้ำ บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง บันทึกผลของการยับยั้งเชื้อ โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบแผ่นกระดาษซับกลม

3.4.9 ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มี โอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต

3.4.9.1 การเตรียมตัวอย่างนมพร่องมันเนยสำหรับการผลิตโยเกิร์ต

นำนมสดมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenize) หลังจากนั้น นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

3.4.9.2 ศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคบาง ชนิดที่มีโอกาสปนเปื้อนระหว่างการหมักโยเกิร์ต

จากผลการทดลอง ข้อ 3.4.5 และ 3.4.7 ทำให้สามารถเลือกรูปแบบและปริมาณของสารสกัดที่ได้จากเปลือกมะม่วง ที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค นำมาใช้ในการทดลองกับโยเกิร์ต โดยนำนมสดพาสเจอร์ไรซ์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.9.1 ใส่ในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ หลอดละ 10 มิลลิลิตร เตรียมปริมาณสารสกัดจากเปลือกมะม่วงให้มีความเข้มข้นที่ค่า MBC ต่ำที่สุด ที่ให้ผลในการทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคภายใน 6 ชั่วโมง (ผลการทดลองข้อ 3.4.7) เตรียมสารแขวนลอย (suspension) ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดยปริมาณของเชื้อที่ใช้คือ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยเตรียมการทดสอบดังนี้

ชุดควบคุม (control)

- นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค
- นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + เชื้อโยเกิร์ต

ชุดทดสอบ (test sample)

- นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค + เชื้อโยเกิร์ต + สารสกัดจากเปลือกมะม่วง
- นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค + เชื้อโยเกิร์ต
- นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + เชื้อโยเกิร์ต + สารสกัดสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

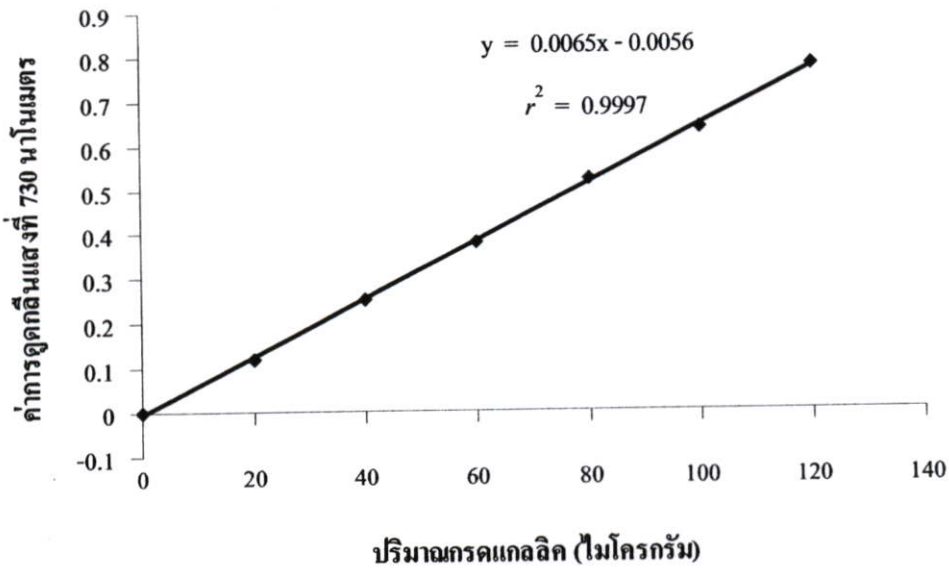
บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate ทุก 2 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด (total polyphenols) ในสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่าง ๆ

จากการเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่างๆ ได้กราฟมาตรฐานเป็นเส้นตรง ที่มีสมการเส้นตรง คือ $y = 0.0065x - 0.0056$ โดย $r^2 = 0.9997$ ดังแสดงในภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิคสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด ในเปลือกมะม่วงดิบ 4 พันธุ์ คือ มะม่วงน้ำดอกไม้ เขียวเสวย ฟ้าลั่น และแก้ว ให้ผลแสดงดังตารางที่ 4.1 จากข้อมูลในตาราง จะเห็นได้ว่า สารสกัดที่ได้จากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่างกัน มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดแตกต่างกัน โดยที่สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วมีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลสูงสุด รองลงมา คือ เปลือกมะม่วงน้ำดอกไม้ เขียวเสวย และฟ้าลั่น ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในเปลือกมะม่วงดิบ 4 พันธุ์

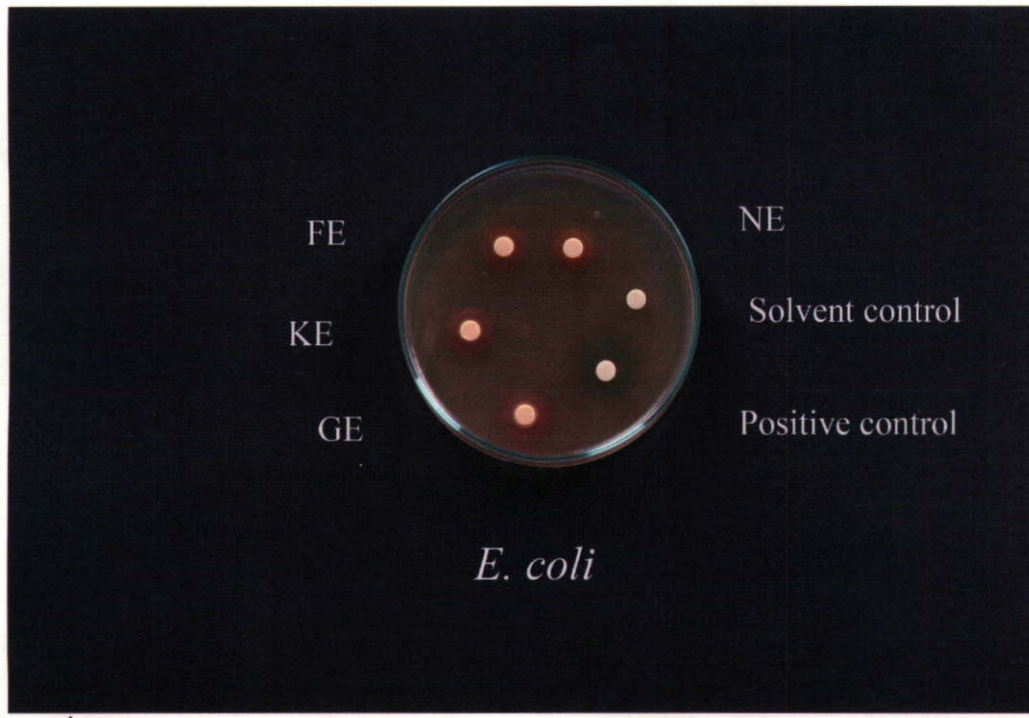
เปลือกมะม่วง	ปริมาณสารประกอบโฟลีฟีนอลทั้งหมด ในสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบ (มิลลิกรัม กรดแกลลิค/กรัม สารสกัด)
มะม่วงฟ้าลั่น	143.26 ± 2.32
มะม่วงเขียวเสวย	167.77 ± 1.42
มะม่วงน้ำดอกไม้	213.11 ± 2.22
มะม่วงแก้ว	220.80 ± 4.80

4.2 การศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่าง ๆ

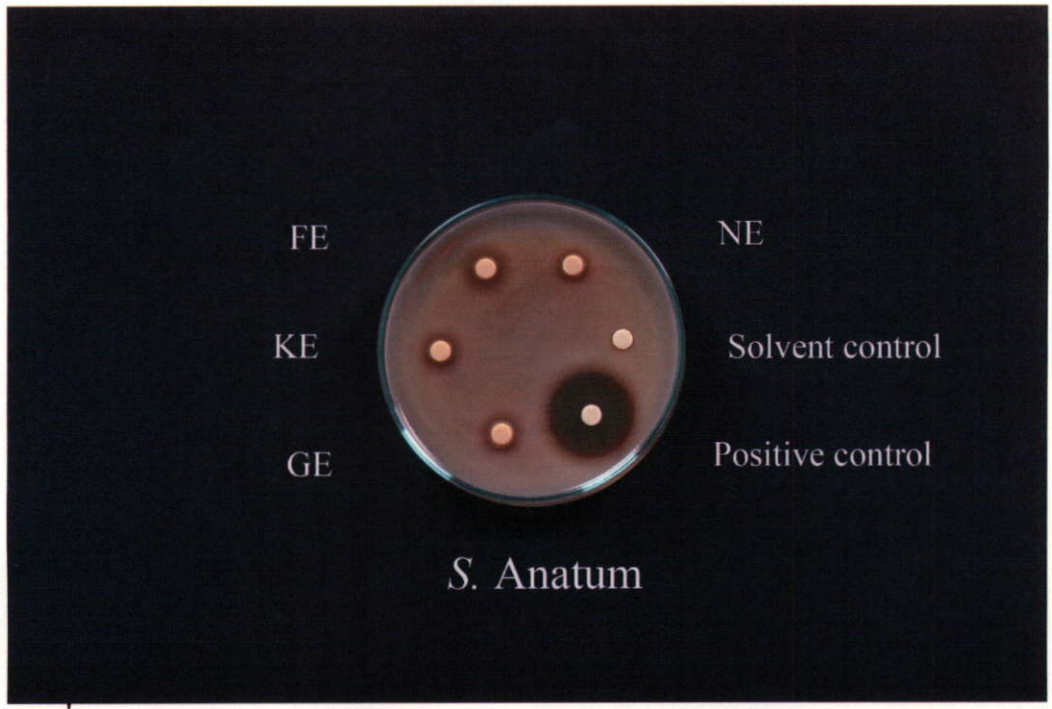
การประเมินสมบัติการต้านการเจริญของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง จะใช้การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธีให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น (agar disc diffusion method) ซึ่งการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดที่มีฤทธิ์ทั้งชนิดต้านการเจริญ (bacteriostatic) และทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) จะก่อให้เกิดวงใส (clear zone) รอบแผ่นกระดาษซับกลม (paper disc) ทดสอบโดยเตรียมสารละลายของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบ 4 พันธุ์ ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ดังนี้คือ 25, 50, 100 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *E. coli, S.* Anatum, *Staph. aureus, L. innocua* และแบคทีเรียแลคติค 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ผลการทดสอบแสดงดังภาพที่ 4.2 ถึงภาพที่ 4.7 จากภาพ จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว น้ำดอกไม้ เขียวเสวย และฟ้าลั่น ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli, S.* Anatum, *L. innocua , L. plantarum* และ *P. pentosaceus* โดยมีผลในการยับยั้งเชื้อ *Staph. aureus* เพียงสายพันธุ์เดียว สำหรับวงใสที่เกิดขึ้นมีลักษณะใสเช่นเดียวกับวงใสของ คลอแรมเฟนนิคอล ทั้งนี้จากการทดสอบเชื้อ *S.* Anatum และ *L. innocua* นั้น พบว่า มีวงเกิดขึ้น (ภาพที่ 4.3 และ 4.4) แต่ไม่ใสเช่นเดียวกับวงใสของ *Staph. aureus* และคลอแรมเฟนนิคอล โดยเมื่อสังเกตดูพบว่ายังมีเชื้อบางส่วนที่สามารถเจริญได้อย่างบาง ๆ รอบแผ่นกระดาษซับกลม จึงสรุปว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงไม่มีผลในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าว

จากการจากการศึกษาของ Toshihide และคณะ (2000) พบว่าสารประกอบโพลีฟีนอลจากเมล็ดมะม่วงสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staph. aureus* โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุด

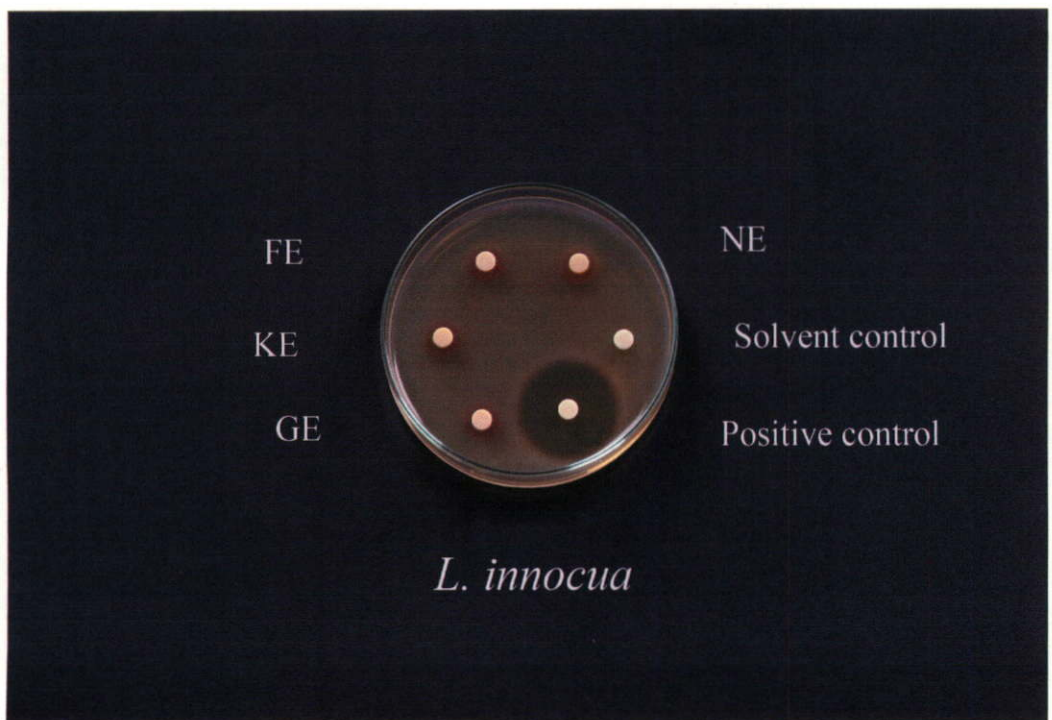
ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดนี้ ได้คือ 1000 ppm และไม่มีผลยับยั้ง *L. plantarum* เช่นเดียวกันกับผลการทดลองที่ได้ แต่จากการทดลอง Toshihide และคณะ (2000) นอกจากจะให้ผลดังกล่าวแล้วยังพบว่า สารสกัดจากเมล็ดมะม่วงสามารถยับยั้ง *P. acidilactici, E. coli, S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium โดยมีค่า MIC ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันคือ 2500 ppm และ ยับยั้ง *Listeria monocytogenes* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 100 ppm จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองของงานวิจัยนี้ จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบ มีสมบัติในการต้าน *Staph. aureus* เพียงชนิดเดียวซึ่งแตกต่างจากสารสกัดจากเมล็ดมะม่วง ที่สามารถต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิดดังกล่าว (Toshihide *et al.*, 2000) อาจเป็นไปได้ว่ามะม่วงที่ใช้ในการทดลองเป็นพันธุ์ที่ต่างกัน รวมทั้งส่วนของเปลือกและเมล็ดอาจมีปริมาณและชนิดของสารประกอบโพลีฟีนอล ที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แตกต่างกันด้วย



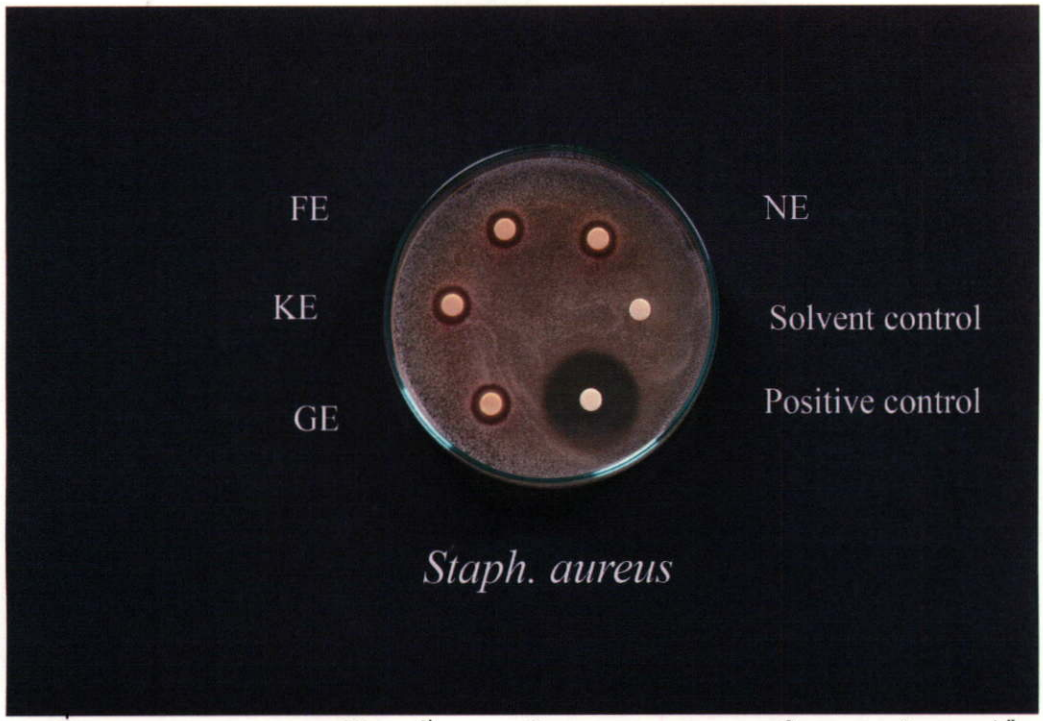
ภาพที่ 4.2 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *E. coli* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ (GE = มะม่วงแก้ว, KE = มะม่วงเขียวเสวย, FE = มะม่วงฟ้าลั่น, NE = มะม่วงน้ำดอกไม้, Solvent control = 40 % เอธานอล, Positive control = คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม/แผ่น)



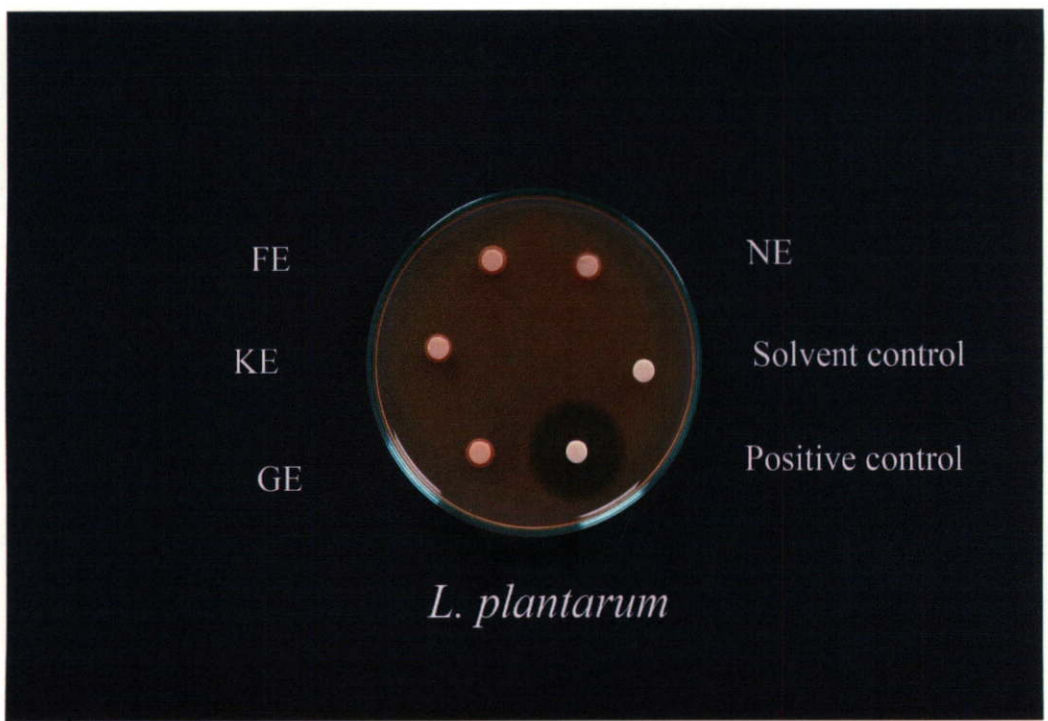
ภาพที่ 4.3 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *S.* Anatum โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ (GE = มะม่วงแก้ว, KE = มะม่วงเขียวเสวย, FE = มะม่วงฟ้าลั่น, NE = มะม่วงน้ำดอกไม้, Solvent control = 40 % เอธานอล, Positive control = คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม/แผ่น)



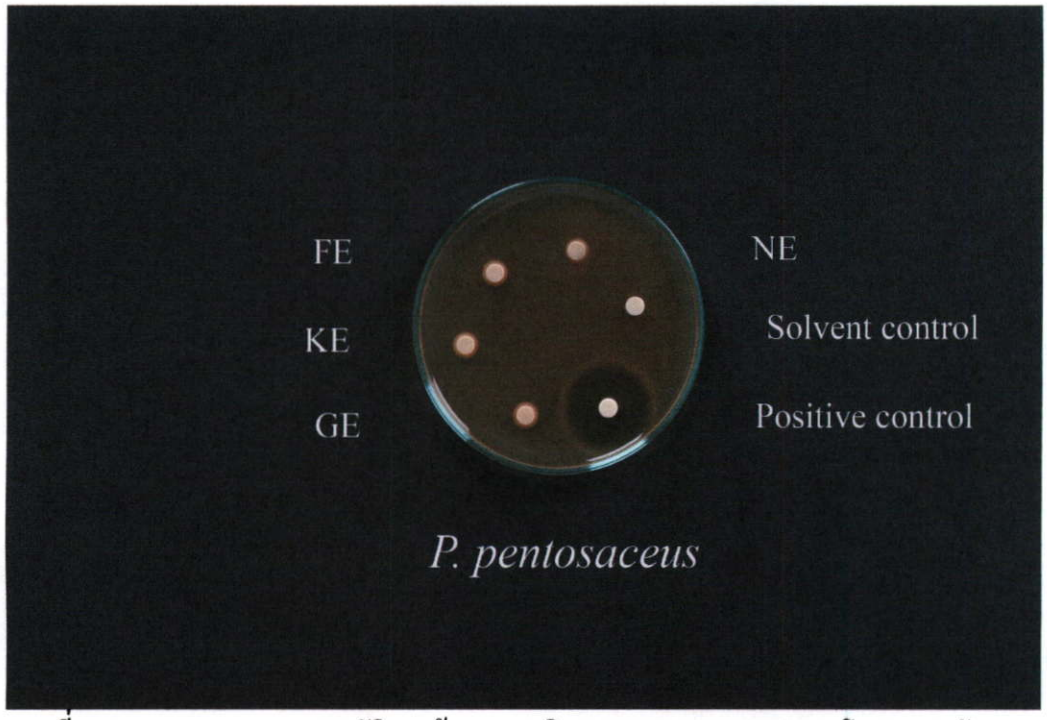
ภาพที่ 4.4 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *L. innocua* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ (GE = มะม่วงแก้ว, KE = มะม่วงเขียวเสวย, FE = มะม่วงฟ้าลั่น, NE = มะม่วงน้ำดอกไม้, Solvent control = 40 % เอธานอล, Positive control = คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม/แผ่น)



ภาพที่ 4.5 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ (GE = มะม่วงแก้ว, KE = มะม่วงเขียวเสวย, FE = มะม่วงฟ้าลั่น, NE = มะม่วงน้ำดอกไม้, Solvent control = 40 % เอธานอล, Positive control = คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม/แผ่น)



ภาพที่ 4.6 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *L.plantarum* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ (GE = มะม่วงแก้ว, KE = มะม่วงเขียวเสวย, FE = มะม่วงฟ้าลั่น, NE = มะม่วงน้ำดอกไม้, Solvent control = 40 % เอธานอล, Positive control = คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม/แผ่น)



ภาพที่ 4.7 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *P. pentosaceus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ (GE = มะม่วงแก้ว, KE = มะม่วงเขียวเสวย, FE = มะม่วงฟ้าลั่น, NE = มะม่วงน้ำดอกไม้, Solvent control = 40 % เอธานอล, Positive control = คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม/แผ่น)

จากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่นกระดาษซับกลม เมื่อใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบ 4 พันธุ์ ต่อการยับยั้ง *Staph. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.2 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสจะกว้างขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่าง ๆ

ความเข้มข้นสิ่งทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ± S.D.																							
	E. coli				*S.* Anatum				*Staph. aureus*				*L. innocua*				*L .plantarum*				*P. pentosaceus*			
	GE	KE	FE	NE	GE	KE	FE	NE	GE	KE	FE	NE	GE	KE	FE	NE	GE	KE	FE	NE	GE	KE	FE	NE
25 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	8.00±0.70	7.20±0.44	7.00±0.44	7.60±0.54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	9.20±0.54	8.40±0.89	8.20±0.45	9.00±0.70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	10.00±0.44	10.00±0.44	10.40±0.70	10.00±0.44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200 mg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0	11.80±0.44	11.00±0.70	10.60±0.54	11.00±0.70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solvent control 40 %	0				0				0				0				0				0			
Positive control 30 µg/disc	18.93±0.46				23.30±0.68				22.05±1.65				32.40±1.47				25.85±1.01				26.00±0.78			

หมายเหตุ 0 ไม่เกิดวงใส

GE = สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว

KE = สารสกัดจากเปลือกมะม่วงเขียวเสวย

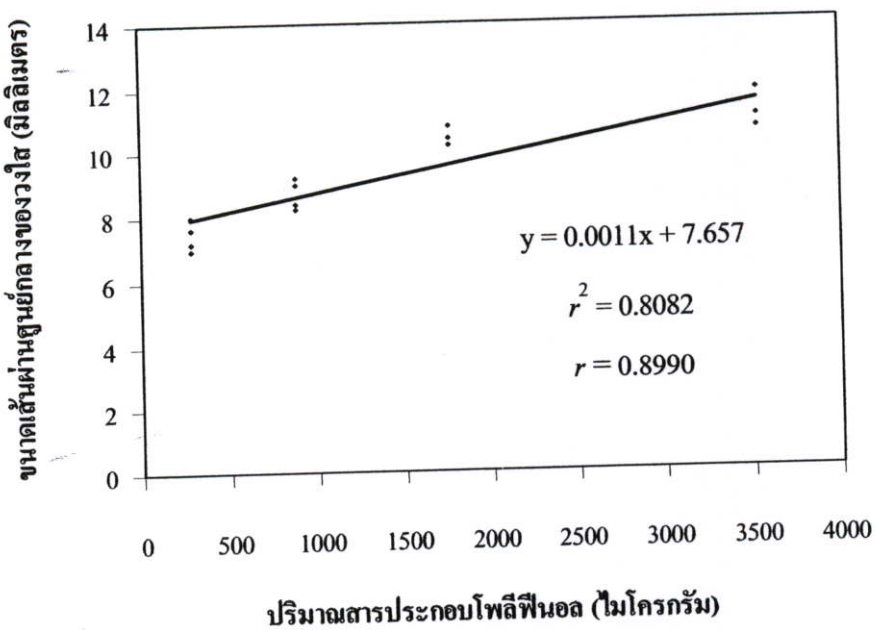
FE = สารสกัดจากเปลือกมะม่วงฟ้าลั่น

NE = สารสกัดจากเปลือกมะม่วงน้ำดอกไม้

Solvent control = 40 % เอธานอล

Positive control = คลอแรมเฟนนิคอล 30 ไมโครกรัม/แผ่น

จากข้อมูลปริมาณประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด ที่วิเคราะห์ได้ในตัวอย่างสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบพันธุ์ต่างๆ ในตารางที่ 4.1 สามารถคำนวณหาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดที่มีอยู่ในสารสกัดจากเปลือกมะม่วงที่แต่ละระดับความเข้มข้น (25, 50, 100, 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ที่หยดลงบนแผ่นกระดาษซับกลม ในการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อนำข้อมูลที่คำนวณได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดกับขนาดวงใสที่เกิดขึ้น ในการทดสอบสมบัติการต้าน *Staph. aureus* ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดบนแผ่นกระดาษซับกลมและขนาดวงใสที่เกิดขึ้น ในการทดสอบสมบัติการต้าน *Staph. aureus* ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์ต่าง ๆ

จากกราฟ ภาพที่ 4.8 จะเห็นได้ว่า สมบัติการต้าน *Staph. aureus* มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงแบบแปรผันตรง (r^2 = 0.8082 , r = 0.8990) กับปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด นั่นคือที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงสูงขึ้น หรืออีกนัยหนึ่งคือ เมื่อปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงขึ้น ความสามารถในการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* จะสูงขึ้นด้วย ผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นชัดเจนว่า สารประกอบโพลีฟีนอล จากเปลือกมะม่วงมีฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ก่อโรคดังกล่าว ซึ่งตรงกับรายงานของ Silva และคณะ (2005) โดยพบว่าปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจาก Brazilian Popolis Extracts มีผลต่อการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* โดยมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (r^2 = 0.8000 , r = 0.9055) เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 และ 4.2 จึงเลือกสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วไปศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) เนื่องจากเป็นตัวอย่างสารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุดและให้ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสกว้างที่สุด

4.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) และสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้าน (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal)

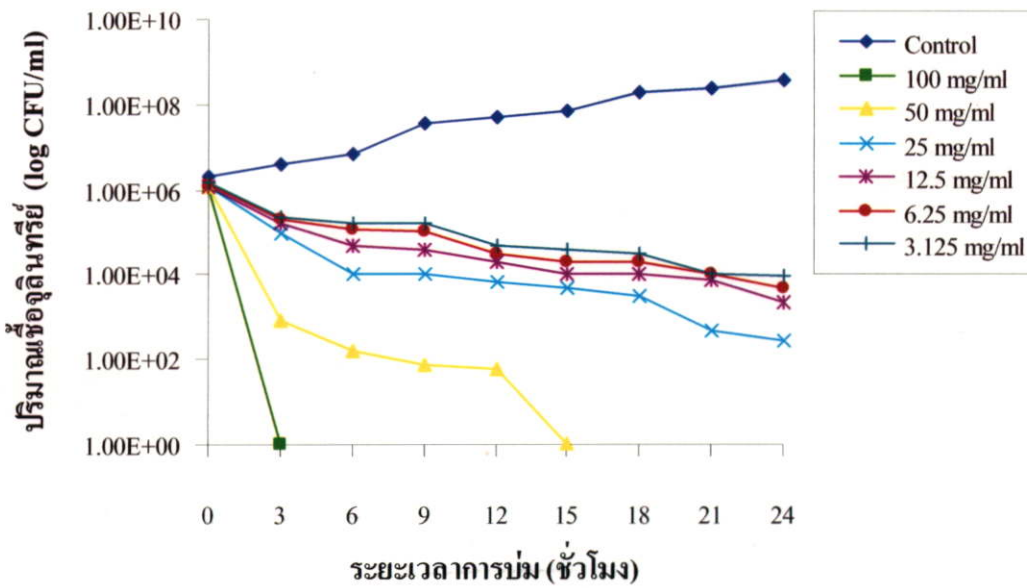
4.3.1 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว โดยวิธีเจือจางในอาหารเหลว (broth dilution method) โดยนำสารละลายของสารสกัดมาเจือจางในอัตราส่วน 1:2 (2- fold dilution) ด้วยอาหารเหลวให้ได้ความเข้มข้น 6 ระดับได้แก่ 100, 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วใส่เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 10^6 เซลล์ต่อหลอด ภายหลังการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่ระดับ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่พบการเจริญของเชื้อ ดังนั้นค่า MIC ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อ *Staph. aureus* คือ 12.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 2.76 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ซึ่งสูงกว่าค่า MIC ของสารสกัดจากเมล็ดมะม่วงที่สามารถต้าน *Staph. aureus* ได้ที่ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งรายงานโดย Toshihide และคณะ (2000)

4.3.2 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (Minimal bactericidal concentration, MBC) และสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้าน (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal)

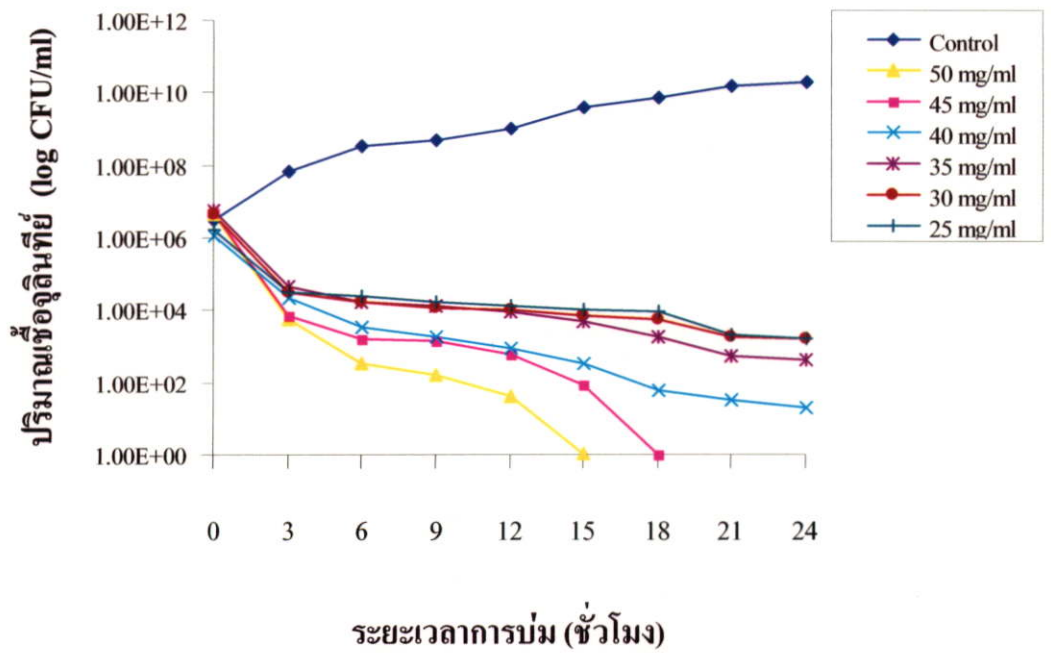
การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (MBC) ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว โดยการเจือจางแบบอัตราส่วน 1:2 (2- fold dilution) และ การตรวจสอบว่าสารสกัดมีสมบัติเป็นสารชนิดต้าน (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) ทำได้โดยตรวจหา

ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตอยู่ทุก ๆ 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง พล็อตกราฟระหว่างปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (log CFU/ml) กับระยะเวลา ถ้าสารสกัดเป็นชนิดต้านจุลินทรีย์ กราฟปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตที่ได้จะลดลงหรือคงที่ในช่วงการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง กรณีสารสกัดเป็นชนิดทำลายจุลินทรีย์ลักษณะของกราฟปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตที่ได้ จะมีลักษณะลดลงจนไม่มีการเจริญของเชื้อในระยะเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง จากกราฟภาพที่ 4.9 จะเห็นได้ว่า สมบัติของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบ เป็นชนิดทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) โดยพิจารณาจากกราฟปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ พบว่าลดลงจนไม่มีการเจริญของเชื้อในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MBC)โดยการเจือจางแบบอัตราส่วน 1:2 (2- fold dilution) ที่สามารถทำลาย *Staph. aureus* ได้คือ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสามารถทำลาย *Staph. aureus* ได้ในชั่วโมงที่ 15



ภาพที่ 4.9 ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ภายใน 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นในช่วง 3.125 – 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

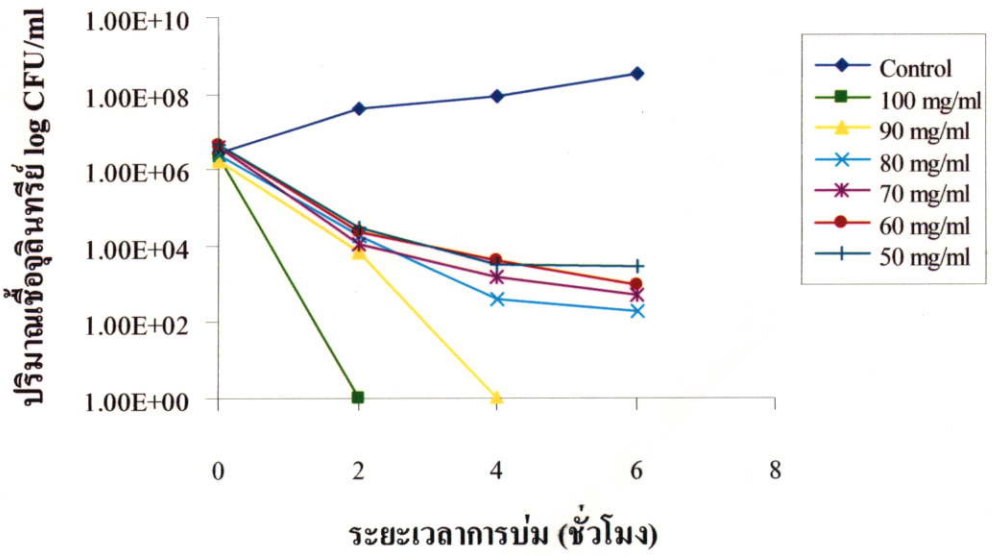
จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วโดยการเจือจางแบบอัตราส่วน 1:2 (2- fold dilution) ดังกล่าวข้างต้นทำให้ทราบถึงช่วงระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย *Staph. aureus* ภายใน 24 ชั่วโมง ได้คือ ช่วงความเข้มข้นที่ 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ถึง 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ค่า MBC ที่แน่นอนมากขึ้นจึงเลือกช่วงระดับความเข้มข้นดังกล่าวมาศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลาย *Staph. aureus* ผลการทดลองแสดงดังกราฟ ภาพที่ 4.10 จากกราฟ พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลาย *Staph. aureus* ได้คือ 45 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยสามารถทำลาย *Staph. aureus* ได้ในชั่วโมงที่ 18



ภาพที่ 4.10 ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ภายใน 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 25 – 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

4.3.3 การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) ภายใน 6 ชั่วโมง

จากการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทีย์ (MBC) และศึกษาสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้าน (bactriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) ในข้อ 4.3.2 ทำให้ทราบผลการตรวจสอบเบื้องต้นถึงความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ภายใน 24 ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่า สามารถทำลายจุลินทรีย์ *Staph. aureus* ได้ภายใน 15 ชั่วโมง และที่ระดับความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้ภายใน 3 ชั่วโมง จึงเลือกความเข้มข้นที่ 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มาศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ภายใน 6 ชั่วโมง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ซึ่งในการทำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตต้องใช้ระยะเวลาการบ่มภายใน 6 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังกราฟ ภาพที่ 4.11 จากกราฟแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นที่ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำลายจุลินทรีย์ ได้ภายใน 4 ชั่วโมง จึงเลือกความเข้มข้นที่ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลตร ไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง *Staph. aureus* ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต



ภาพที่ 4.11 ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ภายใน 6 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 50 – 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

4.4 ผลของ pH ต่อความเสถียรของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว

การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ในการยับยั้ง *Staph. aureus* และแบคทีเรียแลคติค 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ด้วยวิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น โดยทำการปรับ pH ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบจาก pH เริ่มต้น 3.27 ให้ได้เท่ากับ 4.00, 5.00 และ 6.00 ด้วย 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผลการทดลอง แสดงดังภาพที่ 4.12 จะเห็นได้ว่า การปรับ pH ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Staph. aureus* ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Toshihide และคณะ (2000) พบว่าที่ pH 4.00, 5.00 และ 6.00 ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสารสกัดจากเมล็ดมะม่วงต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค จากผลการทดลองที่ได้ทำให้ทราบว่า ผลการยับยั้ง *Staph. aureus* ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วไม่ได้เป็นผลมาจากการที่สารสกัดมี pH เป็นกรด (pH 3.27) และที่ pH 4.00, 5.00 และ 6.00 พบว่า สารสกัดยังคงมีความเสถียรดีอยู่ เนื่องจากยังสามารถยับยั้ง *Staph. aureus* ได้เหมือนเดิม

นอกจากนั้นผลของการปรับ pH ของสารสกัดยังไม่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียแลคติค 2 สายพันธุ์ (*L. plantarum* และ *P. pentosaceus*) ดังแสดงในภาพที่ 4.13 และ 4.14 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติค เช่นเดียวกับแบคทีเรียในกลุ่มของนมหมัก เช่น โยเกิร์ตซึ่งเป็นผลดีในการนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วไปใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Staph. aureus* ซึ่งมีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต เนื่องจากในระหว่างการหมักโยเกิร์ตจะมีการเปลี่ยนแปลง pH ค่อนข้างมาก

จากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่นกระดาษซับกลม เมื่อใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ในการทดลองการยับยั้ง *Staph. aureus* และแบคทีเรียแลคติค 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ที่ pH 4.00, 5.00 และ 6.00 ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.3

ภาพที่ 4.12 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *Staph. aureus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่มีการปรับให้มี pH ต่าง ๆ กัน

ภาพที่ 4.13 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *L. plantarum* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่มีการปรับให้มี pH ต่าง ๆ กัน

ภาพที่ 4.14 ผลการทดสอบสมบัติการต้านการเจริญของ *P. pentosaceus* โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่มีการปรับให้มี pH ต่าง ๆ กัน

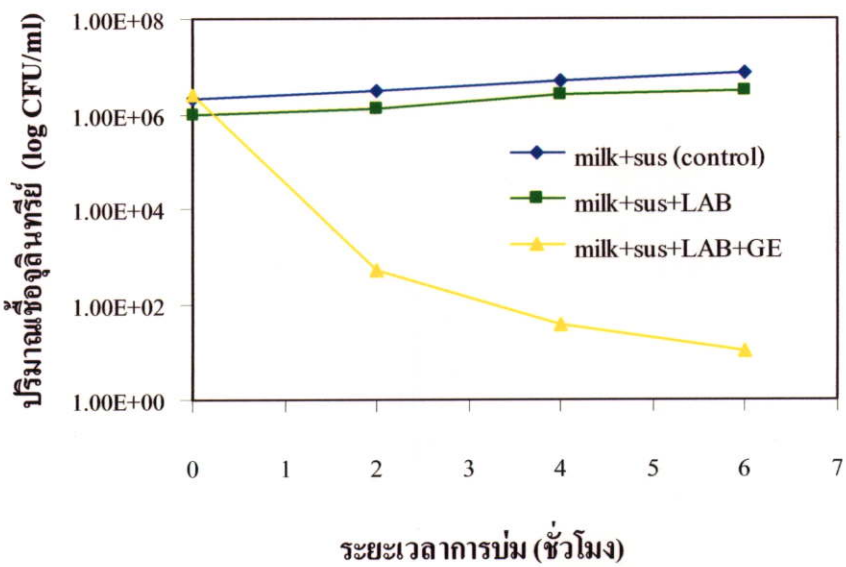
ตารางที่ 4.3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นเมื่อปรับ pH ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในการทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียแลคติค

pH	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) ± S.D.		
	Staph. aureus	*L. plantarum*	*P. pentosaceus*
4.00	10.00±0.79	0	0
5.00	9.90±0.74	0	0
6.00	9.90±0.55	0	0
Control (3.27)	10.20±0.91	0	0
0.1 N NaOH	0	0	0
Chloramphinecol 30 μg	25.40±0.89	32.30±0.45	34.10±0.89

หมายเหตุ 0 = ไม่มีผลยับยั้ง

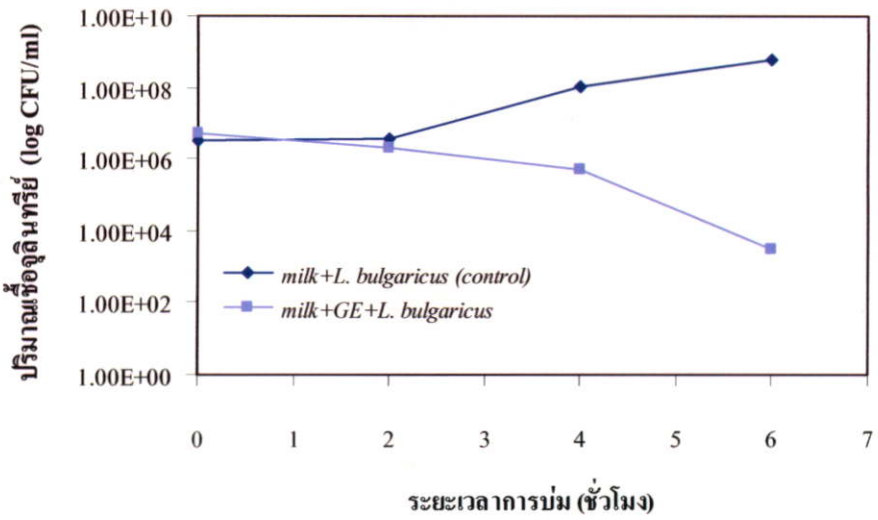
4.5 การศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่มี โอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต

จากการนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด ในการยับยั้ง *Staph. aureus* ภายใน 6 ชั่วโมง มาใส่ในโยเกิร์ต ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วให้ผลการยับยั้ง *Staph. aureus* ได้โดยที่ระยะการบ่มที่ชั่วโมงเริ่มต้นจากปริมาณเชื้อ 6.88 log CFU/ml เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมง พบเชื้อที่ 1 log CFU/ml โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staph. aureus* ได้ 5.88 log CFU/ml ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.15 เมื่อเปรียบเทียบ ชุดควบคุม คือ นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + เชื้อ *Staph. aureus* 6.88 log CFU/ml และ ชุดทดสอบ นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + เชื้อ *Staph. aureus* 6.88 log CFU/ml + เชื้อโยเกิร์ต (*L. bulgaricus* และ *S. thermophillus*) พบว่าเชื้อโยเกิร์ตสามารถลด *Staph. aureus* ได้ไม่ถึง 1 log CFU/ml จากเริ่มต้นที่ 6.88 log CFU/ml เมื่อผ่านไป 6 ชั่วโมง เชื้อ *Staph. aureus* คงเหลือที่ 6.48 log CFU/ml (ดังแสดงในภาพที่ 4.15) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วมีประสิทธิภาพที่ดีในการยับยั้ง *Staph. aureus* ในโยเกิร์ตโดยประสิทธิภาพในการยับยั้งยังคงไม่ลดลงในสภาพ pH ต่ำ ๆ ของโยเกิร์ต

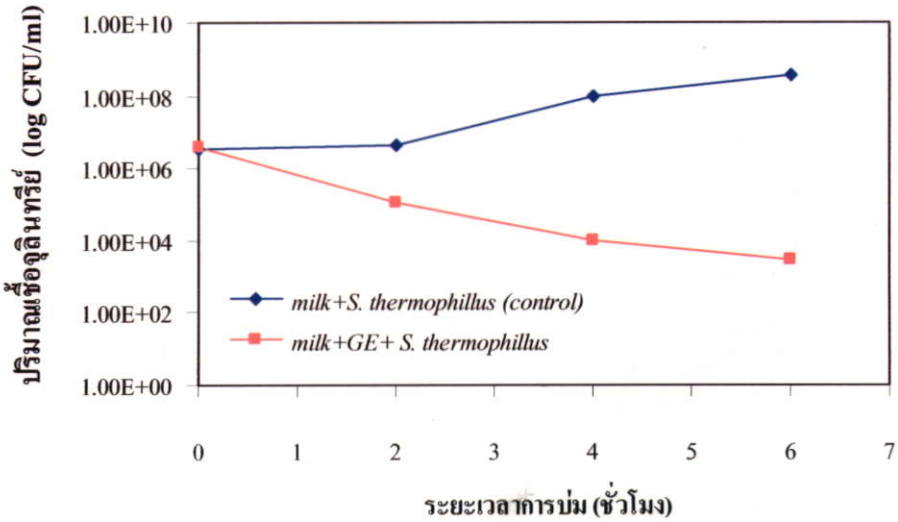


ภาพที่ 4.15 ผลการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในโยเกิร์ต ที่มีต่ออัตราการเจริญของ *Staph. aureus* ที่ระดับความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในระยะเวลาการบ่มโยเกิร์ต 6 ชั่วโมง (milk = นมสดพาสเจอร์ไรซ์, sus = *Staph. aureus* 6.88 log CFU/ml, LAB = Lactic acid bacteria, GE = สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ต่อการยับยั้งเชื้อโยเกิร์ตทั้ง 2 ชนิด คือ *L. bulgaricus* และ *S. thermophillus* พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วมีผลต่อเชื้อโยเกิร์ตทั้ง 2 ชนิด โดยไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโยเกิร์ต ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับ ชุดควบคุมคือ น้ำนม + เชื้อ *L. bulgaricus* กับ ชุดทดสอบคือ นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + เชื้อ *L. bulgaricus* พบว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วมีผลทำให้เชื้อ *L. bulgaricus* ลดลง โดยลดลงจาก 8.778 log CFU/ml เป็น 3.477 log CFU/ml ที่ระยะเวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.16) และ สำหรับชุดควบคุม คือ นมสดพาสเจอร์ไรซ์+ *S. thermophillus* กับ ชุดทดสอบคือ นมสดพาสเจอร์ไรซ์ + สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร + เชื้อ *S. thermophillus* พบว่า สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วมีผลทำให้เชื้อ *S. thermophillus* ลดลง โดยลดลงจาก 8.544 log CFU/ml เป็น 3.255 log CFU/ml ในระยะเวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.17) ซึ่งผลดังกล่าวส่งผลต่อการเกิดลิ่มนม (curd) ของโยเกิร์ตทำให้การเซทตัวของโยเกิร์ตเกิดขึ้นได้ไม่ดี เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดสอบเบื้องต้นถึงสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วง จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว น้ำดอกไม้ เขียวเสวย และฟ้าลั่น ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแลคติค ได้แก่ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เลือกมาเพื่อใช้เป็นตัวแทนของแบคทีเรียในกลุ่มแลคติค โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้การทดสอบคือ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบในโยเกิร์ต (90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ผลการทดลองที่แตกต่างกันดังกล่าว อาจเป็นไปได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบในโยเกิร์ตที่ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อาจเป็นระดับความเข้มข้นที่สูงเกินกว่าที่แบคทีเรียแลคติคจะทนได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Toshihide และคณะ (2000) ที่พบว่า ระดับความเข้มข้นที่มากกว่า 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (2500 ppm) ไม่มีผลในการยับยั้ง *L. plantarum* และ *L. casei* แต่มีผลต่อ *P. acidilactici* และ *S. thermophilus* NRIC 1747 นอกจากนี้ในการทดลองข้อ 4.2 เป็นการทดสอบด้วยวิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้นซึ่งมีองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่แตกต่างกันกับในโยเกิร์ต รวมทั้งวิธีการทดสอบซึ่งเป็นการหยดสารสกัดลงบนแผ่นกระดาษซับกลม และมีการทิ้งให้ไว้แห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบโดยใส่สารสกัดลงในโยเกิร์ต โอกาสที่เชื้อโยเกิร์ตจะสัมผัสกับสารสกัดได้โดยตรงมีมากกว่า จึงอาจเป็นผลทำให้เชื้อโยเกิร์ตบางส่วนถูกทำลายได้ นอกจากนั้นเชื้อที่ใช้ทดสอบด้วยวิธีการให้สารสกัดแพร่ในอาหารวุ้น เป็นกลุ่มแบคทีเรียแลคติคเช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ใช้เป็นหัวเชื้อในโยเกิร์ต แต่มีความแตกต่างกันที่สายพันธุ์ จึงอาจมีปัจจัยทางสายพันธุ์ของเชื้อที่ไม่เหมือนกัน ทำให้ผลการทดลองแตกต่างกันดังกล่าว



ภาพที่ 4.16 ผลการยับยั้ง *L. bugaricus* ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในระหว่างการหมักโยเกิร์ต (milk = นมสดพาสเจอร์ไรซ์, GE = สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



ภาพที่ 4.17 ผลการยับยั้ง *S. thermophillus* ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในระหว่างการหมักโยเกิร์ต (milk = นมสดพาสเจอร์ไรซ์, GE = สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staph. aureus* ในระหว่างการหมักโยเกิร์ตได้เป็นอย่างดี โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบ เป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่อาจนำมาใช้ทดแทนสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (antimicrobials) ซึ่งปัจจุบันในหลายประเทศ เริ่มมีการต่อต้านการใช้สารเคมี เป็นสารป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากพบอันตรายจากฤทธิ์ข้างเคียง และความเป็นพิษของสารเคมีสังเคราะห์ จึงให้ความสนใจกับสารสกัดจากธรรมชาติ โดยมีการค้นคว้าวิจัยพบว่าสารประกอบโพลีฟีนอล เป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด (Vaquero *et. al.* 2005; Silva *et. al.* 2005; Lu *et. al.* 2004; Vuotto 1999; Kujumgiev 1998) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของสารประกอบโพลีฟีนอลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์นั้น จากรายงานของ Karou และคณะ (2005) พบว่าสารประกอบโพลีฟีนอลจะไปยับยั้งการทำงานของไฮโดรไลติก เอนไซม์ (hydrolytic enzymes) ซึ่งได้แก่ โปรติเอส (proteases) และคาร์โบไฮโดรเรส (carbohydrolases) จึงส่งผลต่อการทำงานของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด

ในการนำสารสกัดจากธรรมชาติ ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ แต่ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม ในส่วนของปริมาณที่เหมาะสม ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากระดับปริมาณที่สูงอาจส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพ ดังเช่น ผลการศึกษาของงานวิจัยนี้ ที่ได้มีการนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบที่ระดับความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ซึ่งมีแบคทีเรียแลคติคเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในการเซทตัวของโยเกิร์ต แต่การใช้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดิบ นอกจากมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *Staph. aureus* แล้ว ยังมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแลคติคด้วย จึงมีผลทำให้การเซทตัวเกิดได้ไม่สมบูรณ์ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่ระดับความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ธรรมชาติเพื่อยับยั้ง *Staph. aureus* ได้ดี แต่อาจไม่เหมาะสมกับการใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต ทั้งนี้ในการจะนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตอาจจำเป็นต้องใช้ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และระยะเวลาที่ใช้ในการทำลาย *Staph. aureus* อาจจำเป็นต้องมากกว่า 6 ชั่วโมง โดยอาจใช้เวลาที่ 15 - 18 ชั่วโมง ดังผลการศึกษาใน ข้อ 4.3.2 ซึ่งพบว่าระดับความเข้มข้นที่ 50 และ 45 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำลาย *Staph. aureus* ได้ในชั่วโมงที่ 15 และ 18 ตามลำดับ ทั้งนี้จะต้องมีการทดสอบผลของสารสกัดที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว ต่อการเจริญของเชื้อจุลินทีย์ที่ใช้หมักโยเกิร์ตต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด ในสารสกัดจากเปลือกมะม่วงดิบ (*Mangifera indica* L.) 4 พันธุ์ คือ มะม่วงแก้ว มะม่วงน้ำดอกไม้ มะม่วงเขียวเสวย และมะม่วงฟ้าลั่น พบว่า มีปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด เท่ากับ 220.80 ± 4.80, 213.10 ± 2.22, 167.77 ± 1.42 และ 143.26 ± 2.32 มิลลิกรัม กรดแกลลิค/กรัม สารสกัด ตามลำดับ

2. การศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค 4 สายพันธุ์ (*E.coli,S.* Anatum, *Staph. aureus, L. innocua*) และแบคทีเรียแลคติค 2 สายพันธุ์ (*L. plantarum, P. pentosaceus*) ด้วยวิธีการให้สารที่ทดสอบแพร่ในอาหารวุ้น (agar disc diffusion method) พบว่า สารสกัดจากเปลือกมะม่วงทั้ง 4 พันธุ์ ให้ผลการยับยั้ง *Staph. aureus* เพียงสายพันธุ์เดียว โดยสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว พบว่าให้ผลการยับยั้งดีที่สุด เมื่อเทียบกับสารสกัดจากเปลือกมะม่วงพันธุ์อื่น ๆ ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้สมบัติการต้าน *Staph. aureus* ยังมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง ($r^2 = 0.8082$, $r = 0.8990$) กับปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดที่มีในสารสกัดที่ทดสอบ

3. การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) ความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลายจุลินทรีย์ (minimal bactericidal concentration, MBC) และสมบัติของสารสกัดว่าเป็นชนิดต้าน (bacteriostatic) หรือทำลายจุลินทรีย์ (bactericidal) พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านการเจริญ (minimum inhibitory concentration, MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดในการทำลาย (minimum bactericidal concentration, MBC) *Staph. aureus* ภายใน 24 และ 6 ชั่วโมง ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว คือ 12.5, 45 และ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วมีความเสถียรที่ pH ในช่วง 4-6 เนื่องจากยังสามารถยับยั้ง *Staph. aureus* ได้ดี

4. การศึกษาผลของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Staph. aureus* ที่มีโอกาสปนเปื้อนในโยเกิร์ต พบว่า สารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่ระดับความเข้มข้น 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *Staph. aureus* ได้ 5.88 log CFU/ml ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วดังกล่าวมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียแลคติค (*L. bugaricus* และ *S. thermophillus*) ที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตโยเกิร์ตด้วย ซึ่งส่งผลให้การเซทตัวของโยเกิร์ตเกิดได้ไม่สมบูรณ์

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 จากผลการทดลองที่แตกต่างกัน เมื่อทดสอบสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว โดยวิธีการให้สารที่ทดสอบแพร่ในอาหารวุ้น ซึ่งไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติค (*L. plantarum* และ *P. pentosaceus*) แต่ปรากฏว่าสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ผลในการยับยั้งเชื้อโยเกิร์ต (*L. bugaricus* และ *S. thermophillus*) ดังนั้นจึงควรมีการยืนยันผลการทดสอบดังกล่าวว่าผลการทดลองที่แตกต่างกันนั้น เป็นผลมาจากความแตกต่างของลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบที่เป็นของแข็ง (agar) และ ของเหลว (broth) หรือเป็นผลมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติคที่ใช้ทดสอบ ซึ่งสามารถทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้ปริมาณสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบกับเชื้อโยเกิร์ตในอาหารเหลวเปรียบเทียบกับอาหารแข็ง และถ้าต้องการทดสอบว่า ผลดังกล่าวเกิดจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแลคติค สามารถทำได้โดยใช้วิธีการให้สารที่ทดสอบแพร่ในอาหารวุ้น (agar disc diffusion method) และทดสอบกับเชื้อโยเกิร์ต

5.2.2 ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้ระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วที่ 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพียงระดับเดียวในการทดสอบกับโยเกิร์ต ซึ่งความเข้มข้นระดับนี้ อาจเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปจึงมีผลต่อแบคทีเรียแลคติคที่ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ดังนั้นจึงควรมีงานวิจัย เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการนำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้ว ไปใช้ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต โดยจากการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง *Staph. aureus* ภายใน 24 ชั่วโมง (ข้อ 4.3.2) พบว่าระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 90 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะใช้ระยะเวลาในการทำลาย *Staph. aureus* มากกว่า 6 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าระดับความเข้มข้นที่ 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะใช้เวลาในการทำลาย *Staph. aureus* ได้ภายใน 15 ชั่วโมง และระดับความเข้มข้นที่ 45 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะใช้เวลาในการทำลาย *Staph. aureus* ได้ภายใน 18 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้ก็อาจใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวิจัย เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วในการนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตต่อไป นอกจากนั้น ควรมีงานวิจัยและพัฒนานำสารสกัดจากเปลือกมะม่วงแก้วไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น ๆ นอกจากผลิตภัณฑ์หมัก เช่น โยเกิร์ต เพื่อศึกษาผลของการนำสารสกัดจากธรรมชาติ ไปใช้ทดแทนสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (antimicrobials)

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. 2546. *ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์พืช : มะม่วงเล่ม 2.* กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

จิรภรณ์ เกินศักดิ์ไผ่. 2542. *"ผลยับยั้งของพืชสมุนไพรบางชนิดที่ใช้โดยชาวเขาต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วง."* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เฉลิมชัย แก้วชาติ. 2539. *การปลูกมะม่วง.* กรุงเทพฯ : อักษรสยามการพิมพ์.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 2547. *การใช้ประโยชน์และพันธุ์มะม่วง.* [Online]. Available : http://www.sut.ac.th/etexts/Agri/Insectfinal2/Insects% 20web/ chapter4_mango2.htm. (Accessed 2004).

มาลิน จุลศิริ. 2540. *ยาต้านจุลชีพ.* กรุงเทพฯ : สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. *เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.* กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

วนิดา ชื่นชัน. 2545. *"ผลของรอยัลเยลลีต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในนมพาสเจอไรซ์และโยเกิร์ต."* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิจิตร วังใน. 2533. *การทำสวนมะม่วง.* กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิวัฒน์ หวังเจริญ. 2545. *บทบาทของสารประกอบฟีนอลต่อสุขภาพ.* อาหาร. 32:245-253.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. *จุลชีววิทยาทางอาหาร.* กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Aimin W., Pascal D., Kareen S. and Peter T. 2003. *Antilisterial Activity of Selected Phenolic Acids.* Journal of Food Microbiology. 20: 305-311.

Beerh O. P. 1976. *Utilization of mango waste: Peel as a source of pectin.* Journal of Food Science and Technologies. 13:96.

Berardini N., Knödler M., Schieber A. and Carle R. 2005. *Utilization of mango peels as a source of pectin and polyphenolics.* Inovative Food Science and Emerging Technologies. 6:442-452.

Chi-Tang H., Chang Y. L. and Mou-Tuan H. 1992. *Phenolic compounds in food and their effects on health I.* New York : Maple Press.

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

Cvetnic Z. and Knezevic-V. S. 2004. *Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethaolic extract.* Acta Pharmacologica Sinica. 54:243-250.

ESR Ltd. 2001. *Staphylococcus aureus.* [Online]. Available : http://www.nzfsa.govt.nz. (Accessed May 2001).

Evans M. R., Salmon R. L., Nehaul., Mably S., Wafford L., Nolan-Farrell M. Z., Gardner D. and Ribeiro C. D. 2005. *An Outbreak of Salmonella* Typhimurium DT 170 *Associated with Kebab Meat and Yoghurt Relish.* [Online], available World Wide Web, URL:http:// www.ncbi.nlm.gov. (Accessed June 2005).

Harnorne J. B. 1980. *Plant phenolics.* In Encyclopedia of Plant Physiology, volume 8 Secondary Plant Products (Beil E.A. and Charlwood B.V.,eds). New York : Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

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.

Jussi P. R., Susanna R., Marina H., Anu H., Marja K., Tytti K., Kalevi P., Heikki V. and Pia V. 2000. *Antimicrobial Effects of Finnish Plant Extracts Containing Flavonoids and Other Phenolic Compounds.* Journal of Food Microbiology. 56:3-12.

Karou D., Dicko M.H., Simpore J. and Traore A.S. 2005. *Antioxidant and antibacterial activity of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso*. Journal of Biotechnology. 4:823-828.

Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R. and Popov S. 1999. *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin*. Journal of Ethnopharmacology. 64:235-240.

Larrauri J. A. 1998. *High Dietary Fiber Powders With Associated Polyphenols.* [Online]. Available : http://ecsoc2.hcc.ru/DP_TOP1/dp032/dp032.htm. (Accessed September 1998).

Lin Y. T., Labbe R. G. and Shetty K. 2005. *Inhibition of Vibrio parahaemolyticus in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synerdies and lactic acid.* Innovative Food Science and Emerging Technologies. 6: 453-458.

Listeria – a patient's guide. 2005. [Online]. Available : http://www.medic8.com/ healthguide/articles/listeria.html. (Accessed June 2005).

Lu L-C., Chen Y-W. and Chou C-C. 2004. *Antibacterial activity of propolis against Staphylococcus aureus*. International Journal of Food Microbiology. 102: 213-220.

Morgan D., Newman C. P., Hutchinson D. N., Walker A. M., Rowe B and Majid F. 2005. *Verotoxin Producing Escherichia coli O 157 Infections Associated with the Consumption of Yoghurt.* [Online]. Available : http://www. ncbi.nlm.nil.gov. (Accessed June 2005)

Nilgün G. B., Gülcan Ö. and Osman S. 2003. *Total Phenolic Contents and Antibacterial Activities of Grap (Vitis vinifera L.) Extracts.* Journal of Food Control. 15:335-339.

Orihara O., Sakauchi I. and Nakazawa Y. 1992. *Type and Standards for Fermented Milks and Lactic Drinks. In Functions of Fermented Milk : Challenges for Health Sciences.* (Nakazawa Y. and Hosono A.,eds). Cambridge : The University Press.

Sakanaka S., Juneja L. R. and Taniguchi M. 2000. *Antimicrobial effect of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria.* Journal of Bioscience and Bioengineering. 90:81-85.

Silva J.F.M, Souza M.C., Matta S.R., Andrade M. R. and Vildal F.V.N. 2005. *Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities.* Food Chemistry. (accepted July 2005)

Singleton V.L. and Rossi Jr. J.A. 1965. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolydic phosphotungstic acid reagents.* American Journal of Enology and Viticulture. 16:144-158.

Sydney M.F. and Ellen J.B. 1986. *Bailey and Scott's diagnostic microbiology.* 7th ed. St. Louis : C.V. Mosby Co.

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

Tozzi E. Alberto. 1997. *Survival of E. coli in Yoghurt.* [Online]. Available : http ://www. iss.it (Accessed December 1997).

Vaquero M.J.R, Alberto M.R. and Manca de Nadra M.C. 2005. *Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines.* Food Control. (Accepted August 2005)

Vuotto M.L., Basile A., Moscatiello V., Sole P., Cobianchi R.C., Laghi E. and Ielpo M.T.L. 2000. *Antimicrobial and antioxidant activities of Feijoa sellowiana fruit.* International Journal of Antimicrobial Agents. 13:197-201.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

แบคทีเรียทดสอบ

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น แยกได้ครั้งแรกจากอุจจาระเด็กที่ป่วยด้วยโรคท้องร่วงในปี ค.ศ. 1885 โดยนักจุลชีววิทยาชาวเยอรมันชื่อ ทีโอดอร์ เอสเชอริช (Theodor Escherich) ต่อมาได้รับการตั้งชื่อเป็น *Escherichia coli* (*E. coli*) ก่อนปี ค.ศ. 1982 ไม่ถือว่าเป็นแบคทีเรียที่มีอันตรายแม้ว่าจะเป็นที่เข้าใจกันว่าแบคทีเรียนี้มักจะทำให้เด็กทารกในประเทศกำลังพัฒนาเกิดอาการท้องเดิน เหตุที่เป็นแบคทีเรียในลำไส้ จึงพบบ่อยในอุจจาระของคนและสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงใช้แบคทีเรียนี้เป็นดรรชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร (index of faecal contamination) นับตั้งแต่ปี ค.ศ.1971 เป็นต้นมา *E. coli* ได้รับการจัดไว้ในประเภทจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ สืบเนื่องจากการระบาดที่มาจากเนยแข็งนำเข้าสหรัฐอเมริกา ทำให้ผู้บริโภคเกือบ 400 คน ใน 14 มลรัฐป่วย แม้ว่าก่อนหน้านี้ *E. coli* เคยมีประวัติว่าทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษระบาดในประเทศอื่นมาแล้วอย่างน้อย 5 ครั้ง โดยครั้งล่าสุดเกิดในประเทศอังกฤษในปี ค.ศ. 1947 การระบาดครั้งสำคัญของ *E. coli* เกิดขึ้นในสหรัฐอเมริกาปี ค.ศ. 1982 และ ค.ศ. 1993 ทำให้มั่นใจว่า *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

การจำแนกชนิดของ *E. coli* แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้

(1) กลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในทางเดินอาหาร (Enteropathogenic *E. coli*) เขียนย่อว่า EPEC

(2) กลุ่มที่ทำลายเซลล์ในระบบทางเดินอาหาร (Enteroinvasive *E. coli*) เขียนย่อว่า EIEC

(3) กลุ่มที่สร้างสารพิษขึ้นในทางเดินอาหาร (Enterotoxigenic *E. coli*) เขียนย่อว่า ETEC

(4) กลุ่มที่ทำให้เกิดเลือดออกในทางเดินอาหาร (Enterohemorrhage *E. coli*) เขียนย่อว่า EHEC

(5) กลุ่มที่ทำให้เกิดการรวมตัวของเซลล์บุผนังลำไส้ (Enteroaggregative *E. coli*) เขียนย่อว่า EaggEC

2. *Salmonella*

Salmonella เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกแจลลา เป็นสาเหตุของการก่อโรคที่สำคัญเช่น ไข้ไทฟอยด์ (typhoid จากเชื้อ *Salmonella* Thyphi) พาราไทฟอยด์ (paratyphoid จากเชื้อ *S.* Paratyphy) และ โรคอุจจาระร่วงจากเชื้อในกลุ่มที่ไม่ใช้ไทฟอยด์ (non-typhi salmonellae) หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคที่เรียกว่าโรค salmonellosis ซึ่งกลุ่มนี้จะมีมากถึงสองพันกว่าเซโรวาร์และปัญหาสำคัญของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษในอาหารมากกว่า *S.* Typhi เชื้อในกลุ่ม non-typhi salmonellae เป็นกลุ่มที่สร้างปัญหาให้กับอาหารและโรงงานอุตสาหกรรมอาหารมาก เนื่องจากเชื้อกลุ่มนี้ถ้าพบปนเปื้อนในอาหารที่ผ่านการแปรรูปแล้วจะเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการผลิตอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ (sanitary index microorganism) ดังนั้นในอาหารที่ผลิตหลายประเภททั้งที่จำหน่ายในประเทศและเพื่อการส่งออก จะต้องทำการตรวจหาเชื้อนี้และต้องตรวจไม่พบในตัวอย่างอาหารที่ทำการสุ่มตรวจอย่างน้อย 25 กรัม ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยของอาหารที่วางจำหน่ายในประเทศนั้น ๆ เชื้อในกลุ่มดังกล่าวจะมีระยะฟักตัวนาน 12-36 ชั่วโมง ระยะเวลาของการป่วยนาน 1-8 วันโดยจะมีอาการของโรคคือ ปวดหัว เป็นไข้ ปวดท้อง อาเจียน และอุจจาระร่วง ซึ่งผู้สูงอายุ เด็กอ่อน หรือผู้ที่อยู่ในสภาวะอ่อนแอ ถ้ามีการติดเชื้อในกลุ่มนี้อาจเป็นอันตรายถึงตายได้ โดยที่ปริมาณเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับผู้บริโภคนั้นมักอยู่ในช่วง 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหารที่บริโภค

3. *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มักจะอยู่กับเป็นกลุ่มก้อนเหมือนรวงผึ้งหรือพวงองุ่น เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจะเจริญได้ดีในช่วงที่มีอากาศหรือมีอากาศเพียงเล็กน้อยได้ และจะสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือที่สูงกว่าร้อยละ 10 และเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ไม่ต่ำกว่า 0.86 เมื่อเจริญในอาหาร จะสร้างสารพิษ exotoxin ที่เรียกว่า enterotoxin เป็นสารพิษที่ทนต่อการทำลายด้วยความร้อนสูง หรือน้ำเดือดนานกว่า 30 นาที ดังนั้นอาหารที่มีการปนเปื้อนจะเป็นอันตรายมาก ถ้าปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลานานจนเชื้อสามารถเจริญได้ เพราะเมื่อเชื้อเจริญได้จนสร้าง enterotoxin ออกมาไม่ว่าจะนำอาหารไปผัดหรืออุ่นต้มให้ร้อน เชื้ออาจถูกทำลายได้หมด แต่ enterotoxin ยังอาจหลงเหลืออยู่ อาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ถึงแม้ว่าจะมีการอุ่นอาหารให้ร้อนก่อนการบริโภคเมื่อผู้บริโภคทานอาหารที่มีสารพิษนี้เข้าไป ระยะฟักตัวของโรค (Incubation period) ที่เกิดจากสารพิษนี้จะเกิดหลังจากทานอาหารเข้าไปจะอยู่ในช่วง 2-6 ชั่วโมง โดยที่อาการของโรคยังแสดงอยู่นาน 6-24 ชั่วโมง อาการของโรคที่พบ เช่น ปวดท้องอย่างแรง อาเจียน อุจจาระร่วง เป็นต้น โดยที่อาการของ

โรคจะรุนแรงในช่วงแรก ๆ แต่เมื่อพิษเจือจางลงจากการอาเจียนหรือถ่ายท้องแล้ว อาการจะค่อย ๆ ทุเลาลง ซึ่งไม่มีรายงานการตายที่เกิดจากเชื้อนี้ทางอาหาร

4. *Listeria monocytogenes*

Listeria เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ผอมเล็ก ไม่สร้างสปอร์ และเจริญได้ทั้งที่มี และไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) เมื่อย้อมสีแกรม บางครั้งจะเห็นแบคทีเรียปรากฏขึ้นมีลักษณะคล้ายเป็นอักษรจีน *Listeria* สร้างเอนไซม์คะทะเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เคลื่อนที่โดยมีแซ่รอบตัว (peritrichous flagella) ก่อนหน้านี้ รู้จักแบคทีเรียนี้ในฐานะที่ทำให้เกิดโรคระบาดในสัตว์โดยทำให้สัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น วัว แพะ แกะ เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ในปี ค.ศ. 1926 เมอร์เรย์และคณะได้กล่าวถึงแบคทีเรียนี้เป็นครั้งแรกในชื่อ *Bacterium monocytogenes* ว่าเป็นสาเหตุทำให้กระต่ายในห้องทดลองมีสัญญาณการถูกทำลายของเม็ดเลือดขาว (Murray et al., 1926) เป็นผลให้แบคทีเรียนี้ได้รับการจัดไว้ในกลุ่มที่ทำให้คนและสัตว์เป็นโรคนับแต่นั้นมา

5. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียที่มีรูปเป็นท่อนค่อนข้างยาว มักเรียงต่อกันเป็นลูกโซ่เป็นพวกต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (Microaerophilic) แต่มีบางชนิดเป็นพวกแอนแอโรบ สลายน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติคเป็นส่วนใหญ่ ถ้าเป็นพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) จะสลายน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติค เกือบทั้งหมด มีกรดอะซีติค คาร์บอนไดออกไซด์ และอื่น ๆ บ้างเล็กน้อย แต่ถ้าเป็นพวกเฮตเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) จะสลายน้ำตาลแล้วให้สารระเหยได้ รวมทั้งแอลกอฮอล์ในปริมาณมาก พอๆ กับกรดแลคติค ในปัจจุบันการหมักแตงกวาดองมีการใช้ *Lactobacillus plantarum* เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น เพื่อควบคุมคุณภาพในการหมัก แทนการหมักแบบดังเดิม

6. *Pediococcus pentosaceus*

Pediococcus pentosaceus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่เป็น 4 หรือเป็นคู่ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวกต้องการออกซิเจนเล็กน้อย ในการเจริญเติบโต ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส การหมักเป็นแบบโฮโมแลคติค หมักน้ำตาลให้กรด 0.5-0.9 % ส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติค ต้องการอาหารที่ซับซ้อนในการเติบโต พบทั่วไปในอาหารหมัก พบได้ในชีส ไส้กรอกหมัก ไวน์แดง กระหล่ำปลีดอง

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม

1. Trypticase soy broth - yeast extract

Trypticase soy broth	**30**	**g**
Yeast extract	**6**	**g**
น้ำกลั่น	**1,000**	**ml**

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

2. Trypticase soy agar - yeast extract

Trypticase soy broth	**30**	**g**
Agar	**10**	**g**
Yeast extract	**6**	**g**
น้ำกลั่น	**1,000**	**ml**

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3. MRS broth

MRS broth	**52**	**g**
น้ำกลั่น	**1,000**	**ml**

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน ให้ความร้อนจนอาหารละลาย นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

4. MRS agar

MRS broth	**52**	**g**
Agar	**10**	**g**
น้ำกลั่น	**1,000**	**ml**

ละลายส่วนผสมเข้าด้วยกัน นำไปต้มจนวุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

5. 0.1 % Peptone

Peotone	**0.1**	**g**
น้ำกลั่น	**100**	**ml**

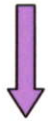
ละลาย Peptone ในน้ำกลั่นให้เข้ากันแล้วแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 มล.นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

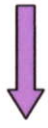
ภาพเครื่องมือ อุปกรณ์ และขั้นตอนการเตรียมสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

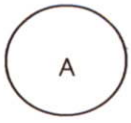
ปอกเปลือก

นึ่งไอน้ำ 10 นาที



ทิ้งให้แห้ง





A

หั่นเป็นชิ้นขนาด 1x2 เซนติเมตร

มะม่วง : 95 % เอธานอล

(1 : 10)

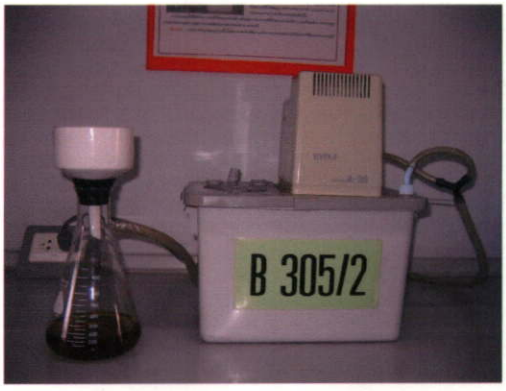
ตีปั่น 2 นาที

เขย่า 18 ชั่วโมง

ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที

B

B



กรองด้วยกระดาษกรอง What man No. 2

ระเหยตัวทำลายออกโดยเครื่องระเหยแบบหมุน

ภายใต้สุญญากาศ (Rotary evaporator)อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

เก็บสารสกัดที่-20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมด จากเปลือกมะม่วง

การเตรียมกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิค

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิค ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยละลายกรดแกลลิค 0.0400 กรัม ใน 95 % เอธานอล ปรับปริมาตร ให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

2. ปิเปต สารละลายมาตรฐานที่ได้ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดละ 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ปริมาณของกรดแกลลิคในแต่ละขวดเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80, 100 และ 120 ไมโครกรัม ตามลำดับ

3. นำขวดรูปชมพู่ทั้งหมดมาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteau ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

4. เติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายจากขวดที่ 1 เป็น blank (กรณีที่สารละลายปฏิกิริยาขุ่น ให้นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกก่อนการวัดค่าดูดกลืนแสง)

6. เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 730 นาโนเมตร กับปริมาณกรดแกลลิคเป็นไมโครกรัม

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในสารสกัดจากเปลือกมะม่วง

1. ปิเปตสารสกัดจากเปลือกมะม่วงความเข้มข้น 0.1 % ในตัวทำละลาย 40 % เอธานอล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 9.5 มิลลิลิตร

2. เติม Folin- Ciocalteau 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

3. เติมสารละลาย Na_2Co_3 ความเข้มข้น 10 % ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที (กรณีที่สารละลายปฏิกิริยาขุ่น ให้นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกก่อนการวัดค่าดูดกลืนแสง)

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 730 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง ในการเตรียม blank คำนวนหาปริมาณสารประกอบโพลีฟีนอลทั้งหมดในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนภชลัช ยอดพรหม เกิดวันที่ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดฉะเชิงเทรา สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมอาหาร จากมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย เมื่อปี พ.ศ. 2544

ประวัติการทำงาน ปี พ.ศ. 2544 – 2546 ตำแหน่งหัวหน้าแผนกประกันคุณภาพ บริษัท ซันวา อินเตอร์ฟู้ด จำกัด

ปี พ.ศ. 2546 ศึกษาต่อในระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในสาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2549