

การใช้สารสกัดจากขมิ้นชัน *Curcuma longa* L. ร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดเพื่อยับยั้ง  
แบคทีเรียก่อโรคและยืดอายุการเก็บของเส้นขนมจีนสด



นางสาวสุภาวิตา ชวนไชยสิทธิ์

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)  
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

USE OF TURMERIC EXTRACT *Curcuma longa* L. IN COMBINATION WITH ACID  
REGULATOR TO INHIBIT PATHOGENIC BACTERIA AND EXTEND SHELF LIFE OF  
FRESH RICE NOODLE

Miss Supawida Chuanchaisit



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

โดย นางสาวสุภาวิตา ชวนไชยสิทธิ์  
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเข็ญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สาริศา สุริยรักษ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

สุภาวิตา ขวณไชยสิทธิ์ : การใช้สารสกัดจากขมิ้นชัน *Curcuma longa* L. ร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและยืดอายุการเก็บของเส้นขนมจีนสด (USE OF TURMERIC EXTRACT *Curcuma longa* L. IN COMBINATION WITH ACID REGULATOR TO INHIBIT PATHOGENIC BACTERIA AND EXTEND SHELF LIFE OF FRESH RICE NOODLE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ชื่นจิต ประภิตชัยวัฒนา, 118 หน้า.

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการใช้สารสกัดจากขมิ้นชันร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและยืดอายุการเก็บของเส้นขนมจีนสด ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดขมิ้นชันด้วยวิธี HPLC และ TLC ตรวจสอบ คัดแยก และจำแนกจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เส้นขนมจีนเสื่อมเสียด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนพื้นที่ rDNA ศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion ร่วมกับการวิเคราะห์หาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) และ minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) และของสารสกัดขมิ้นชัน (curcumin; CCM) และสารควบคุมความเป็นกรด คือ โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate; SA) และโซเดียมแลกเตท (sodium lactate; SL) รวมถึงศึกษาการเสริมฤทธิ์ของสารผสม และศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารผสมในเส้นขนมจีนสด และลักษณะทางกายภาพของเส้นขนมจีนสด จากการศึกษาพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดขมิ้นชัน คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin จุลินทรีย์หลักที่ทำให้ขนมจีนเสื่อมเสีย คือ แบคทีเรีย *Brevibacillus* sp. และยังพบ *Bacillus pumilus* และ *Bacillus cereus* และพบ ยีสต์ *Candida tropicalis* และ *Pichia occidentalis* โดยสาร CCM มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวและจุลินทรีย์ก่อโรค (*Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli*) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดระหว่าง 4.88 ถึง 78.00 µg/ml มีขนาดของ inhibition zone อยู่ในช่วง 7.87±0.06-11.20±0.20 mm ยกเว้น *E.coli* และเมื่อพิจารณา ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารเดี่ยว CCM, SA และ SL พบในช่วง 0.49-3.90, 25-200 และ 12.57-200.15 mg/ml ตามลำดับ และค่า MBC/MFC ในช่วง 1.95-7.81, 50->200 และ 50.29->201.15 mg/ml ตามลำดับ จากการศึกษาการตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารผสมพบว่า มีฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect) ยกเว้นการใช้ CCM ร่วมกับ SA ที่ให้ผล indifference กับ *E.coli* สารผสมที่มีประสิทธิภาพที่สุด คือ การใช้ CCM ร่วมกับ SL ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด จากผลการใส่สารผสมในเส้นขนมจีนสดต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของ CCM ร่วมกับ SL พบว่าเมื่อเติมสารที่ระดับ MBC ของ *E. coli* สารแสดงฤทธิ์ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ แต่ไม่แสดงฤทธิ์ฆ่าจุลินทรีย์ที่ทดสอบทุกชนิด และสารที่ใช้มีผลต่อค่า  $L^* a^* b^*$ , ค่า pH และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ส่วนค่าความเหนียว ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ภาควิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....
ปีการศึกษา	2560	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

## 5872152723 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: CURCUMIN / RICE NOODLE / ANTIMICROBIAL ACTIVITIES/ SHELF LIFE

SUPAWIDA CHUANCHAISIT: USE OF TURMERIC EXTRACT *Curcuma longa* L. IN COMBINATION WITH ACID REGULATOR TO INHIBIT PATHOGENIC BACTERIA AND EXTEND SHELF LIFE OF FRESH RICE NOODLE. ADVISOR: SIRIMA PUANGPRAPHANT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 118 pp.

The aim of this study was to determine the use of turmeric extract *curcuma longa* L. in combination with acid regulators to inhibit pathogenic bacteria and to extend shelf life of fresh rice noodle. The chemical compound of turmeric extract (curcumin; CCM) was determined by HPLC and TLC. Isolated and identified spoilage microorganisms in fresh rice noodles by rDNA sequencing analysis and investigated the inhibitory effects by agar well diffusion method, minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC) of CCM and acid regulators i.e. sodium acetate (SA) and sodium lactate (SL). The synergistic effect of CCM with acid regulators was also investigated. The effects of mixture applied into fresh rice noodle was evaluating microorganism inhibition and physical properties. The results showed that the chemical compound was curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. The main spoilage microorganism was bacteria, which were *Brevibacillus* sp. and besides *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus* whereas yeast and mold were *Candida tropicalis*, and *Pichia occidentalis*. CCM with the concentration ranged from 4.88 to 78.00 µg/ml had inhibitory effects on all isolates and reference pathogens (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) with inhibition zone ranging from 7.87±0.06 to 11.20±0.20 mm and showed no inhibitory effect on *E. coli*. Furthermore, MIC of CCM, SA, and SL were 0.49-3.90, 25-200 and 12.57-200.15 mg/ml, respectively and MBC/MFC were 1.95-7.81, 50->200 and 50.29->201.15 mg/ml, respectively. The combination of those compounds showed the synergistic effect except for CCM with SA showed indifference effect for *E.coli*. The most effective combination was CCM in with SL which can inhibit all tested microorganism. Applying to fresh rice noodle at MBC concentration (*E. coli*) showed the inhibitory effect but showed no bactericidal or fungicidal effect on all tested microorganism. Treated fresh rice noodle had significantly different in color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), pH, and antioxidant activity ( $p \leq 0.05$ ) from the control while there was no difference in toughness ( $p > 0.05$ ).

Department: Food Technology

Student's Signature .....

Field of Study: Food Technology

Advisor's Signature .....

Academic Year: 2017

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา (The Scholarship from the Graduate School, Chulalongkorn University to commemorate the ๗๒nd anniversary off his His Majesty King Bhumibala Adulyadeja is gratefully acknowledged) และ ทุน ๙๐ ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (The ๙๐th Anniversary Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund)) และสำเร็จลุล่วงด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจากอาจารย์ ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.ชินจิต ประภคิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้คำแนะนำด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และให้ข้อคิดในการทำงานที่ดีเสมอมา ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนินธุ์ ปราณีนรารัตน์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์ให้ใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย และนางสาวมนรวิศ วยธนพานิช ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร, อาจารย์ ดร.สาริศา สุริยรักษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำตรวจสอบ กลั่นกรองและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ มีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณนางสาวทรง คำคม เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารและทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจ สนับสนุน ช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำที่ดีเสมอมา

สุดท้ายขอกราบขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียน และเป็นกำลังใจพร้อมทั้งให้การสนับสนุนที่ดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญรูป .....	ฎ
สารบัญตาราง.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ .....	4
2.1 ขนมจีน .....	4
2.2 Polymerase chain reaction (PCR).....	12
2.2.1 หลักการของ PCR.....	12
2.2.2 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR.....	13
2.2.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลผลิตผล PCR (sequencing analysis) .....	14
2.3 ขมิ้นชัน .....	15
2.3.1 ลักษณะทั่วไปของขมิ้นชัน.....	15
2.3.2 เหง้าขมิ้นชัน .....	16
2.2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดขมิ้นชัน (biological activities) .....	20
2.4 สารควบคุมความเป็นกรด.....	26
2.4.1 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate; SA) .....	27
2.4.2 โซเดียมแลกเตต (sodium lactate; SL) .....	29
2.5 การเสริมฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ (synergistic effect) .....	30
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย .....	34

3.1 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมิน .....	37
3.1.1 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) .....	37
3.1.2 การวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟี แผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC) .....	38
3.2 การศึกษาสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ของเส้นขนมจีนสด .....	38
3.2.1 จำนวนจุลินทรีย์และการเสื่อมเสีย .....	38
3.2.2 คัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เส้นขนมจีนสดเสื่อมเสียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) .....	40
3.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมิน .....	42
3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion .....	42
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution .....	43
3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารควบคุมความเป็นกรด .....	43
3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution .....	44
3.5 การศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด (synergistic effect) .....	44
3.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution .....	44
3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution โดยกำหนดความ เข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่ .....	45
3.6 การประเมินผลของเส้นขนมจีนสดต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับ สารควบคุมความเป็นกรด .....	46
3.6.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดต่อจุลินทรีย์ รวม .....	48



3.6.2	ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีน .....	48
3.6.3	ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในเส้นขนมจีน .....	48
3.6.4	สมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของเส้นขนมจีนสดที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด (วันที่ 1) .....	48
3.7	การวางแผนการทดลอง .....	49
บทที่ 4	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	50
4.1	การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมิน .....	50
4.1.1	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) .....	50
4.1.2	การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC) .....	51
4.2	การศึกษาสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ของเส้นขนมจีนสด .....	53
4.2.1	จำนวนจุลินทรีย์และการเสื่อมเสีย .....	53
4.2.2	คัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เส้นขนมจีนสดเสื่อมเสียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) .....	55
4.3	การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมิน .....	60
4.3.1	การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion .....	60
4.3.2	การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution .....	63
4.4	การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารควบคุมความเป็นกรด .....	64
4.4.1	การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution .....	64

4.5 การศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด (synergistic effect) .....	67
4.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution .....	67
4.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution โดยกำหนดความ เข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่ .....	73
4.6 การประเมินผลของเส้นขนมจีนสดต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับ ไซเดียมแลกเตต .....	74
4.6.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตตต่อจุลินทรีย์รวม ...	76
4.6.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตตต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้ เสื่อมเสียในเส้นขนมจีน .....	77
4.6.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตตต่อจุลินทรีย์ก่อโรคใน เส้นขนมจีน.....	79
4.6.4 สมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของเส้นขนมจีนสดที่เติมสารเคอร์คูมินและ ไซเดียมแลกเตต (วันที่ 1).....	82
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	84
รายการอ้างอิง.....	86
ภาคผนวก ก การเตรียมเส้นขนมจีน.....	98
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ .....	100
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์ทางเคมี .....	101
ภาคผนวก ง วิธีวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ .....	104
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	118

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 ขนมจีนแป้งสด .....	4
รูปที่ 2.2 ขนมจีนแป้งหมัก.....	5
รูปที่ 2.3 กรรมวิธีการผลิตขนมจีนแป้งสด .....	8
รูปที่ 2.4 กรรมวิธีการผลิตขนมจีนแป้งหมัก .....	10
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของอะกาโรสเจล .....	14
รูปที่ 2.6 ขมิ้นชัน.....	16
รูปที่ 2.7 โครงสร้างองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นชัน.....	18
รูปที่ 2.8 โครงสร้างและองค์ประกอบของเคอร์คูมิน, ดีเมทิลออกซีเคอร์คูมิน และ บิสดีเมทิลออกซีเคอร์คูมิน จากเหง้าขมิ้นชัน .....	19
รูปที่ 2.9 โครงสร้างโมเลกุลในรูปแบบคีโตและอินอล .....	20
รูปที่ 2.10 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ .....	23
รูปที่ 2.11 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก .....	23
รูปที่ 2.12 โครงสร้างผนังเซลล์ของฟังไจ .....	24
รูปที่ 2.13 กลไกในการเข้าทำลายฟังไจของสารสกัดจากพืช .....	25
รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมอะซิเตท.....	28
รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมแลกเตต.....	29
รูปที่ 2.16 กราฟแสดงผลการเสริมฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์.....	31
รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมขององค์ประกอบของสารเคอร์คูมินที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร....	50
รูปที่ 4.2 องค์ประกอบในสารเคอร์คูมิน (TLC).....	51
รูปที่ 4.3 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างขนมจีนในวันที่ 1 และ 2.....	54
รูปที่ 4.4 ปริมาณยีสต์และราในตัวอย่างขนมจีนในวันที่ 1 และ 2.....	54
รูปที่ 4.5 จุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเส้นขนมจีนสด ประกอบด้วย A) <i>B. cereus</i> , B) <i>B. pumilus</i> , C) <i>Brevibacillus</i> sp. D) <i>C. tropicalis</i> และ E) <i>P. occidentalis</i> .....	57
รูปที่ 4.6 ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนหลักในเส้นขนมจีนที่เสื่อมเสีย.....	58
รูปที่ 4.7 ปริมาณและชนิดยีสต์และราหลักที่เป็นตัวแทนหลักในเส้นขนมจีนที่เสื่อมเสีย .....	58
รูปที่ 4.8 ขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ของ <i>Brevibacillus</i> sp. ที่ความเข้มข้นต่างๆ .....	62
รูปที่ 4.9 ขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ .....	62

**รูปที่ 4.10** กราฟแสดงผลการเสริมฤทธิ์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมอะซิเตท (CCM + SA) โดยวิเคราะห์จากค่า MIC ของสารต่อจุลินทรีย์ทดสอบ..... 69

**รูปที่ 4.11** กราฟแสดงผลการเสริมฤทธิ์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต (CCM + SL) โดยวิเคราะห์จากค่า MIC ของสารต่อจุลินทรีย์ทดสอบ..... 72

**รูปที่ 4.12** การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่อง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ในชุดตัวอย่างควบคุม (TPC\_CT) และชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต (CT\_CS ) ..... 76

**รูปที่ 4.13** การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่อง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ในชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ *Brevibacillus* sp. (NA\_Brevi) และ *C. tropicalis* (PDA\_CS\_BreviC) และวิเคราะห์ยีสต์และราวมในตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ (YM\_CT) ..... 78

**รูปที่ 4.14** การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่อง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ในชุดตัวอย่างที่เติมเชื้อ *E. coli* (EMB\_CS\_E) และ *S. aureus* (BPA\_CS\_S)..... 80

**รูปที่ 4.15** เส้นขนมจีนที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต..... 83

**รูปที่ ค.1.1** โครมาโทแกรม HPLC ของสารมาตรฐานเคอร์คูมิน ที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร ..... 102

**รูปที่ ง.11.1** การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่อง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ในชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ (PDA\_CS\_BreviC) ..... 117

**รูปที่ ง.11.2** ค่า R-squared ( $R^2$ ) ที่ได้จากการคำนวณจากข้อมูลการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่อง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง (PDA\_CS\_BreviC)..... 117

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 ปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้าขมิ้นชัน.....	17
ตารางที่ 2.2 ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของไซเดียมอะซิเตทตามมาตรฐานโคเด็กซ์.....	27
ตารางที่ 2.3 ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของไซเดียมแลกเตทตามมาตรฐานโคเด็กซ์.....	29
ตารางที่ 3.1 ภูมิภาคเคลื่อนที่ด้วยระบบ gradient elution โดยใช้เทคนิค HPLC .....	37
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของสารเคอร์คูมินและค่า $R_f$ .....	52
ตารางที่ 4.2 ปริมาณแบคทีเรียและแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้น ขนมจีนสด .....	55
ตารางที่ 4.3 ปริมาณยีสต์และราและยีสต์และราที่เป็นตัวแทนหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้น ขนมจีนสด .....	56
ตารางที่ 4.4 จุลินทรีย์ไอโซเลทและเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ได้จากตัวอย่างเส้นขนมจีนสดที่เสื่อม เสีย .....	56
ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร) ต่อจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ คัดแยกจากเส้นขนมจีนสดที่เสื่อมเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค (หลุมกว้าง 6 มิลลิเมตร).....	60
ตารางที่ 4.6 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารเคอร์คูมินต่อจุลินทรีย์ทดสอบ.....	63
ตารางที่ 4.7 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของไซเดียมอะซิเตท (SA) และไซเดียมแลกเตท (SL) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ.....	65
ตารางที่ 4.8 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท (CCM + SA) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ .....	67
ตารางที่ 4.9 ค่า FIC index ของสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท (CCM + SA) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ .....	68
ตารางที่ 4.10 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลก เตท (CCM + SL) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ.....	70
ตารางที่ 4.11 ค่า FIC index ของสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตท (CCM + SL) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ .....	71

ตารางที่ 4.12 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเทตโดยกำหนดความเข้มข้นของไซเดียมแลกเทตคงที่ (CCM + SL) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ .....	73
ตารางที่ 4.13 ค่าวิเคราะห์จากกราฟในชุดตัวอย่างควบคุม (TPC_CT) และชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเทต (CT_CS) .....	77
ตารางที่ 4.14 ค่าวิเคราะห์จากกราฟของชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ <i>Brevibacillus</i> sp. (NA_Brevi) และ <i>C. tropicalis</i> (PDA_CS_BreviC) และวิเคราะห์ยีสต์และรารวม ในชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ (YM_CT).....	78
ตารางที่ 4.15 สมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของชุดตัวอย่างควบคุม (CT) และชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเทต (CS) ในวันที่ 1 .....	82
ตารางที่ ง.7.1 ความเข้มข้นของไซเดียมแลกเทตที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ .....	113



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ขนมจีนเส้นสด เป็นอาหารที่ได้รับความนิยมในการบริโภคกันอย่างแพร่หลายในทุกภูมิภาคของประเทศไทยมาช้านาน และปัจจุบันมีปริมาณการผลิตที่สูงขึ้น ทั้งในระดับอุตสาหกรรมในครัวเรือน จนถึงอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เนื่องจากมีขนาดและความต้องการของตลาดที่มากขึ้น (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2549) แต่ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวนิยมบริโภคเป็นอาหารสด จึงมีอายุการเก็บสั้น เกิดการเสื่อมเสีย และปนเปื้อนได้ง่ายจากจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์และรา อันมีสาเหตุมาจากกระบวนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน มีการสัมผัสเส้นขนมจีนด้วยมือตลอดกระบวนการผลิต รวมถึงความไม่เหมาะสมของสถานที่ผลิต อุปกรณ์ เครื่องมือที่ใช้ สุขลักษณะของผู้ปฏิบัติงาน การเก็บรักษา ตลอดจนการขนส่งผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การบริโภคขนมจีนที่จำหน่ายตามท้องตลาดมักจะไม่นำไปผ่านการให้ความร้อนก่อนรับประทาน เมื่อรับประทานแล้ว อาจทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ส่งผลทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยของผู้บริโภค (ลัญญณ์รัฐ ภาตะนันท์, 2551) จากการสำรวจการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในขนมจีนจากหลายหน่วยงานของรัฐในหลายพื้นที่ พบจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และเป็นจุลินทรีย์ก่อโรค อีกทั้งยังทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Coliform*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2551; สถาบันอาหาร, 2554; สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2551) ทั้งนี้ยังมีการตรวจพบการปนเปื้อนของยีสต์และราอีกด้วย (ลัญญณ์รัฐ ภาตะนันท์, 2551) จากรายงานการตรวจพบจุลินทรีย์ในขนมจีนดังกล่าว จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ประกอบการบางรายเติมวัตถุเจือปนที่เป็นสารเคมี ทั้งที่มีมาตรฐานและไม่มีมาตรฐานลงไปผลิตภัณฑ์ เพื่อยืดอายุการเก็บในแกเส้นขนมจีน โดยวัตถุกันเสียที่นิยมใช้ คือ กรดเบนโซอิก จากการรายงานการตรวจสอบเส้นขนมจีนพบที่มีการใช้กรดเบนโซอิก และในบางยี่ห้อพบการใช้ในปริมาณที่เกินมาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนด ซึ่งอาจส่งผลเสียแก่สุขภาพทั้งในระยะสั้นและระยะยาวได้ (มูลนิธิเพื่อผู้บริโภค, 2559; สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2551) จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาเบื้องต้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้มีการนำสารสกัดจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มาทดแทนการใช้วัตถุกันเสียในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เช่น ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีสีเหลือง นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องเทศ ทำหน้าที่ปรุงแต่งสี กลิ่น รส ให้กับอาหาร และประโยชน์ในด้านอื่นๆ เช่น ส่วนผสมในยาหรือเครื่องสำอาง

นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถนำมาทดแทนการใช้วัตถุกันเสียในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ โดยมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์คือ กลุ่มสารเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทฟีนอลิก (phenolic compound) มีองค์ประกอบของสารที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ เคอร์คูมิน (curcumin) ซึ่งเป็นสารประกอบหลัก และดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) และ บิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) เป็นสารประกอบรอง โดยเคอร์คูมินมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง โดยเฉพาะการแสดงฤทธิ์ในด้านจุลินทรีย์ พบว่าสามารถต้านจุลินทรีย์ได้หลายกลุ่ม เช่น แบคทีเรีย ยีสต์และรา (Li et al., 2011) แต่ทั้งนี้การเติมสารสกัดจากธรรมชาติลงในผลิตภัณฑ์เพียงอย่างเดียว อาจก่อให้เกิดความไม่คงตัว หรือเกิดการสลายตัวในระบบอาหารได้ และมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ลดลงได้



การใช้สารควบคุมความเป็นกรดเพื่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษา และอาจช่วยเสริมประสิทธิภาพของสารสกัดจากธรรมชาติได้ ดังเช่นวัตถุเจือปนอาหารในกลุ่ม Generally Recognized As Safe (GRAS) ที่เป็นสารควบคุมความเป็นกรด เช่น โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) และโซเดียมแลกเตต (sodium lactate) ที่มีความปลอดภัยและเป็นสารที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ตามข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหารตามมาตรฐานโคเดกซ์ (Codex General Standard for Food Additives หรือ GSFA 2014) และแสดงค่า ADI (acceptable daily intake) เป็น not limited ซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ดีมาประยุกต์ใช้ร่วมกับสารสกัดจากขมิ้นชันเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและยืดอายุการเก็บของเส้นขนมจีนสด

## จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาและตรวจสอบชนิดจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ของสารเดี่ยว (สารสกัดขมิ้นชัน และสารควบคุมความเป็นกรด) และการเสริมฤทธิ์กันของสารผสมระหว่างสารสกัดจากขมิ้นชันร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด (synergistic effect)
3. เพื่อศึกษาผลของการประยุกต์ใช้สารสกัดจากขมิ้นชันร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดในการยับยั้งจุลินทรีย์ในเส้นขนมจีนสด



### สมมติฐานการวิจัย

1. ทราบชนิดจุลินทรีย์และความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด
2. การใช้สารสกัดจากขมิ้นชันร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด มีฤทธิ์เสริมกันในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด
3. การใช้สารสกัดจากขมิ้นชันร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเส้นขนมจีนสดได้



## บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

### 2.1 ขนมจีน

ขนมจีน เป็นอาหารชนิดหนึ่งที่คนไทยบริโภคกันมาช้านาน ในปัจจุบันเป็นอาหารที่ได้รับความนิยมในทุกภูมิภาคของประเทศไทย เนื่องจากเป็นอาหารที่ทำได้ง่าย หารับประทานได้ทั่วไป และสามารถรับประทานเป็นมื้อหลักแทนข้าวได้ จากประวัติความเป็นมาของขนมจีน สันนิษฐานว่าขนมจีนเริ่มต้นมาจากชาวมอญ ซึ่งเรียกขนมจีนว่า คนอมจิน หมายถึงการทำให้สุก 2 ครั้ง โดยคนอม หมายถึง การจับกันเป็นกลุ่มหรือเป็นก้อน จิน หมายถึงทำให้สุก นอกจากนี้ คนอม นั้น สันนิษฐานว่าน่าจะใกล้เคียงกับคำในภาษาไทยคือ เข้าหนม หมายถึงข้าวที่นำมาผัดให้เป็นแป้ง ซึ่งภายหลังเกิดการกร่อนคำเป็นขนม (พิชัย วาสนาส่ง, 2543) เส้นขนมจีนมีส่วนประกอบหลักคือ ข้าวเจ้าหรือแป้งข้าวเจ้า โดยขนมจีนสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามกระบวนการผลิต (กมลทิพย์ เอกธรรมสุทธิ, 2557) ได้แก่

1. ขนมจีนแป้งสด ทำจากข้าวสารหรือปลายข้าวเจ้า หรือข้าวหักที่ผ่านการแช่น้ำหรือล้างน้ำก่อนที่จะนำมาไม่โดยไม่ผ่านการหมัก ขนมจีนชนิดนี้เก็บไว้ได้ไม่นาน และมีความเหนียวน้อยกว่าขนมจีนแป้งหมัก ขนมจีนแป้งสดอาจทำได้จากแป้งแห้งที่เรียกว่า แป้งชนิดไม่น้ำ (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2528) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ขนมจีนแป้งสด

ที่มา: สำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย (2559)

2. ขนมจีนแป้งหมัก ขนมจีนแป้งหมักเป็นขนมจีนที่ทำจากการหมักข้าวหรือปลายข้าวโดยหมัก 2-3 วัน ก่อนนำมาไม่แล้วทำเป็นขนมจีน ซึ่งผลที่ได้จากการหมักคือเส้นขนมจีนจะมีความเหนียว มีกลิ่นแป้งหมัก และสามารถเก็บได้นาน (สุรางครัตน คัมภีรยศ, 2526) เนื่องจากในขั้นตอนของการหมักแป้งจะมีจุลินทรีย์แบคทีเรียกรดแล็กติก (lactic acid bacteria) เจริญอยู่ โดยปริมาณของจุลินทรีย์ดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำตาลและกรดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก และมีปริมาณจุลินทรีย์ดังกล่าวสูงสุดในช่วง 20-24 ชั่วโมงแรก และจะลดจำนวนลง เนื่องจากจากการสะสมของปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น หรือในกระบวนการผลิตกรดแล็กติกเนื่องมาจากการใช้น้ำตาลที่ถูกเปลี่ยนมาจากแป้งโดยจุลินทรีย์จำพวกยีสต์ได้ด้วยเช่นกัน ซึ่งกระบวนการผลิตกรดแล็กติก จะมีประโยชน์ในการช่วยยืดอายุหรือช่วยชะลอการเน่าเสียของขนมจีนแป้งหมักได้ (ทะเนตร อุฤทธิ์, 2560) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ขนมจีนแป้งหมัก  
ที่มา: สุขภาวะชุมชน (2559)

วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตขนมจีน เป็นส่วนสำคัญในการผลิตซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพทางด้านลักษณะทางกายภาพของเส้นขนมจีน (ลัญญณัฐ ภาตะนันท์, 2551)

1. ข้าว โดยทั่วไปจะใช้ข้าวสารหรือปลายข้าวสารเจ้าหัก ข้าวที่ใช้จะมีอายุหลังการเก็บเกี่ยวประมาณ 6 เดือน ถึง 1 ปี ถ้าใช้ข้าวใหม่ที่มีอายุการเก็บไม่ถึง 6 เดือนจะทำให้เส้นขนมจีนที่ได้มีลักษณะนิ่มเกาะติดกันมากและได้ปริมาณเส้นน้อยกว่าใช้ข้าวเก่า ส่วนข้าวเก่าถ้าอายุเกิน 1 ปีจะได้เส้นขนมจีนที่แข็งกระด้าง ร่วน ไม่มีความเหนียว และทำให้ขนมจีนมีสีเหลืองมาก ปัจจุบันนิยมใช้ข้าวหักในการทำขนมจีนเนื่องจากใช้ข้าวเต็มเมล็ดจะไม่คุ้มทุนในการผลิต

2. น้ำ ควรใช้น้ำสะอาดปราศจากสิ่งแขวนลอย มีความกระด้างต่ำ โดยทั่วไปนิยมใช้น้ำประปามากที่สุด น้ำฝน หรือน้ำบาดาลจะมีใช้น้อยในบางพื้นที่เท่านั้น

3. เกลือ ใช้เกลือป่นหรือเกลือเม็ด สีขาว สะอาด ใส่ขณะโม่แป้งหรือนอนน้ำแป้งเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแป้ง ไม่ทำให้เกิดรสและกลิ่นเหม็นเปรี้ยวเกินไป โดยนิยมใช้ในอัตราส่วน เกลือ 7 กิโลกรัมต่อข้าว 100 กิโลกรัม

กรรมวิธีการผลิตขนมจีนแป้งสด (ณรงค์ นิยมวิทย์, 2528)

กรรมวิธีการผลิตขนมจีนแบบแป้งสด สามารถสรุปขั้นตอนและวิธีการดังต่อไปนี้ และแสดงในรูปที่ 2.3

1. การทำความสะอาดข้าว นำข้าวมากำจัดสิ่งสกปรกจากข้าว เช่น กววด หิน ดิน และทราย โดยการทำความสะอาดจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการโม่ข้าว ขั้นตอนการแช่ข้าว ระดับพื้นบ้านจะแช่ข้าว 12 ชั่วโมง โดยแช่ข้าวค้างคืนไว้ส่วนอุตสาหกรรมมักจะแช่ข้าว 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวอ่อนนุ่มและง่ายต่อการโม่

2. การโม่และการกำจัดน้ำออกจากแป้ง ใช้โม่หินในการนวดและใช้เครื่องกรองแบบใช้ความดันในการกำจัดน้ำ ในระดับพื้นบ้านเรียกว่าการขับน้ำ เนื่องจากมีการนำแป้งที่ไม่บรรจุในถุงผ้าดิบและใช้ของหนักทับไว้ทั้งคืน จนได้แป้ง

3. การผสมและการต้มแป้ง การต้มแป้งเป็นขั้นตอนการทำให้แป้งสุกบางส่วน สามารถทำได้โดยขึ้นแป้งเป็นก้อนให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 ถึง 25 เซนติเมตร ต้มให้สุกจากผิวลึกเข้าไปข้างในประมาณครึ่งนิ้ว ไม่ควรให้แป้งสุกมากเกินไปเพราะจะทำให้แป้งเหนียวยากต่อการโรยเส้น

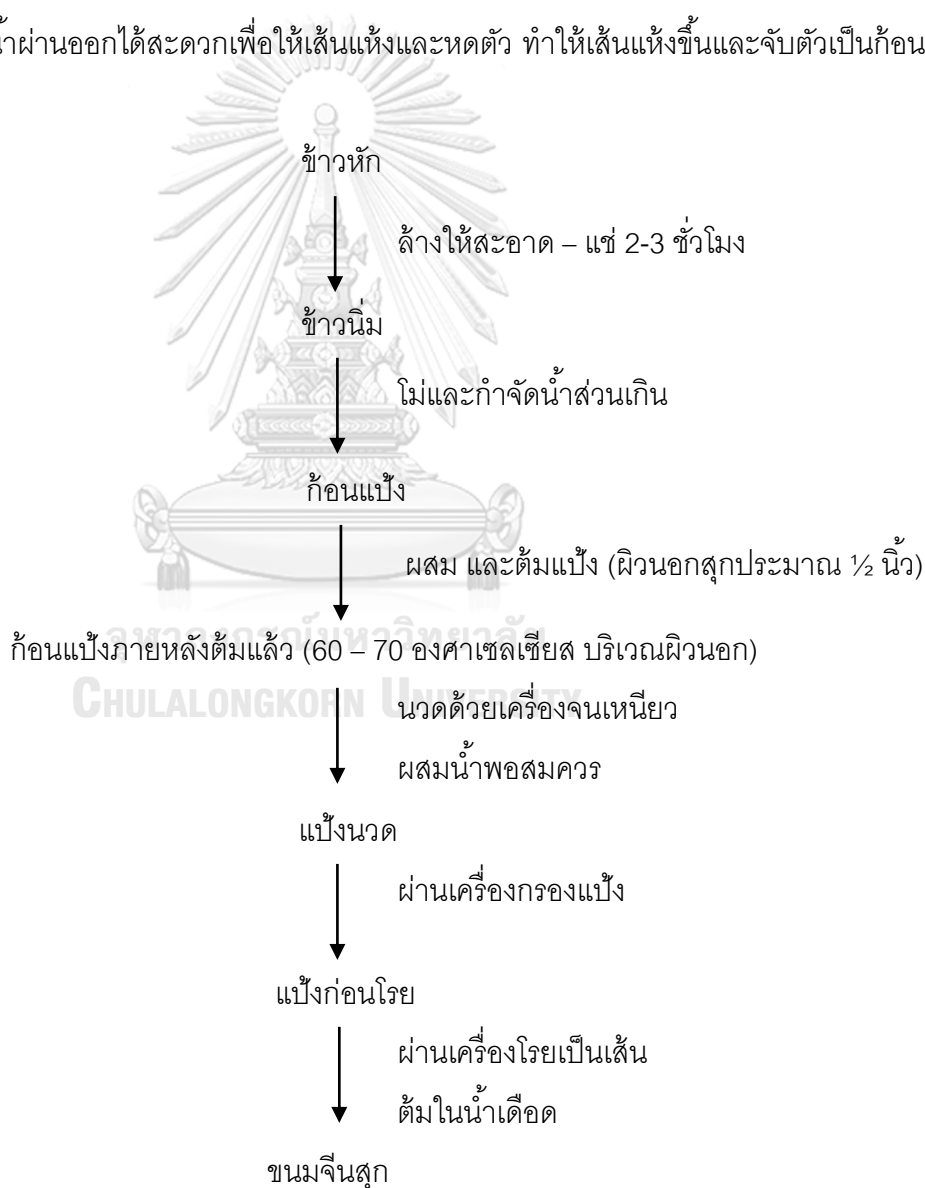
4. การนวดแป้ง เป็นการนำก้อนแป้งที่ต้มให้สุกบางส่วนมานวดผสมให้ส่วนแป้งสุกและส่วนแป้งดิบผสมเป็นเนื้อเดียวกัน โดยแป้งสุกจะเป็นตัวประสานแป้งดิบ ในขณะที่นวดควรเติมน้ำลงไป เพื่อให้แป้งมีความเหนียวพอดี โดยปกติจะเติมน้ำจนแป้งมีความชื้นประมาณ 47 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

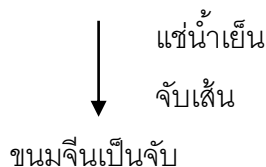
5. การกรองแป้ง นำแป้งที่นวดแล้ว มากรองเพื่อกำจัดส่วนแป้งสุกที่จับตัวเป็นก้อนที่ไม่สามารถนวดให้แตกได้ เพื่อขจัดปัญหาการอุดตันขณะโรยเส้นและทำให้ได้เส้นขนมจีนที่เรียบสม่ำเสมอ

6. การโรยเส้น การผลิตแบบพื้นบ้านมักจะใช้แวนหรือเฟือน โดยกระบอกอัดขนมจีน แวนมีลักษณะเป็นโลหะกลมเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 นิ้วเจาะรูเล็กๆ ตามขนาดที่ต้องการติดกับถุง

ผ้า ใช้มือหนึ่งบีบแบ่งให้ผ่านรูหน้าแว่นลงไปใต้น้ำร้อน เคลื่อนมือไปรอบๆ กระทะให้เป็นวงกลม โดยรักษาระยะหน้าแว่นกับกระทะไว้ให้คงที่ และพยายามอย่าให้เส้นขาด กระทะที่ใช้ต้มขนมจิ้นจะต้องมีขนาดใหญ่ เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำที่ใช้ต้มลดอุณหภูมิเร็วเกินไป ซึ่งจะส่งผลต่อเส้น ทำให้เส้นไม่สุกและไม่เหนียวนุ่ม รักษาระดับอุณหภูมิของน้ำไว้ที่ 90 ถึง 95 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งเส้นขนมจิ้นลอยขึ้น แล้วจึงตักออก

7. การทำให้เย็นและการจับเส้น เมื่อตักเส้นขนมจิ้นสุกออกจากกระทะแล้วนำไปล้างด้วยน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิ ซึ่งจะทำให้เส้นขนมจิ้นหยุดการดูดน้ำ แล้วจึงจับเส้น โดยให้ใช้มือข้างที่ถนัดจับเส้นขึ้นมาพันรอบฝ่ามืออีกข้างที่วางในแนวตั้ง จนกระทั่งหมดความยาวเส้น วางเส้นในภาชนะที่มีรูให้น้ำผ่านออกได้สะดวกเพื่อให้เส้นแห้งและหดตัว ทำให้เส้นแห้งขึ้นและจับตัวเป็นก้อน





### รูปที่ 2.3 กรรมวิธีการผลิตขนมเงินแป้งสด

ที่มา: ณรงค์ นิยมวิทย์ (2528)

กรรมวิธีการผลิตขนมเงินแป้งหมัก (สุภรัตน์ ชวนะ และคณะ, 2534)

กรรมวิธีการผลิตขนมเงินแบบแป้งหมัก สามารถสรุปขั้นตอนและวิธีการดังต่อไปนี้ และแสดงในรูปที่ 2.4

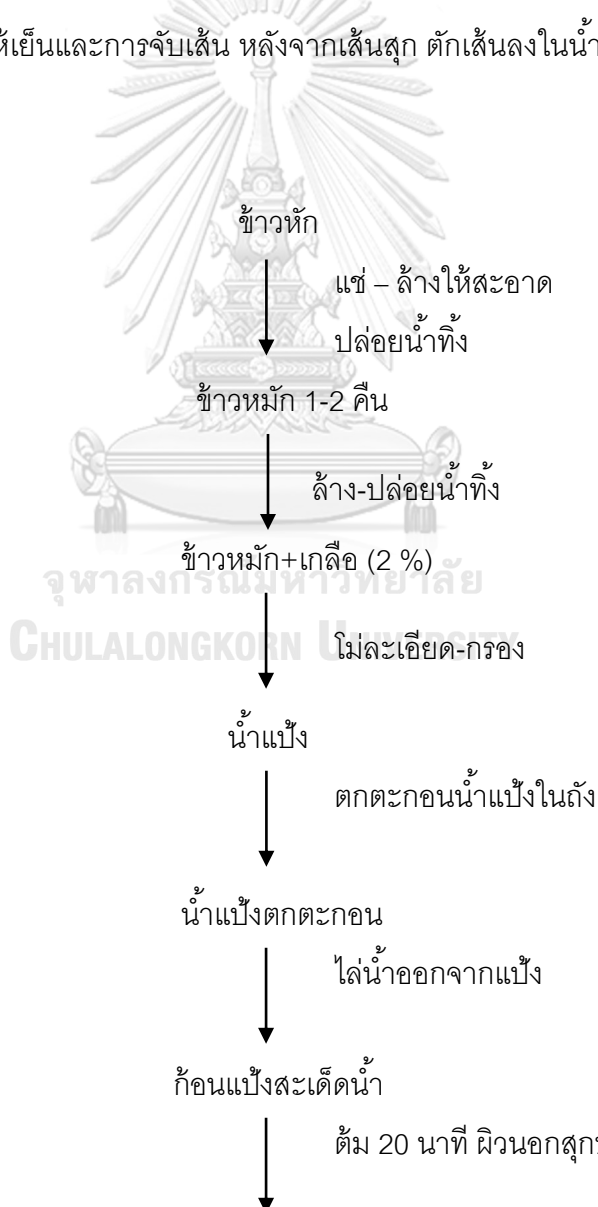
1. การทำความสะอาดข้าว นำข้าวที่ใช้ในกระบวนการผลิตมาล้างทำความสะอาด
2. การแช่ข้าว ในระดับพื้นบ้านจะแช่ข้าว 12 ชั่วโมง โดยแช่ข้าวค้างคืนไว้ส่วนอุตสาหกรรมมักจะแช่ข้าว 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้ข้าวอ่อนนิ่มและง่ายต่อการโม่
3. การโม่และการกรอง เป็นขั้นตอนนำข้าวมาบดผ่านเครื่องบดเพื่อให้เมล็ดข้าวแตกเป็นผงขนาดเล็ก โดยมักบดขณะที่ข้าวอมน้ำร่วมกับเติมน้ำขณะบด โดยข้าวที่บดจะแตกเป็นผงละลายมากับน้ำ ผ่านผ้าขาวสำหรับกรอง ซึ่งในขั้นตอนนี้อาจเติมเกลือประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับป้องกันการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์
4. การนอนแป้งหรือการตกตะกอนน้ำแป้ง เป็นขั้นตอนการแช่น้ำแป้งให้ตกตะกอน น้ำแป้งส่วนบนจะมีสีเหลือง และสิ่งปนเปื้อนสีดำคอลลอยด์จะลอยอยู่บนสุด ในขั้นตอนนี้จะทำการล้างน้ำแป้งด้วยการให้น้ำและปล่อยให้ตกตะกอน ซึ่งจะทำให้แป้งขาวสะอาดและมีกลิ่นน้อยลง
5. การทับน้ำหรือการไล่น้ำ เป็นการกำจัดน้ำออกจากน้ำแป้ง ด้วยการนำน้ำแป้งใส่ผ้าขาวที่มัดให้แน่น แล้วนำของหนักมาทับเพื่อให้ น้ำไหลซึมผ่านออก ขั้นตอนนี้จะใช้เวลาประมาณ 1 วัน หลังจากนั้นจะได้ก้อนแป้งที่มีน้ำประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์
6. การผสมและการต้มแป้ง การต้มก้อนแป้งเป็นการทำให้แป้งสุกบางส่วน โดยต้มให้สุกจากผิวลึกเข้าไปข้างในประมาณครึ่งนิ้ว ไม่ควรให้แป้งสุกมากเกินไปเพราะจะทำให้แป้งเหนียวยากต่อการโรยเส้น สำหรับระดับครัวเรือนจะใช้วิธีการต้ม ส่วนในโรงงานจะใช้วิธีการนึ่งแทน

7. การนวดแป้ง เป็นขั้นตอนการนำก้อนแป้งมานวดด้วยเครื่องนวดจนเหนียว ทำให้ส่วนของแป้งสุกและแป้งดิบผสมเข้าด้วยกัน สังเกตเนื้อแป้งขณะนวด หากแป้งแห้งมากให้ผสมน้ำร้อน หากแป้งเหนียวติดกันมากให้ผสมแป้งดิบ

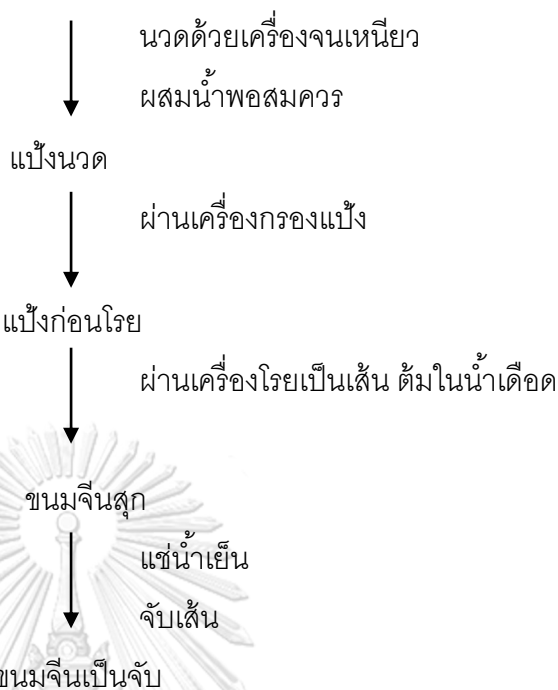
8. การกรองแป้ง แป้งสุกอาจจับเป็นก้อนในขั้นตอนการนวดแป้ง เมื่อโรยเส้นอาจทำให้เส้นขนมจีนไม่ต่อเนื่องได้ จึงต้องกรองแป้งหลังนวด เพื่อกำจัดก้อนแป้งสุก

9. การโรยเส้น การบีบดินแป้งให้ไหลผ่านรูขนาดลงในน้ำเดือดเพื่อทำให้เส้นสุก โดยยังคงรูปเส้นเหมือนเดิม ซึ่งในระดับครัวเรือนจะใช้แว่นหรือฝอย ส่วนระดับโรงงานมักใช้ปั๊มแรงดันต่อท่อดินแป้งผ่านตะแกรงที่มีรูขนาดเล็กลักษณะคล้ายแว่นลงหม้อต้ม บีบเส้นลงหม้อต้มแล้ว ควรรักษาความร้อนของน้ำต้มให้คงที่ เมื่อเส้นขนมจีนลอยตัว แล้วจึงตักขึ้น

10. การทำให้เย็นและการจับเส้น หลังจากเส้นสุก ตักเส้นลงในน้ำเย็นทันที รอจนเส้นเย็นตัว และจับเส้น



ก้อนแป้งภายหลังต้มแล้ว (60 – 70 องศาเซลเซียส บริเวณผิวนอก)



#### รูปที่ 2.4 กรรมวิธีการผลิตขนมจีนแป้งหมัก

ที่มา: สุภารัตน์ และคณะ (2534)

องค์ประกอบโดยเฉลี่ยของเส้นขนมจีนที่ทำจากข้าวเจ้า ประกอบด้วยความชื้น ร้อยละ 63.2-81.6, โปรตีน ร้อยละ 3.6-7.3, ไขมัน ร้อยละ 0.2-1.5, แป้ง ร้อยละ 87.8-91.5, เส้นใย ร้อยละ 0.5-1.4 เถ้า ร้อยละ 0.2-0.5 (สุวิชา ช่วงอารินทร์, 2537)

เส้นขนมจีนเป็นอาหารที่มีอายุการเก็บสั้น เกิดการเสื่อมเสียและปนเปื้อนได้ง่ายจากทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา อันมีสาเหตุมาจากกระบวนการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน มีการสัมผัสเส้นขนมจีนด้วยมือตลอดกระบวนการผลิต รวมไปถึงความไม่เหมาะสมของสถานที่ผลิต อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ สุขลักษณะของผู้ปฏิบัติงาน การเก็บรักษา ตลอดจนการขนส่งผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การบริโภคขนมจีนที่จำหน่ายตามท้องตลาดมักจะไม่นำไปผ่านการให้ความร้อนก่อนรับประทาน เมื่อรับประทานแล้วอาจทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ดังนั้นการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึง ซึ่งส่งผลทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

จากการสำรวจการปนเปื้อนจุลินทรีย์ในขนมจีนจากหลายหน่วยงานของรัฐ ในหลายพื้นที่พบจุลินทรีย์ที่เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ และจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะในน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Coliform*, *Escherichia coli* และ



*Staphylococcus aureus* (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2551; สถาบันอาหาร, 2554; สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2551) และมีการตรวจพบการปนเปื้อนของเชื้อยีสต์และราอีกด้วย (ลัญญณ์รัฐ ภาตะนันท์, 2551) แต่ทั้งนี้ไม่พบรายงานวิจัยที่ระบุชนิดจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของเส้นขนมจีนสด

จากรายงานการตรวจพบจุลินทรีย์ในขนมจีนดังกล่าว จึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ผลิตส่วนมากนิยมใส่วัตถุกันเสียเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาเส้นขนมจีนให้ยาวนานมากยิ่งขึ้น โดยวัตถุกันเสียที่นิยมใช้คือกรดเบนโซอิก (benzoic acid) และกรดซอร์บิก (sorbic acid) จากการสำรวจพบว่ามีการใช้กรดเบนโซอิกเกินมาตรฐานตามที่กฎหมายกำหนด เมื่อรับประทานอาหารที่มีกรดเบนโซอิกในปริมาณสูง อาจก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย อาการเลือดตกในอัมพาต ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของตับและไตลดลงหรือพิการ และถ้าได้รับเกิน 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม อาจเสียชีวิต (วีรยา การพานิช, 2554) โดยค่ามาตรฐานของวัตถุกันเสียหรือกรดเบนโซอิกที่อนุญาตให้ใช้ อ้างอิงตามมาตรฐานสากลของโคเด็กซ์ (CODEX) ต้องมีปริมาณไม่เกิน 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในผลิตภัณฑ์นั้นๆ แต่จากการสุ่มตรวจเส้นขนมจีนในท้องตลาดทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง พบกรดเบนโซอิกในทุกตัวอย่างที่สุ่มตรวจ และพบ 15 ตัวอย่างที่ใช้กรดเบนโซอิกไม่เกินปริมาณที่กำหนดและ 2 ตัวอย่างที่ใช้กรดเบนโซอิกเกินมาตรฐานในปริมาณสูงถึง 1,115.32 และ 1,309.98 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยทุกตัวอย่างไม่ได้แสดงฉลากการใช้วัตถุกันเสีย (มูลนิธิเพื่อผู้บริโภค, 2559; สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2551)

จากสาเหตุดังกล่าวจึงจำเป็นต้องมีการกำหนดเกณฑ์คุณภาพมาตรฐานของขนมจีน ที่กำหนดด้านคุณภาพ กายภาพ เคมีและจุลินทรีย์ เพื่อความปลอดภัยของเส้นขนมจีนสด ดังต่อไปนี้

1. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.500/2547) ได้กำหนดลักษณะทั่วไป ในภาชนะบรรจุเดียวกันต้องจับเรียงหรือทำให้มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกัน เหนียวนุ่ม อาจมีเส้นขาดได้บ้างเล็กน้อย มีสีที่ดีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้และสม่ำเสมอ ไม่มีกลิ่นอับหรือกลิ่นเหม็นบูด มีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของขนมจีน และต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ดิน ทราาย กรวด เศษไม้ ชิ้นส่วนหรือปฏิจุลจากสัตว์ ถ้าหากมีการใช้วัตถุกันเสีย สารฟอกขาว และสารทำให้ขุ่น ให้ใช้ได้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด ความเป็นกรด-ด่างขนมจีน แป้งหมักมีค่าอยู่ระหว่าง 3-4.5 ส่วนขนมจีนแป้งสดมีค่าอยู่ระหว่าง 4-6 และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต้องไม่เกิน  $1 \times 10^6$  โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม, เชื้อ *Bacillus cereus* ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม, เชื้อ *Staphylococcus aureus* ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม และเชื้อ *Escherichia coli* โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2. มาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข จัดให้ขนมจีนอยู่ในกลุ่มอาหารประเภททั่วไปพร้อมบริโภคนทันที ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 237 พ.ศ. 2544 เรื่อง อาหารที่ผลิตหรือขายพร้อมบริโภคนที่บรรจุในภาชนะพร้อมจำหน่ายได้ทันที ที่กำหนดด้านคุณภาพกายภาพ เคมีและจุลินทรีย์ เพื่อความปลอดภัยของเส้นขนมจีนสด มีดังต่อไปนี้

ด้านจุลินทรีย์ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต้องไม่เกิน  $1 \times 10^6$  โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม, เชื้อ *Staphylococcus aureus* ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม, เชื้อโคลิฟอร์มด้วยวิธี MPN น้อยกว่า 500 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม และเชื้อ *Escherichia coli* โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม สารกันเสียไม่เกิน 1,000 ppm ด้านเคมี วัตถุเจือปนอาหาร คือวัตถุที่ตามปกติมีได้ใช้เป็นอาหารหรือส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร ไม่ว่าจะวัตถุนั้นจะมีคุณค่าทางอาหารหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การแต่งสีอาหาร การปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร การบรรจุ การเก็บรักษา หรือการขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพหรือมาตรฐานหรือลักษณะของอาหาร ทั้งนี้หมายความรวมถึงวัตถุที่ไม่ได้เจือปนในอาหาร แต่มีภาชนะบรรจุไว้เฉพาะแล้วใส่รวมอยู่กับอาหารเพื่อประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นด้วยเช่น วัตถุกันชื้น วัตถุดูดออกซิเจน เป็นต้น ทั้งนี้ไม่รวมถึงสารอาหารที่เติมเพื่อปรับให้คุณค่าทางโภชนาการของอาหาร เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และเกลือแร่

## 2.2 Polymerase chain reaction (PCR)

### 2.2.1 หลักการของ PCR

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ (DNA) ในหลอดทดลอง (in vitro) หลักการพื้นฐานของ PCR จะเลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication) โดยปริมาณของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ด้วย PCR จะเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าในทุกๆ รอบของปฏิกิริยา ซึ่งในการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมจำเป็นต้องมีสารหรือองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template), thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), oligonucleotide primers และบัฟเฟอร์ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละรอบ (cycle) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้ (Joshi & Deshpande, 2010; อ่ำไพวรรณ จนวน สัมฤทธิ์ และ ันนชัย สุระ, 2534)

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิในหลอดทดลองให้สูงถึง 90-95 องศาเซลเซียส ความร้อนจะทำให้สายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่พันกันเป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยวสองสาย (two single strands) ซึ่งสายเดี่ยวนี้จะทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2. Primer annealing เป็นขั้นตอนที่ทำอุณหภูมิในหลอดทดลองลดลงเหลือ 40-60 องศาเซลเซียส ไพรมเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่ได้ออกแบบให้จำเพาะในลักษณะเป็นสายดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่จะสังเคราะห์ (annealing sites) จับคู่กัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไพรมเมอร์ที่ได้ออกแบบ

3. Primer extension เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งทำหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ ไปเข้าคู่แบบคู่สมกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ตรงปลาย 5 ของไพรมเมอร์ (5' → 3' extension) โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส โดยเคลื่อนที่ไปตามความยาวของสายดีเอ็นเอแม่พิมพ์ และเติมนิวคลีโอไทด์ที่ปลาย 3 ของไพรมเมอร์ไปเรื่อยๆ จนได้ดีเอ็นเอเข้าคู่สมบูรณ์

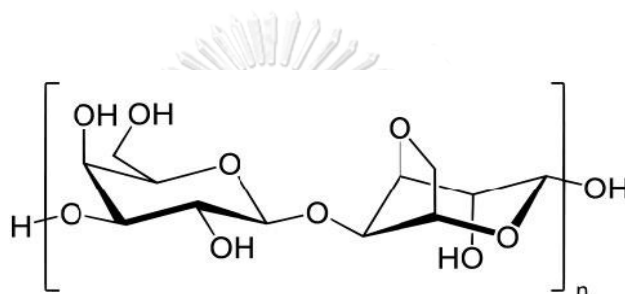
ในปัจจุบันเทคนิค PCR ได้มีการพัฒนาทำให้มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ ได้สูงขึ้นทั้งในเรื่องของปริมาณและความจำเพาะ ไม่จำกัดชนิดของสารพันธุกรรมที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ ช่วยลดปัญหาและอุปสรรคที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ ปรับปรุงและลดขั้นตอนการปฏิบัติงานให้ง่ายและรวดเร็วขึ้น

## จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 2.2.2 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR

วิธีการตรวจวิเคราะห์ผลผลิตผล PCR สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของผลผลิตผล PCR ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งวัดที่ความยาวคลื่นเฉพาะ (260 และ 280 นาโนเมตร) ซึ่งวิธีนี้อาจทำได้เพียงการตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (Saulnier, De Decker, & Haffner, 2009) หรือวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้เครื่อง HPLC ตรวจวัดและวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอ แต่วิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ วิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) มีหลักการ คือทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า ซึ่งสารที่มีประจุ ขนาด และรูปทรงต่างกันจะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ในตัวกลางได้ระยะทางที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงขนาดของ

ผลิตผลที่ได้เป็นสำคัญ หากเป็นผลิตผลที่มีขนาดใหญ่จะใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นตัวกลาง ดังแสดงโครงสร้างในรูปที่ 2.5 แต่ถ้าผลิตผลมีขนาดเล็กจะใช้พอลิอะคริลลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) เป็นตัวกลาง แล้วจึงเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ที่ทราบขนาดความยาวที่แน่นอน ตรวจสอบผลโดยการย้อมแถบเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ซึ่งเป็นสารเรืองแสง ทำให้มองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนภายใต้แสงยูวี (UV) สามารถตรวจสอบแถบที่มีดีเอ็นเอเพียง 1-10 นาโนกรัม และสามารถนำแถบดีเอ็นเอนี้ไปทำการศึกษาต่อ เช่นการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมถึงการโคลนนิ่งต่างๆ ได้ (กาญจนา ซาหอม, 2556)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของอะกาโรสเจล

ที่มา: Ahern, Rajagopal, & Tan (2017)

### 2.2.3 การวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตผล PCR (sequencing analysis)

เป็นวิธีการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ จุลินทรีย์บนฐานข้อมูลของธนาคารยีน (GenBank) ผ่านทางเว็บไซต์ของ NCBI (The National Center for Biotechnology Information) ด้วยโปรแกรม BLAST เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homology) และระบุชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

โดยปัจจุบันเทคนิค PCR เป็นเทคนิคสำคัญในงานวิจัยทางเทคโนโลยีชีวภาพ จึงมีรายงาน มีการนำเทคนิค PCR มาใช้ในงานด้านต่างๆ มากมาย เช่น การวินิจฉัยทางการแพทย์ การตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค หรือการใช้ประโยชน์ในด้านการเกษตร เช่น การตรวจวินิจฉัยเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคในแปลงผลิต เพื่อตรวจติดตามและเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรค เป็นต้น และจากรายงานการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหาร โดยเฉพาะการตรวจหาจุลินทรีย์ที่ชนิดก่อโทษ เช่น จุลินทรีย์ก่อโรคหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร พบว่าการใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบนั้น ได้รับความนิยมมากขึ้น เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก

รวดเร็ว มีความแม่นยำ และมีความจำเพาะสูง (นฤมล ธนานันต์ และ วีระชัย ธนานันต์, 2555) สามารถตรวจสอบเชื้อในปริมาณน้อยได้ ทำให้ทราบถึงชนิดจุลินทรีย์ รวมถึงการป้องกันการแพร่ระบาดและการก่อโรคได้ มีรายงานการวิจัยของณัฐกิตติ์ คำปา และคณะ, (2559) ได้ทำการศึกษาผลของการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในเส้นขนมจีน และทำการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *S.aureus* และ *E. coli* ผลการวิเคราะห์พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอยู่ในช่วง 5.25-6.42 log CFU/g ในวันที่ 1 ซึ่งตามคุณภาพของเส้นขนมจีนตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนจะต้องไม่เกิน 6 log CFU/g และมีจำนวนเชื้อ *S.aureus* และ *E. coli* อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่ทั้งนี้พบว่าไม่พบการระบุหรือการตรวจวิเคราะห์เพิ่มเติมในส่วนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียหรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกับงานวิจัยของวิไลวรรณ หงอกพิสัย (2554) ที่ศึกษาคุณภาพและความปลอดภัยของขนมจีน พบว่ามีตัวอย่างที่พบจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินมาตรฐานร้อยละ 3.90 ของตัวอย่างทั้งหมด แต่ไม่พบการวิเคราะห์ชนิดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหรือทำให้เกิดการเสื่อมเสียว่าเป็นจุลินทรีย์ประเภทใด

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษหาปริมาณและชนิดจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียในตัวอย่างเส้นขนมจีนสด โดยใช้เทคนิค PCR ในการวิเคราะห์

## 2.3 ขมิ้นชัน

### 2.3.1 ลักษณะทั่วไปของขมิ้นชัน

ขมิ้นชันเป็นพืชล้มลุก ที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย พบมากในประเทศเขตร้อน แต่ปัจจุบันเป็นพืชที่สามารถปลูกได้ทั่วไปในภูมิภาคต่างๆของโลก เช่น อินเดีย บังคลาเทศ จีน ไต้หวัน ปรูไทย และอินโดนีเซีย จัดเป็นพืชในชั้น Liliopsida อยู่ในอันดับ Zingiberales และในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Curcuma longa* Linn. (Chattopadhyay, Biswas, Bandyopadhyay, & Banerjee, 2004) มีลักษณะทั่วไป คือ มีลำต้นจริงอยู่ใต้ดิน เรียกว่า เหง้า (rhizome) ซึ่งประกอบด้วยเหง้าหลักใต้ดิน เรียกว่า หัวแม่ (mother rhizome) มีลักษณะรูปไข่และแตกแขนงทรงกระบอกออกด้านข้างทั้ง 2 ด้าน เรียกว่า แง่ง (finger) ส่วนลำต้นเหนือดิน เป็นลำต้นที่เกิดจากการอัดตัวกันของกาบใบ มีความสูงประมาณ 30-90 เซนติเมตร ใบ เป็นใบเดี่ยวขนาดใหญ่มีรูปรีเว้ายาว ใบประดับสีเขียวอ่อนหรือสีนวล ปลายแหลม ดอกจะออกเป็นช่อ มีสีขาวอมเหลืองหรือสีเหลืองอ่อน ก้านช่อแทงออกจากเหง้าโดยตรง มีกลีบประดับสีเขียวอมชมพู โดยขมิ้นชันมีเนื้อสีเหลืองอ่อนจนถึงสีแดงเข้ม และมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ซึ่งมาจากน้ำมันหอมระเหยที่

มีอยู่ภายใน (ไชยวรรณ วัฒนจันทร์, สุธา วัฒนสิทธิ์, และอรุณพร อิศูรัตน์, 2553; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2548) ดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ขมิ้นชัน

ที่มา: Siviero et al. (2015)

### 2.3.2 เหง้าขมิ้นชัน

เหง้าขมิ้นชัน (rhizome) มีสีเหลืองเข้มจนถึงสีแดงจัด มีรสฝาด กลิ่นหอม สามารถเก็บมาใช้ประโยชน์ได้เมื่อมีช่วงอายุ 9-10 เดือน เป็นช่วงที่เหง้ามีความสมบูรณ์เต็มที่ สามารถเก็บรักษาเหง้าสดไว้ในสภาพปกติได้นาน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2548) องค์ประกอบทางเคมีของขมิ้นชัน เป็นสารในกลุ่ม secondary metabolites ที่เป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ โดยปริมาณและชนิดของสารประกอบในแต่ละกลุ่มของสารนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งที่ปลูก สภาพแวดล้อม การเก็บเกี่ยว กระบวนการแปรรูป และสภาวะการเก็บรักษา เป็นต้น เหง้าขมิ้นชันมีสารประกอบที่สำคัญ อยู่ 2 ชนิด (Li et al., 2011) ได้แก่

2.3.2.1 น้ำมันหอมระเหย (essential oil) (Stanojevic, Stanojevic, Cvetkovic, & Danilovic, 2015)

น้ำมันหอมระเหยในขมิ้นชัน จะมีสัดส่วนอยู่ระหว่าง 5-6% โดยสามารถพบน้ำมันหอมระเหยได้ตามส่วนต่างๆ ของขมิ้นชัน เช่น ใบ ดอก และเหง้า จะเป็นตัวให้กลิ่นและรสชาติ ซึ่งในอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันหอมระเหยจากขมิ้นชัน นิยมใช้ส่วนของใบและเหง้าขมิ้นชัน ซึ่งมี

สัดส่วนของน้ำมันหอมระเหยอยู่ระหว่าง 5-6% สำหรับเหง้าขมิ้นชัน และ 1-1.5% สำหรับใบขมิ้นชัน

จากรายงานการวิจัยพบว่าการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นชันจากประเทศเซอร์เบียด้วยวิธี cleverger hydrodistillation ตรวจวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบภายในน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี GC-MS พบว่ามีปริมาณของน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อ 100 กรัมขมิ้นชัน มีปริมาณและองค์ประกอบที่แยกได้มีทั้งสิ้น 8 องค์ประกอบหลัก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โดยเป็นส่วนผสมของสารประเภท benzene derivatives, sesquiterpene hydrocarbons และ oxygenated sesquiterpens ซึ่งมีอยู่ 82.9% ขององค์ประกอบทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหย โดยมีกลุ่ม oxygenated sesquiterpens เป็นสารประกอบหลัก มีทั้งสิ้น 65.4% ประกอบไปด้วย turmerone 26%, aromatic-turmerone 22.7% และ curlone 16.8% ส่วนกลุ่ม benzene derivatives ประกอบด้วย eugenol 8% และ sesquiterpene hydrocarbons 9.5% ประกอบด้วย caryophyllen, aromatic-curcumene,  $\alpha$ -zingiberene และ  $\beta$ -sesquiphellandrene ที่ 2%, 1.8%, 2.8% และ 2.8% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.7

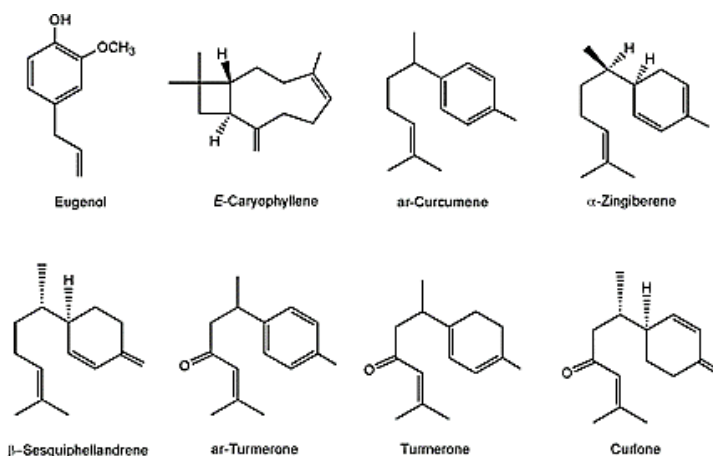
ตารางที่ 2.1 ปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเหง้าขมิ้นชัน

Peak	ret., min	Component	RI <sup>exp</sup>	RI <sup>lit</sup>	Composition (%)
<b>Benzene derivatives (8%)</b>					
1	24.8766	Eugenol	1360	1356 <sup>a</sup>	8
<b>Sesquiterpene Hydrocarbons (9.5%)</b>					
2	26.9897	(E)-Caryophyllene	1427	1417 <sup>a</sup>	2
3	28.8137	ar-Curcumene	1487	1479 <sup>a</sup>	1.8
4	29.1743	$\alpha$ -Zingiberene	1499	1493 <sup>a</sup>	2.8
5	30.0380	$\beta$ -Sesquiphellandrene	1529	1521 <sup>a</sup>	2.8
<b>Oxygenated sesquiterpenes (65.4%)</b>					
6	34.0390	ar-turmerone	1671	1668 <sup>a</sup>	22.7
7	34.1516	Turmerone	1675	1674 <sup>b</sup>	26
8	35.0389	Curfone	1708	1706 <sup>b</sup>	16.8
Total					82.9%

ที่มา: Stanojevic et al. (2015)

ในขณะที่ Raina et al. (2002) ทำการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นชันในที่ราบทางตอนเหนือของประเทศอินเดีย ด้วยวิธีเดียวกัน พบว่ามีปริมาณของน้ำมันหอมระเหยอยู่ที่ 2% ต่อน้ำหนักแห้งของเหง้าขมิ้นชัน และมีองค์ประกอบหลัก คือ 1,8-cineole 11.2%,  $\alpha$ - turmerone 11.1%,  $\beta$ -caryophyllene 9.8% , aromatic-turmerone 7.3% และ sesquiphellandrene 7.1% เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยก่อนหน้านั้นที่ได้ทำการศึกษา

องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นชันในประเทศอินเดีย จีน และภูฏานพบว่า มีอัตราส่วนขององค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.7 โครงสร้างองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้าขมิ้นชัน  
ที่มา: Stanojevic et al. (2015)

### 2.3.2.2 เคอร์คูมินอยด์ (curcuminoids)

เคอร์คูมินอยด์ เป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในกลุ่มของ diarylheptanoids มีสีเหลืองสกัดได้จากเหง้าขมิ้นชัน มีปริมาณอยู่ระหว่าง 2-9% จากรายงานการวิจัยของ Sahne, Mohammadi, Najafpour, & Moghadamnia (2016) ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณและองค์ประกอบของสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันทางชายเชิงการค้า พบว่ามีองค์ประกอบหลักทั้งสิ้น 3 องค์ประกอบ คือ

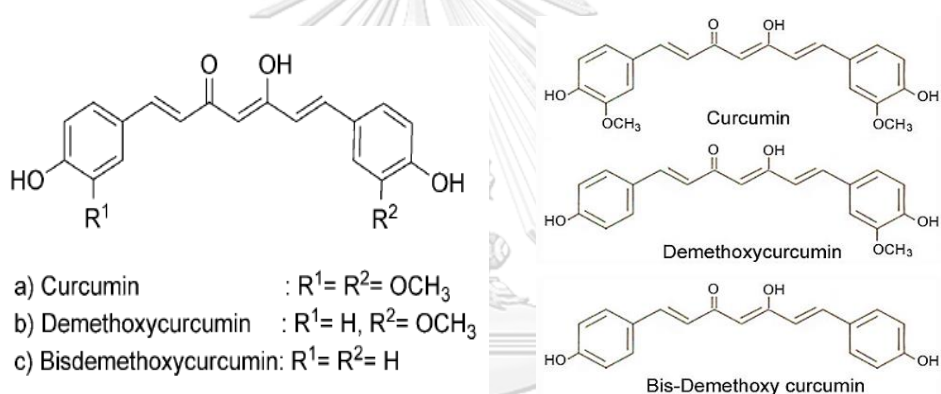
1. เคอร์คูมิน (curcumin) หรือ (1,7-bis (4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-hepta-1,6-diene-3,5-dione) ซึ่งเป็นสารประกอบหลักในเคอร์คูมินอยด์ พบ 77%
2. ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) หรือ (4-hydroxycinnamoyl-(4-hydroxy-3-methoxycinnamoyl) methane) พบ 17%
3. บิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) หรือ (bis-(4-hydroxy cinnamoyl) methane) พบ 3%

เคอร์คูมิน เป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของขมิ้นชัน (active ingredient) ผักสีเหลือง ละลายได้ไม่ดีในน้ำ, ปีโตรเลียม อีเทอร์ (petroleum ether) และ เบนซีน (benzene)



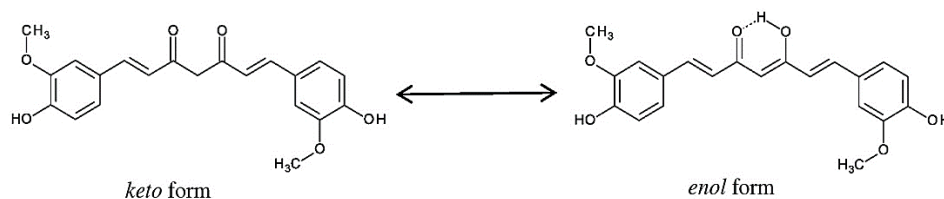
เนื่องจากคุณสมบัติ hydrophobicity แต่สามารถละลายได้ในเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohols) และโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) และสามารถละลายได้ดีในอะซิโตน (acetone) และเอทิลอีเทอร์ (ethyl ether) เคอร์คูมินมีสูตรโมเลกุล คือ  $C_{21}H_{20}O_6$  น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.37 กรัมต่อโมล มีจุดหลอมเหลวที่ 183 องศาเซลเซียส และมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 426 นาโนเมตร (Yu, 2006)

จากการศึกษาโครงสร้างของสารทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.8 พบว่ามีความแตกต่างกันที่การแทนที่ของหมู่ methoxy บนโครงสร้างหลัก โดยสารเคอร์คูมิน มีการแทนที่ด้วยหมู่ methoxy ที่ตำแหน่งของ phenyl ring ทั้งสองข้าง ส่วนดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน มีการแทนที่ด้วยหมู่ methoxy เพียง 1 ตำแหน่งบน phenyl ring และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน ไม่มีการแทนที่ของหมู่ methoxy บน phenyl ring



รูปที่ 2.8 โครงสร้างและองค์ประกอบของเคอร์คูมิน, ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และ บิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน จากเหง้าขมิ้นชัน  
 ที่มา: Sahne et al. (2016)

เคอร์คูมินสามารถอยู่ในรูปแบบของทอโตเมอร์ริก (tautomeric form) ได้ 2 รูปแบบ ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลาย คือ โครงสร้างของโมเลกุลในรูปแบบรูปคีโต (keto form) และอีโนล (enol form) โดยที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปแบบไปมาระหว่างสารทั้งสองรูปแบบได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.9 โดยพบว่าในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรดและกลาง เคอร์คูมินจะอยู่ในรูปของคีโต และในสารละลายที่มีสภาพเป็นเบส เคอร์คูมินจะอยู่ในรูปของอีโนล โดยปกติแล้วเคอร์คูมิน ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์จะอยู่ในรูปอีโนล (Anand, Kunnumakkara, Newman, & Aggarwal, 2007)



**รูปที่ 2.9** โครงสร้างโมเลกุลในรูปแบบคีโตและอินอล

ที่มา: Yuan et al. (2012)

### 2.2.3 ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดขมิ้นชัน (biological activities)

ขมิ้นชันนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง และมีสรรพคุณมากมาย ทั้งในแง่ของในด้านของการนำมาใช้ในอาหาร เช่น การปรุงแต่งสีกลิ่น รส หรือเป็นส่วนผสมของเครื่องแกง ใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง รวมถึงการพัฒนาเป็นยารักษาโรค (พรเทพ เต็มรังษี, 2554; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร 2548)

#### 2.3.3.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

Nahak & Sahu (2011) ทำการศึกษาค้นคว้าวิจัยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผงแห้งพืชสมุนไพรในวงศ์ Zingiberaceae จำนวน 5 ชนิดประกอบด้วย ขมิ้นชัน (*C. longa* L.), ขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria*), อวแดง (*C. angustifolia*) ว่านนางคำ (*C. aromatica*) ขมิ้นขาวป่า (*C. amada*) พบว่าขมิ้นชันแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด 74.61% รองลงมาคือ ขมิ้นอ้อย 63.27% อวแดง 58.35% ว่านนางคำ 55.38% และขมิ้นขาวป่า 52.61% ตามลำดับ ผลที่เกิดขึ้นนี้มีความสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของสารเคอร์คูมินและสารฟีนอลในพืชแต่ละชนิดนั้น คือ ขมิ้นชันมีสารเคอร์คูมินและสารฟีนอลมากที่สุดจึงทำให้แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้สูงที่สุด Martins, Pereira, Siqueira, Salomão, & Freitas (2013) ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารเคอร์คูมินจากเหง้าขมิ้นชันทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH-radical scavenging ด้วยการนำเหง้าขมิ้นชันไปสกัดโดยใช้อัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดร่วมกับสารละลายผสมเอทานอลและน้ำจากการทดลองพบว่ามีความเข้มข้นที่ต้านอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ 530.1 - 860.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ได้มีการเปรียบเทียบสรรพคุณของสารเคอร์คูมินกับวิตามินอี

พบว่าสารเคอร์คูมินมีสรรพคุณในการลดระดับการออกซิเดชันของไขมันในเนื้อเยื่อได้ดีแต่ต่ำกว่าการใช้วิตามินอี นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคอร์คูมิน มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแอลดีไฮด์ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ส่งผลต่อการเกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน และพบว่าการใช้สารเคอร์คูมินที่ระดับ 10 ไมโครโมลาร์ สามารถช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ LDL ในคนได้ 40-85% ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้สาร BHA แต่ให้ผลดีกว่าวิตามินซี

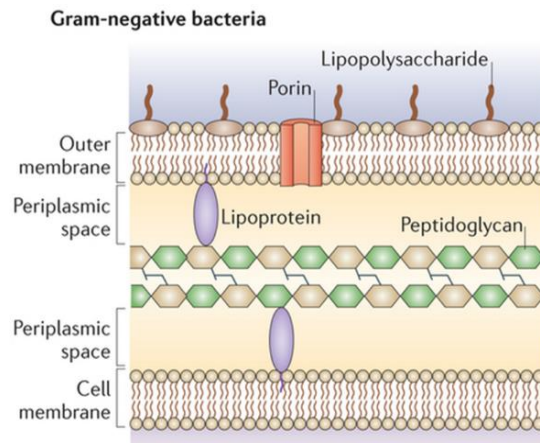
ฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน โดยที่สารเหล่านี้สามารถจับกับอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะ peroxy radicals ส่งผลให้ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ได้หลากหลาย

### 2.3.3.2 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)

สารเคอร์คูมิน มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียชนิดต่างๆ โดยมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและสารพิษที่สร้างโดยแบคทีเรียหลายชนิดในหลอดทดลอง เช่น *Staphylococci* ซึ่งเป็นสาเหตุของหนอง รวมไปถึงแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้ เช่น *Salmonella*, *Shigella* และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร และ *Streptococcus mutans* ที่เป็นสาเหตุของฟันผุได้ จากรายงานการวิจัยของ Mahady, L Pendland, Yun, & Z Lu (2002) ได้ทำการทดลองนำสารสกัดแห้งขมิ้นชันจากเมทานอล สารเคอร์คูมิน และสารผสมระหว่างสารสกัดแห้งขมิ้นชันจากเมทานอลกับเหง้าขิงในอัตราส่วน 1:1 ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร *Helicobacter pylori* ในสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้นสารต่ำสุดที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้ง (minimum inhibition concentration; MIC) ที่ระดับ 6.25-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากรายงานการวิจัยของ Gunes et al. (2013) ใช้สารเคอร์คูมินละลายในเอทานอล แล้วทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญแบคทีเรียด้วยวิธี broth dilution จากการวิเคราะห์การยับยั้ง MIC พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด ตามด้วย *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* (MSSA) และ *Enterococcus faecalis* ที่ค่า MIC 163, 129, 175, 216, 217, 219 และ 293 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับ Wang et al. (2009) ศึกษาผลของการใช้ไมโครแคปซูลเคอร์คูมินในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ใช้ไมโครแคปซูลเคอร์คูมินละลายใน 99.8% อะซิโตน ที่ความ

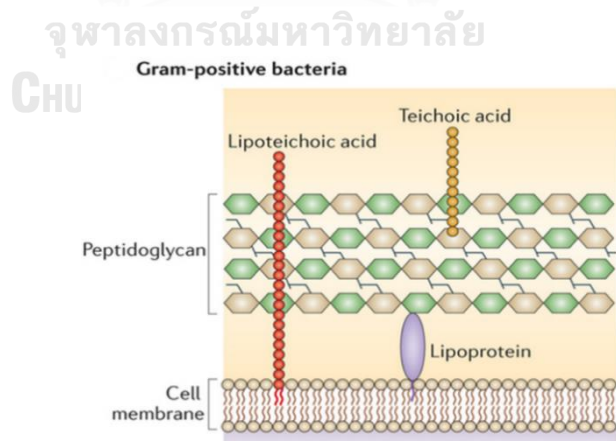
เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้วิธีทดสอบ oxford cup และ broth dilution โดยพบว่า สารที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* และ *Escherichia coli* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ  $17.57 \pm 0.21$ ,  $15.57 \pm 0.15$ ,  $14.23 \pm 0.21$ ,  $12.6 \pm 0.27$  และ  $10.3 \pm 0.10$  มิลลิเมตรตามลำดับ และจากการวิเคราะห์การยับยั้งหรือค่า MIC พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ดีที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามด้วย *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* มีค่า MIC เท่ากับ 125, 125, 250 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สาเหตุที่เคอร์คูมินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สามารถอธิบายได้ด้วยความแตกต่างของโครงสร้างและองค์ประกอบของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม คือ

1. แบคทีเรียแกรมลบ โครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยสายเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ที่เรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้น และไม่พบกรดไทโคอิก (teichoic acid) มีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ปกคลุมชั้นของเปปติโดไกลแคน โดยองค์ประกอบของเยื่อหุ้มชั้นนอกส่วนใหญ่เป็นสารพอลิฟอสฟอไลแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) ซึ่งเกิดจากการเชื่อมยึดกันของไขมัน (lipid), พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide), ฟอสโฟลิพิด (phospholipid) และไลโปโปรตีน (lipoprotein) มีหน้าที่ช่วยป้องกันเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบโปรตีนอีกหลายชนิด โดยชนิดที่สำคัญคือพอริน (porin) ที่มีบทบาทในการควบคุมการผ่านเข้าและออกของสารต่าง ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เรียกว่า periplasmic space หรือ periplasm ซึ่งเป็นบริเวณที่พบเอนไซม์หลายชนิดที่มีบทบาทในการย่อยสลายสารชีวโมเลกุล (biomolecules) ขนาดใหญ่หลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ ก่อนที่เซลล์จะขนส่งเข้าสู่ภายในเซลล์โดยการทำงานของ โปรตีนขนส่ง (transport protein) ดังแสดงในรูปที่ 2.10 (Brown, Wolf, Prados-Rosales, & Casadevall, 2015; Wang et al., 2009)



รูปที่ 2.10 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ  
ที่มา: Brown et al. (2015)

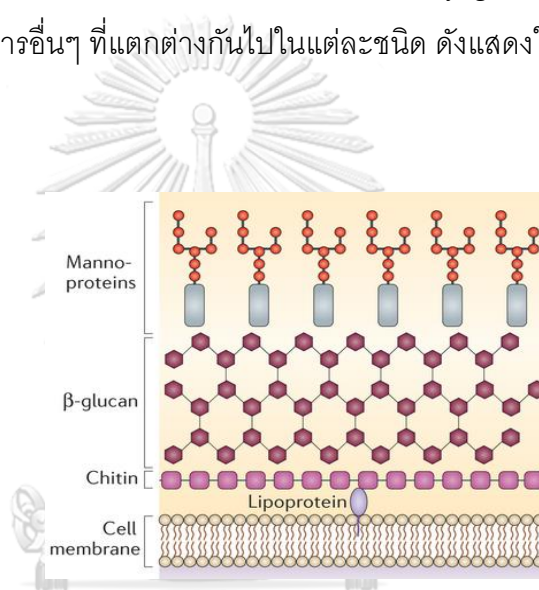
2. แบคทีเรียแกรมบวก โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยชั้นของเปปติโดไกลแคนที่มีความหนา ล้อมรอบอยู่เป็นชั้นนอกสุด เนื่องจากการเรียงซ้อนกันของสายเปปติโดไกลแคนหลายสายเข้าด้วยกัน บริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยอินทรีย์ คือ กรดไทโคอิก ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวป้องกันการซึมผ่านที่ไม่ดี จึงทำให้เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารต่างๆ มากกว่า ดังที่แสดงในรูปที่ 2.11 (Brown et al., 2015; Wang et al., 2009)



รูปที่ 2.11 โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก  
ที่มา: Brown et al. (2015)

### 2.2.3.3 ฤทธิ์ในการต้านเชื้อยีสต์และรา (antifungal activity)

จากการศึกษาของ Apisariyakul, Vanittanakom, & Buddhasukh (1995) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อราหลายชนิดในกลุ่มเดอร์มาโตไฟต์ (dermatophytes) โมลด์ (molds) และยีสต์ (yeasts) ของน้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คิวมินที่แยกได้จากขมิ้นชัน พบว่าน้ำมันหอมระเหยแสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ทั้งสามชนิด ส่วนสารเคอร์คิวมินยับยั้งได้เฉพาะยีสต์ ซึ่งลักษณะของโครงสร้างของยีสต์และรา (ฟังไจ) เป็นเซลล์เดี่ยวหรือหลายเซลล์ประกอบด้วย และมีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารพวกไคติน (chitin; N-acetyl glucosamine) หรือเซลลูโลสกับไคติน นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.12 (Brown et al., 2015)

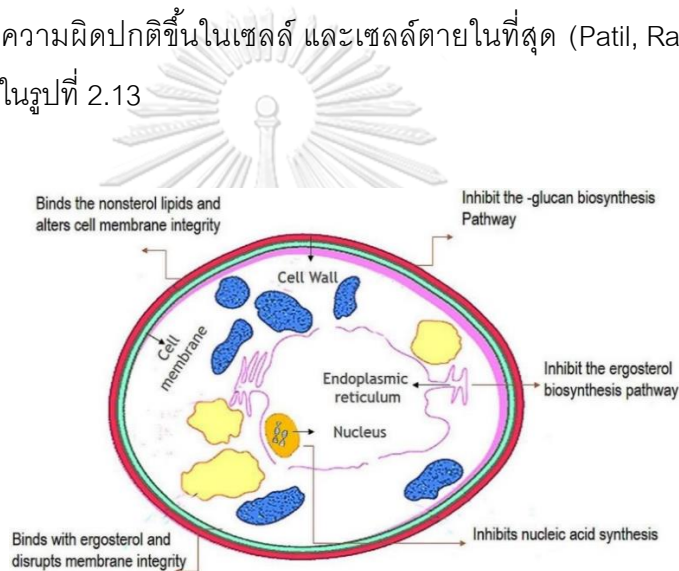


รูปที่ 2.12 โครงสร้างผนังเซลล์ของฟังไจ

ที่มา: Brown et al. (2015)

ขมิ้นชันสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังได้หลายชนิด โดยเฉพาะในรูปแบบน้ำมันหอมระเหยจะมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคกลาก นอกจากฤทธิ์ต้านเชื้อราในคนแล้ว น้ำมันหอมระเหยจากใบและเหง้าขมิ้น ยังมีฤทธิ์ต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคราในข้าว รวมไปถึงสามารถต้านเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) และเชื้อยีสต์และราอื่นๆ ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียได้นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ Wang et al. (2009) ศึกษาผลของการใช้ไมโครแคปซูลเคอร์คิวมินในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ใช้ไมโครแคปซูลเคอร์คิวมินละลายใน 99.8% อะซิโตน ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้วิธีทดสอบ oxford cup และ broth dilution พบว่า

สารที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถยับยั้ง *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone เท่ากับ  $22.4 \pm 0.10$ ,  $20.63 \pm 0.15$  และ  $19.17 \pm 0.15$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ค่าการยับยั้ง หรือ MIC พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้ง *Aspergillus niger* ได้ดีที่สุดในค่า MIC คือ 15.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน *Penicillium notatum* และ *Saccharomyces cerevisiae* มีค่า MIC คือ 31.3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน การยับยั้งยีสต์และราสามารถอธิบายได้หลายกลไก ได้แก่ การยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกในเซลล์ ยับยั้งการสร้างกลูแคน ยับยั้งการสร้างเออร์โกสเตอรอล และสารที่มีฤทธิ์ต้านอาจเข้าทำลายผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้วิธีการซึมผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลทำให้เซลล์หยุดชะงัก เกิดความผิดปกติขึ้นในเซลล์ และเซลล์ตายในที่สุด (Patil, Rao, Majumdar, & Anil, 2015) ดังแสดงในรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 กลไกในการเข้าทำลายฟังไจของสารสกัดจากพืช

ที่มา: ดัดแปลงจาก Patil et al. (2015)

นอกจากฤทธิ์ทางชีวภาพที่กล่าวมาแล้ว สารสกัดจากขมิ้นชันยังแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพในด้านอื่นๆ อีก เช่น ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity), ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer activity), ฤทธิ์ต้านทานการติดเชื้อ (anti-infection activity) และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ (anti-Alzheimer activity) เป็นต้น ทั้งที่เป็นการศึกษาวิจัยในระดับพื้นฐาน และงานวิจัยในระดับคลินิก (clinical trial) ในปัจจุบันได้มีการนำขมิ้นชันไปศึกษาวิจัยด้านการเกษตรมากขึ้น เช่น การใช้ผงขมิ้นชันไปผสมในอาหารเลี้ยงสุกรและไก่ เพื่อเพิ่มคุณภาพการผลิต (ชัชวาลย์ ช่างทำ, 2560)

นอกจากนี้ยังพบรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเติมสารสกัดจากขมิ้นชันลงในอาหารเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ ดังเช่นงานวิจัยของ Gul & Bakht (2015) ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากขมิ้นชันและศักยภาพในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าเมื่อเติมสารสกัดหรือน้ำมันจากขมิ้นชันที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซน (n-hexane), น้ำ, คลอโรฟอร์ม (chloroform) และ เมทานอล (methanol) ลงในอาหารประเภท meals ready-to-eat (MRE) ที่มีส่วนประกอบของมันฝรั่ง, ไก่ไม่มีกระดูก, น้ำมันมะกอก และเกลือ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบเสียและสารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 วันและทำการประเมินสมบัติทางด้านจุลินทรีย์และสมบัติทางด้านประสาทสัมผัสที่วันที่ 0 และทุก 15 วัน พบว่าตัวอย่างอาหารที่มีการฆ่าเชื้อที่เวลาสั้นๆ (5 นาที) ร่วมกับการใช้สารสกัดขมิ้นชันที่ความเข้มข้น 1% หรือ 2% พบว่ามีอายุในการเก็บรักษาที่ยาวนานกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ฆ่าเชื้อที่ระยะเวลา 15 นาทีและไม่เติมสารสกัดขมิ้นชัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยตัวทำละลายต่างกันสามารถต้านเชื้อ *E. coli*, *S. aureus*, *S. Typhi* และ *C. albicans* ได้ด้วยวิธี disc diffusion และพบว่าตัวอย่างที่เติมสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยน้ำ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhi* และ *C. albicans* ได้ ส่วนสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยตัวทำละลายอื่นๆ ร่วมกับการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที สามารถช่วยลดการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ โดยสารสกัดขมิ้นชันด้วยเมทานอล หรือการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส สามารถควบคุมการเจริญของทุกเชื้อในการทดสอบได้ และพบว่าสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดด้วยนอร์มัลเฮกเซนและคลอโรฟอร์มแสดงฤทธิ์แบบอ่อนในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

นอกจากนี้ยังพบว่ายังไม่มีรายงานการวิจัยที่นำสารสกัดขมิ้นชันมาทดสอบลงในเส้นขนมจีนสด และจากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดขมิ้นชันมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสดและช่วยยืดอายุให้แก่เส้นขนมจีนสดได้

## 2.4 สารควบคุมความเป็นกรด

สารควบคุมความเป็นกรด (acid regulator) เป็นวัตถุเจือปนอาหารประเภทหนึ่ง ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแปลงหรือควบคุมความเป็นกรดหรือด่างของอาหาร เป็นวัตถุที่ตามปกติมิได้ใช้เป็นอาหาร หรือเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหาร ไม่ว่าวัตถุนั้นจะมีคุณค่าทางโภชนาการหรือไม่ก็ตาม แต่ใช้เจือปนในอาหารเพื่อประโยชน์ทางเทคโนโลยีการผลิต การบรรจุ การเก็บรักษา หรือการ



ขนส่ง ซึ่งมีผลต่อคุณภาพหรือมาตรฐานหรือลักษณะของอาหาร และให้หมายความรวมถึงวัตถุที่มีได้ใช้เจือปนในอาหาร แต่ใช้รวมอยู่กับอาหารเพื่อประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นด้วย (ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 381 พ.ศ. 2559 เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาสารควบคุมความเป็นกรดที่เป็นวัตถุเจือปนอาหารมาใช้มากขึ้น มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยควบคุมความเป็นกรดต่างในอาหาร และใช้เป็นสารวัตถุกันเสีย เพื่อยืดอายุให้แก่ผลิตภัณฑ์ โดยสารควบคุมความเป็นกรดที่ได้รับความนิยม ได้แก่

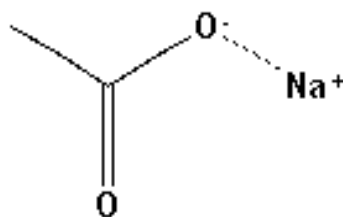
#### 2.4.1 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate; SA)

โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) เป็นสารที่ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็น acidity regulator หรือ buffer ตามข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหารตามมาตรฐานโคเด็กซ์ (Codex General Standard for Food Additives หรือ GSFA 2014) ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 2.2 และแสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีในรูปที่ 2.14

ตารางที่ 2.2 ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของโซเดียมอะซิเตทตามมาตรฐานโคเด็กซ์

ข้อมูล	คำอธิบาย
ค่าความปลอดภัย (ADI)	ไม่จำกัด
เลข INS	เลข INS No. 262(i)
เลข C.A.S.	127-09-3
สูตรเคมี	$C_2H_3NaO_2 \cdot nH_2O$ (n = 0 or 3)
น้ำหนักสูตร	Anhydrous: 82.03
การวิเคราะห์	ไม่น้อยกว่า 98.5% หลังจากทำแห้ง
คำอธิบาย	Anhydrous: สีขาว, ไม่มีกลิ่น, เป็นเม็ด, ผง ดูดความชื้นได้

ที่มา: Codex General Standard for Food Additives (2014)



รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมอะซิเตต

ที่มา: National Center for Biotechnology Information (2005)

Sallam (2007) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของโซเดียมอะซิเตต, โซเดียมแลกเตต และโซเดียมซิเตรทในเนื้อปลาแซลมอนสไลด์ ด้วยวิธีการจุ่มเนื้อปลาลงในสารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 2.5% (w/v) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส และพบว่าสารละลายโซเดียมอะซิเตตสามารถต้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียได้รวมไปถึงจุลินทรีย์ในกลุ่มของ aerobic และ psychrotrophic, *Pseudomonas* spp., แบคทีเรียที่ผลิต H<sub>2</sub>S, แบคทีเรียแลคติก และ *Enterobacteriaceae* ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยความสามารถในด้านแบคทีเรียพบว่าโซเดียมอะซิเตต มีประสิทธิภาพมากที่สุด ตามด้วยโซเดียมแลกเตต และโซเดียมซิเตรท ตามลำดับ ซึ่งสามารถยืดอายุให้กับเนื้อปลาแซลมอนสไลด์ได้มากกว่าตัวอย่างควบคุม 4 ถึง 7 วัน จากรายงานของ Tangkham, Comeaux, Ferguson, & LeMieux (2012) ได้ศึกษาผลของโซเดียมอะซิเตตและโซเดียมแลกเตตต่ออายุการเก็บของอกไก่ดิบ โดยทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ และอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ จากการทดลองโซเดียมแลกเตต ที่ความเข้มข้น 0, 0.87 หรือ 1.74% หรือ 1.74 หรือ 3.48% โซเดียมอะซิเตต โดยทุกตัวอย่างที่ทดสอบจะใส่โซเดียมฟอสเฟต, โซเดียมคลอไรด์ และแปรปริมาณน้ำกลั่นในสูตร เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 2-3 องศาเซลเซียส และตรวจวิเคราะห์ aerobic plate counts (APC) ทุก 3 วัน แบ่งการทดลองทั้งสิ้นออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1, 0 ถึง 14 วัน พบว่าตรวจวิเคราะห์ APC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในวันที่ 3, 6 และ 14 เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าโซเดียมอะซิเตตที่ความเข้มข้น 0.87% หรือ 1.74% มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียมากที่สุด ส่วนการทดลองที่ 2, 0 ถึง 39 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 1.74% หรือ 3.48% ของโซเดียมอะซิเตตเพียงอย่างเดียว หรือแบบการใช้ร่วมกับโซเดียมแลกเตต พบว่าการตรวจวิเคราะห์ APC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ มากกว่าการใช้ 1.74% โซเดียมแลกเตต และตัวอย่างควบคุม ดังนั้นจากสองการทดลองพบว่าโซเดียมอะซิเตตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์มากที่สุด

## 2.4.2 โซเดียมแล็กเตต (sodium lactate; SL)

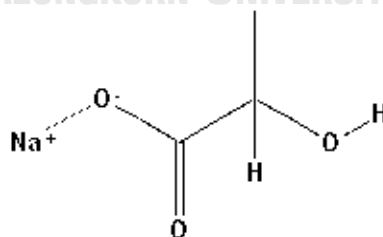
โซเดียมแล็กเตต (sodium lactate) เป็นสารที่ได้รับอนุญาตให้ได้ตามข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหารตามมาตรฐานโคเด็กซ์ (Codex General Standard for Food Additives หรือ GSFA 2014) เพื่อใช้ยืดอายุให้แก่ผลิตภัณฑ์ได้ ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 2.3 และแสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีในรูปที่ 2.15

ตารางที่ 2.3 ข้อกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของโซเดียมแล็กเตตตามมาตรฐานโคเด็กซ์

ข้อมูล	คำอธิบาย
ค่าความปลอดภัย (ADI)	ไม่จำกัด
เลข INS	เลข INS No. 325
เลข C.A.S.	72-17-3
สูตรเคมี	$C_3H_5NaO_3$
น้ำหนักสูตร	Anhydrous: 112.06
การวิเคราะห์	ไม่น้อยกว่า 95% หลัง และไม่มากกว่า 110% ของจำนวนที่ติดฉลาก ข้อกำหนดจากสารละลาย 60% w/w ของ $C_3H_5NaO_3$ ในน้ำ
คำอธิบาย	ใส, ของเหลว, ไม่มีกลิ่นหรือมีเล็กน้อย

ที่มา: Codex General Standard for Food Additives (2014)

CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมแล็กเตต

ที่มา: National Center for Biotechnology Information (2008)

Nanasombat & Chooprang (2009) ได้ศึกษาการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อหมูสด โดยใช้เกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับทำให้เยือกแข็งและหลอมละลาย โดยใช้โซเดียมอะซิเตท,

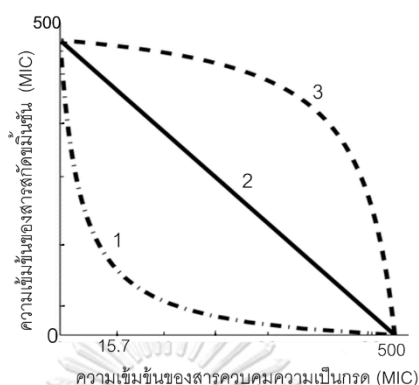
โซเดียมแลกเตตและโพแทสเซียมซอร์เบต โดยเตรียมสารที่ความเข้มข้น 504, 459 และ 615.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 7 ชนิด ด้วยวิธีการวิเคราะห์การยับยั้งจุลินทรีย์ หรือการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ที่ pH 4.5-7.0 พบว่าโซเดียมแลกเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทุกชนิดได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมอะซิเตท โดยพบว่าที่ค่า pH ต่ำ (4.5-5.5) โซเดียมแลกเตต มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ดีกว่าที่ค่า pH สูง (6.0-7.0) โดยเชื้อที่ไวต่อฤทธิ์ต้านของโซเดียมแลกเตต ที่ pH 4.5 คือ *L. monocytogenes* และ *E. coli* มีค่า MIC เท่ากับ 23.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และพบว่าผลของ pH มีผลน้อยต่อการแสดงฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียของโซเดียมอะซิเตท โดยเฉพาะที่ pH 5.0-6.5 นอกจากนี้ยังพบว่า *Y. enterocolitica* ไวต่อฤทธิ์ในการต้านของโซเดียมอะซิเตท ที่ pH 4.5-7.0 มากที่สุด โดยมีค่า MIC อยู่ที่ 13.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (pH 4.5) และ ค่า MIC 52.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (pH 5-7)

Bingol & Bostan (2007) ได้ศึกษาผลของโซเดียมแลกเตตต่อการวิเคราะห์จุลินทรีย์และอายุการเก็บของไส้กรอก โดยการเตรียมโซเดียมแลกเตตที่ความเข้มข้น 0, 0.6, 1.2 และ 1.8 % ตามลำดับ และโซเดียมไนไตรท์เข้มข้น 0.125 % ใส่ลงในผลิตภัณฑ์ และถูกเก็บในบรรจุภัณฑ์สุญญากาศที่ 4 องศาเซลเซียส 60 วัน แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ตามระยะเวลา ซึ่งตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางประสาทสัมผัส, ปริมาณจุลินทรีย์ (aerobic plate count, lactic acid bacteria, yeast-mould, และ sulphite reducing anaerobic bacteria) และค่า pH พบว่าการใช้โซเดียมแลกเตต สามารถช่วยชะลอการเติบโตของจุลินทรีย์ได้ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ และสามารถเพิ่มอายุการเก็บได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยที่โซเดียมแลกเตตไม่ทำให้ค่า pH ระหว่างการเก็บเปลี่ยนแปลงไปซึ่งอาจจะส่งผลต่อจุลินทรีย์ในตัวอย่งได้ ในรายงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการเติมโซเดียมแลกเตตลงในผลิตภัณฑ์สามารถช่วยปรับปรุงคุณภาพทางจุลินทรีย์ได้ โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ สามารถยืดอายุการเก็บรักษาและมีผลต้านจุลินทรีย์ที่ดีกว่าโซเดียมไนไตรท์

## 2.5 การเสริมฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์ (synergistic effect)

ผลของปฏิกริยาระหว่างสารต้านจุลินทรีย์ 2 ชนิด เกิดการปฏิสัมพันธ์ระหว่างกัน (interaction) โดยพิจารณาการเสริมฤทธิ์กันจากกราฟ ดังรูปที่ 2.16 หรือจากการคำนวณหาค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ โดยใช้ค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของสารผสม

ที่ได้จากการทดลอง (fractional inhibition concentration index; FIC index) ตามวิธีของ (Davidson & Parish., 1989)



รูปที่ 2.16 กราฟแสดงผลการเสริมฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Manyam et al. (2006)

กราฟเส้นที่ 1 คือ synergism หมายถึง สารทั้งสองชนิดมีการเสริมฤทธิ์กัน แล้วก่อให้เกิดผลกระทบร่วมกันได้มากกว่าผลจากสารแต่ละชนิดมาบวกรวมกัน โดยผลกระทบที่เกิดอาจเกิดเป็นเท่าทวีคูณ

กราฟเส้นที่ 2 คือ additive หมายถึง สารทั้งสองชนิดก่อให้เกิดผลร่วมกัน โดยผลกระทบที่เกิดอาจเกิดเป็นผลจากสารแต่ละชนิดมาบวกรวมกัน

กราฟเส้นที่ 3 คือ antagonism สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านกัน หรือยับยั้งกันเอง จนไม่แสดงผลการยับยั้ง

การคำนวณหาค่า Fractional inhibition concentration index หรือ FIC index (Davidson & Parish., 1989) จากสูตร

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = [A] / \text{MIC}_A + [B] / \text{MIC}_B \quad (1)$$

โดย [A] คือ ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ A,  
 $\text{MIC}_A$  คือ ค่า MIC ของสารต้านจุลินทรีย์ A  
 $\text{FIC}_A$  คือ ค่า FIC ของสารต้านจุลินทรีย์ A

[B]	คือ	ความเข้มข้นของสารต้านจุลินทรีย์ B,
MIC <sub>B</sub>	คือ	ค่า MIC ของสารต้านจุลินทรีย์ B
FIC <sub>B</sub>	คือ	ค่า FIC ของสารต้านจุลินทรีย์ B

และ

ค่า FIC index	ค่าน้อยกว่า 0.5	หมายถึง synergy
ค่า FIC index	0.5–0.75	หมายถึง partial synergy
ค่า FIC index	1–4	หมายถึง indifference
ค่า FIC index	มากกว่า 4	หมายถึง antagonism

จากการศึกษาของ Mun et al. (2013) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริมฤทธิ์กันของสารเคอร์คูมินในการต้าน methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* จากการศึกษาพบว่าการใช้สารเคอร์คูมินเสริมฤทธิ์ร่วมกับยาปฏิชีวนะ เพื่อใช้ในการต้านเชื้อ MRSA ทำการวิเคราะห์ค่า MIC ด้วยวิธี broth microdilution ร่วมกับ time-kill assay พบว่าสารเคอร์คูมินมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ โดยมีค่า MIC ในช่วง 125 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำสารเคอร์คูมินมาใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ชนิด oxacillin (OXI), ampicillin (AMP), ciprofloxacin (CIP), และ norfloxacin (NOR) พบว่ามีค่า MIC ของสารเคอร์คูมิน ยาปฏิชีวนะของสารผสมมีค่าลดลง และเมื่อนำไปคำนวณค่า FIC index ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* สายพันธุ์ ATCC 33591, ATCC 25923 และ DPS-1 พบว่าแสดงค่าเป็น synergy และ partial synergy ตามแต่ละชนิดของยาปฏิชีวนะ ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับยาปฏิชีวนะมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ นอกจากนี้ยังพบรายงานวิจัยของ Inés Schelegueda, Gliemmo, & Campos (2012) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริมฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของไคโตซาน (chitosan), โซเดียมแลกเตต (sodium lactate), ไนซิน (nisin) หรือโพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) ต่อแบคทีเรียประจำถิ่นที่ทำให้เสื่อมเสียในปลา ได้แก่ *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens*, *L. plantarum* และ *L. innocua* โดยศึกษาผลของการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารสองชนิด หาค่า MIC และคำนวณค่า FIC index พบว่าสารเกือบทุกชนิดสามารถต้านการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียได้ และสารผสมระหว่างสารต้านจุลินทรีย์และไคโตซาน และสารผสมระหว่างโพแทสเซียมซอร์เบตและโซเดียมแลกเตต แสดงการเสริมฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ แต่ทั้งนี้พบว่าสารผสมระหว่างสารต้านจุลินทรีย์และโพแทสเซียมซอร์เบตในระดับที่ทดสอบนั้นมีผลกระทบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของปลา โดยสารผสมระหว่างไคโตซานและโซเดียมแลก

เขตแสดงผลการลดจำนวนของแบคทีเรียได้มากที่สุด ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์สำหรับการเก็บรักษาปลาที่เป็นประเภทอาหารแปรรูปต่ำ

จากผลการศึกษพบว่าการใช้สารสกัดจากธรรมชาติ หากมีการใช้ในรูปแบบของสารเดี่ยวเพียงชนิดเดียว อาจก่อให้เกิดมีความไม่เสถียร หรือความไม่คงตัวในระบบที่ต่อการทดสอบ ดังที่เห็นว่าค่า MIC ของการใช้สารเดี่ยวในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์พบว่าจะมีค่าสูงกว่าการใช้สารตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปในการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ กล่าวคือ การทดสอบฤทธิ์ร่วมกันของสาร แสดงฤทธิ์เป็นแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) การใช้สารสกัดจากธรรมชาติถือเป็นทางเลือกหนึ่ง แต่ทั้งนี้ยังมีเหตุผลในเรื่องของความคุ้มค่าในการใช้สารสกัด เนื่องจากการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว อาจมีราคาสูงและความไม่คงตัวดังที่กล่าว



บทที่ 3  
การดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือ/อุปกรณ์ สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และสายพันธุ์จุลินทรีย์

เครื่องมือ/อุปกรณ์

Autoclave (SX700 Tomy, Japan)  
Balance 0.01-3100 g (NewClassic MF, Mettler Toledo, Switzerland)  
Balance 0.0001-200 g (MS304S, Mettler Toledo, Switzerland)  
Centrifuge (Hettich zentrifugen 19, Germany)  
Centrifuge (Micro22R Hettich, Germany)  
Colorimeter (Konica Minolta, Japan)  
Freezer (SF-C95, Sanyo, Japan)  
Gel documentation (Model InGenious L, Synegne, UK)  
High-performance liquid chromatography (Ultimate 3000 system, Thermo Scientific, USA)  
Hot air oven (DO 6062, Memmert, Germany)  
Hotplate (IF-404, Imarflex, Japan)  
Hotplate Stirrer (HTS-1003, LMS, Japan)  
Incubator (B5042, Heraeus, Germany)  
Laminar flow hood (BVT 123 Iasco, USA)  
Micropipette (Finnpipette F2, Thermo Scientific, USA)  
Micropipette p1000 (Gilson, France)  
Micropipette p200 (Gilson, France)  
Micropipette p10 (Gilson, France)  
Microwave (MS2127CW LG, Korea)  
Petri Dishes 90x15 mm (Hycon plastic, UK)  
pH meter (Mettler toledo, Switzerland)  
Refrigerator (SJ-Y22T-SL, Sharp, Japan)  
Shaking Incubator (WIS-30, WITEG Labortechnik, Germany)



Spectrophotometer (V-530, Jasco, USA)

Stand mixers and attachments (5K5SSWH, Kitchenaid, USA)

Texture analyzer (Stable Micro systems, UK)

PCR thermal cycle (Bio-Rad, USA)

UV-visible spectrophotometer (Genesys 10 uv, Thermo Spectronic, USA)

Vortex mixer (CTL-107, CTL, Japan)

Water bath (WNB 22, Memmert, Germany)

### สารเคมี

2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, USA)

Agarose powder (Axygen, USA)

Curcumin from *Curcuma longa* (Turmeric), powder 65% purity (C1386) (Sigma-Aldrich, USA)

Curcumin standard, 98% purity (Chem-Impex, USA)

Dichloromethane (Uvasol, Germany)

DMSO (RCI Labscan, USA)

DNA Ladder (GenRuler 100 bp plus DNA Ladder, Fermenta, USA)

Ethanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH) (Uvasol, Germany)

Ethidium bromide (Bio basic, Canada)

Loadind dye (Bio basic, Canada)

Methanol (CH<sub>3</sub>OH) (Fisher Chemical, UK)

Methanol HPLC grade (Fisher Chemical, UK)

PCR Primers (1<sup>st</sup> Base, Singapore)

Sodium acetate, food grade (CH<sub>3</sub>COONa) (Foodchem International, China)

Sodium lactate, food grade (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NaO<sub>3</sub>) (60% wt/wt, Henan Jindan Lactic Acid, China)

Tartaric acid (QReC, New Zealand)

ชุดน้ำยาสำหรับทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) (Fermentas, USA)

ชุดสกัด DNA (DNA extraction kit) (HiYield™ Genomic DNA Mini Kit, YBG100, RBC, Taiwan)

ชุด GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Hiyield, Japan)

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

Baird Parker Agar (Himedia, India)

Compact Dry™ EC (Nissui, Japan)

Compact Dry™ X-BC (Nissui, Japan)

Compact Dry™ X-SA (Nissui, Japan)

Egg Yolk Tellurite emulsion (Himedia, India)

Eosin Methylene Blue Agar (Himedia, India)

Mueller Hinton Broth (Himedia, India)

Mueller Hinton Agar (Himedia, India)

Nutrient Agar (Himedia, India)

Nutrient Broth (Himedia, India)

Plate Count Agar (Himedia, India)

Potato Dextrose Agar (Himedia, India)

Potato Dextrose Broth (Himedia, India)

Sabouraud Dextrose Agar (Himedia, India)

Sabouraud Dextrose Broth (Himedia, India)

Sodium chloride (Univar, Australia)

### สายพันธุ์จุลินทรีย์

*Escherichia coli* ATCC 25922 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ผู้ครอบครอง ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ผู้ครอบครอง ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

## ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมิน

#### 3.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

##### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ดัดแปลงตามวิธีการ Jayaprakasha, Jagan Mohan Rao, & Sakariah (2002) ซึ่งสารมาตรฐานเคอร์คูมิน (curcumin standard, 98% purity, Chem-Impex, USA) 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร และกรองผ่านตัวกรอง (micro filter membrane) ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ คือ คอลัมน์ C<sub>18</sub> VertiSep™ UPS 4.6 x 50 มิลลิเมตร, 3 ไมโครเมตร อัตราเร็ว 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้ diode array detector (DAD) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ น้ำ (Milli-Q® water) ผสมกับอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ทำการวิเคราะห์ด้วยระบบ gradient elution โดยรายละเอียดแสดงในตารางที่ 3.1 (ภาคผนวก ค.1)

ตารางที่ 3.1 วัฏภาคเคลื่อนที่ด้วยระบบ gradient elution โดยใช้เทคนิค HPLC

ระยะเวลา (นาที)	น้ำ (Milli-Q®)	Acetonitrile
0-3	80	20
20	20	80
25	20	80
25.1	80	20
28	80	20

##### วิธีวิเคราะห์

ซึ่งตัวอย่างผงเคอร์คูมิน (cucumin powder, 65% purity, Sigma-Aldrich, USA) 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่านตัวกรอง ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนฉีดสารละลายตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC หลังจากนั้นเครื่อง HPLC จะทำการตรวจวัด

วิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยใช้ภาวะของการวิเคราะห์ เช่นเดียวกับการฉีดสารมาตรฐาน

### 3.1.2 การวิเคราะห์ห้องค้ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC)

เตรียมแผ่นโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (TLC) ดัดแปลงจากวิธีของ Kulkarni, Maske, Budre, & Mahajan (2012) โดยมีตัวดูดซับเป็น silica gel (Si-60GF<sub>254</sub>) บนแผ่นอลูมิเนียม ชีตเส้นกำกับให้ห่างจากขอบล่างของแผ่นโครมาโทกราฟี ประมาณ 1.0 เซนติเมตร เพื่อใช้ในการกำหนดจุดเริ่มต้นและด้านบนของแผ่นโครมาโทกราฟี ชีตเส้นระดับสารละลาย โดยให้ห่างจากขอบบนประมาณ 0.3 เซนติเมตร ทำการจุดสารละลายเคอร์คูมิน ที่เตรียมโดยนำผงเคอร์คูมิน 1 มิลลิกรัม ละลายในไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) 10 มิลลิลิตร จุดลงบนแผ่นโครมาโทกราฟี โดยใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) โดยให้มีความกว้างประมาณ 6.0 มิลลิเมตร เตรียมภาชนะบรรจุวัฏภาค เพื่อพัฒนาโดยใช้ตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในสัดส่วน 98 : 2 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) ใส่กระดาษกรองลงภาชนะบรรจุวัฏภาคเคลื่อนที่ โดยให้กระดาษกรองทาบผิวด้านในภาชนะแล้วปิดด้วยแผ่นกระจก เพื่อให้ภายในภาชนะอิมมัวด้วยไอของสารละลาย นำแผ่นโครมาโทกราฟี วางลงในภาชนะดังกล่าว ปิดฝาแล้วปล่อยให้สารละลายเคลื่อนที่จนถึงระดับขีดสารละลายที่กำหนดไว้ นำแผ่นโครมาโทกราฟีออกและเป่าให้แห้ง นำไปตรวจดูองค์ประกอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร สังเกตและบันทึกภาพโครมาโทแกรมภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

(สถานที่ในการทำวิจัย อาคารมหามกุฏ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนิษฐ ปรานีนรารัตน์)

## 3.2 การศึกษาสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ของเส้นขนมจีนสด

### 3.2.1 จำนวนจุลินทรีย์และการเสื่อมเสีย

การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเส้นขนมจีนสด จากร้านค้าปลีกในพื้นที่ของกรุงเทพมหานครทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง (ตลาดนัดโลตัสพระราม1, ตลาดกิงเพชร, โรงอาหารตึกจุลจักรพงษ์ จุฬาฯ และตลาดนัดจุฬาฯ) ที่บรรจุในถุงพลาสติกชนิดโพลิโพรไพลีน (polypropylene) ปริมาณ 150 กรัม และ 1 ตัวอย่างที่ผลิตขึ้นภายในห้องปฏิบัติการประกันคุณภาพอาหารและพัฒนาผลิตภัณฑ์ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามวิธีดัดแปลงจาก มาตรฐาน นียมวิทย์ (2528) (ภาคผนวก ก.1) ตัวอย่างเส้นขนมจีนสด ทั้ง 5 ตัวอย่างถูกเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count: TPC) และการตรวจหาปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count: YMC)

### การเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์

ซึ่งตัวอย่างเส้นขนมจีนสด 25 กรัม ใส่ลงในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตบอาหารด้วยเครื่องตบอาหาร (stomacher) นาน 2 นาที จะได้สารละลายตัวอย่างอาหารที่เจือจางเป็น 1:10 แล้วมาทำการเจือจางเป็นลำดับส่วน ครั้งละ 10 เท่า (serial dilution) ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างจนได้สารละลายที่มีระดับการเจือจางที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและยีสต์และรา

### การตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count)

ตามวิธีของ (BAM, 2001a) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมมาอย่างละ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อ ด้วยวิธี pour plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ในช่วง 25-250 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/g (colony forming unit/gram) (ภาคผนวก ง.1)

### การตรวจหาปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count)

ตามวิธีของ (BAM, 2001b) ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสมมาอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ปรับ pH ด้วย 10% tartaric acid ด้วยวิธี spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 25-250 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/g (colony forming unit/gram) (ภาคผนวก ง.2)

### 3.2.2 คัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เส้นขนมจีนสดเสื่อมเสียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ดัดแปลงวิธีการจาก De et al. (2009) และ Lu, Peng, Cao, Tatsumi, & Li (2008) ดังนี้

#### การคัดแยกจุลินทรีย์ไอโซเลท

คัดแยกจุลินทรีย์ตัวแทน (predominant microorganisms) ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนด้วยวิธี Harrison's disc โดยคัดแยกตามโคโลนีและสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่พบในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TPC) และการตรวจหาปริมาณยีสต์และรา (YMC) นำโคโลนีแบคทีเรียหรือยีสต์และราที่เป็นตัวแทนในการเสื่อมเสียของตัวอย่างมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหาร PCA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 2-3 วัน สำหรับยีสต์และรา จากนั้นเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารแข็งวุ้นเอียง (slant agar)

#### การสกัดสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (DNA extraction)

นำโคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์ที่เป็นตัวแทนของสาเหตุในการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีน ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (microcentrifuge tube) ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ต้มในน้ำเดือด 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ชุดสกัด HiYield™ Genomic DNA Mini Kit เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

#### การเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมดีเอ็นเอ โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอทั้งหมดของจุลินทรีย์มาเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่จำเพาะต่อยีน คือ 357F (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') และ 517R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') สำหรับแบคทีเรีย (Turner, Pryer, Miao, & Palmer, 1999) และ NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') และ LS2 (5'-ATCCCAAACAACACTCGACTC-3') สำหรับยีสต์รา (Cocolin, Bisson, & Mills, 2000) ทำการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับการทำ PCR ปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.1 มิลลิโมลาร์ของ deoxynucleoside triphosphate, 2 หน่วยของ *Taq* polymerase, 0.1 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดของจุลินทรีย์ และดีเอ็นเอแม่พิมพ์

(genomic DNA) ผสมส่วนประกอบต่างๆ ในแต่ละปฏิกิริยาให้เข้ากัน และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR thermal cycle ซึ่งมีจำนวนรอบในการทำ PCR ทั้งหมด 35 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอน denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, primer template annealing ที่ 57 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ DNA synthesis ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที (ภาคผนวก ง.3)

### การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต (PCR product) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมแผ่นเจลอะกาโรส (agarose gel) ที่ความเข้มข้น 1.5 % w/v (ภาคผนวก ง.4) ทำการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเครื่อง horizontal electrophoresis วางแผ่นเจลลงใน electrophoresis tank ที่บรรจุ 1xTBE buffer และผสมผลผลิต PCR เข้ากับสารละลายสี loading dye ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงหยดลงในช่องของอะกาโรสเจล ทำการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าภายใต้สภาวะความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ 5 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำแผ่นเจลอะกาโรสแช่ในเอธิเดียม โบรไมด์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นล้างเอธิเดียม โบรไมด์ โดยการแช่แผ่นอะกาโรสในน้ำกลั่นประมาณ 30 นาที ตรวจแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลอะกาโรสด้วยเครื่อง gel documentation เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

### การทำผลผลิตให้บริสุทธิ์

หลังจากการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต จึงนำผลผลิตที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYield™ GEL/PCR DNA Fragments Extraction Kit เก็บดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendorf) และนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสต่อไป

### การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์หาลำดับเบส

นำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมาวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้จัดส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ณ สาธารณรัฐเกาหลี (เกาหลีใต้) แล้วนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสที่รายงานในฐานข้อมูลธนาคารยีน (Gen bank) โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ผ่านทางเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homology) และระบุชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

### 3.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมิน

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของขมิ้นชัน ดัดแปลงการเตรียมสารและวิธีทดสอบจาก Gunes et al, (2013); Lorian, (1996); Wang et al, (2009)

#### 3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion

##### การเตรียมสารละลายเคอร์คูมิน

เตรียมสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1.95-0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ด้วยวิธีเจือจาง 2 เท่าตามลำดับ (2-fold serial dilution) และมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 78-4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

##### การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียมไอโซเลทแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เคยมีรายงานการตรวจพบในเส้นขนมจีนสด *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Escherichia coli* ATCC25922 ในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไอโซเลทยีสต์และราหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 ในอาหาร Sabouraud Dextrose broth (SDB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำจุลินทรีย์มาปรับปริมาณโดยเทียบความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (CLSI, 2009) และใช้เป็นเชื้อในการทดสอบ

##### การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์

ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ จุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ บิดสำลีกับผนังหลอดอาหารพองหมด และป้ายสำลีให้ทั่วบนผิวหน้าอาหาร โดยแบคทีเรียใช้อาหาร MHA และยีสต์และราใช้อาหาร SDB ตามลำดับ โดยให้ป้ายแบบ 3 ระบาย แต่ละระบายทำมุมกันประมาณ 60 องศา ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้สักครู่แล้วเจาะหลุมด้วยที่เจาะจุกค็อก (cork borer) โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วหยดสารสกัดที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไปในหลุมๆละ 40 ไมโครลิตร โดยใช้ยาปฏิชีวนะ Tetracycline เป็นกลุ่มควบคุมบวก (positive control) และ DMSO เป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์รา วัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น



(inhibition zone) หน่วยเป็นมิลลิเมตร ทดลองสามซ้ำ และรายงานเป็นค่าเฉลี่ยและแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (minimum bactericidal/fungicidal concentration, MBC/MFC) ของสารเคอร์คูมินด้วยวิธี broth microdilution ดังนี้

#### การเตรียมสาร

เตรียมสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 31.25-0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) ด้วยวิธีเจือจาง 2 เท่าตามลำดับ (2-fold serial dilution) และมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 7.81-0.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

#### การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียมไอโซเลทแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 , จุลินทรีย์ก่อโรค *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Escherichia coli* ATCC25922 และไอโซเลทยีสต์และราหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 (ภาคผนวก ง.5)

#### การทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของสารเคอร์คูมิน

ทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของสารเคอร์คูมินต่อจุลินทรีย์ที่ทดสอบ (ภาคผนวก ง.5)

### 3.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารควบคุมความเป็นกรด

ขั้นตอนการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารควบคุมความเป็นกรด ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) และโซเดียมแลกเตต (sodium lactate) ดัดแปลงการเตรียมสารและวิธีการทดสอบจาก Nanasombat & Chooprang (2009)

### 3.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (minimum bactericidal/fungicidal concentration, MBC/MFC) ของโซเดียมอะซิเตท และโซเดียมแลกเทต ด้วยวิธี broth microdilution assay ดังนี้

#### การเตรียมสาร

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตท และโซเดียมแลกเทตที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 800-3.13 และ 804.59-3.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ด้วยวิธีเจือจาง 2 เท่าตามลำดับ (2-fold serial dilution) ตามลำดับ และมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200-0.78 และ 201.15-0.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

#### การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียมไอโซเลทแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เคยมีรายงานการตรวจพบในเส้นขนมจีนสด *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Escherichia coli* ATCC25922 และไอโซเลทยีสต์และราหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 (ภาคผนวก ง.5)

#### การทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของโซเดียมอะซิเตท และโซเดียมแลกเทต

ทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของโซเดียมอะซิเตท และโซเดียมแลกเทตต่อจุลินทรีย์ทดสอบ (ภาคผนวก ง.5)

### 3.5 การศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด (synergistic effect)

การศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมอะซิเตท และสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเทต

### 3.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (minimum bactericidal/

fungicidal concentration, MBC/MFC) ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมอะซิเตท และสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเตต ด้วยวิธี broth microdilution assay ดังนี้

### การเตรียมสาร

เตรียมสารละลายเคอร์คูมินความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 31.25-0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในตัวทำละลาย DMSO, โซเดียมอะซิเตท และโซเดียมแลกเตตที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 800-3.13 และ 804.59-3.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ด้วยวิธีเจือจาง 2 เท่าตามลำดับ (2-fold serial dilution) ตามลำดับ และมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.91-0.015, 100-0.39 และ 100.57-0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

### การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียมไอโซเลทแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เคยมีรายงานการตรวจพบในเส้นขนมจีนสด *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Escherichia coli* ATCC25922 และไอโซเลทยีสต์และราหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 (ภาคผนวก ง.6)

### การทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของผสม

ทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของสารผสมต่อจุลินทรีย์ทดสอบ (ภาคผนวก ง.6) เลือกสารผสมที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบที่ดีที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป โดยพิจารณา ร่วมกับการคำนวณค่า FIC index และกราฟแสดงการเสริมฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์

### 3.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution โดยกำหนดความเข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่

หาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (minimum bactericidal/fungicidal concentration, MBC/MFC) ของสารผสมที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด โดยกำหนดความเข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่ ด้วยวิธี broth microdilution assay ดังนี้

### การเตรียมสาร

เตรียมสารผสมที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในความเข้มข้นที่ประเมินได้จากข้อ 3.5.1 โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่ (ภาคผนวก ง.7)

### การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

เตรียมไอโซเลทแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เคยมีรายงานการตรวจพบในเส้นขนมจีนสด *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Escherichia coli* ATCC25922 และไอโซเลทยีสต์และราหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 (ภาคผนวก ง.7)

**การทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของสารผสมที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด โดยกำหนดความเข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่**

ทดสอบหาค่า MIC และ MBC/MFC ของสารผสมต่อจุลินทรีย์ทดสอบ (ภาคผนวก ง.7) ร่วมกับการแสดงผลในรูปแบบของกราฟแสดงการเสริมฤทธิ์ของสารต้านจุลินทรีย์

**3.6 การประเมินผลของเส้นขนมจีนสดต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด**

### การเตรียมตัวอย่างเส้นขนมจีน

เตรียมตัวอย่างเส้นขนมจีนสด (ภาคผนวก ก.1) ทั้งสิ้น 4 ตัวอย่าง ได้แก่

1. ชุดตัวอย่างควบคุม (CT)
2. ชุดตัวอย่างที่เติมสารผสม (CT\_CS)
3. ชุดตัวอย่างที่เติมสารผสมและเติมจุลินทรีย์ไอโซเลทที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสีย

(CS\_BreviC)

4. ชุดตัวอย่างที่เติมสารผสมและเติมจุลินทรีย์ก่อโรค (CT\_ES)

### การเตรียมสาร

เตรียมสารผสมที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในความเข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่ตามความเข้มข้นที่ประเมินได้จากข้อ 3.5.2 โดยเตรียมตามค่า MBC ของเชื้อที่ทนต่อสารผสมมากที่สุด

### การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

ดัดแปลงจากวิธีการของ Gkana, Doulgeraki, Chorianopoulos, & Nychas (2017) คัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นตัวแทนในการสอบ นำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม จนได้จุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

- ไอโซเลทแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  CFU/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ  $1 \times 10^6$  CFU/ml)
- แบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* ATCC25923) ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  CFU/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ  $1 \times 10^6$  CFU/ml)
- แบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมลบ (*Escherichia coli* ATCC25922) ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^8$  CFU/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ  $1 \times 10^6$  CFU/ml)
- ไอโซเลทยีสต์และราที่เป็นตัวแทนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/ml (ความเข้มข้นสุดท้ายคือ  $1 \times 10^4$  CFU/ml)

### การประเมินผลของเส้นขนมจีนสดต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด

ผลิตเส้นขนมจีนสด (ภาคผนวก ก.1) จนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย จากนั้นเติมจุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์ cocktail ของแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด และจุลินทรีย์ cocktail แบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ โดยเติมจุลินทรีย์ cocktail ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ต่อเส้นขนมจีนสด 25 กรัม เติมสารละลายเคอร์คูมินและสารควบคุมความเป็นกรดตามความเข้มข้นที่ประเมินได้จากข้อ 3.5.2 โดยเตรียมตามค่า MBC ของเชื้อที่ทนต่อสารผสมมากที่สุด เติมนลงในผลิตภัณฑ์เส้นขนมจีนใน 4 ชุดตัวอย่าง ได้แก่ ชุดตัวอย่างขนมจีนควบคุม (CT), ชุดตัวอย่างขนมจีนที่เติมสารผสม (CT\_CS), ชุดตัวอย่างเส้นขนมจีนที่เติมสารผสมและเติมจุลินทรีย์ cocktail แบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด (CS\_BreviC) และชุดตัวอย่างเส้นขนมจีนที่เติมสารผสมและเติมจุลินทรีย์ cocktail แบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ (CS\_ES) เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์ของชุดตัวอย่างทั้งหมด ในช่วง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง และประเมินฤทธิ์การยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดและสมบัติทางกายภาพและเคมี (เฉพาะวันที่ 1 ในตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมสารผสม) โดย

ประเมินในรูปแบบของการศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ที่ตรวจวัดในเส้นขนมจีน เพื่อหาค่าอัตราการเจริญ คือ ค่า K (growth rate) จากสมการต่อไปนี้ (Maier, Pepper, & Gerba, 2009)

$$\log_{10}N_2 - \log_{10}N_1 = K (t_2 - t_1) / 2.303 \quad (2)$$

ประเมินฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดและเติมจุลินทรีย์ cocktail แบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ โดยตรวจวัดจำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้น ดังนี้

### 3.6.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดต่อจุลินทรีย์รวม

1. ปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count; TPC) (ภาคผนวก ง.1)

### 3.6.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีน

1. การตรวจหาปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count; YMC) (ภาคผนวก ง.2)
2. วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ *Brevibacillus* sp. (ภาคผนวก ง.10)
3. วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ *Candida tropicalis* (ภาคผนวก ง.2)

### 3.6.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรดต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในเส้นขนมจีน

1. วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ *Staphylococcus aureus* (ภาคผนวก ง.6)
2. วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ *Escherichia coli* (ภาคผนวก ง.9)

### 3.6.4 สมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของเส้นขนมจีนสดที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด (วันที่ 1)

1. ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter (Mettler toledo, Switzerland) (ภาคผนวก ค.2)

2. ค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Chroma Meter (Minolta, Model CR-300 series, Japan)  
(ภาคผนวก ข.1)

3. ความเหนียวของเส้นขนมจีน (tensile strength) ด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (texture analyzer) โดยใช้หัววัดแบบแรงดึง (noodle tensile) (ภาคผนวก ข.2)

4. ค่าปริมาณการต้านอนุมูลอิสระด้วย DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)  
(ภาคผนวก ค.3)

### 3.7 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้จากแต่ละการศึกษาด้วย one-way analysis of variance analysis of variance (ANOVA) และ Duncan's new range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ที่ระดับความเชื่อมั่น  $\alpha=0.05$

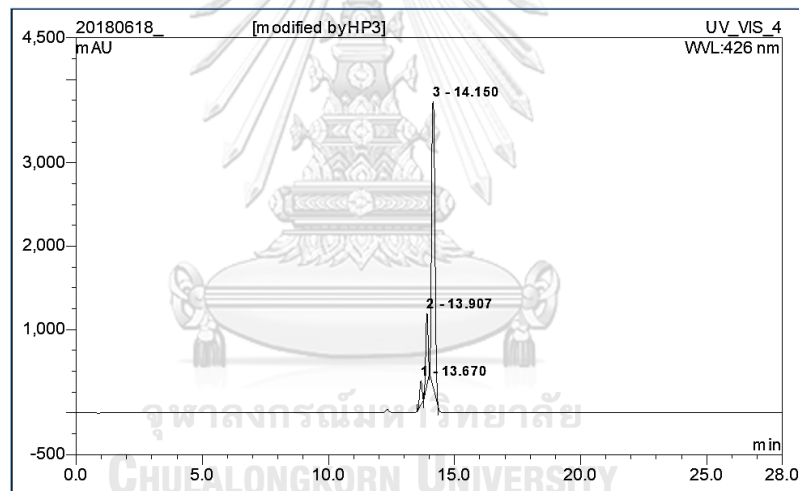


## บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 4.1 การตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมิน

#### 4.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารเคอร์คูมิน (65% purity) ด้วยระบบ HPLC โดยมีวัฏภาคเคลื่อนที่ คือ น้ำ (Milli-Q® water) ผสมกับอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) วิเคราะห์ด้วยระบบ gradient elution และวัดที่ความยาวคลื่นที่ 426 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 โครมาโทแกรมขององค์ประกอบของสารเคอร์คูมินที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร

จากการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร แสดงพีคที่เกี่ยวข้องที่ค่าหน่วงเวลา (retention time) คือ 13.670, 13.907 และ 14.150 ซึ่งแสดงถึงพีคของสารบริสุทธิ์ที่ออกซีเคอร์คูมิน, ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และเคอร์คูมิน ตามลำดับ ทราบได้จากการวิเคราะห์ด้วยสารมาตรฐานพบว่า มีค่าหน่วงเวลา เท่ากับ 13.677, 13.914 และ 14.157 ตามลำดับ (ภาคผนวก ค.1) แต่ทั้งนี้พบว่าการวิเคราะห์ดังกล่าวไม่สามารถแยกสารประกอบที่มีออกจากกันได้ดีและมีค่าการแยก (resolution) ไม่สูงมาก เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนสารที่จะนำมาใช้เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ เพื่อให้สารประกอบสามารถแยกออกจากกันได้ และมีค่าการแยกที่ดีพอสำหรับการ

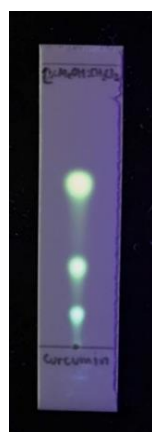


วิเคราะห์ หรือต้องทำการศึกษาส่วนประกอบภายในระบบและปรับปรุงให้มีเหมาะสมสำหรับแยกสารประกอบได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Thongchai, Wongkadnon, Thongpoon, & Srisopa (2011) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของระบบ HPLC ที่มีต่อการวิเคราะห์ปริมาณเคอร์คูมินอยด์ในวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจากพืชสกุลเคอร์คูมา พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ การใช้สารผสมระหว่าง 2 เปอร์เซ็นต์ของกรดแอสติติกร่วมกับอะซิโตนในไตรล์ ด้วยระบบ gradient elution เป็นมีวัฏภาคเคลื่อนที่ มีอัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และคอลัมน์ HPLC Packed Column Inertsil ODS-3 พบว่าสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมินอยด์สามชนิด แยกออกจากกันได้ดี มีค่าการแยกเป็นที่ยอมรับได้

ดังนั้นการวิเคราะห์เพื่อการศึกษาองค์ประกอบของสารเคอร์คูมินที่ดีจึงจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนสภาวะในการตรวจวิเคราะห์ หรือเลือกวิธีการวิเคราะห์ที่เหมาะสมกับตัวอย่าง ดังที่จะศึกษาในขั้นตอนถัดไป

#### 4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC)

จากการศึกษาองค์ประกอบของสารเคอร์คูมินด้วยระบบโครมาโทกราฟีแผ่นบาง (Thin layer chromatography; TLC) โดยมีวัฏภาคคงที่เป็น silica gel บนแผ่นอลูมิเนียม และใช้ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) และเมทานอล (methanol) ในสัดส่วน 98 : 2 เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ และนำตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 องค์ประกอบในสารเคอร์คูมิน (TLC)

จากการวิเคราะห์สามารถแยกสารองค์ประกอบได้ทั้งสิ้น 3 จุด โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสาร (rate of flow) หรือค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.58, 0.29 และ 0.11 ตามลำดับ ซึ่งประกอบไปด้วย สารเคอร์คูมิน, ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบของสารเคอร์คูมินและค่า  $R_f$

องค์ประกอบของสารเคอร์คูมิน	$R_f$
เคอร์คูมิน	0.58
ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน	0.29
บิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน	0.11

โดยได้มีการทดสอบด้วยสารมาตรฐานเคอร์คูมิน พบว่ามีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.58 เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Kulkarni et al. (2012) ได้ทำการศึกษาในหัวข้อการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ของสารเคอร์คูมินอยด์จากขมิ้นชัน (*curcuma longa* L.) ทำการศึกษาโดยการแยกสารประกอบเคอร์คูมินอยด์ ด้วยวิธี TLC โดยใช้โคโรฟอร์ม (chloroform) และเมทานอล (methanol) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.67, 0.60 และ 0.506 ซึ่งประกอบไปด้วยสารเคอร์คูมิน, ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐาน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pothitirat & Gritsanapan (2005) ที่ได้ศึกษาการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารเคอร์คูมิน, ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน ในสารสกัดหยาบเคอร์คูมินอยด์ จาก *Curcuma longa* ในประเทศไทย โดยวิธีโครมาโทกราฟีแผ่นบาง และเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (densiometer) โดยใช้โคโรฟอร์ม (chloroform), เบนซีน (benzene) และเมทานอล (methanol) ในอัตราส่วน 80:15:5 เป็น เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ มีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.69, 0.51 และ 0.39 ซึ่งประกอบไปด้วยสารเคอร์คูมิน, ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ในแต่ละงานวิจัยจะมีค่า  $R_f$  ของสารแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของชนิดและสัดส่วนของวัฏภาคเคลื่อนที่ใช้ในการศึกษา

จากผลการศึกษาพบว่าผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเคอร์คูมินด้วยเทคนิค HPLC สอดคล้องกับผลที่ได้ ซึ่งประกอบไปด้วยสาร 3 ชนิด ได้แก่ เคอร์คูมิน, ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคอร์คูมินที่เป็นสารประกอบหลักและเป็นสาร active compound ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) ที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง และ

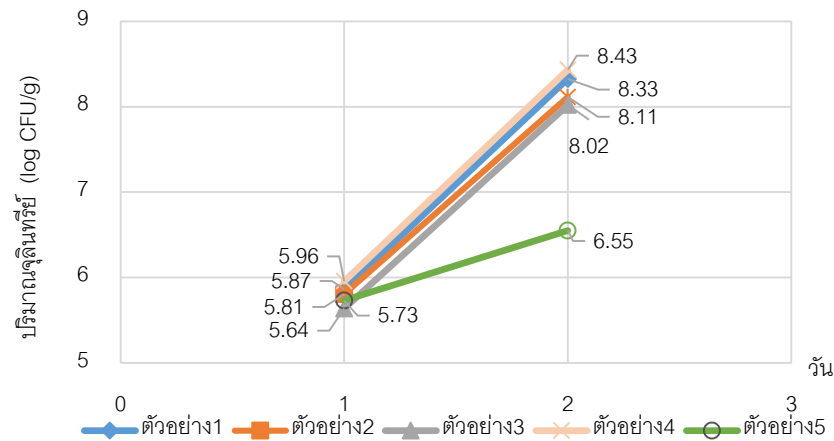
ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสารเคอร์คูมิน โดยเฉพาะฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย และฤทธิ์ในการต้านยีสต์และรา (Chattopadhyay et al., 2004; Jayaprakasha, Rao, & Sakariah, 2005) ส่วนสารประกอบรอง คือ ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน จะมีเพียงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Unnikrishnan & Rao, 1995) ดังนั้นจึงได้นำสารเคอร์คูมินมาใช้ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ต่อไป

## 4.2 การศึกษาสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ของเส้นขนมจีนสด

### 4.2.1 จำนวนจุลินทรีย์และการเสื่อมเสีย

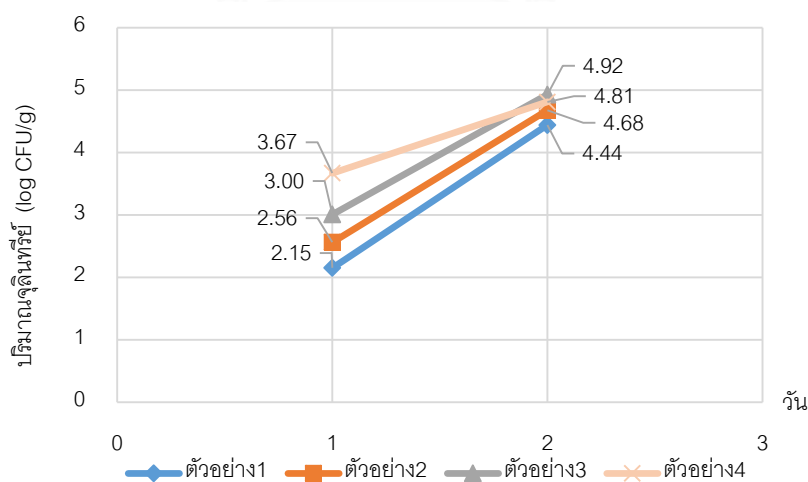
จากการศึกษาสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ของเส้นขนมจีนสดทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง จากร้านค้าปลีกในพื้นที่ของกรุงเทพมหานคร 4 ตัวอย่าง และ 1 ตัวอย่างที่ผลิตขึ้นภายในห้องปฏิบัติการ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ( $30 \pm 2$  องศาเซลเซียส) และนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และปริมาณยีสต์และรา (yeast and mold count) คุณภาพของเส้นขนมจีนตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.500/2547) และมาตรฐานตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 237 พ.ศ. 2544 ได้กำหนดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ต้องไม่เกิน  $1 \times 10^6$  CFU/g หรือ 6 log CFU/g

จากการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ด้วยวิธี total plate count พบว่าในวันที่ 1 ของการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด คือ 5.86, 5.81, 5.64, 5.96 และ 5.73 log CFU/g ตามลำดับ และพบว่าในวันที่ 2 ค่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของแต่ละตัวอย่างเพิ่ม มีค่าเท่ากับ 8.33, 8.11, 8.02, 8.43, และ 6.55 log CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.3 ซึ่งจากเกณฑ์คุณภาพมาตรฐานของขนมจีน พบว่าทุกตัวอย่างขนมจีนเสื่อมเสียในวันที่ 2 ของการเก็บรักษา เมื่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกิน 6 log CFU/g ซึ่งสอดคล้องผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในเส้นขนมจีนของ ณัฐกิตติ์ คำปา และคณะ (2559) ในวันที่ 1 พบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างอยู่ในช่วง 5.25-6.42 log CFU/g ในวันที่ 1 ส่วนสาเหตุที่ค่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของตัวอย่างเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเส้นขนมจีนสดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสด ที่มีปริมาณน้ำที่สูงและมีสารอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Li et al., 2010) โดยลักษณะการเสื่อมเสียที่สำคัญของเส้นขนมจีน คือ เส้นแฉะ และจะมีกลิ่นเหม็นอับของแป้ง



รูปที่ 4.3 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างขนมจีนในวันที่ 1 และ 2

นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณยีสต์และรา ด้วยวิธี yeast and mold count ในวันที่ 1 พบว่าปริมาณยีสต์และราของตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 2.15, 2.56, 3.00 และ 3.66 log CFU/g ตามลำดับ ส่วนในวันที่ 2 พบปริมาณยีสต์และรา มีค่าเท่ากับ 4.44, 4.68, 4.92 และ 4.81 log CFU/g ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ไม่พบโคโลนีของยีสต์และรา หรือมีค่าน้อยกว่า 2 log CFU/g ในตัวอย่างที่ 5 ทั้งสองวันของการตรวจวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างที่ 5 เป็นตัวอย่างที่ผลิตขึ้นภายใต้สภาวะที่ควบคุม โดยใช้ น้ำเตอโรส ในกระบวนการผลิต และที่อุณหภูมิประมาณ 60-71 องศาเซลเซียส สามารถฆ่าเชื้อในกลุ่มของยีสต์และราได้ (Ray, 2003) ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ปริมาณยีสต์และราในตัวอย่างขนมจีนในวันที่ 1 และ 2

#### 4.2.2 คัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เส้นขนมจีนสดเสื่อมเสียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

จากการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์และการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีน จึงคัดแยกและจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของเส้นขนมจีนสด โดยการส่องจุลินทรีย์ตัวแทน (predominant microorganisms) ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนด้วยวิธี Harrison's disc (Harrison, 1938) โดยคัดแยกตามลักษณะโคโลนีและสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์หลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีน และในตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่ามีปริมาณของแบคทีเรียหลักอยู่ที่ร้อยละ 86.32, 84.62, 92.38, 87.82 และ 91.55 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าร้อยละ 80 ของไอโซเลททั้งหมดในแต่ละตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแบคทีเรียและแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด

ตัวอย่าง	แบคทีเรีย วันที่ 1 (CFU/g) หรือ (log CFU/g)	แบคทีเรีย วันที่ 2 (CFU/g) หรือ (log CFU/g)	แบคทีเรียที่เป็น ตัวแทนหลัก (CFU/g) หรือ (log CFU/g)	ร้อยละ แบคทีเรียที่ เป็นตัวแทน หลัก
1	$7.33 \times 10^5$ (5.86)	$2.12 \times 10^8$ (8.33)	$1.83 \times 10^8$ (8.26)	86.32
2	$6.42 \times 10^5$ (5.81)	$1.30 \times 10^8$ (8.11)	$1.10 \times 10^8$ (8.04)	84.62
3	$4.35 \times 10^5$ (5.64)	$1.05 \times 10^8$ (8.02)	$9.70 \times 10^7$ (7.99)	92.38
4	$9.10 \times 10^5$ (5.96)	$2.71 \times 10^8$ (8.43)	$2.38 \times 10^8$ (8.38)	87.82
5	$5.40 \times 10^5$ (5.73)	$3.55 \times 10^6$ (6.55)	$3.25 \times 10^6$ (6.51)	91.55

ในขณะที่ยีสต์และราหลักที่เป็นตัวแทนของการเสื่อมเสีย ในตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 พบว่ามีปริมาณร้อยละ 96.73, 78.15, 64.23 และ 61.80 ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากกว่าร้อยละ 60 ของไอโซเลททั้งหมดในแต่ละตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.3

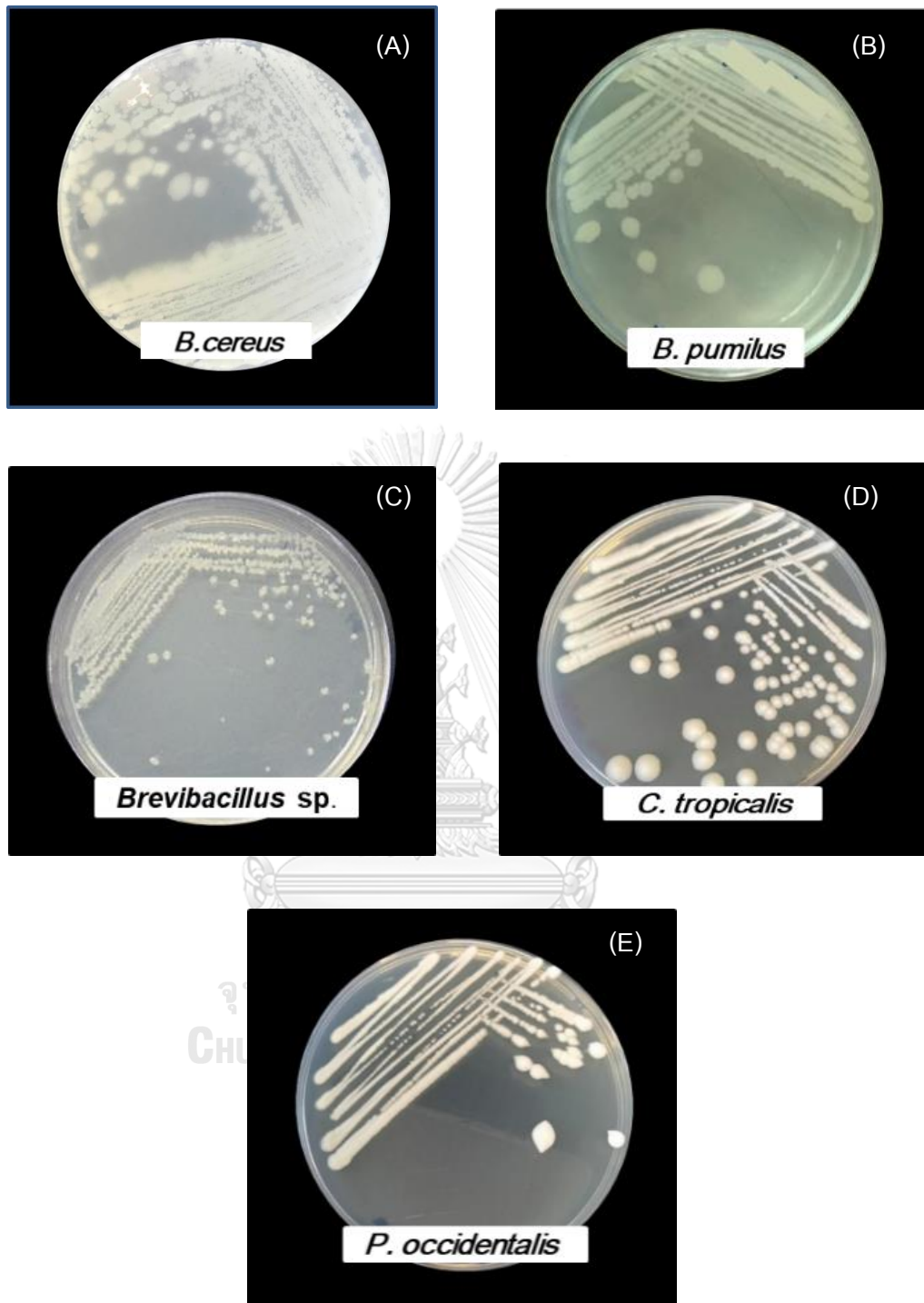
ตารางที่ 4.3 ปริมาณยีสต์และราและยีสต์และราที่เป็นตัวแทนหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด

ตัวอย่าง	ยีสต์และรา วันที่ 1 (CFU/g) หรือ (log CFU/g)	ยีสต์และรา วันที่ 2 (CFU/g) หรือ (log CFU/g)	ยีสต์และราที่เป็น ตัวแทนหลัก (CFU/g) หรือ (log CFU/g)	ร้อยละยีสต์ และราที่เป็น ตัวแทนหลัก
1	$1.42 \times 10^2$ (2.15)	$2.76 \times 10^4$ (4.44)	$2.67 \times 10^4$ (4.43)	96.73
2	$3.65 \times 10^2$ (2.56)	$4.76 \times 10^4$ (4.68)	$3.72 \times 10^4$ (4.57)	78.15
3	$1.02 \times 10^3$ (3.00)	$8.47 \times 10^4$ (4.92)	$5.44 \times 10^4$ (4.73)	64.23
4	$4.66 \times 10^3$ (3.66)	$6.44 \times 10^4$ (4.81)	$3.98 \times 10^4$ (4.60)	61.80
5	<100 (<2)	<100 (<2)	<100 (<2)	-

นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลทจากตัวอย่างเส้นขนมจีนที่เสื่อมเสีย แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% homology) มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 97 ในทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ได้จากวิธี PCR ดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.5

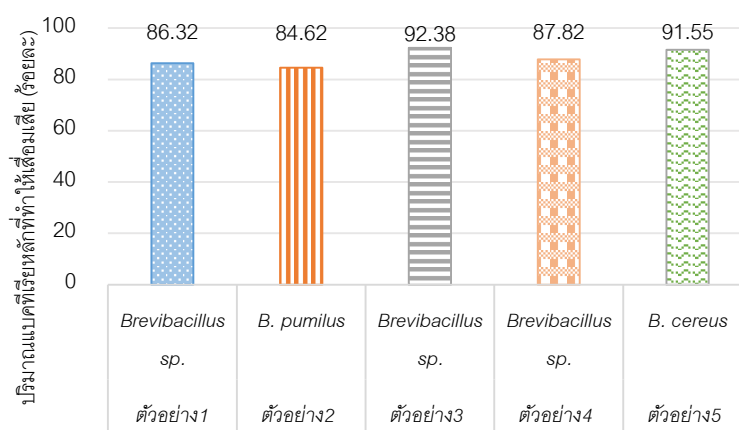
ตารางที่ 4.4 จุลินทรีย์ไอโซเลทและเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ได้จากตัวอย่างเส้นขนมจีนสดที่เสื่อมเสีย

ตัวอย่าง	จุลินทรีย์	Accession#	% homology
ตัวอย่าง 1	<i>Brevibacillus</i> sp.	KY351612.1	99%
	<i>C. tropicalis</i>	KX941846.1	97%
ตัวอย่าง 2	<i>B. pumilus</i>	JQ410788.1	99%
	<i>P. occidentalis</i>	KM234444.1	100%
ตัวอย่าง 3	<i>Brevibacillus</i> sp.	KC493311.1	99%
	<i>C. tropicalis</i>	KX941846.1	97%
ตัวอย่าง 4	<i>Brevibacillus</i> sp.	KC493311.1	99%
	<i>P. occidentalis</i>	KM234444.1	98%
ตัวอย่าง 5	<i>B.cereus</i>	KY344855.1	100%



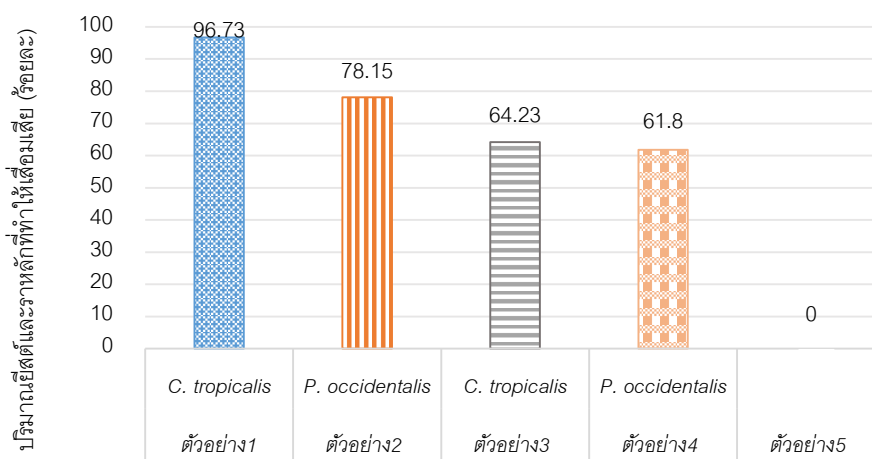
รูปที่ 4.5 จุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างเส้นขนมจีนสด ประกอบด้วย A) *B. cereus*, B) *B. pumilus*, C) *Brevibacillus sp.* D) *C. tropicalis* และ E) *P. occidentalis*

โดยแบคทีเรียที่ตรวจพบทั้งหมดเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ (spore-forming bacteria) โดยพบแบคทีเรีย *Brevibacillus* sp. เป็นแบคทีเรียหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในตัวอย่างที่ 1, 3 และ 4 และพบ *Bacillus* spp. ได้แก่ *B. pumilus* เป็นแบคทีเรียหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในตัวอย่างที่ 2 และ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในตัวอย่างที่ 5 อีกทั้งยังเป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารอีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนหลักในเส้นขนมจีนที่เสื่อมเสีย

และเมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเดียวกัน พบยีสต์และราที่เป็นตัวแทนหลัก ได้แก่ *C. tropicalis* เป็นยีสต์และราหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในตัวอย่างที่ 1 และ 3 และ *P. occidentalis* เป็นยีสต์และราหลักที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในตัวอย่างที่ 2 และ 4 ส่วนในตัวอย่างที่ 5 ไม่พบยีสต์และรา ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้พบว่ายีสต์และราเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนเช่นกัน (ลัญญณัฐ ภาตะนันท์, 2551) ดังที่แสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 ปริมาณและชนิดยีสต์และราหลักที่เป็นตัวแทนหลักในเส้นขนมจีนที่เสื่อมเสีย



จากผลการคัดแยกจุลินทรีย์หลักที่พบในขนมจีนเสื่อมเสีย และเมื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์ดังกล่าวพบว่า จุลินทรีย์หลักที่พบในตัวอย่างขนมจีนเสื่อมเสียทุกตัวอย่างเป็นแบคทีเรียสร้างสปอร์ ได้แก่ *Brevibacillus* sp. และ *Bacillus* spp. ซึ่งการพบจุลินทรีย์ดังกล่าวสะท้อนให้เห็นกลไกการเสื่อมเสียของขนมจีนได้ กล่าวคือ เนื่องจากแบคทีเรียสร้างสปอร์สามารถปนเปื้อนและอยู่รอดในอาหารแห้งหรืออาหารที่มี water activity ( $a_w$ ) ต่ำ เช่น ธัญพืช รวมถึงเมล็ดข้าวได้ ดังนั้นในขั้นตอนการผลิตขนมจีน แบคทีเรียสร้างสปอร์ซึ่งมีความทนต่อความร้อนที่ใช้ในกระบวนการผลิตเส้นขนมจีนได้ (อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส และใช้เวลา 2-3 นาที) มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าสปอร์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* spp. สามารถทนต่อความร้อนในระหว่างกระบวนการทำให้สุกของข้าว โดยที่สปอร์สามารถงอกและสร้างสารพิษได้ (Lake, Hudson, & Cressey, 2004) การให้ความร้อนแก่อาหารอาจไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งหมด (Kanokpornverod, Warin, Wiwat, & Supakdamrongkul, 2016) อีกทั้งเส้นขนมจีนสดมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เป็นกลาง จึงเหมาะแก่การงอกของสปอร์และเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และสร้างสารบางชนิดและทำให้เกิดการเสื่อมเสียของเส้นขนมจีนสดได้ในที่สุด เช่นเดียวกับยีสต์และรา คือ *C. tropicalis* และ *P. occidentalis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้หลากหลายชนิด สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดย *C. tropicalis* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่เขตร้อนและกึ่งเขตร้อน (Adegoke, Iwahashi, Komatsu, Obuchi, & Iwahashi, 2000; Kantor et al., 2016) ซึ่งการพบจุลินทรีย์ดังกล่าวในตัวอย่างเส้นขนมจีน น่าจะมาจากการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการผลิต

จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษา ถ้าหากต้องการยืดอายุให้กับเส้นขนมจีนสดจะต้องยับยั้งการงอกของสปอร์แบคทีเรีย และยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุหลักในการเสื่อมเสียของเส้นขนมจีนสด แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสียในหลายพื้นที่ทั่วประเทศ เช่น การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli*, *S. aureus* และเชื้อยีสต์และรา (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2551; สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2551) ซึ่งมีสาเหตุหลักมาจากกระบวนการการผลิตที่ไม่ได้มาตรฐาน ไม่ถูกสุขลักษณะ รวมถึงการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ระหว่างการปฏิบัติงานและการเก็บรักษา ตลอดจนการขนส่งผลิตภัณฑ์ (ลัญญณ์รัฐ ภาตะนันท์, 2551) ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปจึงประเมินผลการใช้สารเคอร์คูมินในการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เกิดเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสดและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (*E. coli* และ *S. aureus*)

### 4.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมิน

#### 4.3.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion

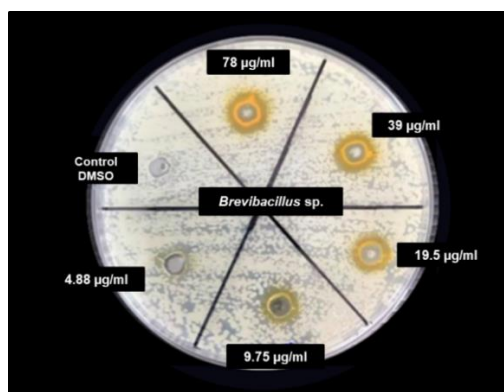
ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นในช่วง 4.88-78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งความเข้มข้นในการทดสอบมาจากการประเมินผลเบื้องต้นของการแพร่กระจายของสารในชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบ และนำสารเคอร์คูมินมาทดสอบต่อจุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกได้ คือ *Brevibacillus* sp., *B. pumilus*, *B. cereus*, *P. occidentalis* และ *C. tropicalis* และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เคยมีรายงานการตรวจพบในเส้นขนมจีนสด คือ *S. aureus* และ *E. coli* ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบที่ ตามลำดับ ด้วยวิธี agar well diffusion และพิจารณาความสามารถในยับยั้งจุลินทรีย์จากขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ (inhibition zone) ในหน่วยมิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร) ต่อจุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกจากเส้นขนมจีนสดที่เสื่อมเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค (หลุมกว้าง 6 มิลลิเมตร)

จุลินทรีย์ทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (มม) ที่ความเข้มข้นต่างๆ				
	78	39	19.5	9.75	4.88
	มค.ก./มล.	มค.ก./มล.	มค.ก./มล.	มค.ก./มล.	มค.ก./มล.
<i>Brevibacillus</i> sp.	12.83±0.2 <sup>a</sup>	12.10±0.26 <sup>b</sup>	11.27±0.40 <sup>c</sup>	10.37±0.25 <sup>d</sup>	0.00±0.00
<i>B. pumilus</i>	10.80±0.26 <sup>a</sup>	10.40±0.44 <sup>b</sup>	9.63±0.25 <sup>c</sup>	8.90±0.10 <sup>d</sup>	0.00±0.00
<i>B. cereus</i>	11.20±0.20 <sup>a</sup>	10.70±0.30 <sup>ab</sup>	9.97±0.47 <sup>b</sup>	9.20±0.52 <sup>c</sup>	0.00±0.00
<i>S. aureus</i>	11.93±0.42 <sup>a</sup>	11.57±0.38 <sup>ab</sup>	11.10±0.35 <sup>bc</sup>	10.57±0.38 <sup>c</sup>	0.00±0.00
<i>E. coli</i>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>P. occidentalis</i>	11.63±0.15 <sup>a</sup>	11.07±0.15 <sup>b</sup>	10.77±0.38 <sup>c</sup>	10.10±0.20 <sup>d</sup>	9.73±0.25 <sup>e</sup>
<i>C. tropicalis</i>	10.70±0.26 <sup>a</sup>	10.11±0.35 <sup>ab</sup>	9.73±0.32 <sup>bc</sup>	9.37±0.38 <sup>cd</sup>	8.90±0.44 <sup>d</sup>

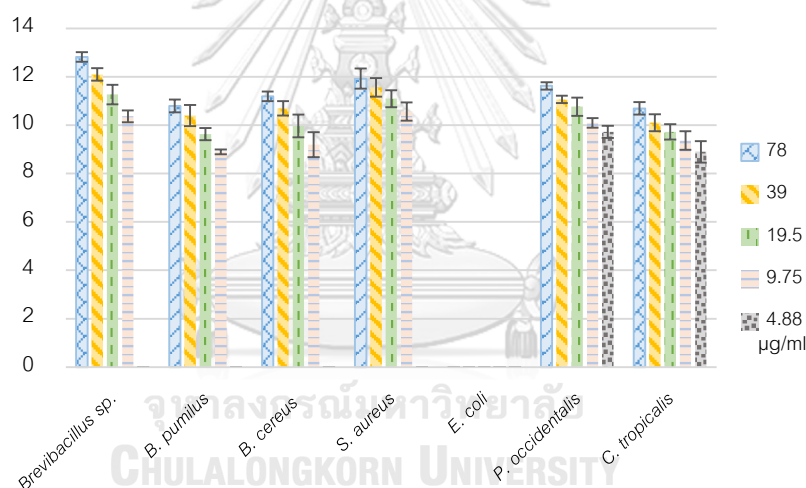
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ระหว่างความเข้มข้นที่แตกต่างกันของจุลินทรีย์ทดสอบชนิดเดียวกัน, ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ยเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ (มิลลิเมตร)  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารละลายเคอร์คูมินใน DMSO (dimethyl sulfoxide) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 78, 39, 19.5, 9.75 และ 4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารเคอร์คูมินความเข้มข้นที่มากกว่า 4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ไอโซเลทได้ทุกชนิดและแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกได้ โดยสารเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *Brevibacillus* sp. ได้ดีที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 4.8 ตามด้วย *S. aureus*, *P. occidentalis*, *B. cereus*, *B. pumilus* และ *C. tropicalis* โดยมีค่าขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น คือ  $12.83 \pm 0.21$ ,  $11.93 \pm 0.42$ ,  $11.63 \pm 0.15$ ,  $11.20 \pm 0.20$ ,  $10.80 \pm 0.26$  และ  $10.70 \pm 0.26$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และที่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 4.88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้เพียงยีสต์และราไอโซเลท คือ *P. occidentalis* และ *C. tropicalis* โดยมีค่าขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น คือ  $9.73 \pm 0.25$  และ  $8.90 \pm 0.44$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 19.5 และ 39 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *Brevibacillus* sp. ได้ดีที่สุด โดยมีค่าขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น คือ  $11.27 \pm 0.40$  และ  $12.10 \pm 0.26$  มิลลิเมตร ตามลำดับ และยับยั้ง *C. tropicalis* ได้น้อยที่สุด โดยมีค่าขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น คือ  $9.73 \pm 0.32$  และ  $10.11 \pm 0.35$  มิลลิเมตร ตามลำดับ เช่นเดียวกับความสามารถในการยับยั้งชนิดของจุลินทรีย์ที่ความเข้มข้น 78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ความเข้มข้น 9.75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด และ *B. pumilus* ได้น้อยที่สุด โดยมีค่าขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้น คือ  $10.57 \pm 0.38$  และ  $8.90 \pm 0.10$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับกับการศึกษาของ Lawhavinit, Kongkathip, & Kongkathip (2010) ได้ศึกษาการใช้สารเคอร์คูมินอยด์ (มีสารเคอร์คูมินเป็นองค์ประกอบหลัก 86.5%) ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่แยกได้จากกุ้งและไก่ 24 ชนิด พบว่าสารดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *B. cereus*



รูปที่ 4.8 ขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ของ *Brevibacillus* sp. ที่ความเข้มข้นต่างๆ

โดยความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมินที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจุลินทรีย์ไอโซเลทที่คัดแยกได้ และจุลินทรีย์ก่อโรค แสดงในรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

นอกจากนี้จากผลการวิจัยนี้ยังพบว่า เมื่อพิจารณาจากสมบัติของผนังเซลล์ตามแกรมสเตรน (gram stain) พบว่าสารเคอร์คูมินสามารถยับยั้งแบคทีเรียไอโซเลทแกรมบวก และแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบได้ (*E. coli*) ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยได้ด้วยความแตกต่างของโครงสร้างและองค์ประกอบของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม ทำให้สารเคอร์คูมินเกิดการซึมผ่านได้แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อขนาดของบริเวณยับยั้งจุลินทรีย์ของเชื้อแต่ละชนิด

ในแบคทีเรียแกรมลบ โครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยสายเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ชั้นนอกสุดของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นสารประเภทฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ที่มี

ส่วนของโครงสร้างลิพอโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide) อยู่ด้วย ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันสารเคอร์คูมินไม่ให้เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกจะมีชั้นของเปปติโดไกลแคนล้อมรอบอยู่เป็นชั้นนอกสุด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวป้องกันการซึมผ่านที่ไม่ดี จึงทำให้จุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารเคอร์คูมินมากกว่า ดังนั้นสารเคอร์คูมินจึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ (Wang et al., 2009) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการวิจัยของ Lawhavinit, Kongkathip, & Kongkathip (2010) ได้ทดสอบการใช้สารเคอร์คูมินอยด์ (มีสารเคอร์คูมินเป็นองค์ประกอบหลัก 86.5 %) ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* พบว่าสารสกัดเข้มข้นไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ด้วยวิธี agar well diffusion

ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงนำสารเคอร์คูมิน และสารควบคุมความเป็นกรดทั้งสองชนิด ได้แก่ โซเดียมอะซิเตท และโซเดียมแลกเตตในรูปแบบของการใช้สารเดี่ยว และสารผสม มาทำการศึกษาต่อเพื่อหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (minimum inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (minimum bactericidal/ fungicidal concentration, MBC/MFC)

#### 4.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC/MFC) ไอโซเลทที่ทำให้เกิดเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด ได้แก่ *Brevibacillus* sp., *B. pumilus*, *B. cereus*, *P. occidentalis* และ *C. tropicalis* และจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *S. aureus* และ *E. coli* ตามลำดับ ของสารเคอร์คูมิน (CCM), แสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารเคอร์คูมินต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ	CCM (มก./มล.)		จุลินทรีย์ทดสอบ	CCM (มก./มล.)	
	MIC	MBC/MFC		MIC	MBC/MFC
<i>B. cereus</i>	1.95	3.90	<i>E. coli</i>	1.95	7.81
<i>Brevibacillus</i> sp.	0.98	1.95	<i>C. tropicalis</i>	0.98	1.95
<i>B. pumilus</i>	0.98	1.95	<i>P. occidentalis</i>	0.49	1.95
<i>S. aureus</i>	1.95	3.90			

จากผลการทดลองพบว่าสารเคอร์คูมิน (CCM) สามารถต้านการเจริญและฆ่าจุลินทรีย์ทดสอบได้ทุกชนิด โดยมีค่า MIC และ MBC/MFC ของจุลินทรีย์ไอโซเลท ได้แก่ *B. cereus*, *B. pumilus*, *Brevibacillus* sp., *C. tropicalis* และ *P. occidentalis* ระหว่าง 0.49-1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1.95-3.90 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *S.aureus* และ *E.coli* พบว่ามีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน และ 3.90 และ 7.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเคอร์คูมินมีความสามารถในการยับยั้งและฆ่า *P. occidentalis* ได้ดีที่สุด (ค่า MIC และ MFC เท่ากับ 0.49 และ 1.95 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) และมีความสามารถในการยับยั้งและฆ่า *E. coli* ได้น้อยสุด (ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 1.95 และ 7.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานกับการศึกษาของ Wang et al. (2009) ได้ทำการทดสอบการใช้สารเคอร์คูมินในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของอาหาร พบว่า ค่า MIC ของยีสต์และรา มีค่าน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งแสดงถึงฤทธิ์การต้านที่ดีกว่า และแบคทีเรียแกรมลบมีค่า MIC สูงสุด ทั้งนี้มีรายงานที่อธิบายกลไกการเข้าทำลายของสารเคอร์คูมินต่อยีสต์ *Candida albicans* พบว่าสารเคอร์คูมินไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ยีสต์ ทำให้เกิดการรั่วไหลของโพแทสเซียมไอออนจาก cytosol และทำให้กลไกการปกป้องเซลล์ของเยื่อหุ้มเซลล์มีประสิทธิภาพลดลง (Lee & Lee, 2014)

#### 4.4 การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารควบคุมความเป็นกรด

##### 4.4.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารควบคุมความเป็นกรด คือ โซเดียมอะซิเตท (SA) และ โซเดียมแลกเตต (SL) ด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC/MFC) ต่อจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เกิดเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด และจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ ด้วยวิธี broth microdilution ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของโซเดียมอะซิเตท (SA) และโซเดียมแลกเตต (SL) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ	SA (มก./มล.)		SL (มก./มล.)	
	MIC	MBC/MFC	MIC	MBC/MFC
<i>B. cereus</i>	100	>200	50.29	201.15
<i>Brevibacillus</i> sp.	25	50	25.14	50.29
<i>B. pumilus</i>	50	100	12.57	50.29
<i>S. aureus</i>	100	>200	25.14	100.57
<i>E. coli</i>	200	>200	201.15	>201.15
<i>C. tropicalis</i>	100	200	50.29	100.57
<i>P. occidentalis</i>	25	50	25.14	50.29

การทดสอบโดยใช้โซเดียมอะซิเตทพบว่า มีค่า MIC และ MBC ของจุลินทรีย์ไอโซเลท ระหว่าง 25-200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50->200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MIC และ MBC ของจุลินทรีย์ก่อโรค อยู่ระหว่าง 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน ตามลำดับ โดยโซเดียมอะซิเตทสามารถยับยั้งและฆ่า *Brevibacillus* sp. และ *P. occidentalis* ได้ดีที่สุด (ค่า MIC และค่า MBC/MFC เท่ากับ 0.25 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เท่ากัน ตามลำดับ) จากการศึกษาของ Silva, Almeida, Figueiredo Ana, & Miranda, (2012) ได้อธิบายถึงกรดอินทรีย์และเกลือของกรดอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ โดยเกิด hyper-acidification ผ่านการให้ของโปรตอนที่ยึดหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของจุลินทรีย์ และเมื่อมีปริมาณสารในระบบมาก สารจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ อาจทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาเสียไป เช่น เอนไซม์ H<sup>+</sup>-ATPase ที่เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์ ATP ของจุลินทรีย์ และมีความสามารถในการยับยั้งและฆ่า *E. coli* ได้น้อยสุด (ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 200 และ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nanasombat & Chooprang (2009) ที่ศึกษาการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อหมูดิบโดยใช้เกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับวิธีการแช่แข็งและการละลาย พบว่าเมื่อใช้โซเดียมอะซิเตทที่ pH 7 มีค่า MIC ของเชื้อ *E. coli* เท่ากับ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาพบว่าไซโตเดียมแลกเตตยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้ทุกชนิด โดยมีค่า MIC และ MBC/MFC ของจุลินทรีย์ไอโซเลท อยู่ระหว่าง 12.57-50.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 50.29-201.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า MIC และ MBC ของจุลินทรีย์ก่อโรค เท่ากับ 25.14 และ 201.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 100.57 และ >201.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยไซโตเดียมแลกเตตมีความสามารถในการยับยั้งและฆ่า *B. pumilus* ได้ดีที่สุด (มีค่า MIC และ MBC เท่ากับ 12.57 และ 50.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ส่วนกลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไซโตเดียมแลกเตต พบว่ามีความใกล้เคียงกับกลไกที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ในขั้นตอนของการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยไซโตเดียมอะซิเตท เนื่องจากเป็นสารประเภทเดียวกัน คือ เกลือของกรดอินทรีย์ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับฤทธิ์ยับยั้งของสารเคอร์คูมินพบว่าสามารถยับยั้ง *E. coli* ได้น้อยที่สุด และพบว่าไซโตเดียมแลกเตตแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวได้น้อยที่สุดเช่นกัน (ค่า MIC และ MBC เท่ากับ 201.15 และ >201.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าไซโตเดียมแลกเตตมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Houtsma, De Wit, & Rombouts (1993) ได้ทำการศึกษาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของไซโตเดียมแลกเตตต่อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยพบว่าไซโตเดียมแลกเตต สามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และยีสต์ได้ โดยพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีค่า MIC ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตเดียมแลกเตต มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่า *B. cereus* ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *B. cereus* (ค่า MIC เท่ากับ 25.14 และ 50.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) จากผลการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC/MFC) ของสารเคอร์คูมิน ไซโตเดียมอะซิเตท และไซโตเดียมแลกเตต พบว่ามีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบ แต่ความสามารถในการฆ่าจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบในบางชนิด ยังจำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้สูงสุด หรืออาจจะประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีทดสอบอื่นๆ ดังนั้นการศึกษาในขั้นตอนต่อไปจึงเป็นการศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับไซโตเดียมอะซิเตท และสารเคอร์คูมินร่วมกับไซโตเดียมแลกเตต เพื่อคัดเลือกสารที่มีประสิทธิภาพในการเสริมฤทธิ์ที่ดีที่สุดต่อไป



#### 4.5 การศึกษาการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด (synergistic effect)

##### 4.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution

การศึกษารูปแบบของการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของสารสองกลุ่ม คือ สารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท (CCM + SA) และสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตท (CCM + SL) ในการต้านจุลินทรีย์ และฆ่าจุลินทรีย์ไฮโซเลทที่ทำให้เกิดเสื่อมเสียในเส้นขนมเงินสด และจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ ด้วยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC/MFC) เพื่อหาสมบัติการเสริมฤทธิ์กันของสารทั้งสองกลุ่มที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ด้วยวิธี broth microdilution assay และพิจารณาการเสริมฤทธิ์กันด้วยวิธีการคำนวณหาค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (fractional inhibition concentration index, FIC index) (Davidson & Parish., 1989) โดยค่า FIC index สามารถอธิบายได้ด้วย synergy หมายถึง การเสริมฤทธิ์กัน, partial synergy หมายถึง การเสริมฤทธิ์กันบางส่วน, indifference หมายถึง แสดงฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว, และ antagonism หมายถึง แสดงฤทธิ์ต้านกัน

โดยผลของการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท (CCM + SA) ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท (CCM + SA) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ	MIC (มก./มล.)		MBC/MFC (มก./มล.)	
	CCM	SA	CCM	SA
<i>B. cereus</i>	0.25	6.25	0.98	25
<i>Brevibacillus</i> sp.	0.06	1.56	1.95	50
<i>B. pumilus</i>	0.25	6.25	1.95	50
<i>S. aureus</i>	0.49	12.5	1.95	50
<i>E. coli</i>	1.95	50	>7.81	>200
<i>C. tropicalis</i>	0.25	6.25	0.98	25
<i>P. occidentalis</i>	0.25	6.25	0.98	25

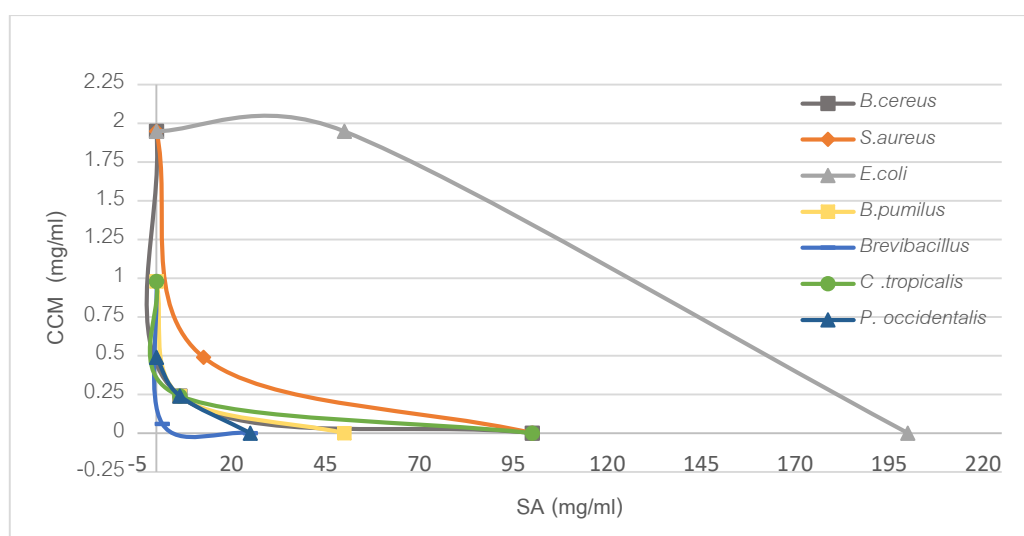
จากผลการทดลองพบว่าการใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท ในการยับยั้ง จุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เกิดเสื่อมเสียในเส้นขนมจิ้นสด และจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.06-1.95 และ 1.56-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าค่า MBC/MFC อยู่ระหว่าง 0.98->7.81 และ 25->200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E.coli* มีค่า MIC เท่ากับ 1.95 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่า MBC เท่ากับ >7.81 และ >200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยแบคทีเรียแกรมลบสามารถต้านทานต่อสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท ได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกและกลุ่มยีสต์และรา นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการเสริมฤทธิ์กันของสาร โดยการคำนวณค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (fractional inhibition concentration index, FIC index) ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท ดังแสดงผลในตารางที่ 4.9

**ตารางที่ 4.9** ค่า FIC index ของสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท (CCM + SA) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อทดสอบ	CCM + SA	
	FIC index	แปลผล
<i>B. cereus</i>	0.186	synergy
<i>Brevibacillus</i> sp.	0.122	synergy
<i>B. pumilus</i>	0.370	synergy
<i>S. aureus</i>	0.375	synergy
<i>E. coli</i>	1.25	indifference
<i>C. tropicalis</i>	0.308	synergy
<i>P. occidentalis</i>	0.373	synergy

จากการศึกษาโดยการคำนวณค่า FIC index ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่ามีค่า FIC index อยู่ระหว่าง 0.122-1.25 โดยทุกเชื้อทดสอบให้ค่า FIC index น้อยกว่า 0.5 ซึ่งหมายความว่า การแสดงฤทธิ์ร่วมกันของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตทเป็นแบบเสริมฤทธิ์กัน (synergy) ยกเว้น ในเชื้อ *E. coli* ให้ค่า FIC index มากกว่า 1 ซึ่งหมายความว่าฤทธิ์ร่วมกันของสารเคอร์คูมินและไซเดียมอะซิเตทเป็นแบบไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference)

นอกจากนี้ยังสามารถแสดงผลในรูปแบบของกราฟ synergistic effect ได้ ซึ่งเป็นการใช้ค่า MIC ของสารเคอร์คูมิน ไฮเดียมอะซิเตท และสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไฮเดียมอะซิเตทในการสร้างกราฟ เพื่อวิเคราะห์ผลของการเสริมฤทธิ์กันของสารเคอร์คูมินร่วมกับไฮเดียมอะซิเตทต่อจุลินทรีย์ทดสอบ และพบว่าจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดให้ผลเสริมฤทธิ์กัน (synergy) ยกเว้นในเชื้อ *E. coli* ดังแสดงรูป 4.10



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงผลการเสริมฤทธิ์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไฮเดียมอะซิเตท (CCM + SA)

โดยวิเคราะห์จากค่า MIC ของสารต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

โดยผลของการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับไฮเดียมแกลกเตต (CCM + SL) ดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตต (CCM + SL) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ	MIC (มก./มล.)		MBC/MFC (มก./มล.)	
	CCM	SL	CCM	SL
<i>B. cereus</i>	0.25	6.29	0.98	25.14
<i>Brevibacillus</i> sp.	0.12	3.14	0.25	6.29
<i>B. pumilus</i>	0.25	6.29	0.98	25.14
<i>S. aureus</i>	0.25	6.29	0.98	25.14
<i>E. coli</i>	0.98	25.14	3.91	100.57
<i>C. tropicalis</i>	0.12	3.14	0.98	25.14
<i>P. occidentalis</i>	0.25	6.29	0.98	25.14

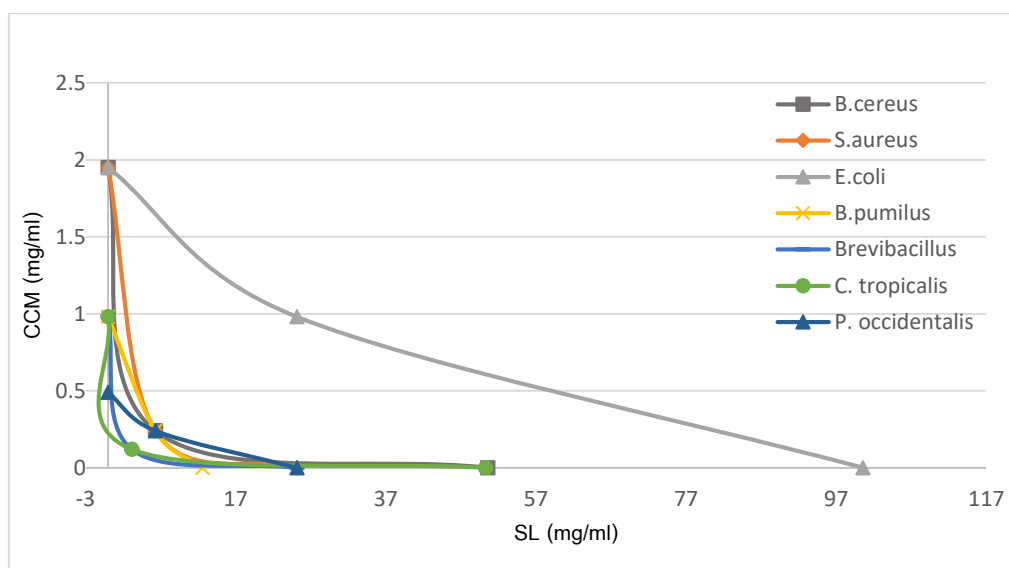
จากผลการศึกษาพบว่าการใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตตในการยับยั้งจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เกิดเสียมเสียมในเส้นขนมจีนสด และจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีค่า MIC อยู่ระหว่าง 0.12-0.98 และ 3.14-25.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่ามีค่า MBC/MFC อยู่ระหว่าง 0.25-3.91 และ 6.29-100.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* มีค่า MIC เท่ากับ 0.98 และ 25.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่า MBC เท่ากับ 3.91 และ 100.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีความต้านทานต่อสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตต มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และกลุ่มยีสต์และรา นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการเสริมฤทธิ์กันของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตตโดยการคำนวณค่าดัชนีสัดส่วนความเข้มข้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (fractional inhibition concentration index, FIC index) ของสารทั้งสองชนิด ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ค่า FIC index ของสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตต (CCM + SL) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อทดสอบ	CCM + SL	
	FIC index	แปลผล
<i>B. cereus</i>	0.248	synergy
<i>Brevibacillus</i> sp.	0.247	synergy
<i>B. pumilus</i>	0.370	synergy
<i>S. aureus</i>	0.373	synergy
<i>E. coli</i>	0.75	partial synergy
<i>C. tropicalis</i>	0.153	synergy
<i>P. occidentalis</i>	0.248	synergy

การคำนวณค่า FIC index ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตตต่อจุลินทรีย์ทดสอบ พบว่ามีค่า FIC index อยู่ระหว่าง 0.153-0.75 โดยทุกเชื้อทดสอบให้ค่า FIC index น้อยกว่า 0.5 ซึ่งหมายความว่าฤทธิ์ร่วมกันของสารเคอร์คูมินและไซเดียมแลกเตต ซึ่งแสดงผลเป็นเสริมฤทธิ์กัน (synergy) ยกเว้น ในเชื้อ *E. coli* ให้ค่า FIC index อยู่ในช่วง 0.5-0.75 หมายความว่าฤทธิ์ร่วมกันของสารเคอร์คูมินและไซเดียมแลกเตต เป็นเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergy)

นอกจากนี้ยังสามารถแสดงผลในรูปแบบของกราฟ synergistic effect ได้ ซึ่งเป็นการใช้ ค่า MIC ของสารเคอร์คูมิน ไซเดียมแลกเตต และสารผสมระหว่างเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตตในการสร้างกราฟ เพื่อวิเคราะห์ผลของการเสริมฤทธิ์กันของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตตต่อจุลินทรีย์ทดสอบ และพบว่าจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิดให้ผลเสริมฤทธิ์กัน (synergy) ยกเว้น ในเชื้อ *E. coli* ให้ผลเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergy) ดังแสดงในรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงผลการเสริมฤทธิ์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตต (CCM + SL) โดยวิเคราะห์จากค่า MIC ของสารต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

นอกจากนี้ยังพบว่ามิงงานวิจัยหลายงานที่ศึกษาการใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับสารในกลุ่มอื่นๆ เช่น สาร พฤษเคมี หรือยาปฏิชีวนะ ได้แก่การศึกษาของ Sharma, Raturi, Dang, Gupta, & Gabrani (2014) ได้ศึกษาการเสริมฤทธิ์กันระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับสารพฤษเคมี ได้แก่ กรดเอลลาจิก (ellagic acid), ยูจีนอล (eugenol) และซินนามาลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) ในการยับยั้งเชื้อ *S. epidermidis* พบว่าสารผสมระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับกรดเอลลาจิก และยูจีนอล ให้ผลเป็น additive ในขณะที่สารผสมระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับซินนามาลดีไฮด์ ให้ผลเป็น synergy แต่ยังไม่มีการศึกษาการเสริมฤทธิ์กันของสารเคอร์คูมินร่วมกับสารควบคุมความเป็นกรด เพื่อใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์

จากข้อมูลของผลการศึกษาผลของการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ของสารทั้งสองกลุ่มพบว่าการใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมอะซิเตท มีค่า MIC ที่เสริมฤทธิ์กัน เมื่อเทียบกับสารเดี่ยวพบว่ามีการใช้สารเคอร์คูมินและไซเดียมอะซิเตทในปริมาณความเข้มข้นที่ลดลง โดยพิจารณาร่วมกับการคำนวณค่า FIC index พบว่าสารดังกล่าวเสริมฤทธิ์กันอย่างชัดเจนในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด ยกเว้น *E. coli* ซึ่งให้ค่า FIC index ที่ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference) ซึ่งแสดงถึงการไม่เสริมฤทธิ์กันของสารเคอร์คูมินและไซเดียมอะซิเตท และประกอบกับผลของค่า MBC ของสารเคอร์คูมินและไซเดียมอะซิเตท พบว่าค่า MBC ที่แสดงไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ ( $>7.81$  และ  $>200$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในขณะที่สารเคอร์คูมินและ

ไซโตเดียมแล็กเทต ก็แสดงผลของค่า MIC แบบเสริมฤทธิ์เช่นเดียวกัน และเมื่อพิจารณาร่วมกับการคำนวณค่า FIC index พบว่ามีการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด แต่ทั้งนี้ *E. coli* จะให้ผลของค่า FIC index แบบเสริมฤทธิ์กันบางส่วน (partial synergy) และมีค่า MBC อยู่ในช่วงที่สามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้ ดังนั้นจากข้อมูลที่พบบ่งชี้ว่า สารผสมที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดคือ สารเคอร์คูมินร่วมกับไซโตเดียมแล็กเทต จึงได้เลือกสารดังกล่าวไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

#### 4.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี broth microdilution โดยกำหนดความเข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่

ศึกษาผลของการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับไซโตเดียมแล็กเทต (CCM + SL) กำหนดความเข้มข้นของไซโตเดียมแล็กเทตคงที่ ในการทดสอบฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (MIC) และและค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ (MBC/MFC) ไอโซเลทที่ทำให้เกิดเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด และจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ ด้วยวิธี broth microdilution assay ซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซโตเดียมแล็กเทตโดยกำหนดความเข้มข้นของไซโตเดียมแล็กเทตคงที่ (CCM + SL) ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์ทดสอบ	MIC (มก./มล.)		MBC/MFC (มก./มล.)	
	CCM	SL	CCM	SL
<i>B. cereus</i>	0.0076	25.14	0.12	25.14
<i>Brevibacillus sp.</i>	0.03	12.57	0.06	12.57
<i>B. pumilus</i>	0.06	6.29	0.12	6.29
<i>S. aureus</i>	0.03	12.57	0.12	12.57
<i>E. coli</i>	0.24	100.57	3.91	100.57
<i>C. tropicalis</i>	0.03	25.14	0.49	25.14
<i>P. occidentalis</i>	0.015	12.57	0.49	12.57

จากผลการศึกษาการใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับไซโตเดียมแล็กเทต โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของไซโตเดียมแล็กเทตคงที่ มีค่าเท่ากับความเข้มข้นที่ลดลงครึ่งหนึ่งของค่า MIC ของการใช้ไซโตเดียม

แล็กเทตเดี่ยว มีค่าอยู่ในช่วง 6.29-100.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ไอโซเลทที่ทำให้เกิดเสื่อมเสียในเส้นขนมจีนสด และจุลินทรีย์ก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบ พบว่ามีค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารเคอร์คูมินอยู่ระหว่าง 0.0076-0.24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.06-3.91 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า การกำหนดให้ความเข้มข้นของโซเดียมแล็กเทตคงที่ สามารถลดค่า MIC ของสารเคอร์คูมินได้เมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของการใช้สารเคอร์คูมินเดี่ยวในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ โดยค่า MIC ของ *B. cereus*, *Brevibacillus* sp., *B. pumilus*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. tropicalis*, และ *P. occidentalis* ลดลงถึง 25, 32, 16, 65, 8, 32 และ 32 เท่าตามลำดับ

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Inés Schelegueda et al. (2012) ได้ศึกษาผลการเสริมฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของไคโตซาน (chitosan), โซเดียมแล็กเทต (sodium lactate), ไนซิน (nisin) หรือโพแทสเซียมซอร์เบต (potassium sorbate) ต่อแบคทีเรียประจำถิ่นในปลา ได้แก่ *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *S. putrefaciens*, *L. plantarum* และ *L. innocua* พบว่าสารผสมระหว่างไคโตซานร่วมกับโซเดียมแล็กเทต แสดงผลเป็น synergy ในทุกเชื้อทดสอบ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบสูงสุด ในขณะที่สารผสมระหว่างโพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับโซเดียมแล็กเทตแสดงผลเป็น synergy ในทุกเชื้อยกเว้น *L. plantarum* ที่แสดงผลเป็น no interaction

ดังนั้นการศึกษากการใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแล็กเทต ซึ่งการใช้สารทั้งสองชนิดร่วมกัน โดยกำหนดค่าโซเดียมแล็กเทตให้คงที่ ซึ่งมีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของค่า MIC ของการใช้โซเดียมแล็กเทตเดี่ยว พบว่าสามารถลดความเข้มข้นของการใช้สารทั้งสองตัวลงได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเดี่ยว

#### 4.6 การประเมินผลของเส้นขนมจีนสดต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแล็กเทต

การศึกษาค้นคว้าขององค์ประกอบในเส้นขนมจีนสดต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแล็กเทต โดยอาศัยการติดตามเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ในตัวอย่างเส้นขนมจีนที่ไม่เติมสารต้านจุลินทรีย์และตัวอย่างที่เติมสารต้านจุลินทรีย์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับค่า MBC (*E. coli*) ที่ประเมินได้จากข้อ 4.3.2 เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของจำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้นในช่วงเวลาที่ 0, 24, 48, 72 และ 120 ในชุดตัวอย่าง ประกอบด้วยชุดตัวอย่างควบคุม (CT), ชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินและโซเดียมแล็ก



เขต (CT\_CS), ชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินและโซเดียมแลกเตตและเติมเชื้อ *Brevibacillus* sp. และ *C. tropicalis* (CS\_BreviC) โดยประเมินในรูปแบบของการศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ที่ตรวจวัดในเส้นขนมจีนเพื่อหาค่าอัตราการเจริญ คือ ค่า K (growth rate) จากสมการต่อไปนี้ (Maier, Pepper, & Gerba, 2009)

$$\log_{10}N_2 - \log_{10}N_1 = K (t_2 - t_1) / 2.303 \quad (2)$$

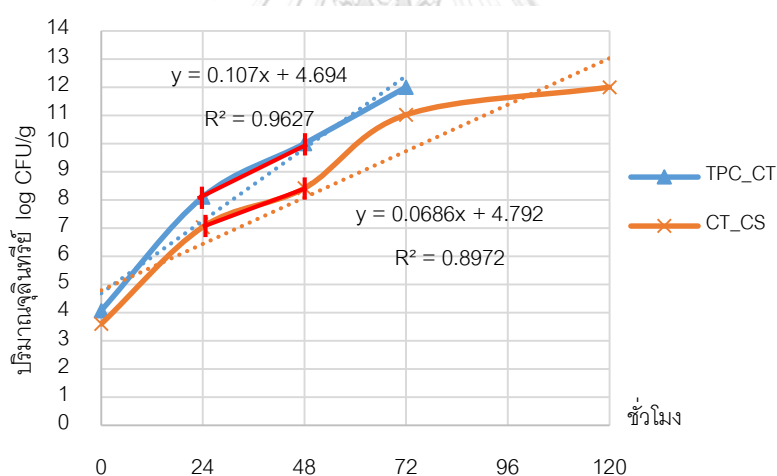
ประเมินฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเตตและเติมเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* (CS\_ES) โดยตรวจวัดจำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้น

เบื้องต้นเมื่อประเมินผลจากการเติมสารเคอร์คูมินที่ละลายใน DMSO ร่วมกับโซเดียมแลกเตต ในปริมาณความเข้มข้นเท่ากับค่า MBC ของเชื้อที่ทนต่อสารมากที่สุดจากการทดสอบ คือ *E.coli* เพื่อใช้ในการประเมินผลของขององค์ประกอบในเส้นขนมจีนสดต่อฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสาร โดยมีปริมาณความเข้มข้นของสารเคอร์คูมินและโซเดียมแลกเตต เท่ากับ 3.91 และ 100.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างเส้นขนมจีนสด 1 กรัม ตามลำดับ เมื่อเติมสารลงในเส้นขนมจีนสดพบการเกิดตะกอนของสารเคอร์คูมินและแบ็งเกาะที่เส้นขนมจีน ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารเคอร์คูมินทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของอาหาร (food matrix) และทำให้ปริมาณของสารเคอร์คูมินที่เป็นสาร active compound ในการฆ่าเชื้อ อาจมีค่าลดลงกว่าค่า MBC ที่ประเมินในระบบหลอดทดลอง และอาจส่งผลต่อการแสดงฤทธิ์ของสารเคอร์คูมินในเส้นขนมจีนสด โดยที่สารคงเหลือหลังการทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของอาหารแล้วจะเป็นตัวที่แสดงฤทธิ์ในการฆ่า ยับยั้ง หรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ในระบบ เนื่องด้วยเคอร์คูมินเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยาหรือเกิดพันธะกับสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตประเภทต่างๆ ได้ พบว่าการเกิดปฏิกิริยาอาจมาจากรูปแบบพันธะชนิดอ่อน (weak bonds) เช่น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) โดยพันธะไฮโดรเจนจะเกิดขึ้นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ของสารประกอบประเภทฟีนอลิกและออกซิเจนอะตอมของพันธะ glycosidic (glycosidic linkage) ของสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต หรือมาจากพันธะโควาเลนต์ (covalent bonds) ระหว่างกรดฟีนอลิก (phenolic acids) และสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต (Jakobek, 2015) นอกจากนี้ยังพบว่า

สารประกอบฟีนอลิกสามารถเกิดปฏิกิริยากับแป้ง รวมทั้งสามารถเกิด complexes กับอะไมโลส (amylose) (Cohen, Orlova, Kovalev, Ungar, & Shimoni, 2008) ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้ เช่นเดียวกับการเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่างโปรตีนและพอลิฟีนอล (Weerawatanakorn, 2013) ดังนั้นเมื่อประเมินฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต้านจุลินทรีย์ที่เติมในเส้นขนมจีนพบการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของสารต่อจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ ดังต่อไปนี้

#### 4.6.1 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแล็กเตตต่อจุลินทรีย์รวม

ผลการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของจำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นทุก 24 ชั่วโมง ของตัวอย่างควบคุม (TPC\_CT) และตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแล็กเตต (CT\_CS) ดังแสดงในรูปที่ 4.12 และแสดงค่าที่วิเคราะห์ได้ในตารางที่ 4.13



รูปที่ 4.12 การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่วง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ในชุดตัวอย่างควบคุม (TPC\_CT) และชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแล็กเตต (CT\_CS)

การคำนวณหาค่า K จากสูตร

$$K_{\text{TPC\_CT}} = (10.0 - 8.1) \times 2.303 / (48-24) = 0.1825 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$$

$$K_{\text{TPC\_CT\_CS}} = (8.4 - 7.0) \times 2.303 / (48-24) = 0.1343 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$$

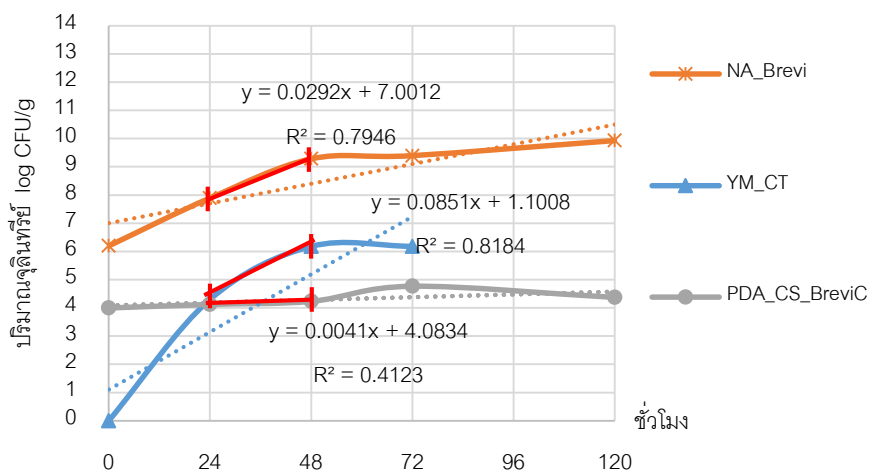
**ตารางที่ 4.13** ค่าวิเคราะห์จากกราฟในชุดตัวอย่างควบคุม (TPC\_CT) และชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเทต (CT\_CS)

ตัวอย่าง	R <sup>2</sup>	K (ชั่วโมง <sup>-1</sup> )
TPC_CT	0.9627	0.1825
TPC_CT_CS	0.8972	0.1343

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์รวม ที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมหรือปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตเส้นขนมจีนสด โดยพิจารณาจากอัตราการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่ตรวจวิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง โดยการเลือกช่วงค่าที่ใช้ในการคำนวณค่า K เลือจากช่วงที่จุลินทรีย์มีการเจริญแบ่งตัวแบบทวีคูณ (exponential phase) โดยพิจารณาจากเส้นกราฟที่แสดงการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลา พบว่าค่า K ในชุดตัวอย่างควบคุม มีค่าเท่ากับ 0.1825 ชั่วโมง<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.9627) และในขณะที่ชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเทตมี ค่าต่ำกว่า คือ 0.1343 ชั่วโมง<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.8972) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าในชุดตัวอย่างที่เติมสารต้านจุลินทรีย์นั้น สารเคอร์คูมินและ/หรือไซเดียมแลกเทตที่เหลืออยู่ยังส่งผลกระทบต่อการยับยั้งจุลินทรีย์จุลินทรีย์รวมที่ปนเปื้อนในเส้นขนมจีนสด โดยสามารถชะลอการเจริญหรือชะลอการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าประมาณ 1.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

#### 4.6.2 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเทตต่อจุลินทรีย์ที่ทำให้เสื่อมเสียในเส้นขนมจีน

ในการประเมินฤทธิ์การยับยั้ง *Brevibacillus* sp. (NA\_Brevi) และ *C. tropicalis* (PDA\_CS\_BreviC) ของสารต้านเชื้อในเส้นขนมจีนสด และวิเคราะห์ฮีสต์และรารวมในตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อดังกล่าว (YM\_CT) และแสดงผลดังรูปที่ 4.13 และตารางที่ 4.14



รูปที่ 4.13 การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่วง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ในชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ *Brevibacillus* sp. (NA\_Brevi) และ *C. tropicalis* (PDA\_CS\_BreviC) และวิเคราะห์ยีสต์และราวมในตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ (YM\_CT)

การคำนวณหาค่า K จากสูตร

$$K_{NA\_Brevi} = (9.28 - 7.89) \times 2.303 / (48-24) = 0.1324 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$$

$$K_{YM\_CT} = (6.18 - 4.3) \times 2.303 / (48-24) = 0.1800 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$$

$$K_{PDA\_CS\_BreviC} = (4.23 - 4.13) \times 2.303 / (48-24) = 0.0096 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$$

ตารางที่ 4.14 ค่าวิเคราะห์จากกราฟของชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ *Brevibacillus* sp. (NA\_Brevi) และ *C. tropicalis* (PDA\_CS\_BreviC) และวิเคราะห์ยีสต์และราวม ในชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ (YM\_CT)

ตัวอย่าง	R <sup>2</sup>	K (ชั่วโมง <sup>-1</sup> )
NA_Brevi	0.7946	0.1324
YM_CT	0.8184	0.1800
PDA_CS_BreviC	0.4123	0.0096

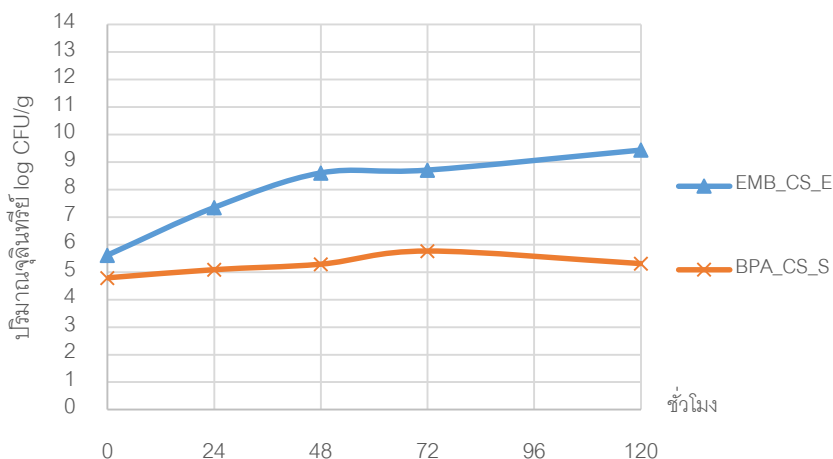
พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อ *Brevibacillus* sp. และ *C. tropicalis* ในเส้นขนมจีนที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเทต มีค่า K เท่ากับ เท่ากับ 0.1324 ชั่วโมง<sup>-1</sup> และ 0.096 ชั่วโมง<sup>-1</sup> ตามลำดับ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญของเชื้อดังกล่าวกับจุลินทรีย์รวม ที่ประเมิน

จากข้อ 4.6.1 และอัตราการเจริญของยีสต์และรารวม พบว่า ค่า K ของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีค่าต่ำกว่าจุลินทรีย์รวม ซึ่งการลดลงของค่า K ของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในเส้นขนมจีนบ่งชี้ได้ว่า สารที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดของเคอร์คูมิน และหรือไซเตียมแลกเทตที่เหลืออยู่ยังมีปริมาณเพียงพอที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์อย่างน้อยที่ระดับ MIC โดยค่า MIC ที่แสดงถึงการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Brevibacillus* sp. ได้มากกว่า 1 log CFU/g (Udekwu, Parrish, Ankomah, Baquero, & Levin, 2009) กล่าวคือ การเจริญแบบปกติของจุลินทรีย์ในชุดตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมสาร จุลินทรีย์จะเจริญได้ถึง 4 log CFU/g ภายในเวลา 24 ชั่วโมงแรก แต่เมื่อพิจารณาในตัวอย่างที่เติมสาร พบว่าการเจริญเพิ่มขึ้นเพียง 1 log CFU/g ที่เวลาเดียวกัน ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าเกิดจากฤทธิ์การยับยั้งของสารที่เติมลงไป ซึ่งสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ได้มากกว่า 3 log CFU/g เช่นเดียวกับ ค่า MIC เชื้อ *C. tropicalis* ที่แสดงการยับยั้งการเจริญได้มากกว่า 1 log CFU/g โดยพบว่าการเจริญของจุลินทรีย์ในสภาวะปกติ พบการเจริญเพิ่มขึ้นถึง 4 log CFU/g ภายในเวลา 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างที่เติมสาร พบว่าการเจริญเพิ่มขึ้นน้อยกว่า 1 log CFU/g (0.13 log CFU/g) ที่เวลาเดียวกัน นอกจากนี้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.2.2 พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นจุลินทรีย์หลักที่พบในขนมจีนสดที่เสื่อมเสีย ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดน่าจะเป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่สามารถเจริญได้ดีในเส้นขนมจีน โดยเฉพาะ *Brevibacillus* sp. เมื่อพิจารณาจลนพลศาสตร์การเจริญเมื่อเติมในเส้นขนมจีนสดที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่า ค่า K ของ *Brevibacillus* sp. มีค่าใกล้เคียงกับค่า K ของจุลินทรีย์รวมที่ตรวจวัดได้ในเส้นขนมจีนที่เติมสารเช่นกัน (0.1343) ซึ่งช่วยบ่งชี้ถึงบทบาทของ *Brevibacillus* sp. ได้ว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวน่าจะเป็นจุลินทรีย์หลักชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของขนมจีนเส้นสด ซึ่งจลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวในเส้นขนมจีนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคำนวณปริมาณ active compound ของสารยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บของเส้นขนมจีนสด

#### 4.6.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทตต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในเส้นขนมจีน

มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ใช้แบบจำลองในการทำนายเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารพบว่า จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารนั้นเสื่อมเสียจะมีการเจริญเติบโตหรือเพิ่มจำนวนในอาหารอย่างรวดเร็วกว่าจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารซึ่งมากไม่เพิ่มจำนวนในอาหาร (European Food Safety Authority, 2016) ดังนั้นในการประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารในตัวอย่างเส้นขนมจีนสดจึงบ่งชี้ด้วยการเปลี่ยนแปลงจำนวน

เซลล์ที่มีชีวิตที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เติมลงในตัวอย่าง โดยประเมินผลของชุดตัวอย่างที่เติมเชื้อ *E. coli* (EMB\_CS\_E) และ *S. aureus* (BPA\_CS\_S) ดังแสดงในรูปที่ 4.14



**รูปที่ 4.14** การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่วง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ในชุดตัวอย่างที่เติมเชื้อ *E. coli* (EMB\_CS\_E) และ *S. aureus* (BPA\_CS\_S)

เมื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างนมจืดที่เติมเซลล์ที่มีชีวิตในรูปแบบของเซลล์สด *E. coli* และ *S. aureus* และเติมสารในปริมาณเท่ากับค่า MBC ของ *E. coli* พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดย *E. coli* จำนวนเพิ่มขึ้นจากค่าเริ่มต้นประมาณ 1.5 log cfu/g ในเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่จำนวน *S. aureus* ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญใน 48 ชั่วโมงแรก แต่จะเพิ่มจำนวนขึ้นในชั่วโมงที่ 72 ผลที่พบดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าสารต้านจุลินทรีย์ที่เติมในนมจืดไม่แสดงฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อจุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้เสื่อมเสียนั้นพบว่าสารดังกล่าวยังคงแสดงฤทธิ์ต้านในระดับ MIC อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่า MIC ของสารในการยับยั้ง *S. aureus* ในการทดสอบในหลอดทดลองพบว่ามีค่าเท่ากับ MIC ของจุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ซึ่งการลดลงของฤทธิ์ต้าน *S. aureus* ของสารจะบ่งชี้ได้ว่าสารที่ซึ่งเป็น active compound ในการยับยั้ง *S. aureus* กับสารจุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้เน่าเสียน่าจะไม่ใช่สารเดียวกัน และมีความเป็นไปได้ที่สารดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของเส้นนมจืดและมีปริมาณเหลือน้อยกว่าระดับ MIC ที่ยับยั้ง *S. aureus* ในกรณีของ *E. coli* พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีการเพิ่มจำนวนในนมจืดซึ่งบ่งชี้ได้ว่าปริมาณสารที่เติมในเส้นนมจืดลดลงต่ำกว่าระดับ MIC ของ *E. coli* เช่นเดียวกันและข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นว่า *E. coli* สามารถปรับตัวและเจริญในนมจืดเส้นสดได้ดี

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในอาหารในแต่ละชนิดจุลินทรีย์พบว่าสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเตตที่เติมลงไปในเส้นขนมจีนที่ระดับ MBC ของ *E. coli* สารดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบเส้นขนมจีนสด ทำให้ปริมาณลดลง และไม่แสดงฤทธิ์ bactericidal หรือ fungicidal effect ได้ แต่พบว่ายังคงปริมาณสารที่เป็น active compound ที่ยังคงฤทธิ์ยับยั้งหรือช่วยชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (inhibitory effect) ในระดับใกล้เคียงกับค่า MIC ของจุลินทรีย์รวม และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของขนมจีน แต่ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบ คือ *E. coli* และ *S. aureus* โดยทั่วไปการประยุกต์ใช้ด้านจุลินทรีย์ในอาหาร มักเติมในปริมาณความเข้มข้นที่มากกว่าค่า MBC ของสารนั้น 10 เท่า เพราะสารสกัดอาจสูญสลายไปในระหว่างกระบวนการได้ (Holzapfel, 2002; Leroy & De Vuyst, 2004) ดังนั้นในการประยุกต์ใช้สารเคอร์คูมินในเส้นขนมจีนสด เนื่องจากสมบัติของสารเคอร์คูมินที่ ทำปฏิกิริยากับคาร์โบไฮเดรตในเส้นขนมจีนสด จึงต้องประเมินผลขององค์ประกอบต่อการลดลงของฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดเพื่อใช้ในการทำนายปริมาณสารเคอร์คูมินที่ต้องเติมเพื่อให้คงฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ช่วงกว้างอยู่ได้ จากการทดลองสามารถทำนายการสูญสลายของสารเคอร์คูมินเมื่อเติมลงในเส้นขนมจีน พบว่าสารเคอร์คูมินลดลงประมาณ 100 เท่า ซึ่งเมื่อคำนวณกลับเป็นปริมาณที่ให้ค่า MBC แล้วพบว่าปริมาณที่ต้องเติมสูงกว่าแนวทางปฏิบัติทั่วไป คือ 10 เท่า ในขณะที่เดียวกันการเติมสารให้มีปริมาณมากจนถึงระดับ excess อาจไม่ใช่วิธีการที่เหมาะสมในกรณีของสารเคอร์คูมินและเส้นขนมจีน เนื่องจากเหตุผลเรื่องของการเกิดปฏิกิริยา รสชาติ และสี อย่างไรก็ตามสารเคอร์คูมินเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์แบบกว้าง ทั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และโดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของขนมจีนได้ดี จึงมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้

ปริมาณสารที่เติมในเส้นขนมจีนที่แสดงฤทธิ์ด้านจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลองนี้ สามารถใช้เป็นแนวทางในการเตรียมสารเพื่อให้คงปริมาณสารที่ต้องการในเส้นขนมจีนได้ โดยต้องปรับเปลี่ยนวิธีการเตรียมสารให้เหมาะสม เช่น การเตรียมสารเคอร์คูมินในรูปแบบที่ไม่ทำปฏิกิริยากับประกอบของอาหาร เช่น ลดการจับกับสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต หรืออาจจะทำในรูปแบบของสารอิมัลชัน (emulsion) หรือนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) นอกจากนี้จากข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สารสกัดจากแหล่งอื่นๆ ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกในอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต หรืออาหารที่มีองค์ประกอบคล้ายกันต่อไปได้

#### 4.6.4 สมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของเส้นขนมจีนสดที่เติมสารเคอร์คูมินและไซเตียมแลกเทต (วันที่ 1)

จากการศึกษาสมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของตัวอย่างควบคุม (CT) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินและไซเตียมแลกเทต (CS) ในวันที่ 1 ดังที่แสดงในตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 สมบัติทางด้านกายภาพและเคมีของชุดตัวอย่างควบคุม (CT) และชุดตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต (CS) ในวันที่ 1

ชุด ตย.	ค่าสี			ค่าความ เหนียว	ค่าความ เป็นกรด- ด่าง	ฤทธิ์ต้าน อนุมูลอิสระ
	L*	a*	b*	กรัม.แรง	pH	%inhibition
CT	68.70±0.90	-0.95±0.11	0.50±0.21	51.73±1.08	5.89±0.07	2.14±0.13
CS	51.57±0.37	17.60±0.42	28.25±0.12	63.14±0.57	6.88±0.02	88.32±0.35

\* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

พบว่าค่าสี ซึ่งเป็นสมบัติทางกายภาพที่สำคัญชนิดหนึ่งของอาหารและมีอิทธิพลต่อความพึงพอใจของผู้บริโภค โดยในตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต มีค่า L\* เท่ากับ 68.7±0.90 และ 51.57±0.37 ตามลำดับ มีค่า a\* เท่ากับ -0.95±0.11 และ 17.60±0.42 ตามลำดับ และมีค่า b\* เท่ากับ 0.50±0.21 และ 28.25±0.12 ตามลำดับ โดยการเติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต มีผลต่อค่าสีในแต่ละค่า (L\* a\* b\*) ของตัวอย่างมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ค่า L\* เป็นค่าความสว่างของตัวอย่างเส้นขนมจีน (มีค่าอยู่ในช่วง 0-100 โดยถ้า L\* มีค่ามากแสดงว่าตัวอย่างมีความสว่างมาก) ค่า a\* เป็นค่าของสีเขียวและสีแดง (-a\* แสดงค่าสีเขียวและ +a\* แสดงค่าสีแดง) ค่า b\* เป็นค่าสีที่แสดงถึงสีเหลืองและน้ำเงิน (-b\* แสดงค่าสีน้ำเงิน และ +b\* แสดงค่าสีเหลือง) (ชลธิชา มณีเชษฐา ญัฐมา เหล่ากุลดิกลง และนันทินา ดำรงวัฒนกุล, 2559) จากการวิเคราะห์ค่า L\* ของตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินและไซเตียมแลกเทต พบว่ามีความสว่างลดลง และค่า a\* เพิ่มขึ้นแสดงถึงการมีสีเป็นสีแดงมากกว่าสีเขียว และค่า b\* เพิ่มขึ้น บ่งบอกถึงมีค่าสีเหลืองมากกว่าสีน้ำเงิน เนื่องจากสารเคอร์คูมินที่ใส่มีสีเหลืองเข้ม จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าสีในตัวอย่างดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่ 4.15





รูปที่ 4.15 เส้นขนมจีนที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต

จากผลการทดลองวัดเนื้อสัมผัส โดยการวัดแรงที่ทำให้เส้นขนมจีนขาดออกจากกัน พบว่าตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต มีค่าการความเหนียวเท่ากับ  $51.73 \pm 1.08$  และ  $63.14 \pm 0.57$  ตามลำดับ เส้นขนมจีนเติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต ถ้าใช้แรงดึงมากแสดงว่ามีความเหนียวมาก (Pansakhorn & Langkapin, 2018) ซึ่งค่าการความเหนียวที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) โดยค่าที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะสารเคอร์คูมินที่เติมลงไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบหลักในอาหารและอาจส่งผลต่อโครงสร้างของเส้นขนมจีนได้ ซึ่งอาจจะทำให้มีความเหนียวเพิ่มมากขึ้นได้ (Lim, Park, Ghafoor, Hwang, & Park, 2011) และเมื่อพิจารณาในส่วนของคุณค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่า pH) พบว่าตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเตียมแลกเทต มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ  $5.89 \pm 0.07$  และ  $6.88 \pm 0.02$  ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าทั้งสองตัวอย่างมีค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เนื่องจากสารเคอร์คูมินและไซเตียมแลกเทต มีฤทธิ์เป็นด่าง โดยทำการวัดค่าของสารเคอร์คูมินและไซเตียมแลกเทต พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ  $7.2 \pm 0.17$  และ  $7.5 \pm 0.08$  ตามลำดับ จึงทำให้ตัวอย่างเส้นขนมจีนมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงขึ้น ส่วนฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่าตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินและไซเตียมแลกเทต มีค่า %inhibition เท่ากับ  $2.14 \pm 0.13$  และ  $88.32 \pm 0.35$  ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างควบคุมไม่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่ตัวอย่างที่เติมสารเคอร์คูมินและไซเตียมแลกเทต มีค่าของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง ซึ่งเป็นผลมาจากสารเคอร์คูมิน ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสารต้านอนุมูลที่มีประสิทธิภาพ (Carvalho, Takeuchi, Geraldine, Moura, & Torres, 2015)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารเคอร์คูมินด้วยเทคนิค HPLC และ TLC พบว่ามีองค์ประกอบหลัก คือ เคอร์คูมิน (curcumin) และมีองค์ประกอบรอง คือ ดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) และบิสดีเมท็อกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) โดยสารเคอร์คูมินเป็น active compound ที่สำคัญ มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่ดี

จากการศึกษาสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ของเส้นขนมจีนสด พบว่าเส้นขนมจีนมีอายุการเก็บรักษาเพียง 1 วัน โดยเกิดการเสื่อมเสียเมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินกว่า 6 log CFU/g และพบว่าสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียของเส้นขนมจีนสด คือ แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ (spore former bacteria) ได้แก่ *Brevibacillus* sp., *Bacillus* spp. (*B. pumilus* และ *B. cereus*) นอกจากนี้ยังพบยีสต์และราที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย ได้แก่ *P. occidentalis* และ *C. tropicalis* จึงนำมาใช้ในการศึกษาหาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ในการทดลองต่อไป

เมื่อศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion ด้วยสารเคอร์คูมิน พบว่ามีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ที่ทำให้เส้นขนมจีนเสื่อมเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค (*S. aureus* และ *E. coli*) ที่ความเข้มข้นของสารสกัดระหว่าง 4.88 ถึง 78.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีขนาดของ inhibition zone ในช่วง  $7.87 \pm 0.06$  ถึง  $11.20 \pm 0.20$  มิลลิเมตร แต่ไม่พบฤทธิ์ต้าน *E. coli* และเมื่อพิจารณาจากค่า MIC และค่า MBC/MFC ของสารเดี่ยว คือ เคอร์คูมิน, โซเดียมอะซิเตท และโซเดียมแลกเตต พบว่ามีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.49-3.90, 25-200 และ 12.57-200.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่า MBC/MFC ในช่วง 1.95-7.81, 50->200 และ 50.29->201.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จากการตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารผสมพบว่า มีฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect) ยกเว้นการใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมอะซิเตท ที่ให้ผล indifference กับจุลินทรีย์ทดสอบ *E. coli* โดยสารผสมมีประสิทธิภาพที่สุด คือ การใช้สารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเตต เมื่อทำการศึกษาต่อโดยการกำหนดความเข้มข้นของแลกเตตให้คงที่ พบว่าสามารถลดค่า MIC และ MBC ของสารเคอร์คูมินลงได้มากกว่าหรือเท่ากับครึ่งหนึ่งของการใช้สารเดี่ยว

จากผลการประเมินผลของเส้นขนมจีนสดต่อฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเตต พบว่าเมื่อเติมลงไป在线ขนมจีนที่ระดับ MBC ของ *E. coli* สารดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบเส้นขนมจีนสด ทำให้ปริมาณลดลง และไม่แสดงฤทธิ์ bactericidal หรือ

fungicidal effect ได้ แต่ยังคงแสดงฤทธิ์เป็น inhibitory effect ในจุลินทรีย์รวม และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของขนมจีน โดยพิจารณาร่วมกับการคำนวณค่า K (growth rate) แต่ทั้งนี้พบว่าไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบ คือ *E. coli* และ *S. aureus* เมื่อทำการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี กายภาพของตัวอย่างที่เติมสารเทียบกับตัวอย่างควบคุมในวันที่ 1 พบว่าการเติมสารเคอร์คูมินร่วมกับไซเดียมแลกเตต มีผลต่อค่าสีในแต่ละค่า ( $L^* a^* b^*$ ), ค่า pH และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ส่วนค่าความเหนียว ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

### ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ เป็นเพียงโมเดลในการทดลองเบื้องต้น หากต้องการนำไปใช้ในระดับนอกห้องปฏิบัติการหรือในระดับที่ใหญ่ขึ้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการเตรียมสารเคอร์คูมิน โดยปกติการประยุกต์ใช้สารสกัดจากธรรมชาติมักเติมลงในอาหาร โดยเติมลงในปริมาณที่มากกว่าความเข้มข้นที่ต้องการ 10 เท่า เนื่องจากสารอาจสูญเสียได้ แต่ทั้งนี้พบว่าการเติมสารเคอร์คูมินในปริมาณที่มากถึง 100 เท่าในเส้นขนมจีนสด อาจจะไม่ใช่วิธีที่ควรปฏิบัติ เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของสารเคอร์คูมินทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของเส้นขนมจีนสด อาจจะต้องเตรียมสารให้มีความคงตัวหรือเตรียมสารในรูปแบบอิมัลชัน (emulsion) หรือนาโนอิมัลชัน (nanoemulsion) ที่อยู่ในรูปที่เสถียร และสามารถละลายน้ำได้ เพื่อให้สารแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ข้อมูลดังกล่าวเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สารสกัดจากแหล่งธรรมชาติอื่นๆ ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารในกลุ่มฟีนอลิกร่วมกับอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต หรืออาหารที่มีองค์ประกอบคล้ายกันต่อไปได้

รายการอ้างอิง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## รายการอ้างอิง

- กมลทิพย์ เอกธรรมสุทธิ. (2557). การปรับปรุงเนื้อสัมผัสของขนมจีนแป้งสดโดยใช้แป้งข้าวโพด. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 45(2).
- กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2549). หลักปฏิบัติเทคโนโลยีการผลิตที่สะอาด (การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและการป้องกันมลพิษ) สำหรับอุตสาหกรรมรายสาขาแป้งขนมจีน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://php.diw.go.th/ctu/files/pdf/12%20COP\\_%20Fermented%20Rice%20Noodle%202006.pdf](http://php.diw.go.th/ctu/files/pdf/12%20COP_%20Fermented%20Rice%20Noodle%202006.pdf) [1 มิถุนายน 2561]
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2551). ความเสี่ยงในการบริโภคอาหารปรุงสุก. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://rmscns.dmsc.moph.go.th> [23 ธันวาคม 2559]
- กระทรวงสาธารณสุข. (2544). ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 237 (พ.ศ. 2544) เรื่อง อาหารที่ผลิตหรือพร้อมบริโภคที่บรรจุในภาชนะพร้อมจำหน่ายได้ทันที. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 118 ตอนพิเศษ 82 ง. (ลงวันที่ 22 สิงหาคม พ.ศ.2544).
- กระทรวงสาธารณสุข. (2559). ประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 381 (พ.ศ. 2559) เรื่อง วัตถุเจือปนอาหาร. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 133 ตอนพิเศษ 82 ง. (ลงวันที่ 20 ธันวาคม พ.ศ. 2559).
- กาญจนา ซาหอม. (2556). การตรวจหาแบคทีเรีย *Vibrio spp.* ในอาหารโดย RT-PCR และ PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.
- ชลธิชา มณีเชษฐา ธีรัฐณา เหล่ากุลดิกลง และนันทินา ดำรงวัฒนกุล. (2559). การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ต้นแบบขนมจีนเสริมโปรตีน และธาตุเหล็กด้วยน้ำปู. เทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม, 11(1), 67-76.
- ชัชวาลย์ ช่างทำ. (2560). คุณประโยชน์และฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายของสมุนไพรขมิ้นชัน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, (2), 94-109.
- ไชยวรรณ วัฒนจันทร์, สุธา วัฒนสิทธิ์, & อรุณพร อธิรัตน์. (2553). ผลการเสริมสารสกัดหยาบจากขมิ้นชันในอาหารไก่กระทงต่อสมรรถภาพการเติบโตลักษณะซากและคุณภาพเนื้อ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 31(3), 199-210
- ณรงค์ นิยมวิทย์. (2528). ขนมจีน. วารสารอาหาร, 15(3).

- ณัฐกิตติ คำปา , วัฒนชัย สัปทน, กันตพิชญ์ ศรีคำ, วิลาวรรณ เรือนสิทธิ์, เกียรติศักดิ์ ภูดีทิพย์ และ  
 นลิน วงศ์ขัตติยะ. (2559). การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีวะจากเส้นขนมจีนสดในอำเภอ  
 สันทราย จังหวัดเชียงใหม่. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา  
 แห่งชาติ ครั้งที่ 38. มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก.
- พะเนตร อุฤทธิ์. (2560). การเพิ่มมูลค่าและประสิทธิภาพการหมักแป้งขนมจีนโบราณจากข้าว  
 อินทรีย์ของเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกด้วยสารสกัดฟรีไบโอติกจากรากบัว.  
 นครสวรรค์: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.
- นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์. (2555). การตรวจสอบแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัสออเรีย  
 สด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 1, 121-126.
- พรเทพ เต็มรังษี. (2554). ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเชื้อที่แยกจากแผลติดเชื้อ.  
 (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (การแพทย์แผนไทยประยุกต์)). มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์,  
 กรุงเทพมหานคร.
- พิชัย วาสนาส่ง. (2543). ช้างคริว. กรุงเทพฯ: สีดา.
- มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.๕๐๐/๒๕๔๗). (2547). ขนมจีน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:  
[http://tcps.tisi.go.th/pub/tcps500\\_47.pdf](http://tcps.tisi.go.th/pub/tcps500_47.pdf) [24 ธันวาคม 2559]
- มูลนิธิเพื่อผู้บริโภค. (2559). การตรวจพบสารกันบูดในผลิตภัณฑ์ขนมจีน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:  
<http://www.consumerthai.org/> [22 ธันวาคม 2559]
- ลัญญณ์ฐู ภาตะนันท์. (2551). การศึกษาศักยภาพของสถานประกอบการผลิตเส้นขนมจีนในการ  
 ปฏิบัติตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร (GMP)(กรณีศึกษาภาคเหนือ).  
 (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต). มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.
- วิไลวรรณ หงอกพิสัย. (2554). ความพร้อมของสถานที่ผลิตขนมจีนในการปฏิบัติตามมาตรฐาน  
 สุขลักษณะทั่วไป. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต), สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ  
 ทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- วีรยา การพานิช. (2554). กรดเบนโซอิก; วัตถุกันเสียที่นิยมใช้ในอาหาร. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:  
<http://www.thaitox.org/media/upload/file/Benzoic-Acid.pdf>. [22 ธันวาคม 2559]
- สถาบันอาหาร. (2554). มีอะไรในขนมจีน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://fic.nfi.or.th/> [24 ธันวาคม  
 2559]

- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2548). การศึกษาวิจัยเศรษฐกิจสมุนไพรไทย กรณีขมิ้นชัน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [http://oldweb.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae\\_baer/download/article/article\\_20100819130157.pdf](http://oldweb.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_baer/download/article/article_20100819130157.pdf) [22 พฤษภาคม 2561]
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2551). ผลสำรวจโรงงานผลิตขมิ้นชัน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://pr.moph.go.th> [23 ธันวาคม 2559]
- สำนักส่งเสริมและสนับสนุนอาหารปลอดภัย. (2559). เชื้อก่อโรค...กับขมิ้นชันแป้งสด. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://www.foodsafety.moph.go.th/> [22 พฤษภาคม 2561]
- สุขภาพชุมชน. (2559). ขมิ้นชันนวัตกรรมใหม่. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.thaihealthycommunity.org/kanom-jeen-new-innovation/> [22 พฤษภาคม 2561]
- สุภรัตน์ ชวนะ, พัชรี ตั้งตระกูล, อรอนงค์ นัยวิกุล, มาลี สุวรรณอรรถ, ลาวัญย์ ไกรเดช, ปราโมทย์ ศิริโรจน์ และ พรเทพ พัฒนานุรักษ์. (2534). การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของแป้งขมิ้นชันในกระบวนการผลิต. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 29 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร.
- สุรางค์รัตน์ คัมภีรยส. (2526). ขมิ้นชัน, ผลิตภัณฑ์จากขมิ้นชันและขมิ้นชันหัว: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.
- สุวิชา ช่างอารินทร. (2537). การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของขมิ้นชันในเขตอำเภอเมืองเชียงใหม่. (ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อำไพวรรณ จวนสัมฤทธิ์ และ ธันยชัย สุระ. (2534). ความรู้พื้นฐานเรื่องเวชพันธุศาสตร์. วารสารโลหิตวิทยา และเวชศาสตร์บริการโลหิต, 1(4).
- Adegoke, G. O., Iwahashi, H., Komatsu, Y., Obuchi, K., & Iwahashi, Y. (2000). Inhibition of food spoilage yeasts and aflatoxigenic moulds by monoterpenes of the spice *Aframomum danielli*. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(3), 147-150.
- A.O.A.C. (2000). *Official method of analysis of the Association of Analytical Chemists International* (17<sup>th</sup> ed.). Virginia.
- A.O.A.C. (2012). *Official method of analysis of the Association of Analytical Chemists International*. Washington DC, USA.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*, 4(6), 807-818.

- Ahern, K., Rajagopal, I., & Tan, T. (2017). Electrophoresis. Retrieved from [https://bio.libretexts.org/TextMaps/Biochemistry/Book%3A\\_Biochemistry\\_Free\\_For\\_All\\_\(Ahern%2C\\_Rajagopal%2C\\_and\\_Tan\)/8%3A\\_Basic\\_Techniques/8.03%3A\\_Electrophoresis](https://bio.libretexts.org/TextMaps/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_For_All_(Ahern%2C_Rajagopal%2C_and_Tan)/8%3A_Basic_Techniques/8.03%3A_Electrophoresis) [28 May 2018]
- Apisariyakul, A., Vanittanakom, N., & Buddhasukh, D. (1995). Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol*, 49(3), 163-169.
- BAM. (2001a). Bacteriological Analytical Manual online. Chapter 3: Aerobic Plate Count. Retrieved from <https://www.fda.gov/> [20 December 2017]
- BAM. (2001b). Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Retrieved from <https://www.fda.gov/> [20 December 2017]
- Bingol, E. B., & Bostan, K. (2007). Effect of sodium lactate on the microbiological quality and shelf life of sausages. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 31(5), 333-339.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*, 13(10), 620-630.
- Carvalho, D. d. M., Takeuchi, K. P., Geraldine, R. M., Moura, C. J. d., & Torres, M. C. L. (2015). Production, solubility and antioxidant activity of curcumin nanosuspension. *Food Science and Technology (Campinas)*, 35(1), 115-119.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., & Banerjee, R. K. (2004). Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Current science-bangalore*, 87, 44-53.
- CLSI, C. L. S. I. (2009). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (19<sup>th</sup> informational supplement ed.). Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute.
- Cocolin, L., Bisson, L. F., & Mills, D. A. (2000). Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), 81-87.



- Cohen, R., Orlova, Y., Kovalev, M., Ungar, Y., & Shimoni, E. (2008). Structural and functional properties of amylose complexes with genistein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(11), 4212-4218.
- Davidson, P. M., & Parish, M. E. (1989). Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol*, 43, 148-155.
- De, R., Kundu, P., Swarnakar, S., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Nair, G. B., & Mukhopadhyay, A. K. (2009). Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(4), 1592-1597.
- European Food Safety Authority. (2016). Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat. *EFSA Journal*, 14(6).
- Gkana, E. N., Doulgeraki, A. I., Chorianopoulos, N. G., & Nychas, G.-J. E. (2017). Anti-adhesion and anti-biofilm potential of organosilane nanoparticles against foodborne pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 1295.
- Gul, P., & Bakht, J. (2015). Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2272-2279.
- Gunes, H., Gulen, D., Mutlu, R., Gumus, A., Tas, T., & Topkaya, A. E. (2013). Antibacterial effects of curcumin: An *in vitro* minimum inhibitory concentration study. *Toxicology and Industrial Health*, 32(2), 246-250.
- Harrison, J. (1938). Numbers and types of bacteria in cheese. *Proceedings of the Society of Agricultural Bacteriologists*, 1(1), 12-14.
- Holzappel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75(3), 197-212.
- Horvath, R. S., & Ropp, M. E. (1974). Mechanism of action of Eosin-Methylene Blue agar in the differentiation of *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*. *International journal of systematic bacteriology*, 24(2).

- Houtsma, P., De Wit, J., & Rombouts, F. (1993). Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 20(4), 247-257.
- Ibrahim, S., K. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18(5), 566-575.
- Inés Schelegueda, L., Gliemmo, M. F., & Campos, C. (2012). Antimicrobial synergic effect of chitosan with sodium lactate, nisin or potassium sorbate against the bacterial flora of fish. *Journal of Food Research*, 1(3).
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567.
- Jayaprakasha, G., Rao, L. J. M., & Sakariah, K. (2005). Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends in Food Science & Technology*, 16(12), 533-548.
- Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L., & Sakariah, K. K. (2002). Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *J Agric Food Chem*, 50(13), 3668-3672.
- Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Codex Alimentarius Commission. (2014). General standard for food additives: CODEX STAN 192-1995. Retrieved from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/gsfa/en> [18 December 2017]
- Joshi, M., & Deshpande, J. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.
- Kanokpornverod, P., Warin, R., Wiwat, C., & Supakdamrongkul, P. (2016). Detection of *Bacillus cereus* in food samples by polymerase chain reaction technique. *Huachiew Chalermprakiet Science and Technology Journal*, 2(1).
- Kantor, A., Petrova, J., Hleba, L., Kluz, M., & Kacaniova, M. (2016). Determination of spoilage yeasts in different red and white wines. *Scientific Papers: Animal Science & Biotechnologies / Lucrari Stiintifice: Zootehnie si Biotehnologii*, 49(2), 57-65.

- Khare, A. K., Biswas, A. K., & Sahoo, J. (2014). Comparison study of chitosan, EDTA, eugenol and peppermint oil for antioxidant and antimicrobial potentials in chicken noodles and their effect on colour and oxidative stability at ambient temperature storage. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 286-293.
- Kulkarni, S., Maske, K., Budre, M., & Mahajan, R. (2012). Extraction and purification of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.). *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology*, 1(2), 81-84.
- Lake, R., Hudson, A., & Cressey, P. (2004). Risk profile: *Bacillus* spp. in rice. Retrieved from New Zealand:
- Lawhavinit, O.-a., Kongkathip, N., & Kongkathip, B. (2010). Antimicrobial activity of curcuminoids from *Curcuma longa* L. on pathogenic bacteria of shrimp and chicken. *Kasetsart Journal-Natural Science*, 44(3), 364-371.
- Lee, W., & Lee, D. G. (2014). An antifungal mechanism of curcumin lies in membrane-targeted action within *Candida albicans*. *IUBMB Life*, 66(11), 780-785.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Li, M., Ma, M., Zhu, K. X., Guo, X. N., & Zhou, H. M. (2017). Critical conditions accelerating the deterioration of fresh noodles: a study on temperature, pH, water content, and water activity. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4).
- Li, S., Yuan, W., Deng, G., Wang, P., Yang, P., & Aggarwal, B. (2011). Chemical composition and product quality control of turmeric (*Curcuma longa* L.). *Pharmaceutical Crops*, 2, 28-54.
- Lim, H. S., Park, S. H., Ghafoor, K., Hwang, S. Y., & Park, J. (2011). Quality and antioxidant properties of bread containing turmeric (*Curcuma longa* L.) cultivated in south korea. *Food Chemistry*, 124(4), 1577-1582.
- Lorian, V. (1996). *Antibiotics In laboratory medicine* (4 ed.). Philadelphia: Williams & Wilkins.
- Lu, Z. H., Peng, H. H., Cao, W., Tatsumi, E., & Li, L. T. (2008). Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria and yeasts from sour mifen, a traditional

- fermented rice noodle from China. *Journal of applied microbiology*, 105(3), 893-903.
- Mahady, G., L Pendland, S., Yun, G., & Z Lu, Z. (2002). *Turmeric (Curcuma longa) and curcumin inhibit the growth of Helicobacter pylori, a group 1 carcinogen* (Vol. 22).
- Maier, R. M., Pepper, I. L., & Gerba, C. P. (2009). *Environmental microbiology* (Vol. 397): Academic press.
- Manyam, S. C., Gupta, D. K., Johnson, K. B., White, J. L., Pace, N. L., Westenskow, D. R., & Egan, T. D. (2006). Opioid-volatile anesthetic synergia response surface model with remifentanil and sevoflurane as prototypes. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 105(2), 267-278.
- Martins, R. M., Pereira, S. V., Siqueira, S., Salomão, W. F., & Freitas, L. A. P. (2013). Curcuminoid content and antioxidant activity in spray dried microparticles containing turmeric extract. *Food Research International*, 50(2), 657-663.
- Mun, S.-H., Joung, D.-K., Kim, Y.-S., Kang, O.-H., Kim, S.-B., Seo, Y.-S., . . . Kweon, K.-T. (2013). Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 20(8-9), 714-718.
- Nahak, D. G., & Sahu, R. (2011). Evaluation of antioxidant activity in ethanolic extracts of five curcuma species. *International Research Journal of Pharmacy*, 2(12), 243-248.
- Nanasombat, S., & Chooprang, K. (2009). Control of pathogenic bacteria in raw pork using organic acid salts in combination with freezing and thawing. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 43(3), 576-583.
- National Center for Biotechnology Information. (2005). PubChem Compound Database; CID=517045. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=517045> [2 June 2018]
- National Center for Biotechnology Information. (2008). PubChem Compound Database; CID=23666456. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/fl.html?cid=23666456> [2 June 2018]

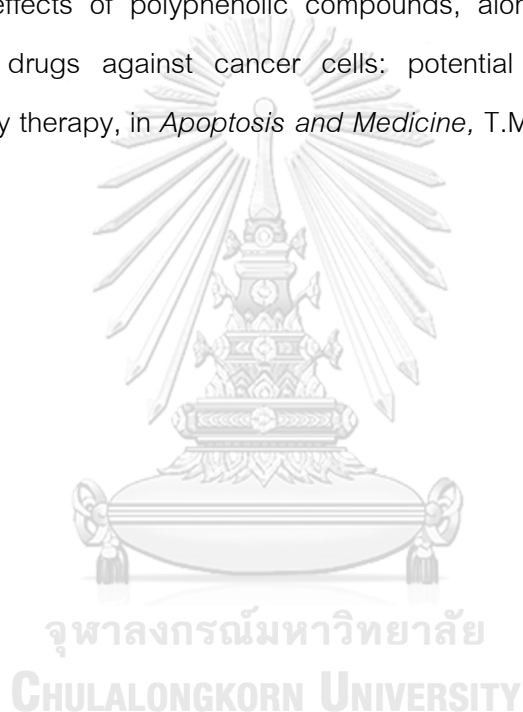
- Panda, A., Bisht, S., De Mandal, S., Senthil Kumar, N., Gurusubramanian, G., & Kumar Panigrahi, A. (2014). *Brevibacillus as a biological tool: A short review* (Vol. 105).
- Parnsakhorn, S., & Langkapin, J. (2018). Effects of drying temperatures on physicochemical properties of germinated brown rice. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 40(1).
- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil, S. (2015). Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Frontiers in microbiology*, 6, 1391.
- Pothitirat, W., & Gritsanapan, W. (2005). Quantitative analysis of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in the crude curcuminoid extract from *Curcuma longa* in Thailand by TLC- densitometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(1-2), 23-30.
- Raina, V. K., Srivastava, S. K., Jain, N., Ahmad, A., Syamasundar, K. V., & Aggarwal, K. K. (2002). Essential oil composition of *Curcuma longa* L. cv. *Roma* from the plains of northern India. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(2), 99-102.
- Ray, B. (2003). *Fundamental food microbiology*. Washington, D.C.: CRC Press LLC
- Sahne, F., Mohammadi, M., Najafpour, G. D., & Moghadamnia, A. A. (2016). Extraction of bioactive compound curcumin from turmeric (*Curcuma Longa* L.) via different routes: a comparative study. *Pak. J. Biotechnol. Vol*, 13(3), 173-180.
- Saulnier, D., De Decker, S., & Haffner, P. (2009). Real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Vibrio aestuarianus* in oyster and seawater: a useful tool for epidemiologic studies. *J Microbiol Methods*, 77(2), 191-197.
- Sharma, G., Raturi, K., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2014). Combinatorial antimicrobial effect of curcumin with selected phytochemicals on *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 16(5), 535-541.
- Silva, E. N. G., Almeida, R. C. C., Figueiredo Ana, C. L., & Miranda, F. A. (2012). Effects of salts of organic acids on the survival of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(9), 1819-1825.

- Siviero, A., Gallo, E., Maggini, V., Gori, L., Mugelli, A., Firenzuoli, F., & Vannacci, A. (2015). Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. *Journal of Herbal Medicine*, 5(2), 57-70.
- Sotome, I., Nei, D., Tsuda, M., Mohammed, S. H., Takenaka, M., Okadome, H., & Isobe, S. (2011). Decontamination effect of milling by a jet mill on bacteria in rice flour. *Biocontrol Sci*, 16(2), 79-83.
- Stanojevic, J. S., Stanojevic, L. P., Cvetkovic, D. J., & Danilovic, B. R. (2015). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the turmeric essential oil (*Curcuma longa* L.). *Advanced technologies*, 4(2), 19-25.
- Tangkham, W., Comeaux, J., Ferguson, C. E., & LeMieux, F. M. (2012). Effect of sodium lactate and sodium acetate on shelf-life of raw chicken breasts. *African Journal of Food Science*, 6(13), 375-380.
- Thompson, R. E., Duncan, G., & McCord, B. R. (2014). An investigation of PCR inhibition using Plexor((R)) -based quantitative PCR and short tandem repeat amplification. *J Forensic Sci*, 59(6), 1517-1529.
- Thongchai, W., Wongkadnon, C., Thongpoon, C., & Srisopa, A. (2011). Analysis of curcuminoids in raw materials and cosmetic products from *Curcuma* spp. *Rajabhat Journal of Sciences, Humanities & Social Sciences*, 12(2).
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryot Microbiol*, 46(4), 327-338.
- Udekwa, K. I., Parrish, N., Ankomah, P., Baquero, F., & Levin, B. R. (2009). Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 63(4), 745-757.
- Unnikrishnan, M. K., & Rao, M. N. (1995). Inhibition of nitrite induced oxidation of hemoglobin by curcuminoids. *Pharmazie*, 50(7), 490-492.
- Wang, Y., Lu, Z., Wu, H., & Lv, F. (2009). Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 71-74.

Weerawatanakorn, M. (2013). Chemical reactions between proteins and polyphenols and human biological consequences of reaction. *Burapha Science Journal*, 18(1), 210-218.

Yu Yongxiang. (2006). Comparison of bioactivities and composition of curcumin-free turmeric (*Curcuma longa* L.) oils from different sources. (Master of Science), Clemson University, SC.

Yuan, B., Imai, M., Kikuchi, H., Fukushima, S., Hazama, S., Akaike, T., . . . Toyo, H. (2012). Cytocidal effects of polyphenolic compounds, alone or in combination with, anticancer drugs against cancer cells: potential future application of the combinatory therapy, in *Apoptosis and Medicine*, T.M. Ntuli, InTech.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**



## ภาคผนวก ก การเตรียมเส้นขนมจีน

### ก.1 การเตรียมเส้นขนมจีนสด

ดัดแปลงจากวิธีการของ ณรงค์ นิยมวิทย์ (2528)

#### วัสดุ

1. แป้งข้าวเจ้า
2. แป้งมัน
3. น้ำต้มสุก

#### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง balance 0.01-3100 กรัม (Mettler, NewClassic MF, Switzerland)
2. เครื่อง stand mixers and attachments (5K5SSWH, Kitchenaid, USA)
3. เครื่อง hotplate (IF-404, Imarflex, China)

#### วิธีทำ

1. ชั่งแป้งข้าวเจ้า 100 กรัม ผสมกับน้ำต้มสุก 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนวดให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปั้นแป้งเป็นก้อนกลม (น้ำหนักก้อนละประมาณ 45 กรัม) โดยที่ผิวภายนอกของก้อนแป้งต้องไม่แห้งและแฉะจนเกินไป
2. นำก้อนแป้ง ไปต้มหรือึ่งให้สุกเฉพาะผิวรอบนอก โดยทำให้แป้งสุกลึกเข้าไปประมาณ 1-2 เซนติเมตรของก้อนแป้ง เพื่อไม่ให้แป้งเหนียวมากเกินไป
3. นำก้อนแป้งที่ได้ไปนวดต่อในเครื่องนวด เพื่อให้แป้งดิบและแป้งสุกที่ผ่านขั้นตอนการทำให้สุกเป็นบางส่วนผสมเข้าด้วยกัน ระหว่างการนวดให้เติมแป้งมัน 20 กรัม โดยสังเกตเนื้อแป้งขณะนวด หากแป้งแห้งมากให้ผสมน้ำร้อน หากแป้งเหนียวติดกันมากให้ผสมแป้งดิบ นวดผสมจนได้แป้งเนื้อเนียน ไม่มีเม็ดแป้ง ใช้เวลาในการนวดประมาณ 10 นาที
4. นำไปโรยเส้นด้วยเครื่องโรยเส้น การโรยเส้นจะโรยลงในหม้อใส่น้ำตั้งไฟที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส เมื่อโรยเส้นลงหม้อต้มแล้ว ให้พยายามรักษาความร้อนให้คงที่ และรอก่อนว่าเส้นขนมจีนจะลอยตัวจึงใช้ตะแกรงตักขึ้นมา แล้วพักเส้นในน้ำเย็น
5. จับเส้นขนมจีนที่แช่อยู่ในน้ำเย็น วิธีจับเส้นขนมจีนทำโดยใช้มือจับขนมจีนขึ้นมาจากน้ำเรียงเส้นขนมจีนให้เป็นเส้นซ้อนกันโดยให้เรียงกันประมาณ 7-8 เส้น แล้วพันเส้นขนมจีน ที่นิ้วชี้

หรือนิ้วหัวแม่มือ ให้เส้นขนมจิ้นห้อยลงมาตามขนาดของจับที่ต้องการวางขนมจิ้นในลักษณะคว่ำ  
มือลงในภาชนะ ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ เก็บในถุงพลาสติก เพื่อจะนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป



## ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ

### ข.1 ค่าสีของเส้นขนมจีน

1. นำตัวอย่างเส้นขนมจีนมาวัดค่าสีด้วยเครื่อง Chroma meter (Model CR-400 series, Minolta, Japan) บันทึกค่า  $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$  (ระบบ CIELAB) หลังจากเปิดเครื่องต้องทำการตั้งค่ามาตรฐานของเครื่องโดยใช้จานเทียบสีดำ และสีขาวก่อนการใช้งานทุกครั้ง

โดยค่า  $L^*$  แสดงถึง ค่าความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0-100

0 แสดงถึง สีดำ

100 แสดงถึง สีขาว

ค่า  $a^*$  แสดงถึง ค่าสีแดงและเขียว (redness/greenness)

$+a^*$  แสดงถึง สีแดง

$-a^*$  แสดงถึง สีเขียว

ค่า  $b^*$  แสดงถึง ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (yellowness/blueness)

$+b^*$  แสดงถึง สีเหลือง

$-b^*$  แสดงถึง สีน้ำเงิน

### ข.2 ค่าความเหนียวของเส้นขนมจีน

วัดค่าความเหนียวค่าของเส้นขนมจีนด้วยเครื่อง texture analyzer (TA.XT plus, Stable Micro systems, UK)

1. หัวดึงชนิด noodle tensile grips (A/SPR) นำเส้นขนมจีนที่ต้องการทดสอบพันรอบหัวดึง 2-3 รอบ

2. ตั้งค่าโปรแกรม measure force in tension, กำหนดให้ระยะ grips ห่างกัน 30 มิลลิเมตร ค่าความเร็ว test speed: 3.0 มิลลิเมตรต่อวินาที, post-test speed: 10.0 มิลลิเมตรต่อวินาที ระยะทางในการดึง 100 มิลลิเมตร ใช้แรงในการดึง 5 กรัม

3. วัดตัวอย่างและบันทึกผลการทดลอง

**ภาคผนวก ค**  
**วิธีวิเคราะห์ทางเคมี**

**ค.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเคอร์คูมินด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)**

ดัดแปลงตามวิธีการ Jayaprakasha et al. (2002)

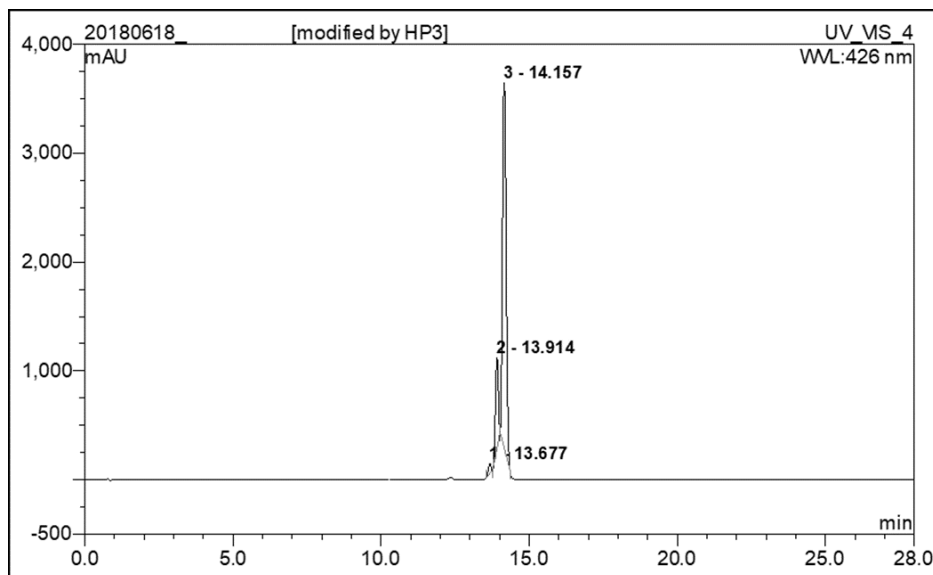
**วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน**

1. ชั่งสารมาตรฐานเคอร์คูมิน 5 มิลลิกรัม ละลายด้วยเอทานอล 10 มิลลิลิตร
2. บีบสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 กรองผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.22 ไมครอน ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC
3. เมื่อฉีดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน เข้าเครื่อง HPLC เครื่องจะทำการตรวจวัดวิเคราะห์และประมวลผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ ดังนี้
  - คอลัมน์ C<sub>18</sub> VertiSep™ UPS 4.6 x 50 มิลลิเมตร, 3 ไมครเมตร
  - อัตราเร็ว 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที
  - วัฏภาคเคลื่อนที่ คือ น้ำ (Milli-Q® water) ผสมกับอะซิโตนไนด์รล์ (acetonitrile) วิเคราะห์ด้วยระบบ gradient elution โดยมีรายละเอียดแสดงในตารางที่ ค.1.1
  - เครื่องตรวจวัด diode array detector (DAD) และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร

**ตารางที่ ค.1.1 วัฏภาคเคลื่อนที่ด้วยระบบ gradient elution โดยใช้เทคนิค HPLC**

ระยะเวลา (นาที)	น้ำ (Milli-Q®)	Acetonitrile
0-3	80	20
20	20	80
25	20	80
25.1	80	20
28	80	20

จากการฉีดสารละลายมาตรฐานเคอร์คูมิน เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่า  
 หน่วงเวลา (retention time) ที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ ค.1.1



รูปที่ ค.1.1 โครมาโทแกรม HPLC ของสารมาตรฐานเคอร์คูมิน ที่ความยาวคลื่น 426 นาโนเมตร

## ค.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ตามวิธีการของ A.O.A.C (2000)

### อุปกรณ์และเครื่องมือ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. เครื่อง pH meter (Mettler toledo, Switzerland)
2. กระดาษกรอง Whatman NO.45
3. magnetic stirrer

### วิธีการวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัมเติมน้ำปราศจากไอออน 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 1 นาที
2. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO.45
3. นำส่วนที่ผ่านการกรองไปวัดค่า pH

ค.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay  
ดัดแปลงจากวิธีของ Khare, Biswas, and Sahoo (2014)

### อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, Genesys 10 UV, USA)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler, NewClassic MF, Switzerland)
3. กระดาษกรอง Whatman NO.45

### สารเคมี

1. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma Aldrich, USA)
2. Methanol (CH<sub>3</sub>OH) (Fisher Scientific, UK)

### วิธีการเตรียมสารละลาย DPPH

1. ชั่ง DPPH มา 0.001 กรัม ละลายในเอทานอล 10 มิลลิลิตร เติลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยเอทานอล จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ DPPH เท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลาย DPPH ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 5 วัน

### การเตรียมตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างเส้นขนมจีนที่ต้องการวิเคราะห์ 5 กรัม บดผสมกับเอทานอล 20 มิลลิลิตร
2. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO.45

### วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างที่กรองได้มา 1 มิลลิลิตรผสมกับ 1 มิลลิลิตรของสารละลาย DPPH ที่เตรียมไว้ข้างต้น ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
2. วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความยาวคลื่นแสง 517 นาโนเมตร ใช้เอทานอลเป็นตัวอย่างอ้างอิง และวัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง
3. คำนวณและรายงานค่าจากสมการ %Radical Scavenging =  $[(AB - AA) / AB] \times 100$   
เมื่อกำหนดให้ AA = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารตัวอย่างผสมกับ DPPH  
AB = ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของสารละลาย DPPH

## ภาคผนวก ง

### วิธีวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

#### ง.1 การตรวจหาปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยวิธีการ pour plate

ตามวิธีของ BAM (2001a)

#### วัสดุ

1. ตัวอย่างนมจืด 5 ตัวอย่าง

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Sodium chloride (Univar, Australia)
2. Plate Count Agar (Himedia, India)

#### วิธีการวิเคราะห์

##### เตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ละลาย sodium chloride 0.85 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่งอาหาร Plate Count Agar 23.50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

#### การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อที่ใช้สำหรับตีปนอาหาร
2. เติมสารละลาย sodium chloride ความเข้มข้น 0.85 % ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุง
3. ตีปนด้วยเครื่องตีปนอาหาร (stomacher) ด้วยความเร็วปานกลาง นาน 2 นาที (ระดับเจือจาง 1:10 หรือ  $10^{-1}$ )
4. ปิเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$  ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมนลงในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:100 หรือ  $10^{-2}$  ทำการเจือจางต่อจนได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

## การวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว (ตามความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์) มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ
2. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) ที่หลอมเหลว ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เททับลงไปบนตัวอย่างในจานเพาะเชื้อปริมาณ 15-20 มิลลิลิตร
3. เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้ตัวอย่างกระจายตัว ตั้งทิ้งไว้ ปล่อยให้อาหารแข็งตัว
4. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
5. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 25-250 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/g (colony forming unit/gram)

## ง.2 การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา

ตามวิธีของ BAM (2001b)

## วัสดุ

1. ตัวอย่างขนมจีน 5 ตัวอย่าง

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Sodium chloride (Univar, Australia)
2. Potato Dextrose Agar (Himedia, India)
3. Tartaric acid (QReC, New Zealand)

## วิธีการวิเคราะห์

### เตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ละลาย sodium chloride 0.85 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ละลาย tartaric acid 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
3. ชั่ง Potato Dextrose Agar (PDA) 39.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงถึง 45 องศาเซลเซียส ผสมสารละลาย tartaric acid ความ



เข้มข้น 10% ในอัตราส่วน 1: 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว

### การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อที่ใช้สำหรับตบอาหาร
2. เติมสารละลาย sodium chloride ความเข้มข้น 0.85 % ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุง
3. ตบอาหารด้วยเครื่องตบอาหาร (stomacher) ด้วยความเร็วปานกลาง นาน 2 นาที (ระดับเจือจาง 1:10 หรือ  $10^{-1}$ )
4. ปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$  ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลาย 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer เพื่อที่จะได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:100 หรือ  $10^{-2}$  ทำการเจือจางต่อจนได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์

### การวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว (ตามความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์) 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)
2. ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
3. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน
4. นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 25-250 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/g (colony forming unit/gram)

### ง.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR)

ปฏิกิริยาจะประกอบด้วยสารเคมีดังนี้ ดัดแปลงจากวิธีการ Thompson, Duncan, and McCord (2014)

1. 1x tag buffer with KCL
2. deoxynucleotides (dNTPs) 0.1 มิลลิโมลาร์
3. Taq DNA polymerase 2 หน่วย

4. 357F (forward primer) (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') สำหรับแบคทีเรีย 0.1 ไมโครโมลาร์
5. 517R (reverse primer) (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') สำหรับแบคทีเรีย 0.1 ไมโครโมลาร์
6. NL1 (forward primer) (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') สำหรับยีสต์ และรา 0.1 ไมโครโมลาร์
7. LS2 (reverse primer) (5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3') สำหรับยีสต์และรา 0.1 ไมโครโมลาร์
8. DNA template 10-50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
9. แมกนีเซียม คลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) 1.5 มิลลิโมลาร์
10. Water, nuclease-free

สภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยา คือ

- |                         |                          |                    |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|
| 1. Initial denaturation | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 5 นาที    |
| 2. Denaturation         | อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 3. Annealing            | อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 30 วินาที |
| 4. Extension            | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 1 นาที    |
| 5. Final extension      | อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส | เป็นเวลา 4 นาที    |
- ทำซ้ำ ข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ

CHULALONGKORN UNIVERSITY

#### ง.4 การเตรียมอะกาโรส เจลที่ความเข้มข้น 1.5% w/v

1. เตรียมอะกาโรส เจลความเข้มข้น 1.5% โดยชั่งผงอะกาโรส 3 กรัม ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตรและหลอมอะกาโรสโดยใช้เครื่องไมโครเวฟ จนกระทั่งได้สารละลายใส
2. ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายอะกาโรสมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส
3. เตรียมพิมพ์สำหรับใส่เจล นำถาดเจลมาวางบนฐานวางถาดเจล แล้วใส่หัวสับลงบนด้านปลายหัวและท้ายของแผ่นเจล
4. เทสารละลายอะกาโรสลงในพิมพ์ ให้มีความหนาประมาณ 5-6 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีเกิดฟองอากาศ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 30-45 นาที

5. เท 1XTBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าเจล แล้วจึงดึงหัวสับออก
6. เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อบรรจุนำไปใช้ต่อไป

ง.5 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum inhibitory concentration (MIC) และ ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum bactericidal/ fungicidal concentration (MBC/MFC) ของสารเคอร์คูมิน, โซเดียมอะซิเตท และโซเดียมแลกเตต

ดัดแปลงจากวิธีของ Lorian (1996)

#### อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Sodium chloride (Univar, Australia)
2. Mueller Hinton Broth (Himedia, India)
3. Sabouraud Dextrose broth (Himedia, India)
4. Mueller Hinton agar (Himedia, India)
5. Sabouraud Dextrose agar (Himedia, India)

#### วิธีการวิเคราะห์

##### การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ละลาย sodium chloride 0.85 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่ง Mueller Hinton broth 21.00 กรัม และละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ละลายสารเคอร์คูมินที่ความเข้มข้น 31.25 มิลลิกรัม ใน DMSO 1 มิลลิลิตร ดัดแปลงจาก Wang et al. (2009) และ Gunes et al. (2013)
2. ละลายโซเดียมอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 800 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ดัดแปลงจาก Nanasombat and Chooprang (2009)
3. ละลายและโซเดียมแลกเตต ที่ความเข้มข้น 804.59 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ดัดแปลงจาก Nanasombat and Chooprang (2009)

### การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1. เตรียมไอโซเลทแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เคยมีรายงานการตรวจพบในเส้นขนมจีนสด *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Escherichia coli* ATCC25922 ในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไอโซเลทยีสต์และราหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 ในอาหาร Sabouraud Dextrose broth (SDB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
2. นำจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ มาปรับเพื่อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1 \times 10^8$  CFU/ml) และเจือจางเชื้อแบคทีเรียและยีสต์และราให้มีปริมาณ  $1 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^4$  CFU/ml ตามลำดับ

### การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

1. ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MHB สำหรับแบคทีเรีย และ SDB สำหรับยีสต์และรา) ใส่ลงใน 96-well plate หลุมที่ 2-12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร
2. ปิเปตสารละลายเคอร์คูมิน, โซเดียมอะซิเตท หรือโซเดียมแลกเตต ใส่ลงในหลุมที่ 1, 2 และ 11 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการเจือจางสารที่ใช้ทดสอบให้ความเข้มข้นลดลงหลุมละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) ผสมสารทดสอบให้เข้ากันในหลุมที่ 2 จากนั้นปิเปตสารละลายผสมในหลุมที่ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลุมที่ 3 และทำเช่นเดียวกันจนถึงหลุมที่ 10 ในหลุมที่ 10 ให้ปิเปตสารผสมทิ้ง 100 ไมโครลิตร
3. ปิเปตจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/ml สำหรับแบคทีเรีย และ  $1 \times 10^4$  สำหรับยีสต์และ ลงในหลุมที่ 1-10 และ 12 ผสมให้เข้ากันตามลำดับ
4. เตรียมหลุมควบคุม โดยที่หลุมที่ 1 คือ media control หลุมที่ 11 คือ reagent control และ หลุมที่ 12 คือ growth control
5. ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์และรา
6. บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ เป็นค่า MIC โดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ใส ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้

7. นำเชื้อจากที่หุ้มที่ใส่มา streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton agar (MHA) สำหรับแบคทีเรีย นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ Sabouraud Dextrose agar (SDA) สำหรับยีสต์และรา นำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ 99.9% เป็นค่า MBC หรือ MFC

ง.6 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum inhibitory concentration (MIC) และ ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum bactericidal/ fungicidal concentration (MBC/MFC) ของสารผสมระหว่างสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมอะซิเตท และสารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเตต

ดัดแปลงจากวิธีของ Lorian (1996) และ Mun et al. (2013)

#### อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Sodium chloride (Univar, Australia)
2. Mueller Hinton Broth (Himedia, India)
3. Sabouraud Dextrose broth (Himedia, India)
4. Mueller Hinton agar (Himedia, India)
5. Sabouraud Dextrose agar (Himedia, India)

#### วิธีการวิเคราะห์

##### การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ละลาย sodium chloride 0.85 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่ง Mueller Hinton broth 21.00 กรัม และละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

##### การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ละลายสารเคอร์คูมิน และโซเดียมอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 31.25 และ 800 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร

2. ละลายสารเคอร์คูมิน และโซเดียมแลกเทต ที่ความเข้มข้น 31.25 และ 804.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

### การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1. เตรียมไอโซเลทแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เคยมีรายงานการตรวจพบในเส้นขนมจีนสด *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Escherichia coli* ATCC25922 ในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไอโซเลทยีสต์และราหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 ในอาหาร Sabouraud Dextrose broth (SDB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2. นำจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ มาปรับเพื่อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1 \times 10^8$  CFU/ml) และเจือจางเชื้อแบคทีเรียและยีสต์และราให้มีปริมาณ  $1 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^4$  CFU/ml ตามลำดับ

### การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

1. ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MHB สำหรับแบคทีเรีย และ SDB สำหรับยีสต์และรา) ใส่ลงใน 96-well plate หลุมที่ 2-12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร

2. ปิเปตสารเคอร์คูมิน และโซเดียมอะซิเตท หรือสารเคอร์คูมิน และโซเดียมแลกเทต ใส่ลงในหลุมที่ 1, 2 และ 11 ปริมาตรรวมหลุมละ 100 ไมโครลิตร (สารอย่างละ 50 ไมโครลิตร) และทำการเจือจางสารที่ใช้ทดสอบให้ความเข้มข้นลดลงหลุมละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) และผสมสารทดสอบให้เข้ากันในหลุมที่ 2 จากนั้นปิเปตสารละลายในหลุมที่ 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลุมที่ 3 และทำเช่นเดียวกันจนถึงหลุมที่ 10 ในหลุมที่ 10 ให้ปิเปตสารผสมทั้ง 100 ไมโครลิตร

3. ปิเปตจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/ml สำหรับแบคทีเรีย และ  $1 \times 10^4$  สำหรับยีสต์และ ลงในหลุมที่ 1-10 และ 12 ผสมให้เข้ากันตามลำดับ ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร

4. เตรียมหลุมควบคุม โดยที่หลุมที่ 1 คือ media control หลุมที่ 11 คือ reagent control และ หลุมที่ 12 คือ growth control

5. ป่มที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และป่มที่อุณหภูมิต่ำ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์และรา

6. บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ เป็นค่า MIC โดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ใส ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้

7. นำเชื้อจากที่หลุมที่ใสมา streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton agar (MHA) สำหรับแบคทีเรีย นำไปป่มที่อุณหภูมิต่ำ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ Sabouraud Dextrose agar (SDA) สำหรับยีสต์และรา นำไปป่มที่อุณหภูมิต่ำ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ 99.9% เป็นค่า MBC หรือ MFC

ง.7 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum inhibitory concentration (MIC) และ ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ minimum bactericidal/ fungicidal concentration (MBC/MFC) ของสารผสมที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด โดยกำหนดความเข้มข้นของสารควบคุมความเป็นกรดให้คงที่ (สารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเตต)

ดัดแปลงจากวิธีของ Lorian (1996) และ Mun et al. (2013)

#### อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Sodium chloride (Univar, Australia)
2. Mueller Hinton Broth (Himedia, India)
3. Sabouraud Dextrose broth (Himedia, India)
4. Mueller Hinton agar (Himedia, India)
5. Sabouraud Dextrose agar (Himedia, India)

#### วิธีการวิเคราะห์

##### การเตรียมสารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ละลาย sodium chloride 0.85 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิต่ำ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ชั่ง Mueller Hinton broth 21.00 กรัม และละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิต่ำ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ละลายสารเคอร์คูมิน และสารควบคุมความเป็นกรด (สารเคอร์คูมินร่วมกับโซเดียมแลกเทต) ตามที่ประเมินได้ใน 3.5.1 โดยกำหนดความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทตคงที่ ดังแสดงในตารางที่ ง.7.1

ตารางที่ ง.7.1 ความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทตที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่อจุลินทรีย์ทดสอบ

จุลินทรีย์	SL (มก./มล.)	จุลินทรีย์	SL (มก./มล.)
<i>B. cereus</i>	25.14	<i>Brevibacillus</i> sp.	12.57
<i>S. aureus</i>	12.57	<i>C. topicalis</i>	25.14
<i>E. coli</i>	50.29	<i>P. occidentalis</i>	12.57
<i>B. pumilus</i>	6.29		

### การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

1. เตรียมไอโซเลทแบคทีเรียหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 และจุลินทรีย์ก่อโรคที่เคยมีรายงานการตรวจพบในเส้นขนมจีนสด *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Escherichia coli* ATCC25922 ในอาหาร Mueller Hinton broth (MHB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และไอโซเลทยีสต์และราหลักที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียที่คัดแยกได้จากหัวข้อที่ 3.2.2 ในอาหาร Sabouraud Dextrose broth (SDB) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2. นำจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ มาปรับเพื่อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard (มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1 \times 10^8$  CFU/ml) และเจือจางเชื้อแบคทีเรียและยีสต์และราให้มีปริมาณ  $1 \times 10^6$  และ  $1 \times 10^4$  CFU/ml ตามลำดับ

### การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

1. ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MHB สำหรับแบคทีเรีย และ SDB สำหรับยีสต์และรา) ใส่ลงใน 96-well plate หลุมที่ 2-12 หลุมละ 100 ไมโครลิตร

2. ปิเปตสารเคอร์คูมินใส่ลงในหลุมที่ 1, 2 และ 11 สารเคอร์คูมิน ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำการเจือจางสารที่ใช้ทดสอบให้ความเข้มข้นลดหลุมละ 2 เท่า (2-fold serial dilution) แล้วผสมสารทดสอบให้เข้ากันในหลุมที่ 2 จากนั้นปิเปตสารละลายในหลุมที่ 2 ปริมาตร



75 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลุมที่ 3 และทำเช่นเดียวกันจนถึงหลุมที่ 10 ในหลุมที่ 10 แล้วจึงเติมไฮเดียมแลกเทต ตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ ปริมาตรหลุมละ 25 ไมโครลิตรตามลำดับ

3. ปิเปตจุลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้น  $1 \times 10^6$  CFU/ml สำหรับแบคทีเรีย และ  $1 \times 10^4$  สำหรับยีสต์และรา ลงในหลุมที่ 1-10 และ 12 ผสมให้เข้ากัน ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร

4. เตรียมหลุมควบคุม โดยที่หลุมที่ 1 คือ media control หลุมที่ 11 คือ reagent control และ หลุมที่ 12 คือ growth control

5. ป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรีย และป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สำหรับยีสต์และรา

6. บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ เป็นค่า MIC โดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ใส ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ โดยค่า MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้

7. นำเชื้อจากที่หลุมที่ใสมา streak plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Mueller Hinton agar (MHA) สำหรับแบคทีเรีย นำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ Sabouraud Dextrose agar (SDA) สำหรับยีสต์และรา นำไปป่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ 99.9% เป็นค่า MBC หรือ MFC

## ง.8 วิเคราะห์หาจำนวนเชื้อ *Staphylococcus aureus*

ตามวิธีของ A.O.A.C (2012)

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird Parker Agar (Himedia, India)
2. Egg Yolk Tellurite emulsion (Himedia, India)

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่ง Baird Parker Agar 63.00 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 950 มิลลิตร บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 องศาเซลเซียส เติม Egg Yolk Tellurite emulsion ทำ

ให้ผสมเข้ากัน เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว

### วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว (ตามความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์) มา 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird-Parker Agar
2. ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
3. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่มีสีดำ ขอบขาว และวงใส (clear zone) นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 25-250 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/g (colony forming unit/gram)

### ง.9 วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ *Escherichia coli*

ดัดแปลงจาก Horvath & Ropp (1974)

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Eosin Methylene Blue Agar (Himedia, India)

#### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ชั่ง Eosin Methylene Blue Agar 36 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร บรรจุใน flask ปิดด้วยจุกสำลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว

### วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปิดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว (ตามความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์) มา 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar
2. ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
3. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ตรวจสอบลักษณะโคโลนีสีดำเขียวของโลหะ (metallic sheen) นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 25-250 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/g (colony forming unit/gram)

### ง.10 วิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ *Brevibacillus* sp.

ดัดแปลงจากวิธีของ Panda et al. (2014)

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (Himedia, India)

#### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

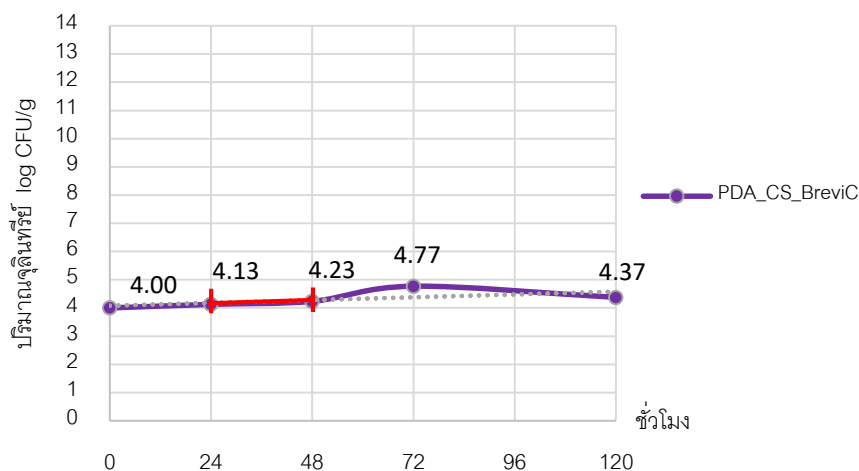
1. ชั่ง Nutrient Agar 28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร บรรจุใน flask ปิดด้วยจุก สาลีหลังจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 องศาเซลเซียส เทลงในจานเพาะเชื้อปริมาณ 15-20 มิลลิลิตร เขย่าหมุนจานเพาะเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายตัวและปล่อยให้อาหารแข็งตัว

#### วิธีวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจางแล้ว (ตามความเข้มข้นที่ต้องการวิเคราะห์) มา 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar
2. ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่ว ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
3. นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. ตรวจสอบลักษณะโคโลนีกลม แบน และมีสีขาวครีม นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในช่วง 25-250 โคโลนี และคำนวณเป็น CFU/g (colony forming unit/gram)

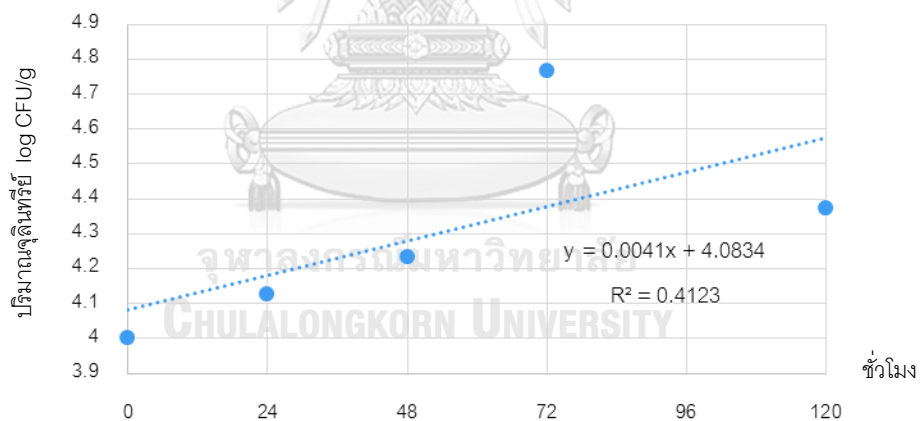
### ง.11 การวิเคราะห์หาค่า R-squared ( $R^2$ ) ของชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสีย (PDA\_CS\_BreviC)

1. กราฟแสดงการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในชั่วโมงต่างๆ ในชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสีย (PDA\_CS\_BreviC)



รูปที่ ง.11.1 การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่อง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง ในชุดตัวอย่างที่เติมสารและเติมเชื้อ (PDA\_CS\_BreviC)

2. ข้อมูลการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในชั่วโมงต่างๆ (log CFU/g) และแสดงค่า R-squared ( $R^2$ ) ที่ได้จาก การคำนวณ (PDA\_CS\_BreviC)



รูปที่ ง.11.2 ค่า R-squared ( $R^2$ ) ที่ได้จาก การคำนวณจากข้อมูลการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในช่อง 0, 24, 48, 72 และ 120 ชั่วโมง (PDA\_CS\_BreviC)

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภาวิตา ชวนไชยสิทธิ์ เกิดวันที่ 25 ธันวาคม 2534 ที่จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกียรตินิยมอันดับ 2) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2556 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2558

ได้นำเสนอผลงานด้วยโปสเตอร์ในหัวข้อผงเคอร์คูมิน: ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อ โรคและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียของขนมจีนเส้นสด (Curcumin powder: Inhibitory activity against pathogenic and spoilage microorganisms associated with fresh rice noodles) ในงานประชุมวิชาการอุตสาหกรรมเกษตรระดับนานาชาติ ประจำปี 2561 (The 20th Food Innovation Asia Conference 2017, FIAC 2017) ภายใต้หัวข้อ Creative Food for Future and Sustainability ระหว่างวันที่ 14-16 มิถุนายน 2561 ณ ศูนย์นิทรรศการ และการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ

ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลย เดชทรงเจริญพระชนมายุครบ ๗๒ พรรษา (H.M. the King Bhumibhol Adulyadej's ๗๒nd Birthday Anniversary Scholarship) และทุนอุดหนุนการทำวิจัย ทุน ๙๐ ปี จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (THE ๙๐th Anniversary of Chulalongkorn University Scholarship)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**