รหัสโครงการ SUT3-305-56-24-07

รายงานการวิจัย

การพัฒนาคุณภาพและประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการล้างผัก ผลไม้และพื้นผิววัสดุ

(Quality and effective biosurfactant development for cleaning fruits and vegetables and surface washing materials)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ **SUT3-305-56-24-07**

รายงานการวิจัย

การพัฒนาคุณภาพและประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการล้างผัก ผลไม้และพื้นผิววัสดุ

(Quality and effective biosurfactant development for cleaning fruits and vegetables and surface washing materials)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีผู้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 – 2557 ที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งขอบคุณหน่วยงานอาคารศูนย์เครื่องมือ 1 อาคารศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัยทดลอง ตลอดจนศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นแหล่งให้ข้อมูลประกอบงานวิจัยและเอกสารอ้างอิงต่างๆ เพื่อจัดทำรายงานการวิจัยเล่มนี้ให้ลุล่วงสำเร็จไปได้ด้วยดี

ผศ.ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

สิงหาคม 2559

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การพัฒนาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยการประยุกต์ใช้สารตั้งต้นในกระบวนการหมักจากวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ มะเฟือง (*Averrhoa carambola* L.) นำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักแบบ spontaneous fermentation ซึ่งเป็นหมักด้วยวิธีการธรรมชาติ ที่อาศัยแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ในวัตถุดิบ จุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถเจริญในสภาวะการหมักแบบ facultative fermentation ทำให้สามารถใช้สารตั้งต้นในวัตถุดิบผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ผลการติดตามกิจกรรมและสารเมทาบอไลท์ที่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการหมัก สรุปว่าสารเมทาบอไลท์และหรือสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางเคมี จุลินทรีย์ และกายภาพที่ดีที่สุดต่อผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ การหมักเป็นระยะเวลา 3 เดือน ทำให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุไฟฟ้าเท่ากับ 1,272.58 ppm ปริมาณสารซาโปนิน 2.91 mg/ml ค่าแรงตึงผิว (surface tension) 43.43 mN/m ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 636.29 ppm และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ด้วยคุณสมบัติข้างต้นจึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ (biosanitizer) สำหรับล้างในผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สด โดยเฉพาะมะเขือเทศ และโหระพา ที่มีปริมาณการปนเปื้อนจุลินทรีย์กลุ่ม *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50 ppm มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณ *Staphylococcus aureus* ในมะเขือเทศ และโหระพา ลงได้ถึง 2 และ 1 log ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดอย่างน้อย 100 ppm สามารถควบคุม *Salmonella* spp. ให้ตรวจไม่พบในตัวอย่างมะเขือเทศและโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ เพื่อให้เกิดกระบวนการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้มีประสิทธิภาพสูงสุด วิธีการล้างที่ดีที่สุดคือการล้างด้วยน้ำประปาด้วยวิธีการแช่นาน 2 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำที่ผ่านการเตรียมด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการแช่นาน 5 นาที ส่วนการใช้สำหรับล้างพื้นผิวที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง ได้แก่พื้นผิวประเภทสแตนเลสซึ่งเป็นพื้นผิวที่นิยมใช้และส่วนประกอบของภาชนะที่ใช้สัมผัสอาหารโดยตรงในอุตสาหกรรมอาหาร จากผลการวิเคราะห์ และทดสอบทำให้ทราบว่าจะต้องใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับความเข้มที่สูงกว่าการล้างผักผลไม้ ซึ่งความเข้มข้นที่เลือกใช้ในการทดสอบ คือ 200, 400 และ 600 ppm พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* บนพื้นผิวดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ความเข้มข้น 600 ppm มีประสิทธิภาพในการควบคุมและลดปริมาณ *S. aureus* ได้ดีที่สุด และที่ความเข้มข้นต่ำสุด 200 ppm เพียงพอต่อการควบคุมและลด *Salmonella* spp.

Abstract

Production and development of biosurfactant (BSF) using Carambola (*Averrhoa carambola* L.) waste as substrate for bacteria, yeast and mold under spontaneous fermentation. These microorganisms could grow and utilize a substrate via microbial metabolic pathways. The chemical, microbiological and physical properties of BSF at three month fermentation were shown that the non-ionic BSF, saponin, surface tension, and CMC of BSF were approximately 1,272.58 ppm, 2.91 mg/ml, 43.43 mN/m, 636.29 ppm, respectively, as well as its properties could minimize *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. Therefore, those BSF properties mentioned above can be applied as biosanitizer for washing the vegetable, especially tomato and sweet basil which contaminated by *S. aureus* and *Salmonella* spp. The *S. aureus* was reduced with 50 ppm BSF, in tomato and sweet basil to 1 and 2 log CFU/g, respectively. Meanwhile, *Salmonella* spp. was not detected of both vegetables.

In order to gain the most effective surface cleaning, such as stainless which normally used as food utensils in food industries, soaking with tap water was done for 2 min, followed by soaking with BSF for 5 min, therefore, were performed. Results from this research showed that the BSF 200, 400 and 600 ppm of which higher than that of vegetable washing could minimize the *S. aureus*. At 600 ppm BSF could effectively control and decrease the number of *S. aureus*, however, of which 200 ppm adequately controlled *Salmonella* spp. not to be presented.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญภาพ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 2

ข้อตกลงเบื้องต้น 3

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล 4

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล 7

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล 8

บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

อภิปรายผล 14

บทที่ 4 บทสรุป

สรุปผลการวิจัย 29

ข้อเสนอแนะ 30

บรรณานุกรม 31

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 33

ภาคผนวก ข 37

ประวัติผู้วิจัย 47

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่		**หน้า**
ตารางที่ 1	จำนวนการปฏิเสธการนำเข้าสินค้าไทยตามเหตุผลระหว่างปี 2002-2010	5
ตารางที่ 2	จำนวนการปฏิเสธการนำเข้าสินค้าไทยจัดประเภทผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างปี 2002-2010	6
ตารางที่ 3	ค่าลดแรงตึงผิวตลอดระยะเวลาการหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	20
ตารางที่ 4	ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ	22
ตารางที่ 5	ผลการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในมะเขือเทศหลังกระบวนการล้าง	25
ตารางที่ 6	ผลการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในโหระพาหลังกระบวนการล้าง	27
ตารางที่ 7	ผลการทดสอบล้างบนพื้นผิวสแตนเลสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen)	28

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) และระยะเวลาในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง.....14

รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid, TF) และระยะเวลาในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง.....15

รูปที่ 3 ความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง.....16

รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ($^{\circ}$Brix) ตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง.....17

รูปที่ 5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/ml) ตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง.....18

รูปที่ 6 จำนวนแลคติกแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/ml) ตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง.....19

รูปที่ 7 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (critical micelle concentration; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ.....23

รูปที่ 8 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ในมะเขือเทศด้วยกระบวนการล้าง.....24

รูปที่ 9 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในมะเขือเทศด้วยกระบวนการล้าง.....25

รูปที่ 10 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ในโหระพาด้วยกระบวนการล้าง.....26

รูปที่ 11 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในโหระพาด้วยกระบวนการล้าง.....27

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปัจจุบันอุตสาหกรรม และชุมชนต่างๆ มีการนำวัตถุดิบทางการเกษตรมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ รวมทั้งวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรที่เป็นผักและผลไม้ ได้ถูกนำมาประยุกต์พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่สามารถเพิ่มมูลค่าและนำกลับมาใช้ใหม่ให้เกิดประโยชน์สูงสุด เช่น การนำวัตถุดิบเหลือใช้มาประยุกต์เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตวัสดุ ผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยเฉพาะกลุ่ม green products รวมถึงนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) เรียกสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า “สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (biosurfactant)” สารนี้ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์เป็นหลักที่นำมาผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพรองลงมา คือ ยีสต์ บางสายพันธุ์ ซึ่งสารที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิวเป็นผลของความมีขั้วและไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกันนอกจากจะสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ที่หลากหลายจุลินทรีย์ ยังสามารถใช้แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน (carbon and nitrogen source) ที่เป็นองค์ประกอบในผักผลไม้ได้ (Xu, Nakajima, Liu and Shiina, 2011) และสามารถนำของเหลือใช้ จากอุตสาหกรรมมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต เป็นการลดต้นทุนในการผลิต ใช้วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์สูงสุด เพิ่มมูลค่า ทั้งนี้เพื่อสนองนโยบายการเสริมสร้างและพัฒนาคุณค่าของทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมเกี่ยวกับการบริหารจัดการและการใช้ประโยชน์ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อมอย่างยั่งยืน เหมาะสมกับการใช้ชีวิตแบบเศรษฐกิจพอเพียงตามแผนยุทธศาสตร์ จึงมีการนำวัตถุดิบเหล่านั้นกลับมาใช้เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้นี้จะถูกพัฒนาให้สามารถนำไปใช้งานในกระบวนการล้างวัตถุดิบทางการเกษตร ได้แก่ ผัก ผลไม้สด รวมถึงใช้กับบริเวณพื้นผิวที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง จะต้องไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม ทดแทนการใช้สารทำความสะอาดเคมีสังเคราะห์ โดยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพผลิตจากสารตั้งต้นประเภทผลไม้รสเปรี้ยว จะมีโครงสร้างโมเลกุลแบบแอมฟิพาติก เมื่ออยู่ในสารละลายโมเลกุลแบบแอมฟิพาติกของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะจับกับบริเวณพื้นผิวของตัวทำละลาย จึงทำให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนละลายได้ในน้ำ หรือส่วนของน้ำละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอนได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารชำระล้าง (detergent) สารเกิดฟอง และการเกิดอิมัลชั่น นอกจากนี้คุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ คุณสมบัติในการยับยั้ง และทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค ผลการศึกษาสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิด sophorolipid และ glycolipid มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ถึงร้อยละ 98% และมีประสิทธิภาพในการทำลายร้อยละ 45 (Valotteau et al., 2015) นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวชนิด sophorolipid และ glycolipid จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุไฟฟ้า (nonionic surfactant) ที่มีรายงานการวิจัยว่ามีความเป็นพิษต่ำเมื่อเทียบ

กับสารเคมีสังเคราะห์ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ (lipopeptide biosurfactant) ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* ATCC 6633 พบว่าผลต่อการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงที่ต่ำกว่าสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มีความเป็นพิษต่ำ (low-toxicity) ต่อผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง (Noudeh, Housaindokht and Bazzaz, 2005) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบความเป็นพิษของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดไลโปเปปไทด์ แบบกึ่งเรื้อรัง (subacue) ในหนูแรท (rat) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย เป็นเวลา 28 วัน ที่ความเข้มข้น 500 ถึง 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าที่ความเข้มข้นสูงไม่มีผลต่อน้ำหนักของหนู (Hwang, et al., 2009)

ดังนั้นด้วยคุณสมบัติต่างของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากวัตถุเหลือใช้ทางการเกษตรประเภทผลไม้รสเปรี้ยว ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ล้างวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ที่มักตรวจพบในผลิตภัณฑ์ผักผลไม้สด หรือในกลุ่มผลิตภัณฑ์ประเภท ready to eat รวมถึงการส่งออก ที่ไทยประสบปัญหาการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรค ส่งผลให้สหภาพยุโรปที่มีมาตรการควบคุมการนำเข้าผักผลไม้สดจากไทยแจ้งเตือน (RASFF; Rapid Alert System for food and feed) การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogens) ในผัก ผลไม้ สมุนไพรและเครื่องเทศ สูงถึงร้อยละ 13 จึงทำให้มีการออกกฎระเบียบมาตรการกักสุ่มตรวจผักและผลไม้นำเข้าจากไทย โดยเฉพาะ มะเขือเทศ (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Lycopersicon esculentum* Mill.) และโหระพา (ชื่อวิทยาศาสตร์ *Ocimum basilicum* L.) ที่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp จึงเป็นสาเหตุสำคัญให้ผู้วิจัยเลงเห็นปัญหาความปลอดภัยของอาหาร จึงประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักผลไม้รสเปรี้ยวนำไปใช้ในกระบวนการล้างเพื่อลดปริมาณการปนเปื้อนด้านจุลินทรีย์ พร้อมกันนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้จะต้องสามารถนำไปใช้ล้างพื้นผิวที่สัมผัสอาหาร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

(1) เพื่อพัฒนาสูตรการผลิตสารลดแรงตึงผิว เพื่อใช้ในการล้างผักผลไม้ และพื้นผิววัสดุ

(2) เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตและผลิตภัณฑ์ ให้มีคุณภาพและประสิทธิภาพในการลดปริมาณจุลินทรีย์ดัชนีความเสี่ยงสูงสุดที่ปนเปื้อนในผักผลไม้ สด และสามารถใช้ทำความสะอาดพื้นผิวที่สัมผัสอาหารได้

ขอบเขตการวิจัย

คัดเลือกชนิดของผลไม้ในกลุ่มที่มีรสเปรี้ยว ใช้ผลไม้ที่เป็นวัสดุเหลือใช้ตามชุมชน ซึ่งจะคัดเลือกจากผลไม้ที่มีองค์ประกอบและคุณสมบัติในการหมักให้เกิดเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพคล้ายคลึงกับสารลดแรงตึงผิวจากเชอร์รี่ในโครงการเรื่อง “สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักผลเชอร์รี่เปรี้ยว” (Biosurfactant from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) conventional fermentation) ที่ผู้วิจัยทำการวิจัยสำเร็จแล้ว โดยใช้อัตราส่วนน้ำหมักผลไม้เป็น 1:3 ระยะเวลาการหมัก 3

เดือน ติดตามคุณสมบัติทางด้านเคมี จุลินทรีย์ และกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาการผลิต เพื่อให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเสถียร มีประสิทธิภาพ สม่ำเสมอกันทุกครั้งที่มีการผลิต ทำการทดสอบผลิตอย่างน้อย 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยทางสถิติ จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้ไปทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ 1.) คุณสมบัติการยับยั้งทำลายเชื้อจุลินทรีย์ 2.) ทดสอบหาสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในการเป็นสารชะล้าง 3.) วิเคราะห์ประเภทสารลดแรงตึงผิว 4.) วิเคราะห์หาค่า CMC จากนั้นนำทดสอบประยุกต์ใช้ล้างผักผลไม้และ การล้างพื้นผิววัสดุ

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ ต้นทุนการผลิตต่ำ และมีกรรมวิธีการขั้นตอนการผลิตที่ไม่ซับซ้อน รวมถึงกรรมวิธีการนำไปประยุกต์ใช้ ความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพ สำหรับเป็นสารฆ่าเชื้อในการล้างผักผักผลไม้สด เพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก่อโรค และเป็นผลิตต้นแบบในการนำไปใช้ในการล้างผักผลไม้ และพื้นผิวที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ได้แก่ แบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. นอกจากนี้ยังอาจพบเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Pennicillium*, *Rhizopus* และยีสต์ ได้แก่ *Candida* sp. สารเมตาโบไลท์ที่จุลินทรีย์เหล่านี้ผลิตประกอบด้วย glycolipids, lipoaminoacids, lipopeptides, lipoproteins, lipopolysaccharides, phospholipids, monoglycerides และ diglycerides (Edwards, Lepo and Lewis, 2003; Rodrigues, L. et al., 2006; Pacwa-Plociniczak et al., 2011) โดยสารลดแรงตึงผิวประเภท lipopeptide ได้แก่ surfactin และ subtilisin ผลิตโดย *Bacillus subtilis* (Karanth, Deo and Veenanadig, 2005; Youssef, Wofford & McInerney, 2011) ซึ่งสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มของ lipopeptide ที่สำคัญประกอบด้วย surfactin, fengyein, iturin, mycosubtilin และ bacillomycin (Wei et al., 2010) สารลดแรงตึงผิวประเภท Sophorolipid ผลิตจาก *Candida bombicola* ส่วนสารลดแรงตึงผิว Rhamnolipid เป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีประสิทธิภาพมาก ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* (Maity et al., 2011; Vatsa et al., 2010) ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำ มีความสามารถในการย่อยสลายสูง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ช่วยให้เกิดโฟม มีความเฉพาะเจาะจงสูง ทนต่ออุณหภูมิและสภาวะความเป็นกรดและด่าง และที่สำคัญสามารถนำของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมเช่น ผักผลไม้เหลือใช้มาเป็นวัตถุดิบในการผลิต เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตต่ำ (Abouseoud et al., 2008; Wei et al., 2010; Xu et al., 2011) มีคุณสมบัติในการเป็น emulsifying และ demulsifying รวมถึงมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Nitschke and Costa, 2007) มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อราและไวรัส (Rodrigues et al., 2006) คุณสมบัติดังกล่าว สามารถนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวตามวัตถุประสงค์ของการใช้งานได้ นอกจากการนำไปใช้ประโยชน์ในการลดคราบสกปรกแล้ว ยังมีคุณสมบัติการเป็น antimicrobial จากงานวิจัยพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกได้ เช่น *Bacillus pumilis*, *Micrococcus flavus*, *M.luteus* และ *Mycobacterium smegmatis* สำหรับต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Acetobacter calcoaceticus*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella aerogenes* และ *Enterobacter cloacae*

เนื่องจากประเทศไทยมีการส่งออกผัก ผลไม้สด ในปริมาณที่สูง และได้รับรายงานการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในกลุ่มผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจากประเทศคู่ค่า ดังตารางที่ 1 แสดงให้เห็นจำนวนการปฏิเสธการนำเข้าสินค้าไทยตามเหตุผลระหว่างปี 2002-2010 มีความหลากหลายของสาเหตุการปฏิเสธการนำเข้าสินค้าไทยใน

หมู่ตลาดดังกล่าว การปนเปื้อนของแบคทีเรียเป็นสาเหตุหลักในการปฏิเสธสินค้าไทยในตลาดอียู (ร้อยละ 26) ญี่ปุ่น (ร้อยละ 54) และสหรัฐฯ (ร้อยละ 13) ทำให้ไทยประสบปัญหาการส่งออกผักผลไม้สด

ตารางที่ 1 จำนวนการปฏิเสธการนำเข้าสินค้าไทยตามเหตุผลระหว่างปี 2002-2010

Importing country	Mycotoxins	Food and feed additives	Bacterial contamination	Veterinary drugs residues	Pesticide residues	Other contaminants	Heavy metal	Adulteration/missing document	Hygienic condition/controls	Labelling	Packaging	Others	Total
Number of rejections													
EU	24	126	277	192	253	85	55	10	17	1	5	29	1,074
United States	3	297	464	20	76	25	0	739	1,127	772	0	5	3,528
Japan	38	21	295	0	62	39	0	0	92	0	0	1	548
Australia	24	3	44	8	40	71	22	45	14	488	0	16	775
Proportion of Thai rejections in the importing country													
EU	2.2	11.7	25.8	17.9	23.6	7.9	5.1	0.9	1.6	0.1	0.5	2.7	100.0
United States	0.1	8.4	13.2	0.6	2.2	0.7	0.0	20.9	31.9	21.9	0.0	0.1	100.0
Japan	6.9	3.8	53.8	0.0	11.3	7.1	0.0	0.0	16.8	0.0	0.0	0.2	100.0
Australia	3.1	0.4	5.7	1.0	5.2	9.2	2.8	5.8	1.8	63.0	0.0	2.1	100.0
Proportion of total rejections in the importing country													
EU	0.4	4.8	14.7	12.8	21.0	6.3	5.6	1.1	2.2	0.7	3.6	7.2	5.6
United States	1.0	2.3	4.2	1.5	0.9	1.6	0.0	3.2	5.2	1.5	0.0	2.0	2.7
Japan	4.6	3.5	20.6	0.0	4.4	3.4	0.0	0.0	12.1	0.0	0.0	0.8	8.6
Australia	7.5	2.3	3.3	5.6	10.4	18.3	6.0	3.7	21.5	4.8	0.0	3.7	5.2

ที่มา : สำนักงานที่ปรึกษาด้านอุตสาหกรรมในต่างประเทศ (2558).

ผลิตภัณฑ์อาหารที่ส่งออกจากไทยมีหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่ผลิตภัณฑ์ในกลุ่ม ผัก ผลไม้สด (ตารางที่ 2) จะได้รับการปฏิเสธ และตรวจพบปริมาณการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในระดับที่สูงกว่ามาตรฐานการส่งออกในแต่ละประเทศ จึงจำเป็นจะต้องให้ความสำคัญในการลดปริมาณการปนเปื้อนดังกล่าว โดยเฉพาะผักสด ได้แก่ มะเขือเทศ พริก และโหระพา เป็นต้น (FDA, 2008) ดังนั้นแนวทางในการลดการปนเปื้อนเบื้องต้น ได้แก่ การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวด้วยกระบวนการล้าง

ตารางที่ 2 จำนวนการปฏิเสธการนำเข้าสินค้าไทยจัดประเภทผลิตภัณฑ์อาหารระหว่างปี 2002-2010

Commodity	Thailand	Upper middle-income countries
EU		
Total	0.045	0.013
Fish and fishery products	0.053	0.021
Fruits and vegetables	0.047	0.010
Herbs and spices	1.045	0.097
Nuts and seeds	0.397	0.162
United States		
Total	0.109	0.126
Fish and fishery products	0.057	0.113
Fruits and vegetables	0.212	0.119
Herbs and spices	1.735	0.742
Nuts and seeds	0.084	0.131
Japan		
Total	0.036	0.007
Fish and fishery products	0.040	0.003
Fruits and vegetables	0.102	0.017
Herbs and spices	0.145	0.025
Nuts and seeds	0.163	0.261
Australia		
Total	0.214	0.266
Fish and fishery products	0.112	0.266
Fruits and vegetables	0.462	0.411
Herbs and spices	1.189	1.981
Nuts and seeds	5.623	1.454

ที่มา : สำนักงานที่ปรึกษาด้านอุตสาหกรรมในต่างประเทศ (2558).

การล้าง (washing) เป็นการเตรียมวัตถุดิบเบื้องต้นก่อนการแปรรูป หรือเพื่อส่งออกในรูปผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง (Fresh - Cut produces) ไปต่างประเทศ มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อลดสิ่งปนเปื้อนทุกชนิดที่มากับวัตถุดิบ ทั้งการปนเปื้อนทางกายภาพ การปนเปื้อนจุลินทรีย์และทางด้านเคมี หรือวัตถุอันตรายให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อผู้บริโภคปลอดภัยต่อการบริโภค และอยู่ในระดับมาตรฐานอาหารกำหนด รวมถึงเป็นกระบวนการที่ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีอายุการเก็บรักษานานขึ้น สำหรับกรณีส่งออกผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สดตัดแต่ง ไปยังสหภาพยุโรปได้ถูกกำหนดให้มีการตรวจสอบปริมาณสารพิษยาฆ่าแมลงตกค้างและเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ในผลิตภัณฑ์ ที่มีเงื่อนไขให้ผู้ส่งออกจากไทยจะต้องมีการตรวจสอบเพื่อรับรองความปลอดภัย เช่น การตรวจและออกใบรับรองสุขอนามัยพืช (phytosanitary certificate) หรือจะต้องผ่านการรับรองมาตรฐานคุณภาพสินค้าที่เรียกว่ามาตรฐานการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดี (GAP) จากกรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ในการออกใบรับรองสินค้าผักผลไม้แทนสหภาพยุโรปซึ่งเป็นมาตรการของภาครัฐของไทยที่กำหนดขึ้นเพื่อควบคุมคุณภาพการส่งออกและมาตรฐานสินค้าผักผลไม้ไทยที่สอดคล้องกับความตกลงที่ว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชภายใต้องค์การการค้าโลก (World Trade

Organization; WTO) หรือในส่วนของภาคเอกชนไทยได้มีการกำหนดมาตรฐาน ThaiGAP ซึ่งเป็นมาตรฐานของภาคเอกชนไทยในการปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีที่ได้ผ่านกระบวนการเทียบเคียงมาตรฐานเข้มงวดของระบบโกลบอลบอล จีเอพี (Global GAP) ที่เน้นการปฏิบัติคือความปลอดภัย สภาพแวดล้อม สุขภาพความปลอดภัยและสวัสดิภาพของผู้ปฏิบัติงาน การล้างจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่ง เป็นขั้นตอนในส่วนของการปฏิบัติที่ดีหลังการเก็บเกี่ยว เพื่อลดอันตรายดัชนีความเสี่ยงที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบทางการเกษตร การล้างมีหลายแบบขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่จะล้าง ได้แก่การทำความสะอาดแบบแห้ง (dry cleaning) เหมาะกับวัตถุดิบที่ไม่ต้องการให้เปียกน้ำ เช่น เมล็ดธัญชาติ ถั่วเมล็ดแห้ง ลูกเดือย งา รวมทั้งวัตถุดิบประเภทของแห้ง การทำความสะอาดแบบเปียก (wet cleaning) เป็นการทำความสะอาดวัตถุดิบด้วยน้ำอาจเรียกว่า การล้าง (washing)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการล้าง ได้แก่ ความสะอาดของน้ำล้างอุณหภูมิของน้ำล้างระยะเวลาการล้างหรือการแช่ในน้ำล้างสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) และแรงกลระหว่างการล้าง เช่น การฉีดน้ำ การทำน้ำให้ปั่นป่วน การขัดถูระหว่างการล้างโดยจะต้องผ่านการพิจารณาแล้วว่าการล้างแต่ละประเภทและการเลือกใช้สารฆ่าเชื้อจะต้องมีความเหมาะสมกับวัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาล้าง เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด โดยขั้นตอนการล้างในอุตสาหกรรมมีการใช้สารฆ่าเชื้อร่วมกับการล้างเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ สามารถแบ่งขั้นตอนการล้างได้ 2 ขั้นตอน คือ การล้างเพื่อเตรียม (pre-washing) เป็นการล้างเพื่อลดหรือกำจัดการปนเปื้อนทางด้านกายภาพ เป็นการล้างในลักษณะให้น้ำไหลผ่าน (rinsing) วัตถุดิบผักผลไม้สดที่เรียงอยู่บนสายพานจะถูกล้างและผ่านไปยังขั้นตอนที่สอง เป็นการล้างที่มีการใช้สารฆ่าเชื้อ ร่วมในกระบวนการ ในขั้นนี้จะต้องมีการจำแนกชนิดวัตถุดิบที่นำมาล้างว่าสามารถล้างด้วยการแช่ (soaking) หรือต้องล้างด้วยการฉีดพ่นด้วยสารฆ่าเชื้อ ดังนั้นการจำแนกประเภทวัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาล้างจะช่วยให้การล้างเพื่อลดระดับจุลินทรีย์ สารเคมี สารพิษ มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

ทำการเก็บผลผลิตส่วนใส สารเมทาโบไลท์ที่เกิดจากกระบวนการหมักตลอดระยะเวลาการผลิต ณ ชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72 สัปดาห์ที่ 1, 2, 3 เดือนที่ 1, 2 และ 3 ทำการเก็บรวบรวมข้อมูลที่ทำการหมักอย่างน้อย 3 ครั้ง จำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้ผลมะเฟืองล้างน้ำ 1-2 ครั้ง เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนทางกายภาพ ลดขนาดด้วยเครื่องมือบด pH 3-4 โดยประมาณ นำทั้งส่วนน้ำและเนื้อของมะเฟืองไปหมักกับน้ำสะอาดและเติมกลูโคส 2 % (w/v) หมักในสภาวะปิดไม่มีการกวนผสม อุณหภูมิ 30- 35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลที่ได้วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 23 (SPSS Inc., Illinois, U.S.A.)

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การเตรียมตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้เลือกผลไม้รสเปรี้ยว ได้แก่ มะเฟือง ชื่อวิทยาศาสตร์ *Averrhoa carambola* L. โดยใช้อัตราส่วน 1:3 เติมน้ำตาลความเข้มข้น 2 % (w/v) หมักในสภาวะปิดและไม่มีการเขย่า ทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์คุณสมบัติต่างๆชั่วโมงที่ 0, 12,24,36,48,60,72 สัปดาห์ที่ 1, 2, 3,4 เดือนที่ 2 และ 3

การเตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากมะเฟือง

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักมะเฟือง กรองผ่านสำลีปลอดเชื้อ จากนั้นนำส่วนใสไปกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนใสของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมาปั่นเหวี่ยง ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนและเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์คุณภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากมะเฟือง

1. คุณภาพทางเคมี

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu

ทำการเจือจางสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 100 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า ดูดสารที่ได้จากการเจือจาง 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1.58 มิลลิลิตร และ Folin reagent 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม Na_2CO_3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยควบคุมไม่ให้สัมผัสแสง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ปริมาณฟีนอลสามารถวัดเทียบได้กับสารมาตรฐานโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg GAE/g sample; GAE = Gallic acid Equivalent)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu

ปิเปตตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร และเติม 5% NaNO2 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) 5 นาที หลังจากนั้นเติม 10 % (AlCl3) 150 µl 1 M NaOH 0.5 ml และเติมน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ปริมาณ flavonoids สามารถวัดเทียบได้กับสารมาตรฐาน โดยใช้ catechin เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg CTC/g sample; CTC = catechin)

1.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity)

ปิเปตตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 250 ไมโครลิตร และเติม 75 ไมโครลิตร ของ 0.2 mM DPPH ที่ละลายในเอทานอล 95 %(v/v) และผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณกิจกรรม DPPH radical scavenging

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณซาโปนิน (Vanilline Perchloric acid method)

ละลายสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วย ethyl acetate 99.5% ปิเปตมา 250 ไมโครลิตรเติม vanilline เข้มข้น 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ กรดซัลฟิวริก เข้มข้น 72% ปริมาตร 2.5 ml เขย่าให้เข้ากันบ่มในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แช่ในน้ำแข็งประมาณ 3-4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ 544 นาโนเมตร นำไปคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐาน saponin

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารลดแรงตึงผิวไร้ประจุ (non-ionic) ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากมะเฟือง

ปิเปตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพมะเฟือง 200 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไตรไอโอไดด์ 10 มิลลิลิตร และ เฮกเซน 10 มิลลิลิตรใส่ในกรวยแยกสารทำการเขย่า 1 นาที ทิ้งให้แยกชั้นแยกสารละลายสีชมพู นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 2500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำมาปรับปริมาตรด้วยเฮกเซน นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตรเตรียมสารละลาย triton x-100 เข้มข้น 1000 mg/dm^3

1.6 การสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานและการคำนวณ

1.6.1 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน flavonoids

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (Stock 5 mg/ml) ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ส่วนหลอดควบคุมใช้ น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีจากนั้นเติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาทีนำมาเติมสารละลาย 1 M NaOH 2 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

1.6.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ total antioxidant capacity (TAC) ด้วยวิธี free radical 2,2-dipheynl-1- picrylhydrazyl (DPPH) (Burda, S., and Oleszek, W. 2001)

เก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักแต่ละอัตราส่วนตามระยะเวลาที่กำหนดใส่ flask ปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม DPPH 1.90 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) 15 นาที ใช้ methanol เป็น blank โดยเติม methanol 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ DPPH 1.90 มิลลิลิตร สำหรับ blank ของตัวอย่าง ใช้ตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ methanol 1.90 มิลลิลิตร นำไปวัดค่า absorbance ที่ 515 nm ปริมาณ total antioxidant capacity สามารถวัดเทียบได้กับสารมาตรฐานโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg GAE/g sample; GAE= gallic acid)

1.6.3 วิธีการเตรียมกราฟสารมาตรฐาน gallic acid

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (stock 5mg/ml) gallic acid ปริมาตร 10, 20, 30, 40, 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำปริมาตร 990, 980, 970, 960 และ 950 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้น ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นใส่หลอดทดลอง 20 ไมโครลิตร เติม folin reagent 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1-8 นาที (ห้ามโดนแสง) เติม Na_2CO_3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ห้ามโดนแสง) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ 765 nm

1.6.4 วิธีการสร้างกราฟสารมาตรฐานซาโปนิน

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน saponin ปริมาตร 0, 100, 125, 150, 200, 225, 500, 750, 1000 ไมโครลิตร เติม absolute ethanol ปริมาตร 1000, 900, 875, 850, 800, 775, 500,0 ไมโครลิตรตามลำดับผสมให้เข้ากันเติม vanilline เข้มข้น 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ กรดซัลฟิวริก เข้มข้น 72% ปริมาตร 2.5 ml เขย่าให้เข้ากันบ่มในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แช่ในน้ำแข็ง ประมาณ 3-4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ 544 นาโนเมตร

1.7 การวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด - ด่าง และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (°Brix)

เก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักแต่ละอัตราส่วนตามระยะเวลาที่กำหนดใส่ขวดรูปชมพู่ จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter และปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ด้วยเครื่อง Hand refractometer 0-32 องศาบริกซ์

2. คุณภาพทางจุลชีววิทยา

2.1 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count; TPC)

ชั่งตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 25 กรัม ละลายและปั่นในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 %(w/v) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะมีเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางสิบเท่า (10-fold dilution) เป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร plate count agar (PCA) จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกตรวจนับโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 cfu/plate (FDA Bacterial Analytical Manual;BAM Edition 8, Revision A /1998)

2.2 การตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacterial; LAB)

ชั่งตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 25 กรัม ละลายและปั่นในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 %(w/v) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะมีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับให้ลดลงครั้งละสิบเท่า (10-fold dilution) จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 1.0 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS หมุนจานเพาะเชื้อไปมาให้ตัวอย่างเข้ากันดีกับอาหารเลี้ยงเชื้อตามเทคนิค pour plates ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72ชั่วโมง ใน candle jar ตรวจนับโคโลนี ในระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 cfu/ml

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากมะเฟืองด้วยวิธี Disc *diffusion method*

ทำการ swab เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ ได้แก่ *s.aureuse* และ *Salmonella* sp. ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Muller Hinton วาง paper disc ลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์ หยดสารแขวนลอยของเชื้อจุลินทรีย์(10^{8}cfu/ml) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณยับยั้ง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางด้วยเวอร์เนียแคลิปเปอร์

3. คุณภาพทางกายภาพ

3.1 การทดสอบการหาค่าแรงตึงผิว (surface tension) *ด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว* (Surface Tension Meter)

นำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากมะเฟืองวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว surface tension meter

3.2 และค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (critical micelle concentration; CMC) ด้วยเครื่องวัดค่าแรงติงผิว Surface Tension Meter

เตรียมสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นร้อยละ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 75 และ 100 โดยปริมาตร จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปวัดค่าแรงตึงผิวด้วยเครื่องวัดค่าแรงตึงผิว (surface tension meter) นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร และค่า surface tension จะได้ค่าที่ต่ำที่สุดเริ่มเกิดไมเซลล์

สภาวะของเครื่อง Surface Tension Meter

รุ่น : DY 300 บริษัท : Kyowa Interface Science

Measuring Parameter : Surface Tension and Interfacial Tension

หน่วยการวัด : mN/m

วิธีทดสอบ : Force Tensiometry

วิธีวิเคราะห์ : Wilhelmy Plate

Instrument Operating Procedure : According to Instrument's Operating Manual

สภาวะทดสอบ : Temperature : 25 +/- 1 degree Celsius , Pressure : 0 barg.

Sample Condition : Temperature : 24.0 -24.5 degree Celsius , Pressure : 0 barg.

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

4.1 การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการเป็นสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

4.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเพื่อใช้ Challenge

นำเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *S.aureus* และ *Salmonella* spp. ทั้งสองชนิดจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient broth บ่มใน ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%(w/v) โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วย McFarland standard No. 1 ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 cfu/ml

4.1.2 มะเขือเทศ

นำมะเขือเทศที่ทำการ Challenge ด้วยสารละลายแขวนลอยของ *S.aureus* และ *Salmonella* spp.เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำประปาโดยการแช่เป็นเวลา 2 นาที พักให้สะเด็ดน้ำ 2 นาที จากนั้นนำมะเขือเทศมาล้างด้วยน้ำประปา สารฆ่าเชื้อได้แก่สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($CaOCl_2$) เข้มข้น 50, 100 และ 200 ppm และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (BSF) 50,100 และ 200 ppm เป็นเวลา 5 นาที พักให้สะเด็ดน้ำ ตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar จำนวน *S.aureus* ด้วย Baird Parker Agar Base และ *Salmonella* spp.ด้วย xylose lysine deoxycholate agar

4.1.3 โหระพา

นำโหระพาที่ทำการ Challenge ด้วยสารละลายแขวนลอยของ *S.aureus* และ *Salmonella* spp. เป็นเวลา 20 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำประปาโดยการแช่เป็นเวลา 2 นาที พักให้สะเด็ดน้ำ 2 นาที จากนั้นนำมะเขือเทศมาล้างด้วยน้ำประปา สารฆ่าเชื้อได้แก่สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($CaOCl_2$) เข้มข้น 50, 100 และ 200 ppm และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (BSF) 50,100 และ 200 ppm เป็นเวลา 5 นาที พักให้สะเด็ดน้ำ ตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar จำนวน *S.aureus* ด้วย Baird Parker Agar Base และ *Salmonella* spp.ด้วย xylose lysine deoxycholate agar

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการเป็นสารฆ่าเชื้อบนพื้นผิวสแตนเลส

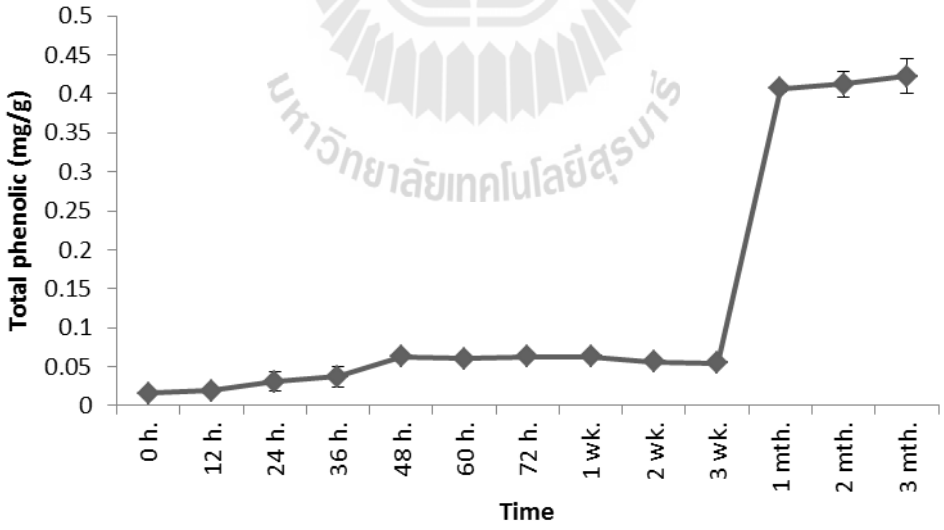
นำเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *S.aureus* และ *Salmonella* spp. ทั้งสองชนิดจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient broth บ่มในที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%(w/v) โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วย McFarland standard No. 2 ($6x10^8$ cfu/ml) จุ่มตัวอย่างพื้นผิวสแตนเลสลงในสารละลายแขวนลอยเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ สารละลายtriton X-100 2%(v/v) และ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพความเข้มข้น 200, 400 และ 600 ppm เป็นเวลา4 นาที แล้วล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำการ swab บนพื้นผิวสแตนเลสนำก้านสำลีใส่ในหลอดที่มี โซเดียมคลอไรด์ 0.85%(v/v) 10 ml ทำ tenfold serial-dilution spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker Agar Base นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ รายงานผลเป็น cfu/cm^2 และตรวจเชื้อ *Salmonella* spp. ทำการ pre-enrichment ด้วย lactose broth เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ xylose lysine deoxycholate agar

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ตอนที่ 1 ผลการติดตามคุณสมบัติทางด้านเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาการหมักของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

1.1 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสารพฤษเคมี (phytochemical) ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

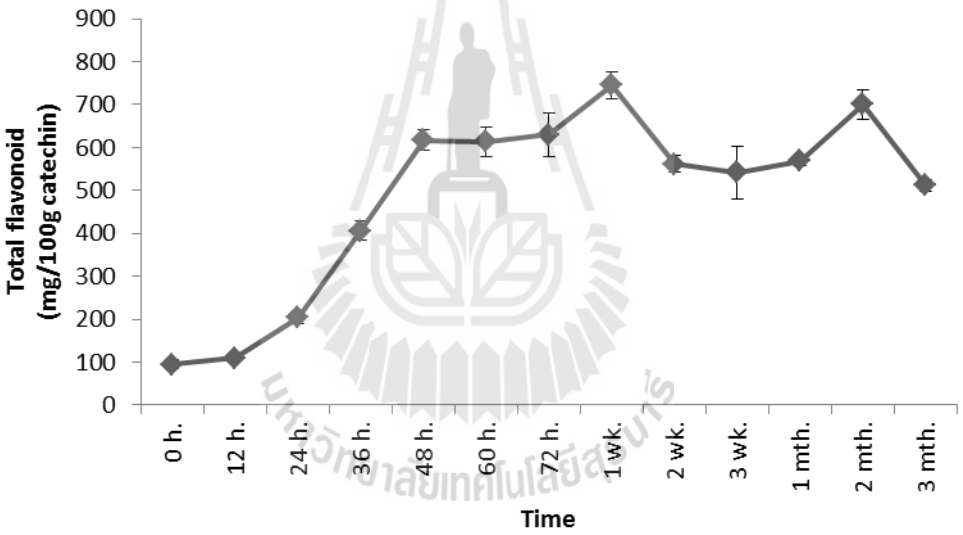
การวิเคราะห์หาปริมาณ total phenolic content (TPC) ดังรูปที่ 1 พบว่ามีสารฟีนอลลิคสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 3 จากนั้นปริมาณฟีนอลลิคจะเพิ่มสูงขึ้น โดยที่สัปดาห์ที่ 3 พบปริมาณฟีนอลลิค เท่ากับ 0.05 mg/g galic acid ในขณะเดือนที่ 1 มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นถึง 0.41 mg/g galic acid โดยที่เดือนที่ 1 2 และ 3 มีปริมาณสารฟีนอลลิคทั้งหมดที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.01$) เป็นระยะเวลาที่จุลินทรีย์กลุ่มแลคติกแบคทีเรียมีการเจริญเต็มที่ ทำให้สามารถผลิตสารเมทาโบไลท์ ปล่อยออกมานอกเซลล์ทำให้สารละลายมีสภาวะเป็นกรด จึงทำให้แบคทีเรียใช้เอนไซม์ใน deglycosylation path way ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดและปริมาณแอลกอฮอล์ที่มากขึ้นในกระบวนการหมักเพื่อใช้ในการย่อยสับสเตรทที่เป็นสารกลุ่ม phenolic ในมะเฟืองได้มากขึ้น รวมถึงแบคทีเรียกรดแลกติกในกระบวนการหมักสามารถผลิตสารฟีนอลลิคโดยใช้กรดอะซิตริก กรดมาลิค เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารฟีนอลลิกได้



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมด (total phenolic content, TPC) และระยะเวลาในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง

หมายเหตุ : h. หมายถึง ชั่วโมง (hour), wk. หมายถึง สัปดาห์ (week) และ mth. หมายถึง เดือน (month)

การวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids, TF) โดยใช้ catechin เป็นสารมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าปริมาณฟลาโวนอย์ไม่คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก อย่างไรก็ตามปริมาณสารดังกล่าวมีแนวโน้มสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 พบว่ามีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 204.53 mg/100g catechin และสูงที่สุดที่สัปดาห์ที่ 1 เท่ากับ 745.03 mg/100g catechin เมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณสารฟลาโวนอยด์มีปริมาณลดลง อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 3 ยังคงมีปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 511.73 mg/100g catechin ทั้งนี้เนื่องจากวัตถุดิบหรือสารตั้งต้นที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักส่วนใหญ่แล้วจะอยู่ในรูปสารประเภท glycoside โดยเชื่อมต่อกับมอโนแซคคาไรด์ หรือ ไดแซคคาไรด์ โดยเฉพาะกลุ่มของสารฟลาโวนอยด์ซึ่งมักรวมกับน้ำตาล เมื่อกระบวนการหมักเริ่มขึ้นโดยจุลินทรีย์จะเริ่มกิจกรรมการหมักโดยอาศัยแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปน้ำตาล หรือ glycoside เปลี่ยนเป็นสารเมทาโบไลท์อื่นๆ ส่งผลให้เมื่อระเวลาการหมักนานขึ้นปริมาณสารฟลาโวนอยด์จะลดลง

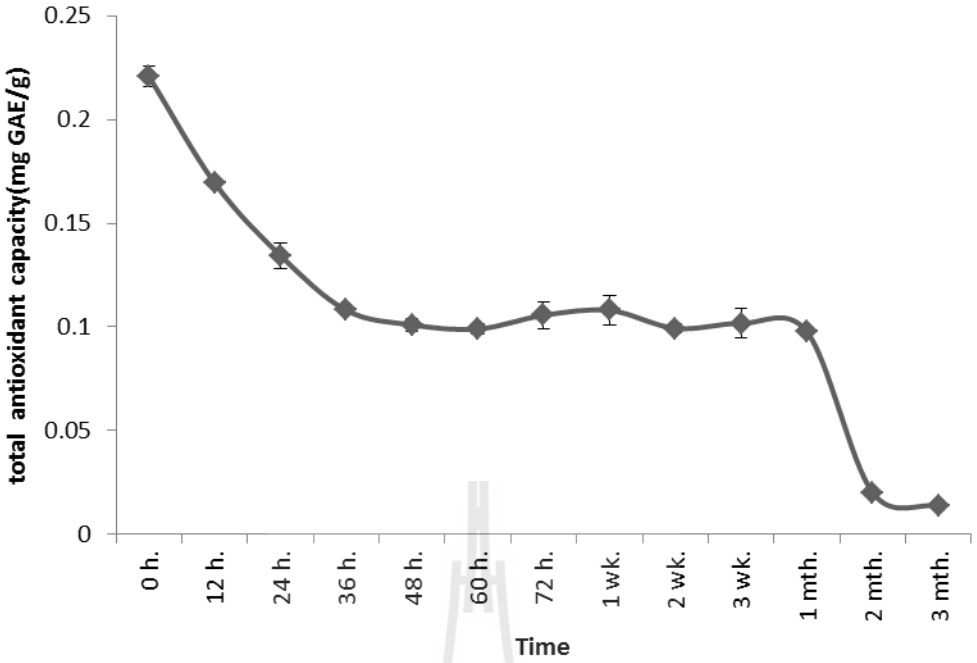


รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoid, TF) และระยะเวลาในกระบวนการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง

หมายเหตุ : h. หมายถึง ชั่วโมง (hour), wk. หมายถึง สัปดาห์ (week) และ mth. หมายถึง เดือน (month)

1.2 ผลการวิเคราะห์ความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

การวิเคราะห์หาปริมาณ total antioxidant capacity แสดงดังรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาปริมาณ total antioxidant capacity จากการหมักมะเฟืองพบว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการหมัก โดยที่ total antioxidant capacity ในช่วงชั่วโมงที่ 48 ถึงเดือนที่ 1 มีความคงที่และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.01$) อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวมีแนวโน้มลดลงในเดือนที่ 2



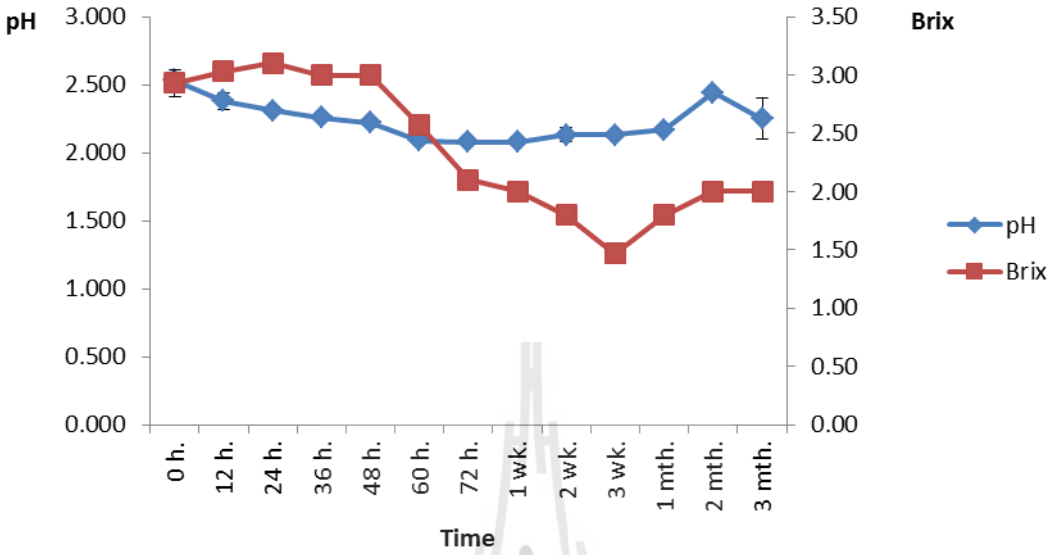
รูปที่ 3 ความสามารถการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง

หมายเหตุ : h. หมายถึง ชั่วโมง (hour), wk. หมายถึง สัปดาห์ (week) และ mth. หมายถึง เดือน (month)

1.3 ผลการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (°Brix) ที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาการหมัก พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากการหมักมะเฟือง มีแนวโน้มการลดลงของค่า pH ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 60 จากนั้นค่า pH เพิ่มสูงขึ้นจนถึงเดือนที่ 2 ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการหมักเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (facultative fermentation) จึงทำให้ช่วงเริ่มกระบวนการหมักเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) ทำให้แบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรตโดยแหล่งคาร์โบไฮเดรตได้แก่ น้ำตาล ในมะเฟือง แบคทีเรียแลคติกจะย่อยน้ำตาลกลูโคสในวัตถุดิบแล้วสร้างกรดแลคติกและกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ทำให้มีปริมาณกรดในสารละลายสูงขึ้น ส่งผลให้ค่า pH ลดลง ในระหว่างการหมักช่วงแรก (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) เมื่อระยะเวลาผ่านจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะสามารถนำสารเมทาโบไลท์ที่ผลิตในช่วงแรก ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิตริก กรดมาลิก เป็นต้น นำมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเมทาบอไลท์อื่นๆ จึงส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ที่เพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (°Brix) ที่แสดงถึงปริมาณของสารตั้งต้น ที่มี

ลักษณะลดลงตามระยะเวลาการหมัก บ่งบอกถึงการใช้ substrate ของจุลินทรีย์ในผลิตสาระสำคัญอื่นๆ และเริ่มเข้าสู่สภาวะคงที่ในเดือนที่ 1, 2 และ 3

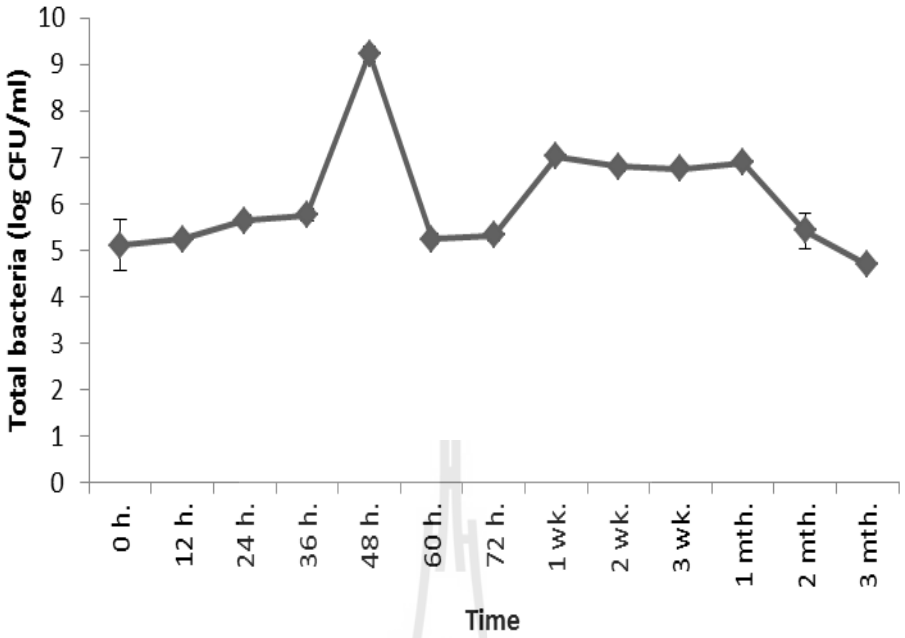


รูปที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ (°Brix) ตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง

หมายเหตุ : h. หมายถึง ชั่วโมง (hour), wk. หมายถึง สัปดาห์ (week) และ mth. หมายถึง เดือน (month)

ตอนที่ 2 ผลการติดตามคุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

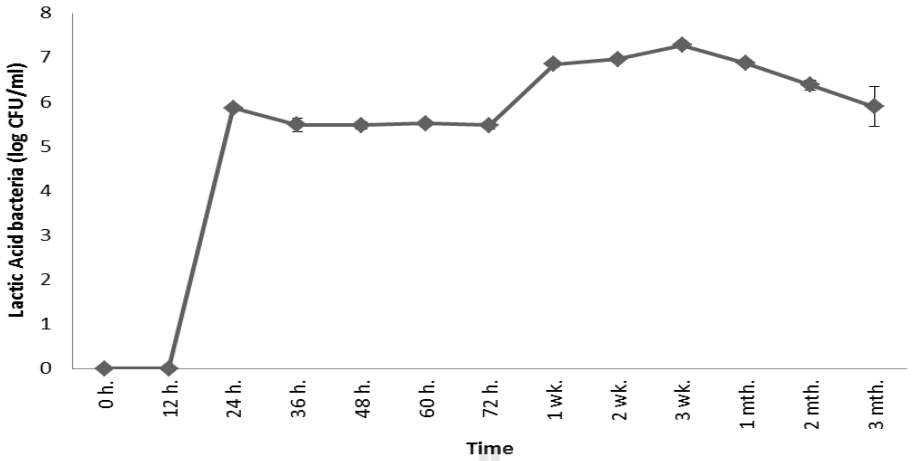
จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในกระบวนการหมักมะเฟืองเพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 5.11 log CFU/ml และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 9.23 log CFU/ml จากนั้นจะเริ่มลดลงและเพิ่มอีกครั้งในสัปดาห์ที่ 1 จนถึงเดือนที่ 1 และในเดือนที่ 3 มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ 4.96 log CFU/ml ทั้งนี้เนื่องจากเป็นระยะที่แบคทีเรียจะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก อัตราการแบ่งเซลล์จะเท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการ เมแทบอลิซึม หลังจากการหมักตั้งแต่เดือนที่ 2 และ 3 พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดทั้งหมดเริ่ม ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/ml) ตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง

หมายเหตุ : h. หมายถึง ชั่วโมง (hour), wk. หมายถึง สัปดาห์ (week) และ mth. หมายถึง เดือน (month)

เช่นเดียวกับ รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแลคติกแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/ml) ที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง พบว่าชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 0 และจะเริ่มเพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 24 (ปริมาณแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 5.86 log CFU/ml) ทำให้ระยะนี้อัตราการเจริญเพิ่มมากขึ้น และสารอาหารที่อยู่ในรูปของแหล่งคาร์บอน เช่น น้ำตาล glycoside รวมถึงสารฟลาโวนอยด์ และสารพฤกษเคมีอื่นๆ สารอินทรีย์อื่นๆ ที่อยู่ในสารตั้งต้น (มะเฟือง) จะถูกนำไปใช้อย่างมากและรวดเร็ว ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 3 และพบว่ามีแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดสูงที่สุดคือสัปดาห์ที่ 3 เท่ากับ 7.27 log CFU/ml



รูปที่ 6 จำนวนแลคติกแบคทีเรียทั้งหมด (log CFU/ml) ตลอดระยะเวลาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักจากมะเฟือง

หมายเหตุ : h. หมายถึง ชั่วโมง (hour), wk. หมายถึง สัปดาห์ (week) และ mth. หมายถึง เดือน (month)

ตอนที่ 3 ผลการติดตามคุณสมบัติทางด้านกายภาพตลอดระยะเวลาการหมักเพื่อผลิตเป็น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

จากตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตึงผิวที่เปลี่ยนแปลงไปกับระยะเวลาต่างๆ โดยที่ค่าแรงตึงผิว หรือ surface tension ที่เกิดขึ้นสามารถวัดได้และมีหน่วยเป็นมิลลินิวตันต่อเมตร (mN/m) หรือไดน์ (Dyne) ซึ่งค่าดังกล่าวมีความสำคัญที่บ่งบอกถึงคุณสมบัติของพื้นผิวของของเหลวของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้ เป็นสิ่งทำให้เกิดบางส่วนของพื้นผิวของเหลวถูกดึงดูด หรือยึดเข้าไว้ด้วยกัน และช่วยให้การกระจายตัวของของเหลวดีขึ้น หรือลดแรงตึงผิวระหว่างของเหลวสองชนิดหรือระหว่างของเหลวกับของแข็ง ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องติดตามคุสมบัติดังกล่าวในผลิตภัณฑ์นี้ พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากกระบวนการหมักมะเฟืองมีค่า surface tension ตลอดระยะเวลาการผลิตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อพิจารณาจากตารางที่ 3 พบว่าค่า surface tension แนวโน้มการเพิ่มขึ้นและลดลง โดยที่ในเดือนที่ 2 และเดือนที่ 3 มีค่า surface tension ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 3 มีค่า surface tension ต่ำที่สุด คือ 43.42 mN/m เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำที่มีค่าดังกล่าวเท่ากับ 70.45 mN/m ซึ่งหมายความว่าของเหลวหรือสารละลายที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักด้วยมะเฟืองนี้สามารถแสดงคุณสมบัติในการลดแรงตึงผิวได้ดีกว่าน้ำ ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) อย่างไรก็ตามเนื่องจากเป็นสารที่ผลิตจากกระบวนการหมักโดยธรรมชาติจึงมีค่าลดแรงตึงผิวได้ที่สูงกว่าสารลดแรงตึงผิวเคมีสังเคราะห์ (synthetic surfactant)

ตารางที่ 3 ค่าลดแรงตึงผิวตลอดระยะเวลาการหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Time	Surface tension (mN/m)		
	BSF	Water	Commercial 5%
0 h.	53.20[a]	70.45	31.58
12 h.	51.84[ab]		
24 h.	50.56[bc]		
36 h.	49.51[cd]		
48 h.	50.37[bc]		
60 h.	49.05[cde]		
72 h.	46.85[f]		
1 wk.	48.11[def]		
2 wk.	47.21[ef]		
3 wk.	48.16[def]		
1 mth.	47.20[ef]		
2 mth.	44.65[g*]		
3 mth.	43.42[g*]		
P - value	0.00		

หมายเหตุ : h. หมายถึง ชั่วโมง (hour), wk. หมายถึง สัปดาห์ (week) และ mth. หมายถึง เดือน (month)

ตอนที่ 4 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสำหรับการนำไปใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) ในกระบวนการล้างผักและพื้นผิว

จากการวิเคราะห์และติดตามผลการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยกระบวนการหมักมะเฟืองทำให้ทราบว่าสารที่ผลิตได้นี้มีคุณสมบัติในการเป็นลดแรงตึงผิวชีวภาพ จึงได้ทำการวิเคราะห์คุณสมบัติอื่นที่จำเป็นสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารและพื้นผิว โดยได้ทำการวิเคราะห์ประเภทของสารลดแรงตึงผิวด้วยเทคนิคยูวี-วิสเบิลสเปคโตรโฟโตเมตรี เป็นวิธีการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารลดแรงตึงผิวไร้ประจุ โดยสกัดสารประกอบ adduct ที่อยู่ในตัวอย่างสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่เป็นกลุ่มสารลดแรงตึงผิวไร้ประจุโดยใช้สารเฮกเซน รวมกับ I_2 และ KI วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 295 นาโนเมตร จากนั้นหาปริมาณสารลดแรงตึงผิวไร้ประจุจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย Triton X-100 พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่แสดงความเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุไฟฟ้า (nonionic surfactant) เท่ากับ 1,272.58 ppm (mg/L) สารประเภทไม่มีประจุไฟฟ้านี้ส่วนใหญ่นำไปใช้เป็นส่วนผสมหรือส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์หรือน้ำยาสำหรับล้างผักผลไม้โดยส่วนใหญ่จะมีสารลดแรงตึงผิวประเภทนี้เป็นส่วนประกอบสูงถึงร้อยละ 40 ได้แก่ alky polyglycoside

lauryl glucoside glycerol monostearate และ triton X-100 ผลการวิเคราะห์หามีปริมาณซาโปนินทั้งหมด (total saponin) พบ 2.91 mg/ml ซึ่งสารซาโปนินที่ตรวจพบ มีการศึกษาและรายงานว่าสามารถนำไปผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลไม้ชนิดเบอร์รี่ (*Sapindus mukorossi*) ได้สารประเภทซาโปนินที่มีความเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุไฟฟ้า สามารถนำไปล้างเพื่อลดการปนเปื้อนสารประกอบฟีแนนทรีน (phenanthrene) (Zhou, Wang, Chen and Zhu, 2013) และสารซาโปนินนี้ยังมีรายงานการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* (Soetan k. O., Oyekunle M. A., Aiyelaagbe O. O. and Fafunso M. A., 2006) จากการศึกษาและติดตามคุณสมบัติของสารเมทาโบไลท์ระหว่างกระบวนการหมัก ทั้งทางด้านสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (flavonoid, antioxidant, phenolic, saponin) ที่ได้ข้อสรุปว่าเดือนที่ 3 เป็นช่วงที่กระบวนการหมักหยุดและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเสถียรภาพมากที่สุด เช่นเดียวกับค่าแรงตึงผิว เมื่อพิจาณาค่าแรงตึงผิวที่น้อยที่สุดจะส่งผลต่อความสามารถในการลดแรงตึงผิวได้ดี ความสามารถในการลดแรงตึงผิวนี้ช่วยให้เกิดการละลายหรือรวมกันระหว่างเฟสที่ละลายน้ำกับไม่ละลายน้ำ ทำให้สามารถจับกับส่วนที่เป็นโปรตีนหรือไขมันได้ รวมถึงโครงของสร้างของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ดังตารางที่ 4 ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อ *Staphylococcus aureus* (gram positive) และ *Salmonella* spp. (gram negative) พบว่าในเดือนที่ 3 สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากกระบวนการหมักมะเฟืองมีคุณสมบัติในการยับยั้ง *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ได้ดีที่สุดโดยมีบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เท่ากับ 10.0 ± 0.0 และ9.0 ± 0.0 ตามลำดับ ดังนั้นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่หมักเป็นระยะเวลานาน 3 เดือน จึงเป็นสารที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการนำไปใช้ในขั้นตอนการล้างต่อไป

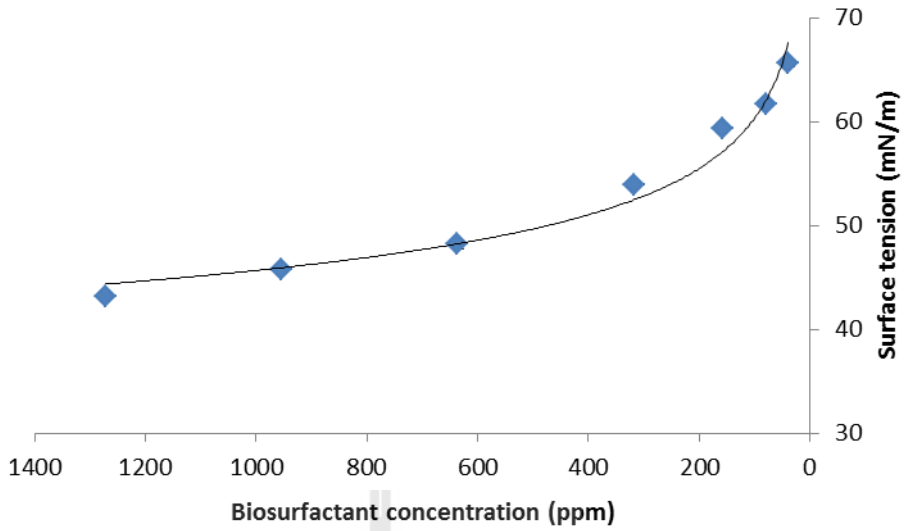
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4 ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

Time	Inhibition zone (mm.)	
	S. aureus	***Salmonella* spp.**
0 h.	9.7 ± 0.6	0
12 h.	10.7 ± 0.0	0
24 h.	9.3 ± 1.5	0
36 h.	0	10.0 ± 0.0
48 h.	0	13.0 ± 0.0
60 h.	0	6.0 ± 1.0
72 h.	0	0
1 wk.	7.7 ± 0.6	13.0 ± 0.0
2 wk.	0	0
3 wk.	0	12.0 ± 0.0
1 mth.	0	8.0 ± 0.0
2 mth.	8.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0
3 mth.	10.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0

หมายเหตุ : h. หมายถึง ชั่วโมง (hour), wk. หมายถึง สัปดาห์ (week) และ mth. หมายถึง เดือน (month)

จากรูปที่ 7 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (critical micelle concentration; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านกระบวนหมักเป็นระยะเวลา 3 เดือน นำไปวิเคราะห์ค่าลดแรงตึงผิวเผื่อหาค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Surface Tension Meter รุ่น DY 300 และวิธีวิเคราะห์ Wilhelmy Plate) พบว่าค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 636.29 ppm ซึ่งการเกิดไมเซลล์จะมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย เมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลายเพิ่มขึ้น ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะมีค่าลดลงจนถึงจุด CMC คือ ค่าแรงตึงผิวของสารละลายจะไม่ลดลงอีก ถึงแม้จะมีความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในสารละลาย



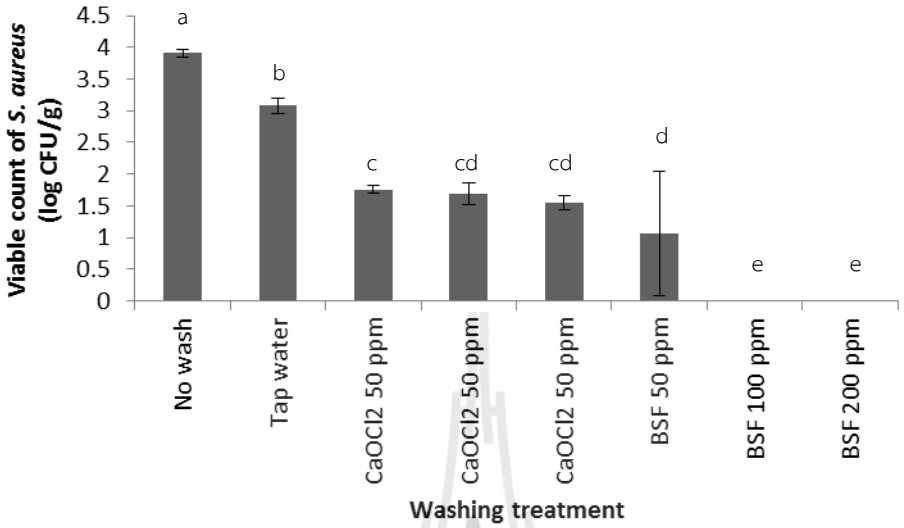
รูปที่ 7 ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (critical micelle concentration; CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ

ตอนที่ 5 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการเป็นสารฆ่าเชื้อสำหรับล้างผัก

5.1 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณจุลินทรีย์ในมะเขือเทศ ด้วยกระบวนการล้าง

การทดสอบกระสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผ่านวิเคราะห์และทดสอบคุณสมบัติต่างๆในข้างต้น นำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการล้างสำหรับเป็นสารฆ่าเชื้อ เปรียบเทียบกับสารเคมีที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการล้างผัก ผลไม้ได้แก่สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ ($CaOCl_2$) โดยความเข้มข้นที่อนุญาตให้ใช้ในการล้างผักผลไม้คือ 50-200 ppm ดังนั้นในการทดลองจึงเป็นการทดสอบประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตได้มาใช้ในขั้นตอนการล้างมะเขือเทศที่มีการเติมเชื้อ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในปริมาณที่มากเกินพอ (challenge test) คือ 10^8 CFU/ml ในมะเขือเทศพบว่ามีปริมาณเชื้อ *S. aureus* เริ่มต้น (initial load) ที่นับได้เท่ากับ 3.91 log CFU/g จากนั้นนำมะเขือเทศไปผ่านกระบวนการล้างด้วยน้ำประปา (Tap water) สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ 50, 100, 200 ppm และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ 50, 100, 200 ppm โดยมะเขือเทศที่ไม่ผ่านกระบวนการ challenge test และไม่ผ่านการล้าง (No wash) เป็นตัวควบคุมการทดลอง (control) จากรูปที่ 8 พบว่าปริมาณ *S. aureus* ที่หลงเหลือหลังกระบวนการล้างด้วยสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยที่มะเขือเทศที่ผ่านการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50 ppm มีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่หลงเหลือ 1.06 log CFU/g ซึ่งสามารถลดปริมาณ *S. aureus* จากมะเขือเทศที่ไม่ผ่านการล้างและล้างด้วยน้ำประปาถึง 2 log ในขณะที่การล้างด้วย สารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ (50, 100 และ 200 ppm) สามารถลดปริมาณเชื้อดังกล่าวได้เพียง 1 log นอกจากนี้ยังพบว่าการล้างด้วยสารลดแรง

ตึงผิวชีวภาพสามารถลดและควบคุมปริมาณเชื้อ *S. aureus* ให้อยู่ในระดับที่ไม่สูงเกินมาตรฐานกำหนด (< 2.00 log CFU/g)



รูปที่ 8 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ในมะเขือเทศด้วยกระบวนการล้าง

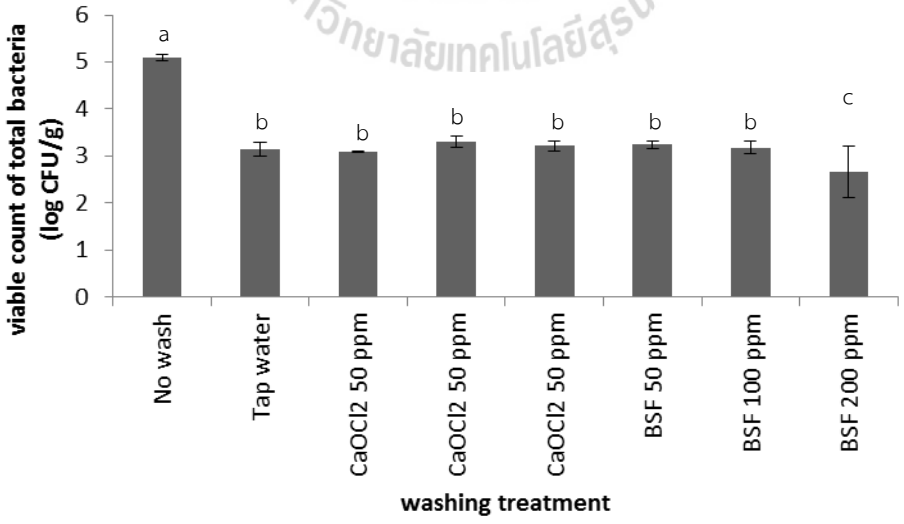
ดัชนีความเสี่ยงสูงสุดที่นอกเหนือจาก *S. aureus* ได้แก่ *Salmonella* จากตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในมะเขือเทศหลังกระบวนการล้าง พบว่ามะเขือเทศที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 200 ppm และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ตรวจไม่พบการปนเปื้อนหรือหลงเหลือของเชื้อ *Salmonella* spp. เป็นไปตามมาตรฐานกำหนด คือ จะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* ซึ่งการล้างด้วยน้ำประปาเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถควบคุมปริมาณเชื้อดังกล่าวนี้ได้

ตารางที่ 5 ผลการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในมะเขือเทศหลังกระบวนการล้าง

Treatment	Before washing		After washing	
No wash (control)	Detect	Detect	-	
น้ำประปา			Detect	Detect
$CaOCl_2$ 50 ppm			Detect	Detect
$CaOCl_2$ 100 ppm			ND	ND
$CaOCl_2$ 200 ppm			ND	ND
BSF 50 ppm			Detect	Detect
BSF 100 ppm			ND	ND
BSF 200 ppm			ND	ND

หมายเหตุ : ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

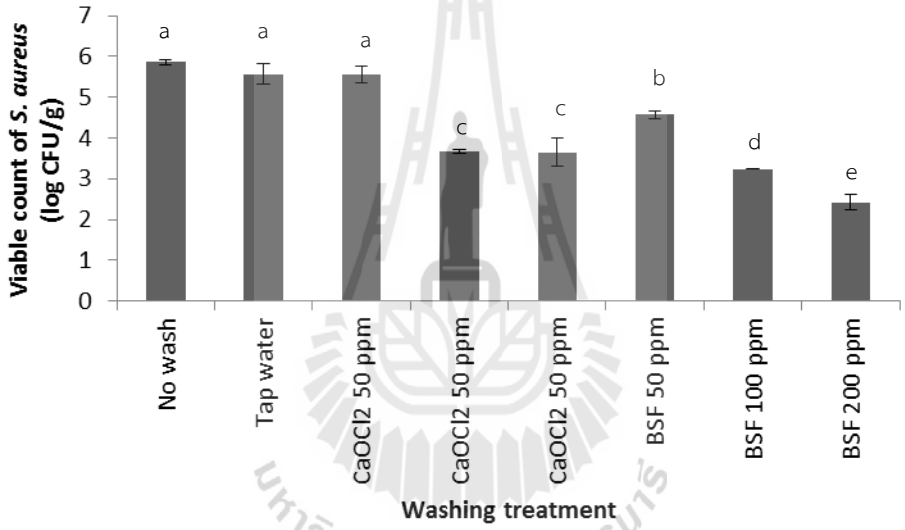
นอกจากดัชนีความเสี่ยงสูงสุด *S. aureus* และ *Salmonella* จำเป็นจะต้องติดตามผลดัชนีความเสี่ยงคุณลักษณะทั่วไปทางด้านจุลินทรีย์ พบว่า (รูปที่) ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่หลงเหลือหลังกระบวนการล้างด้วยสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยที่ การล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นต่ำสุด 50 ppm สามารถลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดให้อยู่ในระดับเดียวกับการล้างด้วยสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ และยังสามารถลดปริมาณแบคเรียทั้งหมดลงได้อย่างน้อย 2 log และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มสูดสุด 200 ppm มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่หลงเหลืออยู่น้อยที่สุด



รูปที่ 9 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในมะเขือเทศด้วยกระบวนการล้าง

5.2 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณจุลินทรีย์ในโหระพา ด้วยกระบวนการล้าง

จากรูปที่ 10 พบว่าปริมาณ *S. aureus* ที่หลงเหลือหลังกระบวนการล้างด้วยสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยที่โหระพาที่ผ่านที่ผ่านการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นสูงสุด 200 ppm มีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ที่หลงเหลือ 2.42 log CFU/g ซึ่งสามารถลดปริมาณ *S. aureus* จากมะเขือเทศที่ไม่ผ่านการล้างและล้างด้วยน้ำประปาถึง 2 log อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นที่ต่ำสุดของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ คือ 100 ppm มีประสิทธิภาพในลดและควบคุมปริมาณเชื้อดังกล่าวได้ดีกว่าสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 200 ppm



รูปที่ 10 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณ *S. aureus* ในโหระพาด้วยกระบวนการล้าง

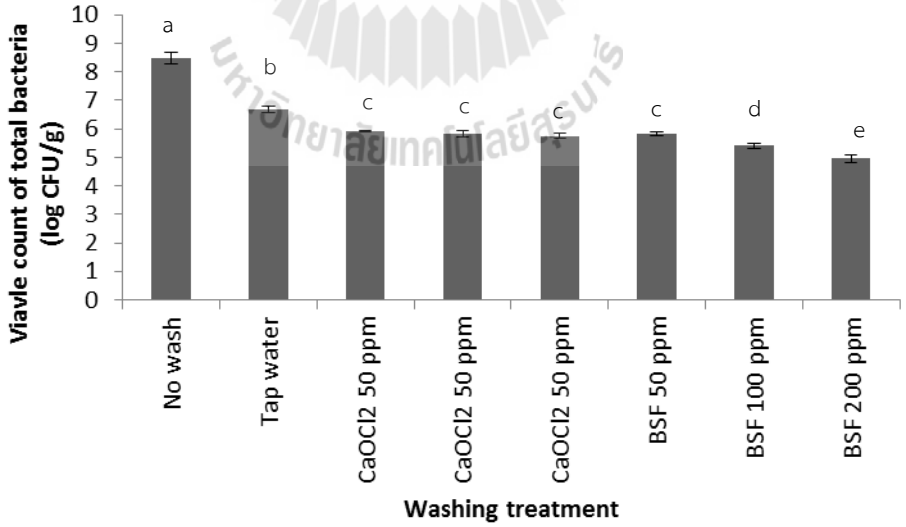
สำหรับผลการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. ในโหระพาหลังกระบวนการล้าง (ดังตารางที่ 6) พบว่าการล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้นอย่างน้อย 100 ppm มีประสิทธิภาพเพียงพอในการลดและความปริมาณเชื้อ *Salmonella* spp. คือตรวจไม่พบเชื้อดังกล่าวซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานกำหนด คือ จะต้องตรวจไม่พบเชื้อ *Salmonella* ในขณะที่การล้างด้วยสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ต้องใช้สารที่ความเข้มสูงถึง 200 ppm ถึงจะสามารถลดปริมาณเชื้อให้อยู่ในระดับมาตรฐานอาหารกำหนด

ตารางที่ 6 ผลการตรวจวิเคราะห์ *Salmonella* spp. ในโหระพาหลังกระบวนการล้าง

Treatment	Before washing		After washing	
No wash (control)	Detect	Detect	-	
น้ำประปา			Detect	Detect
$CaOCl_2$ 50 ppm			Detect	Detect
$CaOCl_2$ 100 ppm			Detect	Detect
$CaOCl_2$ 200 ppm			ND	ND
BSF 50 ppm			Detect	Detect
BSF 100 ppm			ND	ND
BSF 200 ppm			ND	ND

หมายเหตุ : ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบในโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายต่างๆ ดังรูปที่ 11 พบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่หลงเหลือหลังกระบวนการล้างด้วยสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยที่การล้างด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ppm สามารถลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าการล้างด้วยสารละลายแคลเซียมไฮโปคลอไรท์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน และที่ความเข้มข้นต่ำสุดสามารถลดปริมาณแบคเรียทั้งหมดลงได้อย่างน้อย 3 log



รูปที่ 11 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในโหระพาด้วยกระบวนการล้าง

ตอนที่ 6 ประสิทธิภาพสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการเป็นสารฆ่าเชื้อสำหรับล้างพื้นผิว

จากตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต่อการลดปริมาณแบคทีเรียก่อโรค *S. aureus* และ *Salmonella* spp. พบว่าการล้างบนพื้นผิวด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพและ Triton X-100 (nonionic surfactant) มีผลต่อการลดปริมาณ *S. aureus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติยิ่ง ($p<0.01$) อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 600 ppm สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่า 2% (v/v) Triton X-100 ในขณะที่ผลต่อการลด *Salmonella* spp. พบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพทุกความเข้มข้น (200, 400 และ 600 ppm) สามารถควบคุม ลดปริมาณเชื้อได้เช่นเดียวกับ 2% (v/v) Triton X-100

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบล้างบนพื้นผิวสแตนเลสด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen)

Treatment	*S. aureus* (log CFU/cm^2)	*Salmonella* spp.
control	0.32^a	Detect
sterile distilled water (DI)	0.26^b	Detect
2% (v/v) Triton X-100	0.19^d	ND
Biosurfactant 200 ppm	0.23^c	ND
Biosurfactant 400 ppm	0.23^c	ND
Biosurfactant 600 ppm	0.13^e	ND
P-value	0.00	-

หมายเหตุ : ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิเคราะห์ข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า มะเฟืองเป็นผลไม้รสเปรี้ยวที่มีความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนาเพื่อผลิตเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งสารที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยใช้มะเฟืองเป็นสารตั้งต้น ได้ข้อสรุปว่าระยะเวลาที่ดีที่สุดต่อกระบวนการหมักคือ เดือนที่ 3 ที่ส่งผลต่อคุณสมบัติทางด้านเคมี จุลินทรีย์ และกายภาพ ให้ได้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีประสิทธิภาพ ดังนี้ มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 2.25 มีความเป็นสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุไฟฟ้าเท่ากับ 1,272.58 ppm ปริมาณสารซาโปนิน 2.91 mg/ml ค่าแรงตึงผิว (surface tension) 43.43 mN/m ค่าความเข้มข้นวิกฤตของไมเซลล์ (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 636.29 ppm ซึ่งจะทำให้เกิดไมเซลล์จะมีผลต่อค่าแรงตึงผิวของสารละลาย ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการละลาย และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *Staphylococcus aureus* (gram positive) และ *Salmonella* spp. (gram negative) จากคุณสมบัติข้างต้นที่ได้ทำการพิสูจน์สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารสำหรับล้างในผลิตภัณฑ์ผัก ผลไม้สด โดยเฉพาะมะเขือเทศ และโหระพา ที่มีปริมาณการส่งออกสูง และการปนเปื้อนจุลินทรีย์กลุ่ม *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ได้ข้อสรุปว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพนี้มีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในกระบวนการล้างเพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ดังกล่าว โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ 100 ppmยังคงมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการใช้สารละลายแคลเซียมไฮโปรคลอไรท์ โดยกระบวนการล้างจะต้องมีวิธีการล้าง 2 ขั้นตอนดังนี้ 1.) การล้างด้วยน้ำสะอาดด้วยวิธีการ soaking นาน 2 นาที จากนั้น 2.) นำไปล้างในน้ำที่ผ่านการเตรียมด้วยสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวิธีการ soaking นาน 5 นาที นอกจากการนำไปประยุกต์ใช้ล้างผักผลไม้แล้วผู้วิจัยไปนำไปทดสอบการใช้สำหรับล้างพื้นผิวที่สัมผัสกับอาหารโดยตรง ได้แก่พื้นผิวประเภทสแตนเลส ซึ่งเป็นพื้นผิวที่นิยมใช้และส่วนประกับของภาชนะที่ใช้สัมผัสอาหารโดยตรงในอุตสาหกรรมอาหารและครัวเรือน จากผลการวิเคราะห์และทดสอบทำให้ทราบว่าจะต้องใช้สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในระดับความเข้มที่สูงกว่าการล้างผักผลไม้ ซึ่งความเข้มข้นที่เลือกใช้ในการทดสอบ คือ 200, 400 และ 600 ppm พบว่าสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* บนพื้นผิวดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่ความเข้มข้น 600 ppm มีประสิทธิภาพในการควบคุมและลดปริมาณ *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยที่ความเข้มข้นต่ำสุด 200 ppm เพียงพอต่อการควบคุมและลด *Salmonella* spp.

จากผลการวิจัยตลอดทั้งโครงการจึงสามารถสรุปในภาพรวมได้ว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ผลิตจากกระบวนหมักโดยธรรมชาติที่อาศัยมะเฟืองเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิต สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพต้นแบบที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการล้างผักผลไม้ และพื้นผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยตลอดทั้งโครงการทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบ ที่มีรูปแบบกรรมวิธีการผลิตไม่ซับซ้อน สามารถลดต้นทุน และเป็นการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยการนำไปประยุกต์ใช้ควรเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีรูปแบบและลักษณะการล้างเช่นเดียวกันกับมะเขือเทศ และ โหระพา เนื่องด้วยโครงการวิจัยต้องการความเสถียรของผลิตภัณฑ์จึงใช้ระยะเวลาในการทวนสอบหลายครั้งจนมีความน่าเชื่อถือทางสถิติ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพทุกครั้งที่มีการผลิต และเพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ของผลิตภัณฑ์ต้นแบบควรมีการทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ในการนำไปใช้งานในอนาคต และจากข้อเสนอแนะของผู้ทรงคุณวุฒิในกรณีการทดลองบางหัวข้อที่ไม่ได้นำเสนอในรายงานการวิจัยนี้ เนื่องจากข้อเสนอโครงการครั้งแรกยังไม่ได้รับพิจารณางบประมาณ เมื่อได้รับพิจาณางบประมาณผู้วิจัยได้พิจารณาและมีการปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองให้สอดคล้องกับงบประมาณที่ได้รับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

ปิยะวรรณ กาสลัก. (2554). สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากผลเชอร์รี่เปรี้ยว. **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี**.**

สำนักงานที่ปรึกษาด้านอุตสาหกรรมในต่างประเทศ. (2558). ส่งออกเกษตรไทยได้รับยกเป็นกรณีศึกษาการดำเนินการตามมาตรฐานการนำเข้าสินค้า. [ออนไลน์]. ได้จาก: https://thaiindustrialoffice.wordpress.com/2015/09/17

Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., and Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens. **Desalination**. 223: 143-151.

Edwards, K.R., Lepo, J. E., and Lewis, M. A. (2003). Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**. 46: 1309-1316.

Hwang, Y. H., et al. (2009). Subacute (28 day) toxicity of surfactin C, a lipopeptide produced by Bacillus subtilis, in rats. **Journal of Health Science**. 55(3): 351-355.

Karanth, N.G.K., Deo, P.G., and Veenanadig, N.K., (2005). Microbial production of biosurfactants and their importance [On-line]. Available: http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles19.htm

Maity, J.P. et al. (2011). Synthesis of Brushite Particles in Reverse Microemulsions of the Biosurfactant Surfactin. **International Journal of Molecular Sciences**. 12: 3821-3830.

Monteiro, S. A., et al. (2007). Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by Pseudomonas aeruginosa DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**. 147: 1-13.

Nitschke, M., and Costa, S. G. V. A. O. (2007). Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**. 18(5): 252-259.

Noudeh, G. D., Housaindokht, M., and Bazzaz, B. S. F. (2005). Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by Bacillus subtilis ATCC 6633. **The Journal of Microbiology**. 43(3): 272-276.

Pacwa-Plociniczak, M., Plaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z. And Cameotra, S.S. (2011). Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. **International Journal of Molecular Sciences**. 12: 633-654.

Rodrigues, L., Moldes, A., Teixeira, J., and Oliveira, R. (2006). Kinetic study of fermentative biosurfactant production by Lactobacillus strains. **Biochemical Engineering Journal**. 28: 109-116.

Soetan, k. O., Oyekunle, M. A., Aiyelaagbe, O. O. and Fafunso M. A. (2006). Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of Sorghum Bicolor L. Moench. **African Journal of Biotechnology.** 5(23): 2405-2407

Valotteau, C. et al., 2015 Biocidal Properties of a Glycosylated Surface: Sophorolipids on Au (111). **ACS Appl. Mater. Interfaces**. 7: 18086−18095.

Vatsa, P., Sanchez, L., Clement, C., Baillieul, F., and Dorey, S. (2010). Rhamnolipid Biosurfactants as New Players in Animal and Plant Defense against Microbes. International Journal of Molecular Sciences. 11: 5095-5108.

Wei, Y-H., Wang, L-C., Chen, W-C., and Chen, S-Y. (2010). Production and Characterization of Fengycin by Indigenous *Bacillus subtilis* F29-3 Originating from a Potato Farm. **International Journal of Molecular Sciences**. 11: 4526-4538.

Xu, Q., Nakajima, M., Liu, Z., and Shiina, T. (2011). Biosurfactants for microbubble preparation and application**. International Journal of Molecular Sciences**. 12(1): 462-475.

Youssef, N.H., Wofford, N. and McInerney, M.J. (2011). Importance of the Long-Chain Fatty Acid Beta-Hydroxylating Cytochrome P450 Enzyme YbdT for Lipopeptide Biosynthesis in *Bacillus subtilis* Strain OKB105. **International Journal of Molecular Sciences**. 12: 1767-1786.

Zhou, W., Wang, X., Chen, C., and Zhu, L. (2013). Enhanced soil washing of phenanthrene by a plant-derived natural biosurfactant, sapindus saponin. **Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects**. 425: 122-128.

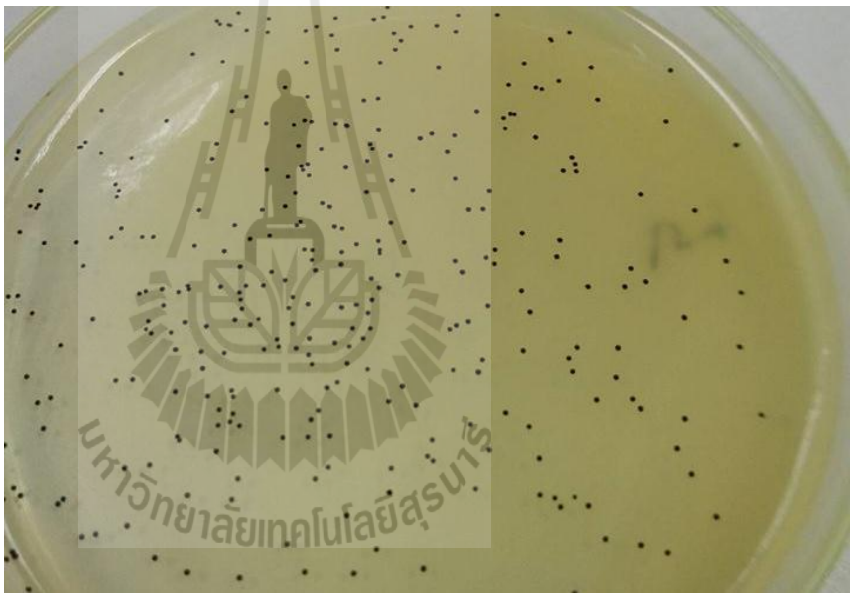
ภาคผนวก ก

วิธีการทดลอง

1. การตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิดคือ *S.aureus* และ *salmonella* spp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ(selective media)

1.1 การตรวจนับจำนวน *S.aureus* ด้วย baird parker agar

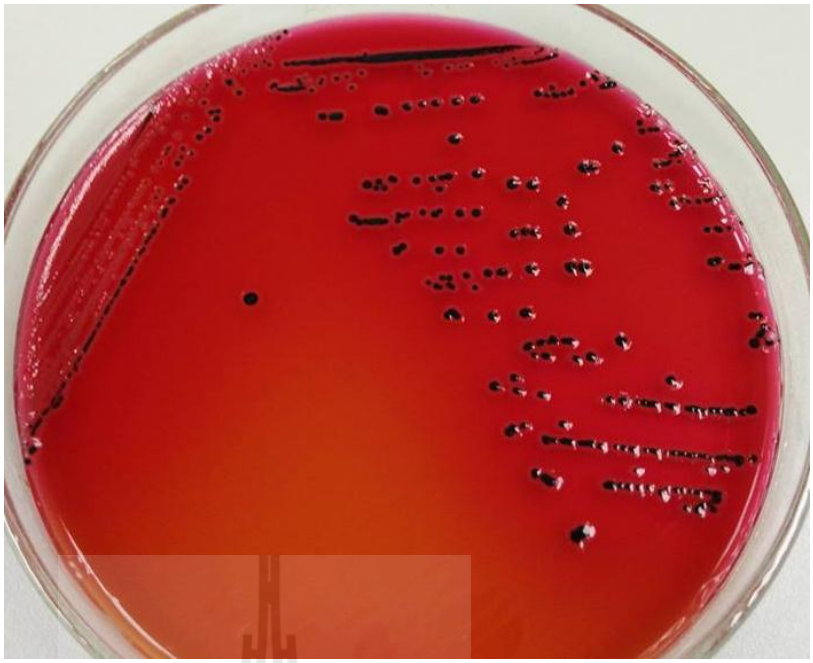
ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ลงใน 0.85%(w/v)NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตรจะมีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางสิบเท่า (10-fold dilution) เป็นลำดับ จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร baird parker agar จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกตรวจนับโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 cfu/g



ลักษณะโคโลนีของ *S.aureus* บน baird parker agar

1.2 การวิเคราะห์หาเชื้อ Salmonella spp. ด้วย xylose lysine deoxycholate agar

ชั่งตัวอย่างอาหาร 10 กรัม ลงใน lactose broth ปริมาตร 90 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เขี่ยตัวอย่างโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) steak ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ xylose lysine deoxycholate agarโคโลนีของ *Salmonella* spp.จะมีสีแดง ซึ่งจะผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทำให้ตรงกลางโคโลนีมีสีดำ



ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* บน XLD agar

2. การสร้างกราฟสารละลายมาตรฐานและการคำนวณ

2.1 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน Flavonoids

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (Stock 5 mg/ml) ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ส่วนหลอดควบคุมใช้ น้ำกลั่น 5 มิลลิลตร แล้วเติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีจากนั้นเติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาทีนำมาเติมสารละลาย 1 M NaOH 2 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

2.2 วิธีการเตรียมกราฟสารมาตรฐาน gallic acid

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (Stock 5mg/ml) gallic acid ปริมาตร 10 20 30 40 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำปริมาตร 990 980 970 960 950 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้น ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นใส่หลอดทดลอง 20 ไมโครลิตร เติม folin reagent 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1-8 นาที (ห้ามโดนแสง) เติม Na_2CO_3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ห้ามโดนแสง) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ 765 nm

2.3 วิธีการสร้างกรฟสารมาตรฐานซาโปนิน

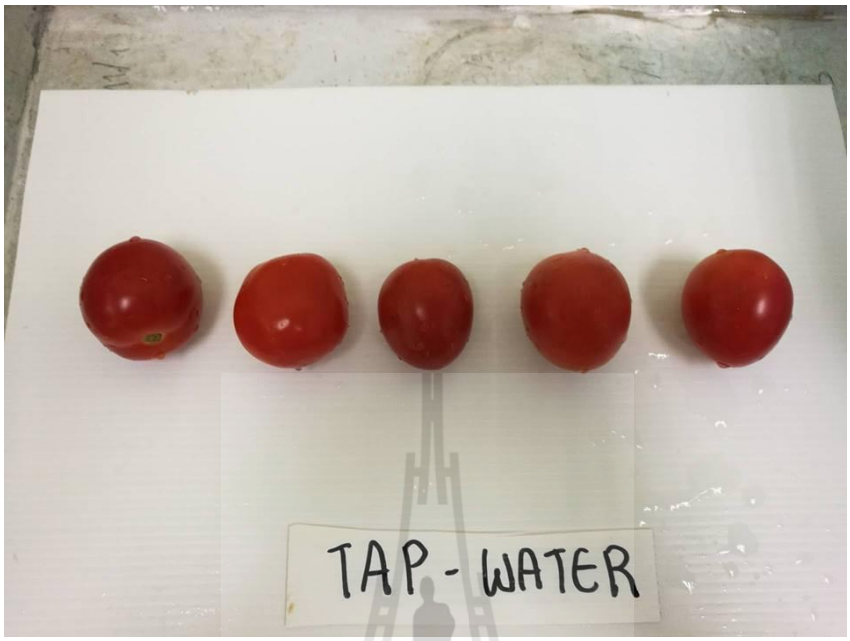
ปิเปตสารละลายมาตรฐาน saponin ปริมาตร 0, 100, 125, 150, 200, 225, 500, 750, 1000 ไมโครลิตร เติม absolute ethanol ปริมาตร 1000, 900, 875, 850, 800, 775, 500,0 ไมโครลิตรตามลำดับผสมให้เข้ากันเติม vanilline เข้มข้น 5% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ กรดซัลฟิวริก เข้มข้น 72% ปริมาตร 2.5 ml เขย่าให้เข้ากันบ่มในอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แช่ในน้ำแข็ง ประมาณ 3-4 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย spectrophotometer ที่ 544 นาโนเมตร

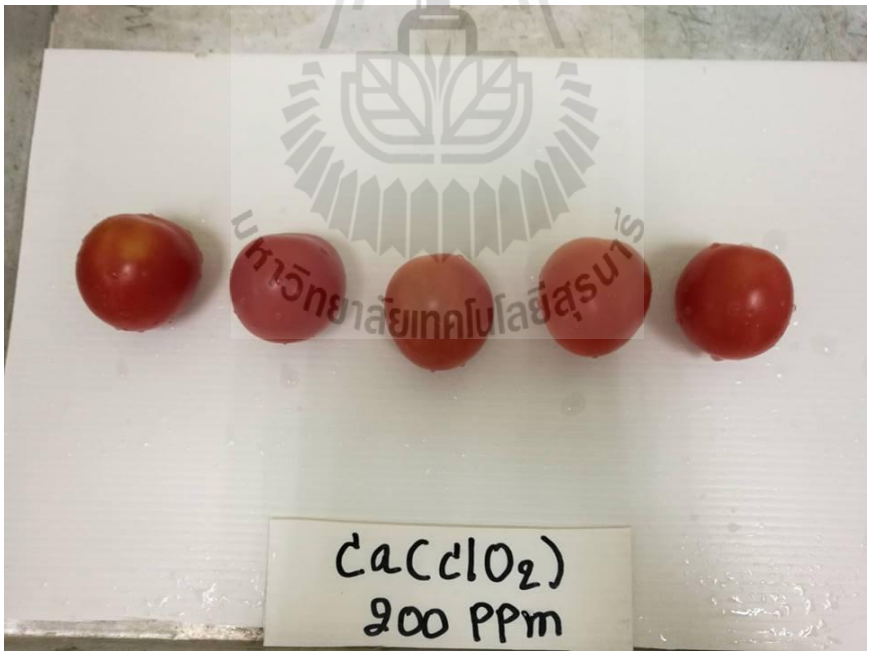
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

1.ลักษณะของมะเขือเทศที่ผ่านการล้างด้วยน้ำประปา, สารละลาย $CaOCl_3$ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ





มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2. **ลักษณะของโหระพาที่ผ่านการล้างด้วยน้ำประปา, สารละลาย $CaOCl_3$ และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ**

BSP 50

Ca(ClO2)
100 ppm

Ca(ClO2)
200 PPm

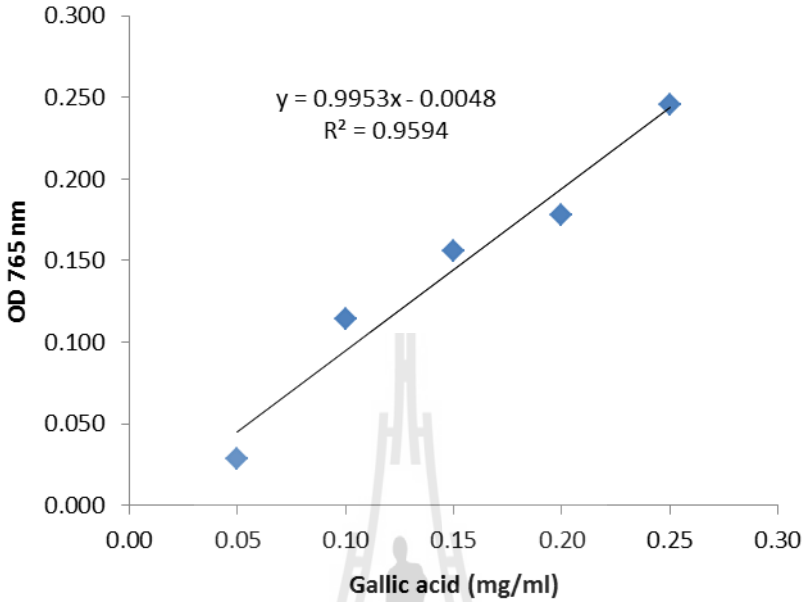
BSP 50

BSF 100 PPm

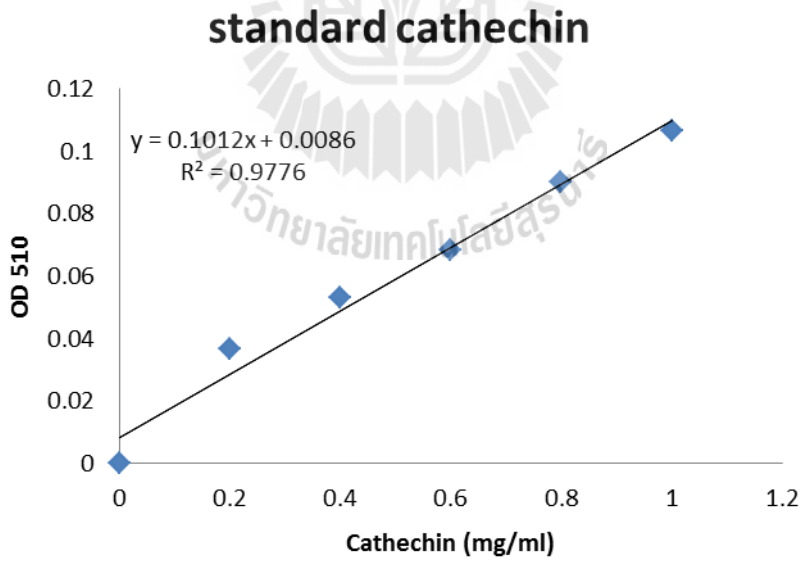
BSF 200 PPm

2.การสร้างกราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

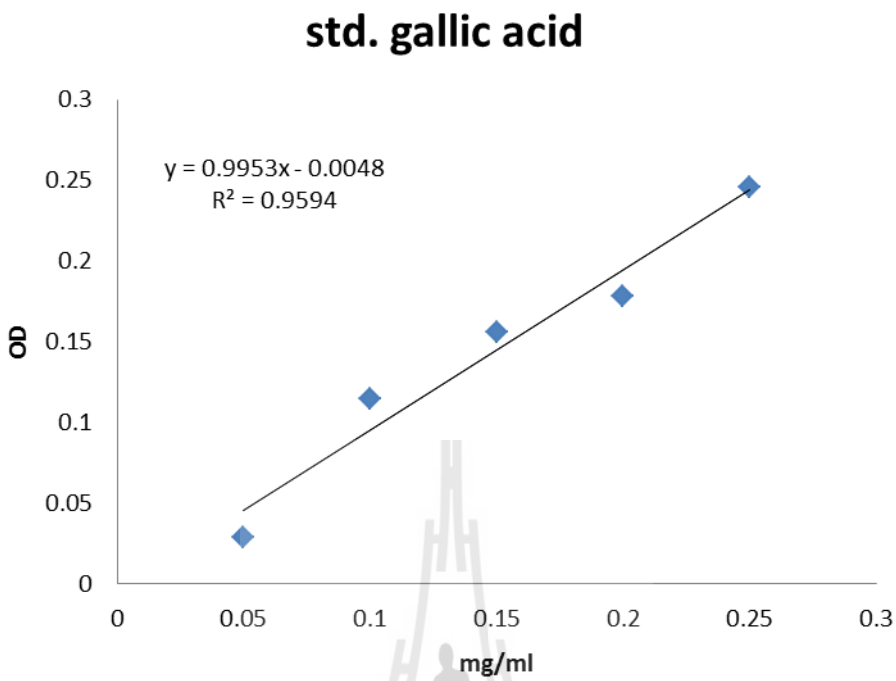
2.1 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Total phenolic



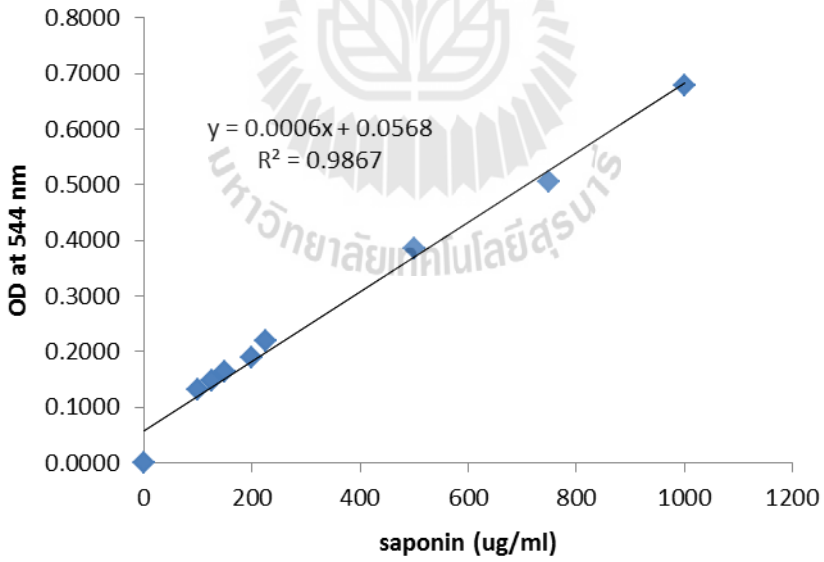
2.2 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Flavonoids



2.3 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ antioxidant



2.4 กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ saponin



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

นางปิยะวรรณ กาสลัก

นางปิยะวรรณ กาสลัก เกิดเมื่อวันที่ 12 เดือนมีนาคม พ.ศ.2502 ณ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (ชีววิทยา)จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2523 จบการศึกษาระดับปริญญาโท (Biotechnology and Biochemistry) จาก Mie Universityประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2536 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก (Applied Sciences and Biotechnology) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2539

นางปิยะวรรณ กาสลัก ได้มีผลงานทางวิชาการดังต่อไปนี้

Gasaluck, P., Lumprai, S. and Chaiwat, K. 2012. Microbial and heavy metalcontamination monitoring of ready-to eat food in Nakhon Ratchasima province.International Journal of Food, Nutrition and Public Health Vol.5 pp. 213-223.

Thitikorn, M. and Gasaluck, P. 2011. Effect of Freeze-drying and maltodextrin matrix on Poly-γ-glutamic acid (PGA) productivity from *Bacillus subtilis* starter powder. In Proceeding International Food Conference “Life Improvement through Food Technology” Surabaya, October 28th-29th pp. 80-85.

Natthida, C. and Gasaluck, P. 2011. Bacteriocin production and its crude characterization of lactic acid bacteria isolates from pickled Garcinia schomburgkiana pierre. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 4(01) pp. 54-64.

Natthida, C. and Gasaluck, P. 2010. Bacteriocin production and its crude characterization of Lactic acid bacteria isolates from pickled Garcinia schomburgkiana Pierre. In Proceeding of 12th Food Innovation Asia Conference on Indigenous Food Research and Development to Global Market). BITEC, Bangkok, Thailand. June 17-18, pp. 640 - 649.

Natthida, C. and Gasaluck, P. 2010. Morphological changes of *Bacillus cereus* TISTR 687 cells induced by crude bacteriocin producing Lactococcus lactis ssp. lactis 1. In Proceeding of 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB): International Conference on Biotechnology for Healthy Living. Prince of Songkla University, Trang Campos, Thailand. October 20-22.

Petchkongkaew, A., Taillandier,P., Gasaluck, P., and Lebrihi, A. 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from Thai Fermented Soybean (Thua-nao): Screening for Aflatoxin B1 and Ochratoxin A detoxification. Journal of Applied Microbiology Vol.104 (No.5) 1495-1502 (8).

Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., and Eumkeb, G. 2006. Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. LWT Food Science and Technology (39) 1214-1220.

Thongbai, B., Gasaluck, P., and Waites, W. M. 2006. Morphological changes of temperature- and pH-stressed Salmonella following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. LWT - Food Science and Technology. (39) 1180-1188.

Thongbai, B., Waites, W. M. and Gasaluck, P. 2005. The susceptibility of Bioluminescent *Salmonella typhimurium* Contaminating Chicken Carcases to Cetylpyridinium Cholide and Nisin. Kasetsart Journal: Natural Science October-December 2005. Vol. 39 No. 4 (622-632).

Gasaluck, P. 1999. The Development of the Curricula of Food Technology of Suranaree University of Technology (SUT). In Proceedings of the International Workshop on University Education, Research and in Asia-Pacific Region, MieUniversity Press, April 6 and 7.

Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. 1996. The occurrence of *Bacillus cereus* in Local Thai Traditional Foods. J. Antibact. Antifung. Agents Vol 24. No. 5(349-356).

Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. 1996. Some Chemical and Microbiological Properties of Thai Fish Sauce and Paste. J. Antibact. Antifung. Agents Vol 24. No. 6, (385-390).

Chinzei, Y., Gasaluck, P., et al. 1995. “A Study of Three Endemic Diseases in Rural Areas of Northeast Thailand.” International Scientific Research Program (Grant No.04041057), Mie University, School of Medicine.

Gasaluck, P. 1994. “Thai Fermented Fish Sauce.” In Proceedings of the InternationalSeafood Research Meeting of Mie University, Mie Academic Press, September 30.

Hibasami, H., Midorikawa, Y., Gasaluck, P., Tsukada, T., Shirakawa, S., Yoshimura, H.,Imai, M., Nakashima, K. 1992. Growth Inhibition of Canida By 15- Deoxyspergualin, anImmunosuppressive Agent Used In Experiment Organ Transplantation. Letters inApplied Microbiology. Vol 14 (81-83).

Hibasami, H., Midorigawa, Y., Gasaluck, P., Yoshimura, H., Masuji, A., Takaji, S.,Nakasahima, K., Imai M. 1991. Bactericidal Effect of 15-Deoxyspergualin, on Staphylococcus aureus. J. Chemotherapy Vol. 37 (202-205).

Midorigawa, Y., Hibasami, H., Gasaluck, P., Yoshimura, H., Masuji, A., Nakashima, K. and Imai, M. 1991. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Methyglyoxal B(Guanylhydrazone) Analogdes, The Inhibitors for Polyamine Biosynthetic pathway. J.Applied. Bacteriol Vol 70 (291-293).

Gasaluck, P., Midorigawa, Y., Imai, M. and Yoshimura, H. 1990. Enteropathogenic *E. coli* (ETEC) Isolation in Northeast Thailand and Their Resistance to Antibiotics. Mie Medical Journal Vol 40 (3):379-384.

Thongrajai, P., Chanarat, P., Kulapongs, P., Chanarat, N., Gasaluck, P. and Kaewpila, S. 1988. Epidermiological Assessment of Anti-HIV I Anti-bodies in Thailand, Sounteast Asian J.Trop.Med.Pub.Hith Vol 19. No. 4 Dec.

Thongrajai, P., Chanarat, P., Kulapongs, P., Chanarat, N. and Gasaluck, P. 1988. Seroepidemiology of Anti-HIV I Antibodies. In Thailand, Srinagarind Hospital Medicine Vol 3. No. 4, Oct-Dec.

Thongrajai, P., Gasaluck, P. et al. 1986. Detection of Anti-Rota Virus Secretory IgA by ELISA. The Second Annual Meeting on Faculty of Medicine Khon KaenUniversity.

Thongrajai, P., Gasaluck, P. et al., 1986. Diarrhoea in Children in Rural Thailand. 1986. AFull research report to the USAID Department of Microbiogy Faculty of Medicine Khon Kaen University.

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “โปรไบโอติกและเชอร์รี่เปรี้ยวหมักเสริมสุขภาพ” 2558รับสนับสนุนจากทุนวช.57 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากถั่วเหลืองหมักผงผสมบุกสำหรับผู้สูงอายุ” 2558รับสนับสนุนจากทุนวช.55 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าชุดโครงการ: โครงการเรื่อง “บาซิลัส สับทิลิส ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วหมักเพื่อเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ” 2558 รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก” 2558 รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “สมบัติวิทยากระแสและการประยุกต์ใช้เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากถั่วเหลืองหมักด้วยกล้าเชื้อบาซิลัส สับทิลิสในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ”2558 รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วหมัก” 2558 รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “การจัดทำระบบ GMP สำหรับน้ำปรุงรสผัดหมี่”2555 รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “การลดกลิ่นไม่พึงประสงค์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก โดยการใช้ *Bacillus subtilis* เป็นกล้าเชื้อในการหมัก”2553 รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “การเฝ้าระวังการปนเปื้อนจุลินทรีย์และโลหะหนักในอาหารสำเร็จรูป เพื่อจำหน่ายในเขตจังหวัดนครราชสีมา” 2553 รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักผลเชอร์รี่เปรี้ยว (*Prunus cerasus* L.)” 2553 รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การศึกษาผลการเติม แคลเซียมเบนโทไนต์ ในอาหารสัตว์ต่อการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา” 2553 รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การพัฒนากุนเชียงไขมันต่ำ” 2553 รับสนับสนุนจากทุนศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมเขต 6 จังหวัดนครราชสีมา

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การยืดอายุการเก็บรักษาขนมถั่วกวนอบเทียน” 2553 รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส.

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “การศึกษาอายุการเก็บของขนมถั่วอบเทียน”2552 รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส.

นางปิยะวรรณ กาสลัก ผู้ร่วมโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในโรงฆ่าสุกร การขนส่งจากโรงฆ่าไปยัง จุดจำหน่าย และแหล่งจำหน่ายเนื้อสุกร ในเขตจังหวัดนครราชสีมาและอุบลราชธานี” 2552 รับสนับสนุนจากทุนวิจัยสถาบันคลังสมองแห่งชาติ

นางปิยะวรรณ กาสลัก ผู้ร่วมโครงการวิจัยการวิจัย: โครงการเรื่อง “สถานการณ์ความปลอดภัยด้านผักและผลไม้กรณีตลาดนัด-รถเร่ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง)” 2548 รับสนับสนุนจากทุนวิจัยสถาบันคลังสมองแห่งชาติ

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “การใช้ไนซินในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกมาจากชิ้นปลาที่บรรจุในสภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ” 2544 รับสนับสนุนจากทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ มทส.

สิทธิบัตรสิ่งประดิษฐ์

สิทธิบัตร กรรมวิธีการผลิตสารทำความสะอาดจากการหมักผลไม้ไทยรสเปรี้ยว

เลขที่คำขอ 1401004175

สิทธิบัตร เครื่องกรองของเหลวมีกากแบบต่อเนื่อง

เลขที่คำขอ 1501005214

สิทธิบัตร ถังหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรเหลือใช้

เลขที่คำขอ 1501005215

สิทธิบัตร ผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วเหลืองที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *Bacilus subtilis* SB-MYP-1 เลขที่คำขอ 1601004346

ที่อยู่ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
จังหวัด นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 0-4422 - 4270 โทรสาร 0-4422-4387
Email address: piyawan@sut.ac.th

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร. เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ.

ประวัติการศึกษา

2524 : ประกาศนียบัตรพยาบาลและอนามัย, กรมแพทย์ทหารเรือ, กองทัพเรือ, กรุงเทพฯ

2532 : เภสัชศาสตรบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ , ประเทศไทย

2542 **:** Ph.D. (Pharmacology) ; School of Pharmacy, Faculty of Health and Social care, The Robert Gordon University, Aberdeen, **United Kingdom**

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Medicinal Plant, Clinical Pharmacology, Hospital Pharmacy, Toxicology , Pharmacognosy

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

หัวหน้าโครงการวิจัย :

- Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria
- The study of medicinal plants and supplement food for health of community in NakhonRatchasima province
- The study of antibacterial activity of some medicinal plants in Lamiaceae Family
- Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria.
- Investigation of the effect of Galangin on some β - lactam antibiotics resistant bacteria.
- In vivo toxicity test of Galangin
- In vivo toxicity test of some Flavonoids
- Trend in needs if Biomedical Sciences.
- Antibacterial activity of the pericarp of *Garcinia mangostana* against drug resistant bacteria
- Research and development new antibacterial drug for treatment of drug resistant bacteria (เมธีวิจัย สกว. ปี 2549)

- Bioactive Compounds form the Tuberous Roots of *Butea superba* Roxb

งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

สิทธิบัตรยาจำนวน 1 สิทธิบัตรตามโครงการวิจัยร่วมกับ สกว. ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ : สารผสมของยา เพื่อยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Enterobacter cloacae* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะเลขที่คำขอสิทธิบัตร เลขที่ 0601001839

ผลงานตีพิมพ์

Richards, R.M.E., **Eumkeb, G**.and Marshall, D. (1997). Is the ultrastructural damage caused by subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulphadiazine part of their normal mechanism of action? Microbios, 92, 183 - 197.

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2005). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. *Acta Horticulturae*. Vol 4: 678: 171-178.

Jirawan Oonmetta-aree, Tomoko Suzuki, Piyawan Gasaluck and **Griangsak Eumkeb**.(2006). Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT Food Science and Technology*. 39: 1214-1220. (IF 2005=1.155)

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2003). Reversing beta-lactam antibiotic resistance with flavonoids in Gram positive Bacteria. In **The 3rd World Congress on Medicinal and Aromatic Plant for Human Welfare (WOCMAP III) From Biodiversity through Science and Technology, Trade and Industry to Sustainable Use, Abstracts Book** (Poster presentation, PP04 -59, pp. 450). 3-7 February 2003, Chiangmai, Thailand : Chiangmai University.

Punopas, K., **Eumkeb, G**., Chitsomboon, B. and Nakkiew, P. (2004). The study of antibacterial activity of some medicinal plant in Lamiaceae family. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:52-59.

Eumkeb, G**. and Richards R.M.E. (2004). Reversing β- Lactam Antibiotic Resistance in Gram- positive bacteria by Some Flavonoids. *Suranaree J. Sci. Technol.* 11:143-150.**

Eumkeb, G. and Richards, R.M.E. (2004). Reversing beta-lactam antibiotic resistance in Gram positive Bacteria with some flavonoids. In :The 20th **FAPA Congress 2004 : Emerging Science and Profession in Pharmacy , Abstracts Book** (Oral presentation, PP-O-01, pp. 160). 30 Nov – 3 Dec 2004, Bangkok, Thailand : The Pharmaceutical Association of Thailand under Royal Patronage, Bangkok.

Eumkeb, G. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some β - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers**, Abstracts Book** (Poster presentation, MRG168/p225, pp. 214.). 14-16 January 2005, Kanchanaburee, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, Abstract Book (Oral presentation, 13-R1-S1-MRG4680168/p227, pp. 1). 13-15 October 2005, Petchaburi, Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok.

Eumkeb, G. Chukratok. S., Suttajit. M. and Ruangrungsi. N. (2005). Investigation of the effect of Some Flavonoids on some beta - lactam antibiotics resistant bacteria. In :The 1st International Conference on Natural products for Health and Beauty; From local wisdom to global marketplace. Abstract Book (Oral presentation, O4-1/p232, pp. 124). 17-21 October 2005, Mahasarakham, Thailand : Mahasarakham University, and the higher education commission, Thailand.

Eumkeb,G. and Jinakoon, N. (2003). The study of medicinal plants and supplement food for health of community in NakhonRatchasima province. Research report.

Pornjunya, S., Thanee, N. and **Eumkeb, G**. (2003). Toxicity of *Bacillus Thruingiensis* var *Israelensis* towards *Aedes aegypti* larvae in various water containers and under different environmental conditions. MSc. Thesis

Leesuraparanon, B. and **Eumkeb, G**. (2003). Comparison of the toxicity effect of neem extract and some Thai medicinal plants on house fly larvae. MSc. Thesis

Eumkeb, G., Wongkamsound, K (2007). Flavonoids synergy with beta-lactam antibiotics against beta-lactam-resistant bacteria. In :The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers **7th, Abstract Book** (Poster presentation, P-PHY-B06-RSA4980004 /p26 , pp. 26.). 11-13 October 2007, Pattaya, Chonburee,Thailand : The Thai Research Fund and The higher education commission, Bangkok

Griangsak Eumkeb, Nichayanan Chaisena, Nitaya Rojtinnakorn, Supatcharee Siriwong, Aphai Duangkham. (2008). P14 Reversing β-Lactam Antibiotic Resistant Bacteria with Flavonoids. In: Proceeding of 30th Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand Meeting. 27-28 March 2008. *Thai Journal of Pharmacology*. Vol 29: No I: 117-126. Bangkok: Ruen Kaew Press.

Eumkeb, G., Wongkamsound, K. (2008). Flavonoids synergy with **β-**lactam antibiotics against **β-**lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, Abstract Book (Poster presentation, PS-BIO-E20). 16-18 October 2008, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education**:** p. 144.

Eumkeb, G., Phitaktim, S., Rojtinnakorn, N., Siriwong, S., Duangkham, A.,Naknarong, W., Wisansawat, J. (2009). Flavonoids synergy with **β-**lactam antibiotics against **β-**lactam-resistant bacteria. The Thai research Fund meeting : Senior Thai research Fund researchers meet Junior Thai research Fund researchers, Abstract Book (Poster presentation, PS-BIO-B24). 15-17 October 2009, Cha-am, Petchaburi, Thailand, Thailand research fund and Commission on higher education**:** p. 105.

Eumkeb, G., Sakdarat, S and Siriwong, S. (2010). "Reversing [beta]-lactam antibiotic resistance of Staphylococcus aureus with galangin from Alpinia officinarum Hance and synergism with ceftazidime." Phytomedicine **18**(1): 40-45. (*Impact Factor 2009 = 2.174*)

Siriwong S, Thumanu K, **Eumkeb G.** (2010). Using FT-IR microspectroscopy to investigate biochemical change of drugs-resistance *Escherichia coli* treated with amoxicillin and apigenin. In: Proceeding of the 36th Congress on Science and Technology of Thailand (STT36). Abstract Book (Oral presentation, B2_0051/pp70.) 26-28 October 2010, Bangkok, Thailand: Bangkok International Trade & Exhibition Centre (BITEC), Thailand.

Eumkeb, G. and Duangkham A. (2011). "Subacute Toxicify Test of Galangin and ceftazidime in Mice." Thai Journal of Toxicology **26**(1): 5-13.

ผลงานตีพิมพ์ทางหนังสือพิมพ์และสื่ออินเตอร์เนต (บางส่วน)

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ **พัฒนาสารสกัด"ข่า"สู่ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง** สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย **วันที่ 14 มกราคม 2548**

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ **วิจัยพบ"ข่า"ยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ผู้จัดการออนไลน์ วันที่ 15 มกราคม 2548 เวลา 12:39 น.** http://www.manager.co.th/

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ **เร่งวิจัย"ข่า"เป็นยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองดื้อยา** หนังสือพิมพ์บ้านเมือง **ประจำวันจันทร์ที่ 17 มกราคม 2548**

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ **"ข่า"สยบเชื้อดื้อยา เล็งวิจัยสูตรใหม่ ผสมสารสมุนไพร** หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ **ประจำวันอังคารที่ 18 มกราคม 2548**

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ **วิจัย"ข่า"ทำยาปราบเชื้อแบคทีเรียจอมดื้อ** หนังสือพิมพ์ผู้จัดการรายวัน **ประจำวันศุกร์ที่ 21 มกราคม 2548 หน้า 43.**

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ **พัฒนาสารสกัดจาก"ข่า"แทนยาปฏิชีวนะสมัยใหม่ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดหนอง** หนังสือพิมพ์สยามรัฐ **ประจำวันศุกร์ที่ 28 มกราคม 2548**

เกรียงศักดิ์ เอื้อมเก็บ **สารสกัด"ข่า"ส่วนผสมยาปฏิชีวนะสูตรใหม่ ต้านเชื้อหนองดื้อยา หนังสือพิมพ์โพสต์ทูเดย์** ประจำวันอาทิตย์ที่ 13 กุมภาพันธ์ 2548 หน้า B5**.**

หน่วยงานที่อยู่ สาขาวิชาปรีคลีนิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
111 ถ. มหาวิทยาลัย 1 ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000.
โทร : 0 - 4422 - 4260 **โทรสาร**: 0-44 22- 4633 และ 0-4422- 4185
E-mail : griang@sut.ac.th