

การใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดง *Hylocereus polyrhizus* ร่วมกับโซเดียมแลกเตตเพื่อการ  
ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและการยืดอายุการเก็บรักษาเค้กสตาร์ดครีม



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 RED DRAGON FRUIT *Hylocereus polyrhizus* PEEL EXTRACT IN COMBINATION  
WITH SODIUM LACTATE FOR PATHOGENIC INHIBITION AND SHELF LIFE EXTENSION OF  
CUSTARD CREAM



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



ทรงพร คำคม : การใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดง *Hylocereus polyrhizus* ร่วมกับโซเดียมแลกเตตเพื่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและการยืดอายุการเก็บรักษาคัสตาร์ดครีม (USE OF RED DRAGON FRUIT *Hylocereus polyrhizus* PEEL EXTRACT IN COMBINATION WITH SODIUM LACTATE FOR PATHOGENIC INHIBITION AND SHELF LIFE EXTENSION OF CUSTARD CREAM) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา, 134 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วน mesocarp ร่วมกับโซเดียมแลกเตตในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและลดการเสื่อมเสียของคัสตาร์ดครีม โดยหาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัด ศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดที่ได้และของโซเดียมแลกเตต ประเมินการเสริมฤทธิ์ของสารผสม และประยุกต์ใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในคัสตาร์ดครีม วัดปริมาณเบต้าไซยานิน สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และองค์ประกอบทางเคมีในสารสกัดด้วยวิธี HPLC วัดสมบัติการต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar well diffusion วิเคราะห์ค่า minimum inhibitory concentrations (MIC) และ minimum bactericidal concentration (MBC) วิเคราะห์ค่าทางเคมี กายภาพและการเจริญของเชื้อผสม (culture cocktail) ที่เติมลงในคัสตาร์ดครีม จากการศึกษาพบว่าการใช้เอทานอลผสมกับน้ำที่อัตราส่วน 50:50 (v/v) ในการสกัดให้ปริมาณเบต้าไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ  $53.80 \pm 1.15$  mg/ 100 g dry wt. และ  $387.67 \pm 26.74$  mgGAE/ 100 g dry wt. ตามลำดับ สารสกัดที่ได้ประกอบด้วย betacyanin, gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, rutin และ pyrogallol มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคมাত্রฐาน ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium* และ *Escherichia coli* มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของฤทธิ์ยับยั้ง (clear zone) อยู่ในช่วง  $2.08 \pm 0.10$ - $21.06 \pm 0.14$  mm และมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 7.81-15.63 mg/mL และ 15.63-250 mg/mL ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของโซเดียมแลกเตต มีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 1.88-7.5% และ 7.5- มากกว่า 30% ตามลำดับ ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตตมีฤทธิ์เสริมกัน (synergistic effect) โดยสารผสมแสดงค่า MIC และ MBC ลดลงจากความเข้มข้นเดิมมากกว่าร้อยละ 50 ใช้อัตราส่วนของสารสกัดต่อโซเดียมแลกเตตต่อคัสตาร์ดครีมที่ 6.25:1:100 ในคัสตาร์ดครีมที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าคัสตาร์ดครีมที่เติมสารผสมมีสมบัติด้านอนุมูลอิสระสูงกว่า มีค่า hardness และ %syneresis ต่ำกว่าคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) จึงทำให้เพิ่มอายุการเก็บรักษาได้มากกว่า 7 วัน และการเติมสารผสมสามารถลดจำนวนของ *B. cereus* และ *S. Typhimurium* ได้ 2.16 และ 2.04 log CFU/g ตามลำดับ แต่ไม่ลดจำนวนของ *S. aureus* และ *E. coli* การใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตสามารถรักษาคุณภาพทางกายภาพและทางเคมี รวมถึงลดอันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค *B. cereus* และ *S. Typhimurium* ในคัสตาร์ดครีมได้

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

# # 5872135023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: RED DRAGON FRUITS (HYLOCEREUS POLYRHIZUS) PEEL / SODIUM LACTATE / SYNERGISTIC EFFECT / CUSTARD CREAM / PATHOGENIC BACTERIA

SONGPORN KUMKOM: USE OF RED DRAGON FRUIT *Hylocereus polyrhizus* PEEL EXTRACT IN COMBINATION WITH SODIUM LACTATE FOR PATHOGENIC INHIBITION AND SHELF LIFE EXTENSION OF CUSTARD CREAM. ADVISOR: SIRIMA PUANGPRAPHANT, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF.CHEUNJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D., 134 pp.

The objective of this research is to evaluate the combined effect of red dragon fruit peel from mesocarp extract and sodium lactate to inhibit pathogenic microorganism and to extend custard cream's shelf life. The research determines the most appropriate solvents for extracting the extract, studies the microorganism inhibition of the extract and sodium lactate, the synergistic effect of both compounds, and application in custard cream. The chemical component of the extract, betacyanin and total phenolic was characterized and determined by HPLC technique. The microorganism inhibition was achieved by agar well diffusion method, minimum inhibitory concentrations (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC). The treated custard cream was evaluated the physical and chemical properties and the growth of added culture cocktail. The most effective extracting solvent was 50 % (v/v) ethanol in water which yielded the extract with the highest betacyanin and total phenolic content of  $53.80 \pm 1.15$  mg/100 g dry wt. and  $387.67 \pm 26.74$  mg GAE/100 g dry wt., respectively. It contained betacyanin, gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, rutin and pyrogallol. It could inhibit standard pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli*, with the mean value of clear zone in the range of  $2.08 \pm 0.10$  mm to  $21.06 \pm 0.14$  mm. The average MIC and MBC of the extract and sodium lactate were 7.18-15.63 mg/ml and 15.63-250 mg/mL, and 1.88-7.5% and 7.5 to more than 30%, respectively. The synergistic effect to microorganism inhibition of the extract and sodium lactate was indicated by MIC and MBC of the mixture were at least 50% less than the individual one. The ratio of the extract, sodium lactate and custard cream at 6.25:1:100 was applied to custard cream kept in 4 °C for 7 days. Treated custard cream had significantly ( $p \leq 0.05$ ) more antioxidant activity but less hardness and %syneresis than the control. Consequently, the shelf life of the custard cream with the extract and sodium lactate was more than 7 days. The extract and sodium lactate addition remarkably reduced *B. cereus* and *S. Typhimurium* by 2.16 and 2.04 log CFU/g, respectively; however, there was no significant inhibition on *S. aureus* and *E. coli*. The red dragon fruit peel extract combined with sodium lactate can maintain physical and chemical properties and inhibit *B. aureus* and *S. Thyphimurium* in custard cream.

Department: Food Technology

Field of Study: Food Technology

Academic Year: 2017

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลงได้โดยการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) และ “กลุ่มวิจัยวิธีทางเคมีสำหรับการประยุกต์ทางอาหาร” และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดีด้วยความกรุณาและการสนับสนุนอย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร. ศิริมา พ่วงประพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สละเวลาในการให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางการแก้ปัญหา และอุปสรรค ให้ข้อคิดในการทำงาน ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดมา รวมถึงให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนิษฐ ปรานีนรรัตน์ และนางสาวมนรวิศ รวยธนพานิช จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการสอนวิเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography) และขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิติพงศ์ อัครกุล, อาจารย์ ดร. สาริศา สุริยรักษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภัทรา ลีลิตชาญ ที่กรุณาเป็นประธานและคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ พร้อมทั้งข้อเสนอแนะต่างๆ อันเป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนนิสิตภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือตลอดมา และที่สำคัญขอขอบคุณนางสาวสุภาวิตา ชวนไชยสิทธิ์ ที่เป็นคู่หูในการทำงาน และให้คำปรึกษาตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัวและญาติ ที่คอยห่วงใย เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนตลอดมา จึงส่งผลให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป .....	ฎ
สารบัญตาราง.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
1.3 วัตถุประสงค์ .....	3
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	4
2.1 แก้วมังกร .....	4
2.2 แก้วมังกรแดง.....	5
2.2.1 คุณค่าทางอาหารของแก้วมังกรแดง.....	6
2.2.2 การใช้ประโยชน์จากแก้วมังกรแดง.....	6
2.3 เปลือกแก้วมังกรแดง.....	6
2.3.1 สารให้สีกลุ่ม Betalain ในเปลือกแก้วมังกรแดง.....	7
2.3.2 โครงสร้างและชนิดของเบต้าไซยานิน.....	9
2.3.3 สมบัติของเบต้าไซยานิน .....	11
2.3.4 เสถียรภาพของเบต้าไซยานิน .....	12
2.3.5 การสกัดสารให้สีในกลุ่ม Betalain .....	17
2.4 สารประกอบฟีนอลิก.....	18

2.4.1	ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ .....	20
2.4.2	ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์.....	21
2.5	โซเดียมแลกเตต .....	25
2.5.1	ความปลอดภัยของโซเดียมแลกเตต .....	25
2.5.2	สมบัติของโซเดียมแลกเตต.....	26
2.5.3	สมบัติการต้านจุลินทรีย์ .....	28
2.6	อันตรกิริยาระหว่างสารต้านจุลชีพ.....	30
2.7	คัสตาร์ดครีม .....	31
2.7.1	การเสื่อมเสียของคัสตาร์ดครีม .....	32
2.7.2	ข้อกำหนดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในคัสตาร์ดครีม.....	34
2.7.3	การศึกษาวิธีการลดการเสื่อมเสียและลดการเจริญของจุลินทรีย์ในคัสตาร์ดครีม .....	34
2.8	ช่องว่างทางวิชาการและสมมติฐานในงานวิจัย.....	35
บทที่ 3	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	36
3.1	วัตถุดิบ สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และอุปกรณ์ .....	36
3.1.1	วัตถุดิบ .....	36
3.1.2	สารเคมี.....	36
3.1.3	อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	37
3.1.4	อุปกรณ์ (เครื่องมือ).....	38
3.2	ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	39
3.2.1	การเตรียมตัวอย่างเปลือกแก้วมังกรแดง .....	39
3.2.2	การศึกษาวิธีการสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงโดยใช้เอทานอลและน้ำ .....	40
3.2.3	การสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและศึกษาสมบัติของสารสกัด .....	41
3.2.4	การระบุชนิดและปริมาณสารองค์ประกอบในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC .....	42



3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของโซเดียมแลกเตต .....	44
3.2.6 การศึกษาผลที่เสริมฤทธิ์กัน .....	44
3.2.7 การศึกษาผลของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตต่อสมบัติ ของคัสตาร์ดครีม .....	46
3.2.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ .....	49
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	50
4.1 การศึกษาวิธีการสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงโดยใช้เอทานอลและน้ำ .....	50
4.1.1 ปริมาณเบต้าไซยานิน .....	50
4.1.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด .....	51
4.1.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ .....	52
4.2 การสกัดสารจากเปลือกแก้วมังกรแดงและศึกษาสมบัติของสารสกัด .....	55
4.2.1 สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี .....	55
4.2.2 การระบุชนิดและปริมาณสารองค์ประกอบในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC .....	58
4.2.3 สมบัติการต้านจุลินทรีย์ .....	61
4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของโซเดียมแลกเตต .....	65
4.4 การศึกษาผลที่เสริมฤทธิ์กัน .....	66
4.5 การศึกษาผลของการใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตต่อสมบัติ ของคัสตาร์ดครีม .....	70
4.5.1 สมบัติทางกายภาพ .....	70
4.5.2 สมบัติทางเคมี .....	74
4.5.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ .....	79
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ .....	87
รายการอ้างอิง .....	89
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ .....	101

ญ

หน้า

ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	104
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพ .....	122
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	134



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

**สารบัญรูป**

รูปที่ 2.1 แก้วมังกรขาว (A) และ แก้วมังกรแดง (B)..... 4

รูปที่ 2.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เบต้ามีลค์ นมพร้อมไขมันรสสารสกัดเปลือกแก้วมังกร..... 7

รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของรงควัตถุให้สีในกลุ่ม Betalain..... 8

รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเบต้าไซยานิน ..... 9

รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ Betanin (A), Phyllocactin (B) และ Hylocerenin (C)..... 10

รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการสลายตัวของ Betanin ในสภาวะต่างๆ..... 13

รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการสลายตัวของ Phyllocactin (A) และ Hylocerenin (B) ในสภาวะต่างๆ ..... 14

รูปที่ 2.8 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก ..... 18

รูปที่ 2.9 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกและความไวต่อจุลินทรีย์ ..... 23

รูปที่ 2.10 เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (a) และแบคทีเรียแกรมบวก (b)..... 24

รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมแล็กเตต..... 26

รูปที่ 2.12 กราฟของอันตรกิริยาระหว่างสารต้านจุลชีพ ..... 30

รูปที่ 2.13 กราฟอันตรกิริยาของสารต้านจุลินทรีย์จากการนำค่า MIC ของสารแต่ละตัวมาแปรความ  
เข้มขึ้น..... 31

รูปที่ 2.14 คัสตาร์ดครีม ..... 31

รูปที่ 3.1 การเตรียมตัวอย่างเปลือกแก้วมังกรแดง ..... 39

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บ ..... 40

รูปที่ 3.3 วิธีการเตรียมสารสกัดและการวิเคราะห์ชนิดเบต้าไซยานิน ..... 43

รูปที่ 3.4 Synergistic Interaction..... 45

รูปที่ 3.5 การเตรียมคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ศึกษา ..... 47

รูปที่ 4.1 ปริมาณเบต้าไซยานินของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่  
แตกต่างกัน.....50

รูปที่ 4.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดจากอัตรา  
ส่วนตัวทำละลายที่แตกต่างกัน..... 52

รูปที่ 4.3 สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง..... 55

รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมสารกลุ่มเบต้าไซยานินของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำที่อัตราส่วน 50:50 (v/v).....	58
รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำที่อัตราส่วน 50:50 (v/v).....	59
รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำที่อัตราส่วน 50:50 (v/v) แบบขยาย ที่ค่าหน่วงเวลา (retention time) 1.00–8.00 นาที.....	59
รูปที่ 4.7 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง.....	60
รูปที่ 4.8 ขนาดบริเวณการยับยั้ง (mm) ของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง.....	61
รูปที่ 4.9 ค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์.....	63
รูปที่ 4.10 เซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (A) และแบคทีเรียแกรมลบ (B).....	64
รูปที่ 4.11 ผลที่เสริมฤทธิ์กันของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเทตจากการ วิเคราะห์ค่า MIC ของสารแต่ละตัวและการใช้สารร่วมกัน.....	67
รูปที่ 4.12 คัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทต (A) และคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (B).....	77
รูปที่ 4.13 ค่าวอเตอร์แอกทีวิตี้ของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับ โซเดียมแลกเทตระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	72
รูปที่ 4.14 การแยกตัวของน้ำของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับ โซเดียมแลกเทตระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	75
รูปที่ 4.15 การแยกตัวของน้ำของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ในวันที่ 3.....	76
รูปที่ 4.16 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g) และปริมาณกรดแลคติก (%) ในคัสตาร์ดครีม ตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	81
รูปที่ 4.17 จำนวน <i>B. cereus</i> ของคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสม ใน ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	83

รูปที่ 4.18 จำนวน <i>S. Typhimurium</i> ของคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสมในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	83
รูปที่ 4.19 จำนวน <i>E. coli</i> ของคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสมในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	84
รูปที่ 4.20 จำนวน <i>S. aureus</i> ของคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสมในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	86



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารอาหารที่พบในผลแก้วมังกรแดงที่มีน้ำหนักประมาณ 100 กรัม (ของส่วนที่รับประทานได้).....	5
ตารางที่ 2.2 ชนิดของเบต้าไซยานินที่พบในเปลือกแก้วมังกร .....	10
ตารางที่ 2.3 ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในเนื้อและเปลือกของแก้วมังกรแดง.....	19
ตารางที่ 2.4 สมบัติของโซเดียมแลกเทต.....	26
ตารางที่ 3.1 สูตรการเตรียมคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมตัวอย่างที่ศึกษา สำหรับการเตรียม 1 กิโลกรัม.....	46
ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่แตกต่างกัน .....	53
ตารางที่ 4.2 สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง.....	56
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC .....	60
ตารางที่ 4.4 เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณการยับยั้ง (mm) ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อแบคทีเรียที่ทดสอบแต่ละสายพันธุ์ .....	61
ตารางที่ 4.5 ค่า MIC และ ค่า MBC ของโซเดียมแลกเทต.....	65
ตารางที่ 4.6 ค่า MIC และ ค่า MBC ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง โซเดียมแลกเทต และสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเทตที่ความเข้มข้นคงที่ต่อแบคทีเรียที่ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ .....	68
ตารางที่ 4.7 ค่าสีของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทต ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน .....	71
ตารางที่ 4.8 ลักษณะเนื้อสัมผัสของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (CT) และคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทต (CT+RD+SL) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน.....	74

ตารางที่ 4.9 ค่า pH และปริมาณกรดแลคติก (%) ของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (CT) และคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตต (CT+RD+SL) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 7 วัน ..... 77

ตารางที่ 4.10 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (CT) และคัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตต (CT+RD+SL) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน..... 78

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ (log CFU/g) ของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) คัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและใส่สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตต ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน..... 80



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในอุตสาหกรรมอาหารมีการนำวัตถุดิบเสียซึ่งเป็นสารเคมีชนิดต่างๆ มาใช้ในอาหาร เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากวัตถุดิบเสียที่ได้จากการสังเคราะห์นั้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันได้มีการตระหนักถึงผลข้างเคียงอันเกิดจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์นำมาซึ่งการศึกษาหาสารทดแทนจากธรรมชาติที่มีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์และมีประโยชน์ด้านอื่นๆ ต่อสุขภาพมาใช้แทนวัตถุดิบเสีย รวมถึงการนำวัตถุดิบอาหารในกลุ่ม GRAS (Generally recognized as safe) ที่มีความปลอดภัยมาใช้ด้วย

แก้วมังกรแดง (*Hylocereus polyrhizus*) เป็นผลไม้เศรษฐกิจของไทย ที่ได้รับความนิยมในการบริโภคและนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทำให้มีเปลือกเหลือทิ้งอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งพบว่าเปลือกแก้วมังกรในส่วนมีโซคาร์บ (mesocarp) มีสารให้สีที่น่าสนใจ คือ Betalain ประเภทเบต้าไซยานิน (betacyanin) ซึ่งเป็นสารจากพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่มีคุณสมบัติต้านจุลินทรีย์แบบกว้าง มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ ต้านมะเร็ง และมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มีสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ดีและให้สีแดงในช่วงค่า pH กว้าง คือตั้งแต่ pH 3-7 จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารให้สี สารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านจุลินทรีย์ ในเครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์จากนม เช่น โยเกิร์ต และนม จากสมบัติของสารสกัดจากธรรมชาติที่ไม่คงตัวและอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีได้ในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นในการนำสารสกัดมาใช้เพียงอย่างเดียวอาจมีประสิทธิภาพไม่ดีเพียงพอ จึงได้มีการนำวัตถุดิบอาหารที่มีความปลอดภัยมาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสกัดดังกล่าว โดยโซเดียมแลกเตต (sodium lactate) เป็นหนึ่งในวัตถุดิบอาหารที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาว่าสามารถใช้เติมลงในอาหารได้อย่างปลอดภัย ได้รับรองว่าเป็น GRAS ไม่จำกัดปริมาณการใช้แต่จะให้ใช้ได้เท่าที่จำเป็น มีคุณสมบัติในการปรับสมดุลกรด-ด่างในอาหาร เป็นสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบเสียในการยืดอายุอาหารได้ รวมถึงช่วยปรับปรุงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหาร เช่น สี เนื้อสัมผัส และกลิ่นรส จึงมีการนำมาใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนและจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบในอาหาร เพื่อยืดอายุการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์และลดอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรคที่พบ

อย่างไรก็ตามจนถึงปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาผลการเติมสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตลงในอาหาร แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจคือการใช้สารสกัดจากพืชร่วมกับวัตถุดิบอาหารชนิด GRAS เพื่อลดปริมาณการใช้วัตถุดิบอาหารและอาจช่วยเสริมฤทธิ์กันในการ



ยับยั้งจุลินทรีย์ที่กว้างขึ้นและคงเสถียรภาพฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืช รวมทั้งช่วยลดความเข้มข้นของสารสกัด เพราะการใช้ในความเข้มข้นสูงอาจทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในการสกัดสารได้ ดังนั้นการนำสารผสมมาใช้ในการลดอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรคและยืดอายุการเก็บรักษาในผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

คัสตาร์ดครีม (custard cream) เป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์จากนม ที่ทำมาจากนมและไข่เป็นหลัก มีองค์ประกอบและสมบัติทางเคมีที่เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (microbial spoilage) ซึ่งสาเหตุการเสื่อมเสียเกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากส่วนประกอบในการผลิตรวมถึงการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic bacteria) ทำให้อาหารมีอายุการเก็บรักษาสั้นและก่อโรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) เมื่อผู้บริโภครับประทานเข้าไปจึงเกิดความไม่ปลอดภัย จึงมีการใช้วัตถุกันเสียเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษา แต่วัตถุกันเสียเหล่านี้ส่งผลเสียต่อสุขภาพและก่อให้เกิดอันตรายหากใช้เกินปริมาณที่กฎหมายกำหนด

งานวิจัยนี้จึงสนใจการใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บร่วมกับโซเดียมแลกเตตเติมลงในคัสตาร์ดครีม เนื่องจากเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์จากนมที่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์และเสื่อมเสียได้ง่าย และการนำโซเดียมแลกเตตมาใช้ร่วมด้วยจากประโยชน์ดังที่กล่าวมา รวมถึงโซเดียมแลกเตตมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มเดียวกับที่พบในคัสตาร์ดครีม ดังนั้นการใช้สารผสมทั้งสองตัวนี้ร่วมกันอาจจะช่วยเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่พบในคัสตาร์ดครีมได้

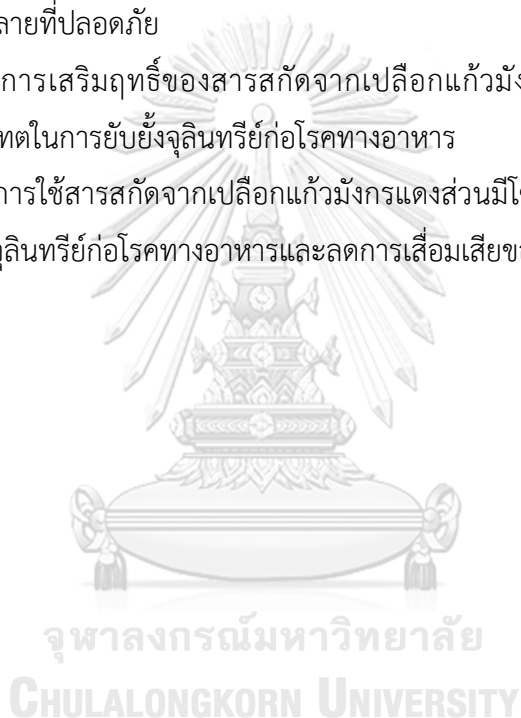
งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บร่วมกับโซเดียมแลกเตตในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและลดการเสื่อมเสียของคัสตาร์ดครีม โดยหาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดสารจากเปลือกแก้วมังกรแดง และศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดที่ได้และของโซเดียมแลกเตต รวมถึงประเมินการเสริมฤทธิ์ของสารผสมและประยุกต์ใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในคัสตาร์ดครีม เพื่อใช้ผลจากการศึกษาเป็นแนวทางในการลดการเสื่อมเสียของคัสตาร์ดครีมและลดอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรคนานัปการต่างๆ นอกจากนี้เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งจากผลผลิตทางการเกษตรและเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกแก้วมังกรแดงในทางพาณิชย์

## 1.2 สมมติฐานของงานวิจัย

1. การใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บร่วมกับโซเดียมแลกเตต มีฤทธิ์ที่เสริมกันในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารได้
2. การใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บร่วมกับโซเดียมแลกเตตสามารถยืดอายุการเก็บรักษาศีสตาร์ดครีมได้

## 1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บที่สกัดจากตัวทำละลายที่ปลอดภัย
2. เพื่อประเมินการเสริมฤทธิ์ของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บร่วมกับโซเดียมแลกเตตในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหาร
3. เพื่อประเมินการใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บร่วมกับโซเดียมแลกเตตในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารและลดการเสื่อมเสียของคีส์ตาร์ดครีม



## บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

### 2.1 แก้วมังกร

แก้วมังกร (dragon fruits) เป็นผลไม้ที่จัดอยู่ในวงศ์ *Cactaceae* สกุล *Hylocereanae* ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับตะบองเพชรประเภทไม้เลื้อย มีชื่อสามัญว่า Dragon Fruit หรือชื่อเรียกในภาษาสเปนว่า พิโทอา (pitaya) หรือ พิทาโฮอา (pitahaya) (Wu et al., 2006) แก้วมังกรมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในอเมริกากลาง จากนั้นบาทหลวงชาวฝรั่งเศสได้นำเข้าสู่ทวีปเอเชียเมื่อประมาณ 100 ปีที่แล้ว เข้ามาที่เวียดนาม ปัจจุบันผลไม้ชนิดนี้นิยมปลูกทั่วไปในเอเชีย เช่น เวียดนาม ใต้หวัน มาเลเซีย และไทย โดยแก้วมังกรที่นิยมปลูกทางค้ามี 3 ชนิด ได้แก่ *Mediocactus* spp. (ผลขนาดเล็ก รสหวานมาก) *Selenicereus* spp. (ผลสีเหลืองและเป็นหนามเนื้อในสีขาว มีเมล็ดภายในสีดำ นิยมเรียกแก้วมังกรผิวทอง) และ *Hylocereus* spp. (มีสองชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.1 คือ (1) เปลือกสีแดงเนื้อขาว (*H. undatus*) นิยมเรียกแก้วมังกรขาว และ (2) เปลือกสีแดงเนื้อแดง (*H. polyrhizus*) นิยมเรียกแก้วมังกรแดง จะมีขนาดผลเล็กกว่าแก้วมังกรขาวเล็กน้อยและสีของเนื้อจะมีสีแดงหรือแดงม่วง) โดยสกุล *Hylocereus* spp. เป็นสกุลที่นิยมปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย (สุรพงษ์ โกสิยะจินดา, 2545)

แก้วมังกรประกอบไปด้วยสารพฤกษเคมี (phytochemical) หลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ แอนโทไซยานิน (anthocyanins) เบต้าไซยานิน (betacyanins) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) อีกทั้งยังมีใยอาหารสูง ซึ่งสารเหล่านี้มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ช่วยลดคอเลสเตอรอล ป้องกันการอุดตันของหลอดเลือดหัวใจ ลดความดันโลหิต ควบคุมน้ำหนัก แก้อาการท้องผูก ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่และช่วยทำให้ผิวชุ่มชื้น (สุรพงษ์ โกสิยะจินดา, 2545)



รูปที่ 2.1 แก้วมังกรขาว (A) และ แก้วมังกรแดง (B)

## 2.2 แก้วมังกรแดง

แก้วมังกรแดง (red dragon fruit) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Hylocereus polyrhizus* มีเนื้อสีแดง และเปลือกสีแดง โดยเปลือกไม่มีหนาม แต่มีก้านเหลี่ยมสีเขียวหรือแดง ผลเป็นรูปทรงกลม มีขนาดเล็กกว่าพันธุ์แก้วมังกรเนื้อขาวเปลือกแดง มีน้ำหนักประมาณ 200 - 500 กรัม ขนาดผลยาวประมาณ 10 เซนติเมตร มีเมล็ดสีดำคล้ายงาแทรกอยู่ในเนื้อของผลจำนวนมาก และมีรสชาติหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย (สุรพงษ์ โกสิยะจินดา, 2545) โดยปริมาณสารอาหารที่พบในผลแก้วมังกรแดงที่มีน้ำหนักประมาณ 100 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณสารอาหารที่พบในผลแก้วมังกรแดงที่มีน้ำหนักประมาณ 100 กรัม (ของส่วนที่รับประทานได้)

องค์ประกอบ	ปริมาณต่อ 100 กรัม ของผลแก้วมังกรแดง
คาร์โบไฮเดรต	20.4 กรัม
โปรตีน	1.6 กรัม
ไขมัน	0.4 กรัม
ใยอาหาร	1.1 กรัม
แคลเซียม	37 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	49 มิลลิกรัม
เหล็ก	0.8 มิลลิกรัม
วิตามินเอ	67 หน่วยสากล (I.U.)
วิตามินบี 1	0.03 มิลลิกรัม
วิตามินบี 2	0.01 มิลลิกรัม
วิตามินซี	8.0 มิลลิกรัม
ไนอะซิน	0.70 มิลลิกรัม
ความชื้น	66 แคลอรี
พลังงาน	76.9 กรัม

ที่มา : กรรณิการ์ สอนโยธา, 2552

## 2.2.1 คุณค่าทางอาหารของแก้วมังกรแดง

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ได้ให้ข้อมูลว่า แก้วมังกรมีสารที่มีประโยชน์ คือ มิวซิเลจ (mucilage) ซึ่งมีในเฉพาะในตระกูลกระบองเพชร มีลักษณะคล้ายวุ้นเจล ช่วยดูดซับน้ำในร่างกาย และควบคุมระดับกลูโคสในคนที่เป็โรคเบาหวานในชนิดที่ไม่ต้องใช้อินซูลินได้ สามารถช่วยในการบรรเทาโรคโลหิตจางช่วยเพิ่มธาตุเหล็กให้แก่ร่างกาย ช่วยในการป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือดหัวใจอุดตัน มะเร็งลำไส้ และต่อมลูกหมาก ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของกระดูกและฟัน นอกจากนี้ กรมวิชาการเกษตร ได้ระบุว่าแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงเปลือกแดงมีสารไลโคปีนซึ่งมีคุณสมบัติในการต่อต้านการเกิดโรคมะเร็ง นอกจากนี้แก้วมังกรยังมีประโยชน์อื่น ได้แก่ (1) ช่วยบำรุงผิวพรรณให้เปล่งปลั่งสดใส ชุ่มชื้น และมีส่วนช่วยในชะลอการเกิดริ้วรอยแห่งวัยต่างๆ (2) ช่วยดีบรีนและดับกระหาย (3) ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้แข็งแรง เพราะมีวิตามินซีสูง (4) ช่วยบรรเทาอาการโรคความดันโลหิตได้ (5) ช่วยในการต่อต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง (6) ช่วยกระตุ้นการขับน้ำนมในสตรี (7) ช่วยดูดซับสารพิษต่างๆ ออกจากร่างกาย เช่น สารตกค้างอย่างตะกั่ว ที่มาจากควันท่อไอเสีย หรือสารตกค้างที่มาจากยาฆ่าแมลง (8) มีกากใยสูงช่วยในการขับถ่ายให้สะดวก แก้อาการท้องผูก และ (9) ช่วยปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ แก้ปัญหาการขับถ่ายให้ดีขึ้น (สุรพงษ์ โกสิยะจินดา, 2545)

## 2.2.2 การใช้ประโยชน์จากแก้วมังกรแดง

แก้วมังกรแดงมีสรรพคุณหลายอย่างที่ทำให้ประโยชน์ต่อสุขภาพ ดังนั้นส่วนใหญ่จึงนิยมรับประทานในรูปของผลสด ในปัจจุบันแก้วมังกรเป็นที่นิยมในการบริโภคและมีการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น น้ำแก้วมังกรแดง แก้วมังกรแดงกวน ไอศกรีมแก้วมังกรแดง โยเกิร์ตแก้วมังกรแดง และไวน์แก้วมังกรแดง เป็นต้น จากการบริโภคแก้วมังกรที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีเปลือกเหลือทิ้งอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้น จึงมีนักวิจัยที่สนใจในการนำเปลือกแก้วมังกรแดงที่เหลือทิ้ง มาสกัดสารสีเพื่อเพิ่มมูลค่าและนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารให้สีในอุตสาหกรรมอาหาร (ภชมน, 2556)

## 2.3 เปลือกแก้วมังกรแดง

จากการบริโภคแก้วมังกรที่ได้รับความนิยมมากขึ้น เฉลี่ย 6,000 ตันต่อปี ทำให้ปัจจุบันมีเปลือกแก้วมังกรที่เหลือทิ้งจำนวนมากประมาณ 180 ตันต่อปี (เบต้า มิลค์, 2561) โดยเปลือกแก้วมังกรแดงมีองค์ประกอบทางเคมี ประกอบด้วย betanin, phyllocactin, hylocerenin,

betacyanin, pectin, triterpenoids และ steroids (Luo, Cai, Peng, Liu, & Yang, 2014) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในการต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ ต้านมะเร็ง และมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Kim et al., 2010) โดยสารสำคัญที่พบในเปลือกแก้วมังกรแดง คือ สารเบต้าไซยานิน ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compounds) ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินซีและชาเขียว นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติช่วยต้านไวรัสและต้านจุลินทรีย์

จากประโยชน์ของเบต้าไซยานินดังที่กล่าวมา ปัจจุบันได้มีการศึกษาและสกัดสารเบต้าไซยานินจากแก้วมังกร เพื่อใช้ทดแทนสารให้สีสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมอาหาร นำมาใช้ในอาหารที่เป็นกรดต่ำ (low acid food) เช่น เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์จากนม (ดังแสดงในรูปที่ 2.2) และของหวานแช่แข็ง นอกจากนั้นนำมาใช้เป็น nutraceutical ด้วย



รูปที่ 2.2 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์เบต้ามิลค์ นมพร้อมไขมันรสสารสกัดเปลือกแก้วมังกร

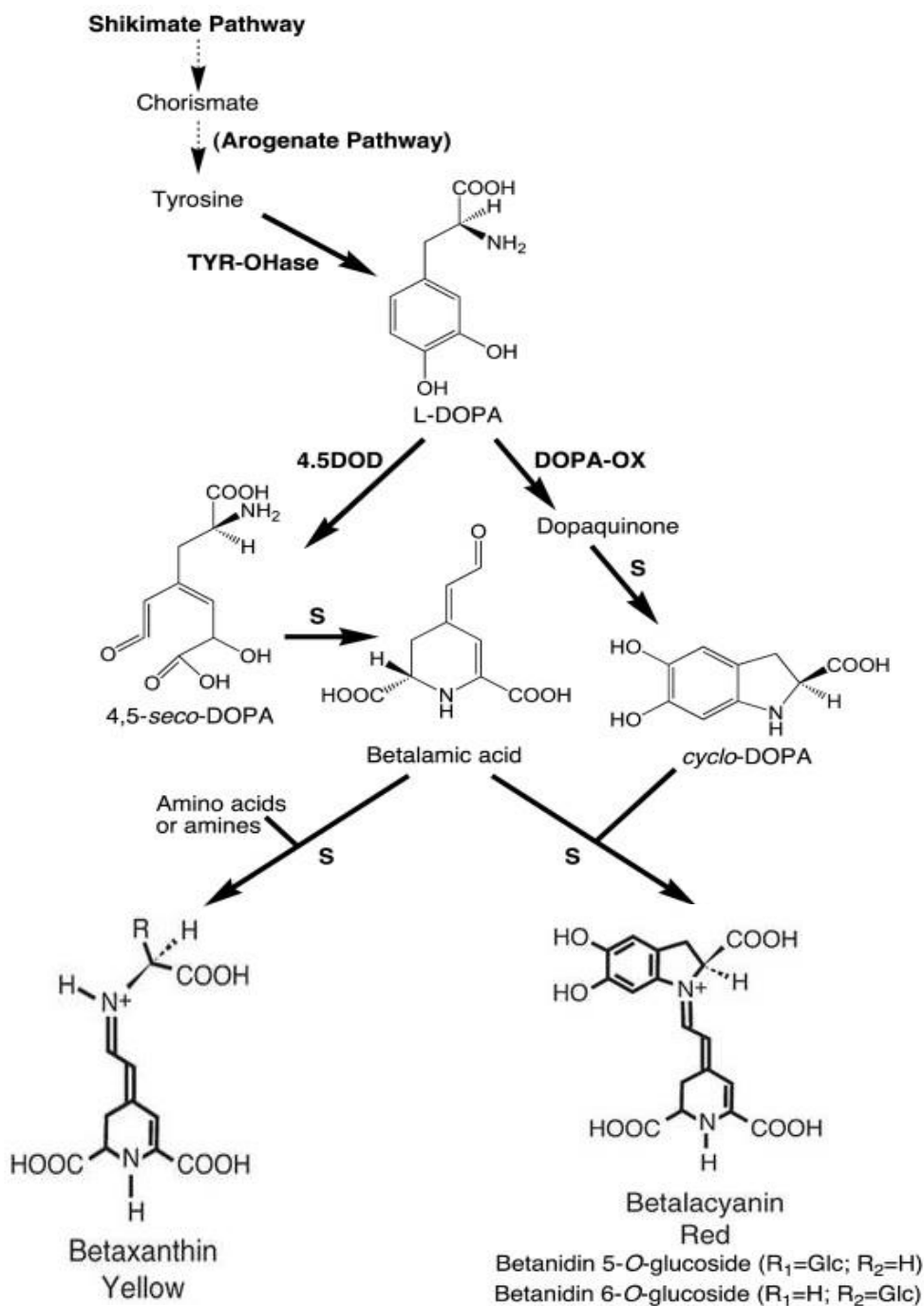
### 2.3.1 สารให้สีกลุ่ม Betalain ในเปลือกแก้วมังกรแดง

Betalain เป็นรงควัตถุธรรมชาติที่พบอยู่ในส่วนแวคิวโอล (vacuoles) ของเซลล์พืช (Stintzing & Carle, 2004) มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นอนุพันธ์อิมโมเนียมของ betalamic acid ดังแสดงในรูปที่ 2.3 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (Strack, Vogt, & Schliemann, 2003) คือ

1. เบต้าไซยานิน (betacyanin) ที่ให้สีแดงถึงม่วงดูดกสีแสงที่ความยาวคลื่น 535-540 nm มี 4 ชนิดที่พบบ่อย ได้แก่ เบตานิโน (betanin-type) บูเจนวิลลิน (bougainvillein-type) กอมพรีนิน (gomphrenin-type) และอะมารานทีน (amaranthin-type)
2. เบต้าแซนทีน (betaxanthin) ที่ให้สีเหลืองส้ม ดูดกสีแสงช่วงความยาวคลื่น 475-480 nm

ในธรรมชาติเท่าที่มีรายงาน พบ Betalain ที่เป็นเบต้าไซยานินประมาณ 50 ชนิดและเป็นเบต้าแซนทีนประมาณ 20 ชนิด (Cai, Sun, & Corke, 2003) โดย Betalain เป็นรงควัตถุที่พบในผลไม้ ดอกไม้ และส่วนประกอบของพืช พบเฉพาะในพืช order Caryophyllales ได้แก่ ปืท หงอนไก่

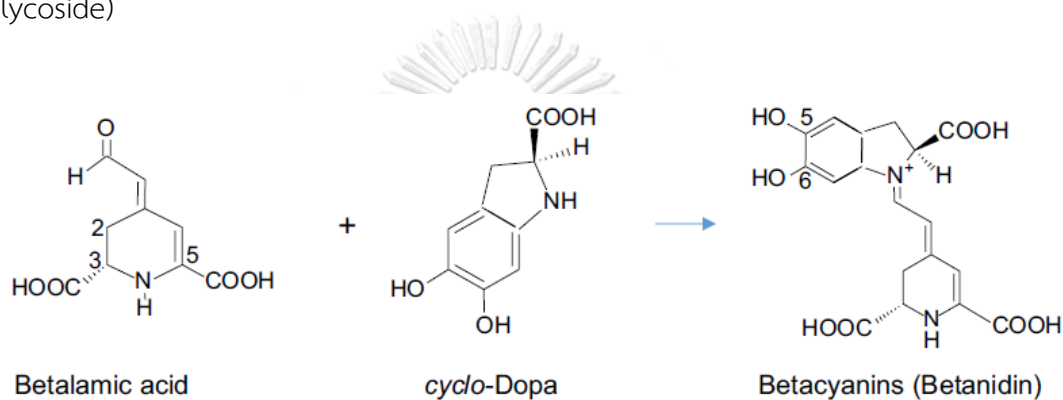
บานไม่รู้โรย เฟื่องฟ้า รวมทั้งแก้วมังกร (Stintzing & Carle, 2004) ซึ่งสารกลุ่ม Betalain ที่พบในแก้วมังกรแดง คือ เบต้าไซยานิน สามารถพบได้ที่ส่วนเนื้อและเปลือกของแก้วมังกร



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของรงควัตถุให้สีในกลุ่ม Betalain  
ที่มา : Harris และคณะ (2012) และ Hatlestad และคณะ (2012)

### 2.3.2 โครงสร้างและชนิดของเบต้าไฮยานิน

เบต้าไฮยานินมีโครงสร้างพื้นฐาน ประกอบด้วย betalamic acid เชื่อมต่อกับ cyclo-3,4-dihydroxyphenyl alanine (cyclo-dopa) ดังแสดงในรูปที่ 2.4 ถ้าไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เรียกว่า อะไกลโคน (aglycone) ซึ่งมักอยู่ในรูปของเบตานิดิน (betanidin) และไอโซเบตานิดิน (isobetanidin) เมื่อหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 5 หรือ 6 ของเบตานิดินถูกแทนที่ด้วยน้ำตาล (glycosylation) ที่แตกต่างกันได้เบต้าไฮยานินชนิดต่างๆ เช่น ถ้าน้ำตาลที่เกาะในตำแหน่งที่ 5 เป็น น้ำตาลกลูโคสได้เบตานิิน (betanidin-5-O- $\beta$ -glycoside) และไอโซบีตานิิน (isobetanidin-5-O- $\beta$ -glycoside)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของเบต้าไฮยานิน

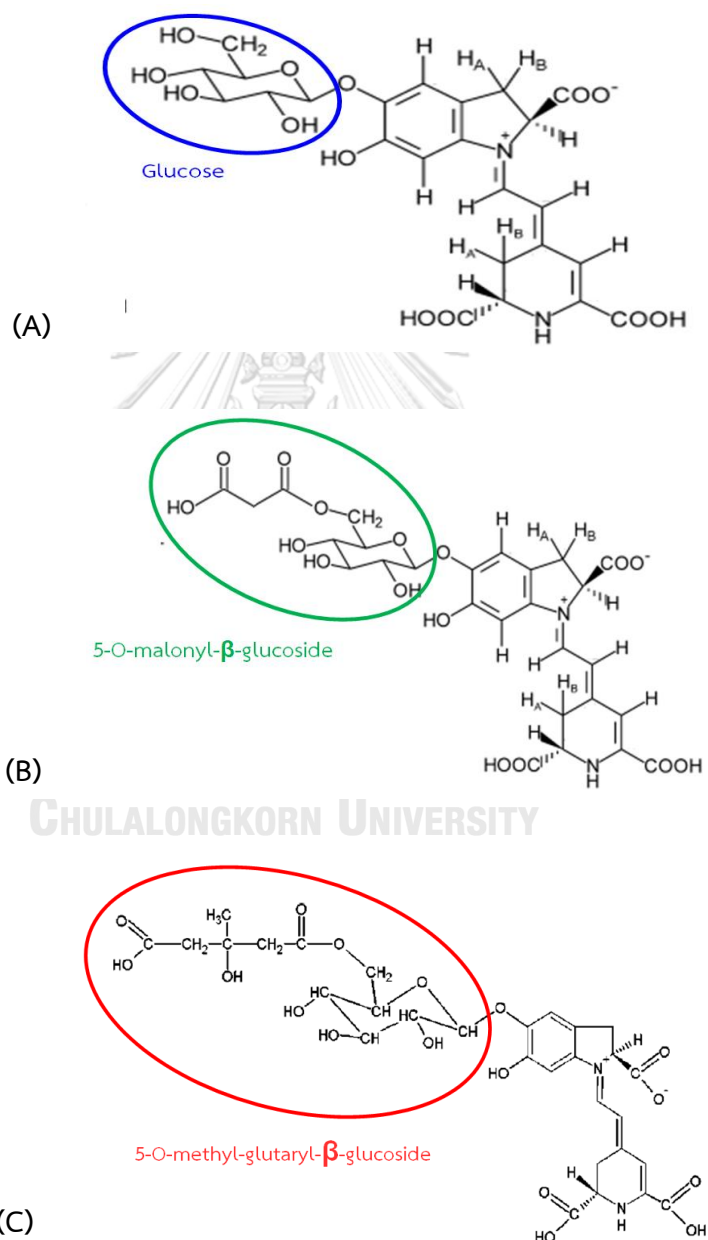
ที่มา : Esquivel (2016)

โดยเบต้าไฮยานินที่พบในแก้วมังกรเป็นชนิด betanin จะอยู่ในรูปที่มีน้ำตาลมาต่อได้เป็นไกลโคไซด์ มีหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 5 ถูกแทนที่ด้วยน้ำตาล และหมู่ไฮดรอกซิลในตำแหน่งที่ 6 ถูกแทนที่ด้วย H ทำให้ได้เบต้าไฮยานินหลายชนิด ซึ่งชนิดของเบต้าไฮยานินที่พบส่วนใหญ่ในแก้วมังกร ได้แก่ Betanin (betanidin-5-O- $\beta$ -glucoside) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 (A), Hylocerenin (betanidin-5-O-methyl-glutaryl- $\beta$ -glucoside) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 (B) และ Phyllocactin (betanidin-5-O-malonyl- $\beta$ -glucoside) ดังแสดงในรูปที่ 2.5 (C) (Esquivel, 2016) โดยการแทนที่ในตำแหน่งที่ 5 ของเบต้าไฮยานินแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.2



ตารางที่ 2.2 ชนิดของเบต้าไซยานินที่พบในเปลือกแก้วมังกร

Compound	การแทนที่ในตำแหน่งที่ 5
Betainin	Glucose
Phyllocactin	Glucose + COCH <sub>2</sub> COOH
Hylocerenin	Glucose + COCH <sub>2</sub> (OH)(Me)CH <sub>2</sub> COOH



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ Betainin (A), Phyllocactin (B) และ Hylocerenin (C)

ที่มา : Esquivel, 2016

### 2.3.3 สมบัติของเบต้าไซยานิน

เบต้าไซยานิน (betacyanins) จัดเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกที่พบปริมาณสูงในเปลือกแก้วมังกรแดง จากการศึกษาของ Stintzing และคณะ (2007) พบว่าสารเบต้าไซยานินมีสมบัติที่สามารถละลายน้ำได้ดี (water soluble pigment) และให้สีแดงในช่วงค่า pH กว้าง คือตั้งแต่ pH 3-7 ให้ประโยชน์ต่อสุขภาพ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (Kim et al., 2010; Stintzing, Schieber, & Carle, 2002; Tenore, Novellino, & Basile, 2012)

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา พบว่าในส่วนของเปลือกแก้วมังกรแดงมีปริมาณสารเบต้าไซยานินและมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าในเนื้อ (Nurliyana et al., 2010; Tenore et al., 2012)

Tenore และคณะ (2012) ได้ศึกษาปริมาณและชนิดของสารพฤกษเคมี ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บ โดยการใช้ 70% เมทานอลในการสกัดแบบแยกบริสุทธิ์สารแต่ละชนิด พบว่า มีปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกสูง โดยมีสารพฤกษเคมีดังต่อไปนี้ ปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด 755 mg/100 g fw. (น้ำหนักเปียก) ซึ่งประกอบด้วย เบต้าไซยานิน ฟลาโวนอยด์ และกรดฟีนอลิก เท่ากับ 655.6, 97.1 และ 2.3 mg/100 g fw. ตามลำดับ และเบต้าไซยานินมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันโดยวิธี DPPH เท่ากับ  $805.1 \pm 1.2 \mu\text{mol trolox}/100 \text{ g fw.}$  และวิธี FRAP เท่ากับ  $478.0 \pm 1.5 \mu\text{mol trolox}/100 \text{ g fw.}$  ในส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเบต้าไซยานิน พบว่า สามารถต้านการเจริญของแบคทีเรียได้ โดยวัดจากค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยเบต้าไซยานิน มีค่า MIC ในการยับยั้ง *B. cereus*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* และ *S. Typhimurium* เท่ากับ  $15.6 \pm 0.2$ ,  $15.6 \pm 0.2$ ,  $15.6 \pm 0.2$ ,  $31.3 \pm 0.4$  และ  $62.5 \pm 0.0 \mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และราได้อีกด้วย จึงจัดว่าสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงเป็นสารกลุ่มที่มีขอบเขตการออกฤทธิ์กว้างในการต้านจุลินทรีย์ (broad spectrum) และมีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ได้ดีและหลากหลายกว่าแก้วมังกรขาว ซึ่งมีค่า MIC ของ *S. aureus*, *Clostridium perfringens*, *Cl. sporogenes* และ *S. Typhimurium* เท่ากับ 50.93, 50.93, 50.93 และ 50.93 mg/mL ตามลำดับ (กมลลักษณ์ มาสาโรง และ วรพจน์ สุนทรสุข, 2557)

จากการศึกษาของ Moreno และคณะ (2008) รายงานว่าเบต้าไซยานิน มีฤทธิ์ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยยับยั้งเอนไซม์ที่ผนังเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของแบคทีเรียทำให้กรดอะมิโนรั่วไหลออกจากเซลล์ สารจึงซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำลายกลไกการทำงานภายในของ

เซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ก่อให้เกิดการเสียสมดุลภายในเซลล์และสารในเซลล์รั่วไหลออกมา ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด

นอกจากนั้นมีการศึกษาสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงในรูปอนุภาคนาโน พบว่า การใช้สารสกัดปริมาณ 0.5 mg/mL ที่ pH 5.35 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดี โดยพบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่มีการยับยั้งเชื้อ (inhibition zone) ของ *S. aureus*, *E. coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* เท่ากับ 9.0, 8.0 และ 7.0 มิลลิเมตร (mm) ตามลำดับ (Phongtongpasuk, Poadang, & Yongvanich, 2016)

ในการนำสารสกัดจากพืชมาใช้ประโยชน์ มีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงอย่างน้อย 2 ปัจจัย ได้แก่ (1) เสถียรภาพของสาร เนื่องจากเบต้าไซยานินเป็นสารสีที่สกัดจากธรรมชาติ และ (2) วิธีที่ใช้ในการสกัดสารเพื่อให้ได้สารออกมาปริมาณมากที่สุด ไม่เกิดการสลายตัว และมีคุณสมบัติไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหรือเปลี่ยนแปลงไปน้อยที่สุด

### 2.3.4 เสถียรภาพของเบต้าไซยานิน

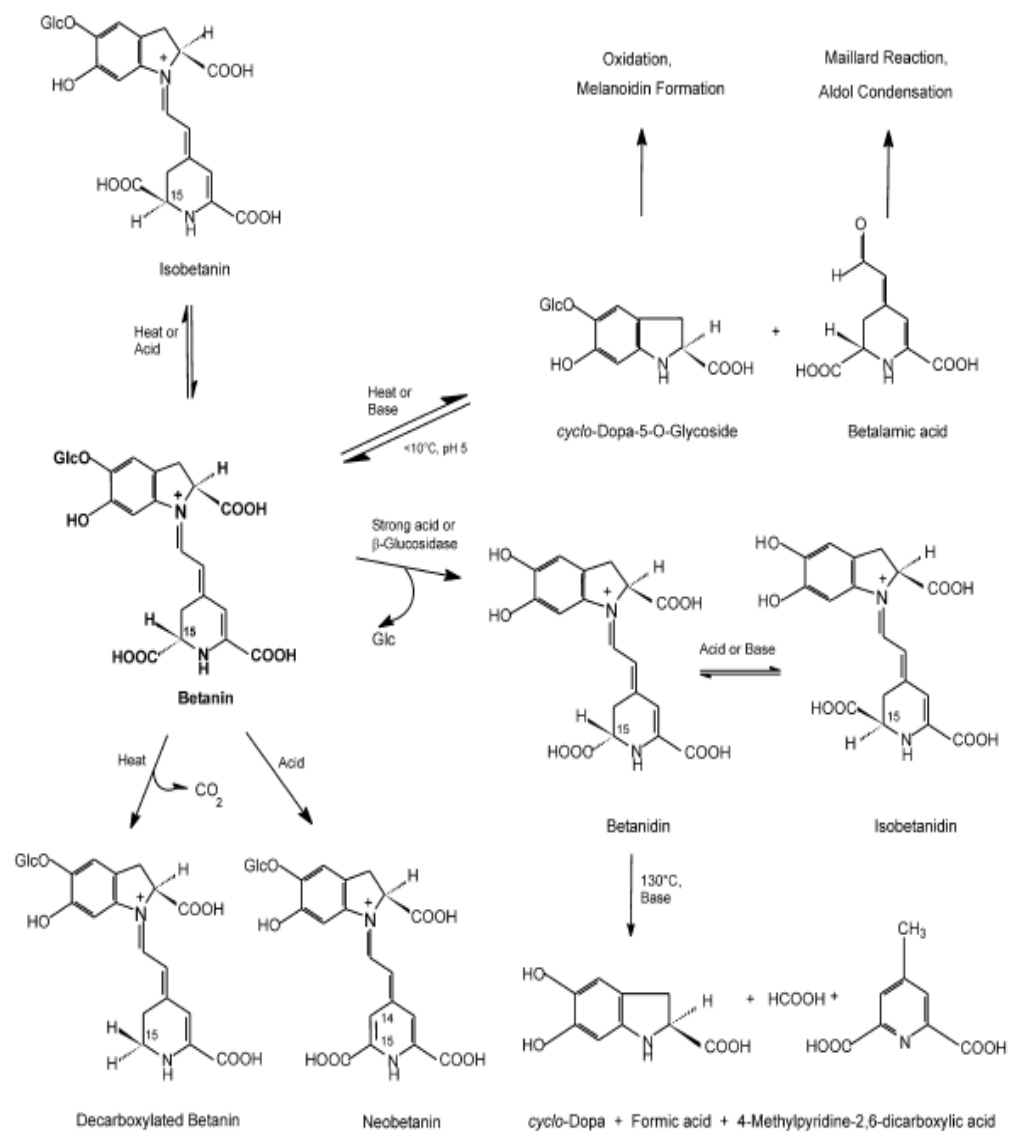
เบต้าไซยานินเป็นสารให้สีที่ได้จากธรรมชาติ มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ คือ มีความคงตัวต่ำ มีความไวและสลายตัวได้ง่ายในกระบวนการแปรรูปอาหารที่ใช้ความร้อน โดยรูปแบบของสารสกัดที่มีลักษณะเป็นผงสามารถเก็บรักษา betalain ได้ดีที่สุด คือ สภาวะที่มีค่าวอเตอร์แอกติวิตี ( $a_w$ ) เท่ากับ 0.12 หรือมีความชื้นร้อยละ 2 ของน้ำหนักแห้ง หรือสภาวะที่มีค่าวอเตอร์แอกติวิตีน้อยกว่า 0.63 และสารให้สีที่สกัดได้จากแก้วมังกรจะมีความคงตัวที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4-6 (Herbach, Rohe, Stintzing, & Carle, 2006) ยกตัวอย่างการสลายตัวของเบต้าไซยานิน เช่น สารละลายเบต้าไซยานินในน้ำเมื่อได้รับความร้อนจะเกิดปฏิกิริยา decarboxylation เกิดการสลายตัวของ betanin (ดังแสดงในรูปที่ 2.6) ได้เป็น neobetanin ที่มีสีเหลือง ทำให้ปริมาณเบต้าไซยานินลดลง โดยอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นกรดเพิ่มขึ้น (Herbach et al., 2006; Stintzing & Carle, 2004)

#### 2.3.4.1 ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับเสถียรภาพของเบต้าไซยานิน

1. Isomerization คือ ปฏิกิริยาที่เปลี่ยนโครงสร้างจากไอโซเมอร์หนึ่งไปอีกไอโซเมอร์หนึ่ง
2. Deglycosylation คือ ปฏิกิริยาที่เอาน้ำตาลออกจากโมเลกุล
3. Hydrolysis คือ ปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปสลายพันธะ ทำให้สารโมเลกุลใหญ่เปลี่ยนเป็นสารโมเลกุลเล็ก

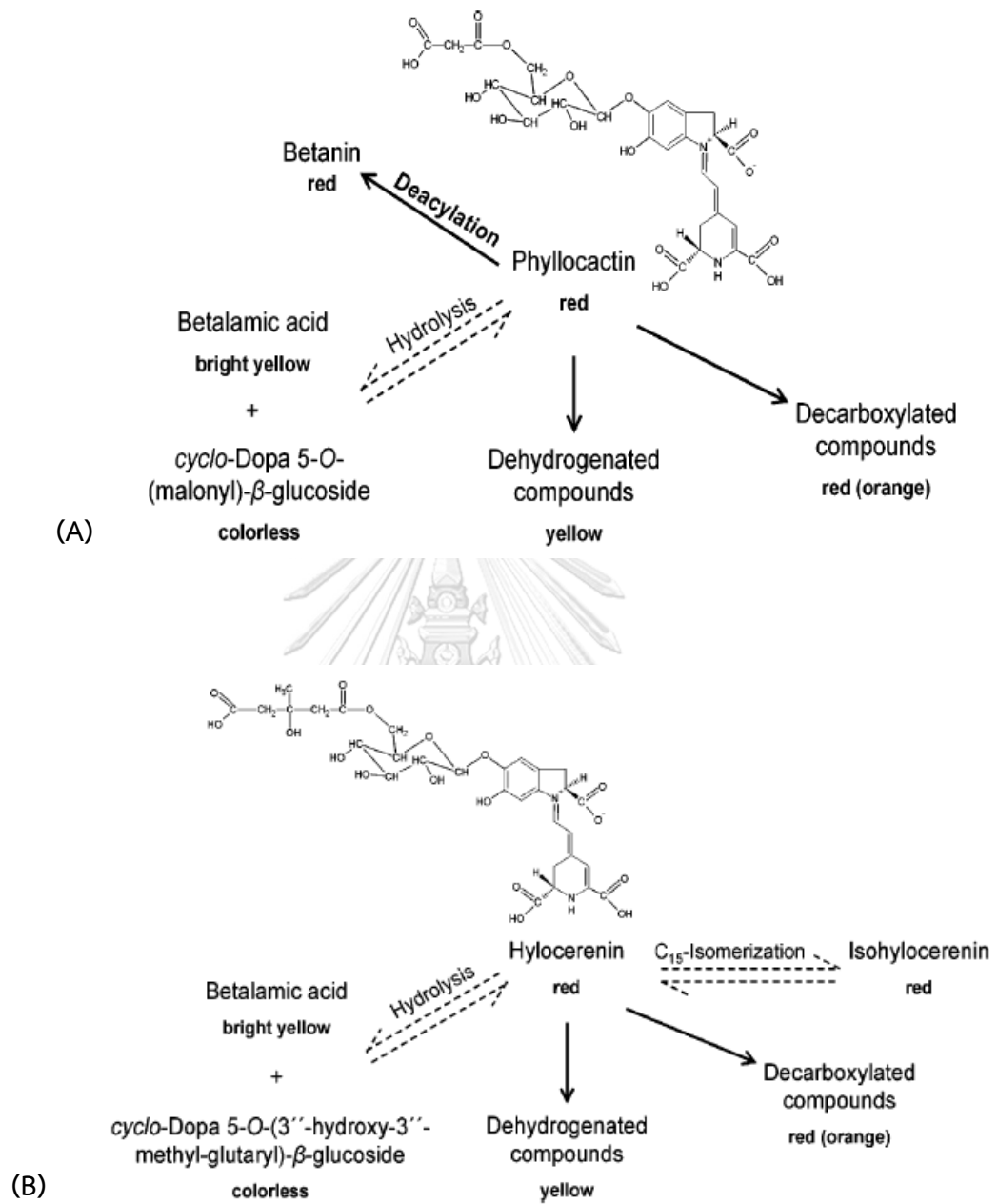
4. Decarboxylation คือ ปฏิกิริยาการกำจัดหมู่  $-\text{COOH}$  ออกจากโมเลกุลของสารประกอบ ทำให้ได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
5. Dehydrogenation คือ ปฏิกิริยาการดึงเอา H-atom ออกจากโมเลกุลของสารประกอบ อินทรีย์

โดยปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนโครงสร้างและเสถียรภาพของเบต้าไซยานินแต่ละชนิด ดังแสดงในรูปที่ 2.6, 2.7 (A) และ 2.7 (B)



รูปที่ 2.6 ขั้นตอนการสลายตัวของ Betanin ในสถานะต่างๆ

ที่มา : Stintzing และ Carle (2004)



รูปที่ 2.7 ขั้นตอนการสลายตัวของ Phylloactin (A) และ Hylocerenin (B) ในสภาวะต่างๆ  
ที่มา : Herbach และคณะ (2006)

### 2.3.4.2 ปัจจัยที่มีผลต่อเสถียรภาพของเบต้าไซยานิน

ปัจจัยที่มีผลต่อเสถียรภาพของเบต้าไซยานิน แบ่งเป็น 2 ปัจจัย คือ (1) ปัจจัยภายใน ประกอบด้วย โครงสร้างทางเคมี และความเข้มข้นของรงควัตถุในเซลล์พืช (2) ปัจจัยภายนอก ประกอบด้วย อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดหรือการผลิต, เวลาในการให้ความร้อน, ค่าวอเตอร์แอกติวิตี ( $a_w$ ), เอนไซม์, ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), สารจับโลหะ, แสง, ออกซิเจน, ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด และสารต้านอนุมูลอิสระที่เติมลงไป เช่น กรดแอสคอร์บิก เป็นต้น

โดยปัจจัยที่มีผลต่อเสถียรภาพของเบต้าไซยานิน ยกตัวอย่างได้ดังนี้

#### a) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อความคงตัวของเบต้าไซยานิน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมและมีความคงตัวมาก อยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 4-7 (Herbach et al., 2006) โดยถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายต่ำกว่า 3.5 ลงไป ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารจะอยู่ที่ความยาวคลื่น 535 nm ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายอยู่ในช่วงระหว่าง 3.5-7.0 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารจะอยู่ที่ความยาวคลื่น 538 nm และถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเท่ากับ 9.0 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารจะอยู่ที่ความยาวคลื่น 544 nm ซึ่งในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดต่ำมากๆ จะทำให้คาร์บอนตัวที่ 15 (C-15) ของ betanin เกิดปฏิกิริยา isomerization กลายเป็น isobetanin ได้ และสารสียังคงมีสีม่วงแดงอยู่ นอกจากนี้สภาวะกรดมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปของสารเบต้าไซยานินกลายเป็น 14,15-dehydrobetanin (หรือเรียกอีกอย่างว่า neobetanin) หรือเกิดปฏิกิริยาที่มีน้ำเข้าไปสลายพันธะ (hydrolysis) กลายเป็น betalamic acid ซึ่งทั้งหมดเกิดเป็นสารสีเหลือง (Herbach et al., 2006; Stintzing & Carle, 2004) (ดังแสดงในรูปที่ 2.6)

#### b) อุณหภูมิ

เบต้าไซยานินมีความคงตัวค่อนข้างน้อยต่อความร้อน ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีแดงไปเป็นสีน้ำตาล สีของเบต้าไซยานินมีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำซึ่งการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของเบตาเลน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ การสกัดที่อุณหภูมิ 25 °C และ 60 °C พบว่า ค่าครึ่งชีวิตของเบต้าไซยานิน ที่อุณหภูมิ 25 °C คือ 413.6 นาที และค่าครึ่งชีวิตของเบต้าไซยานิน ที่อุณหภูมิ 60 °C คือ 83.5 นาที (Azeredo Henriette, 2009; M. Herbach, C. Stintzing, & Carle, 2004) นอกจากนี้ Gengatharan, Dykes และ Choo (2015) ได้ศึกษาผลของการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30, 50, 85 และ 100 °C ในการสกัดสารเบต้าไซยานิน

จากเนื้อแก้วมังกรแดง โดยศึกษาผลของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 สัปดาห์ต่อ (1) ปริมาณเบต้าไซยานิน และ (2) ค่าสีที่เปลี่ยนแปลงไป ( $\Delta E^*$ ) พบว่า

1. ปริมาณเบต้าไซยานิน : ในสัปดาห์ที่ 0 เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงขึ้น ปริมาณของเบต้าไซยานิน ได้แก่ phyllocatin, betanin และ isobetanin ลดลง และพบว่าเมื่อให้อุณหภูมิมากกว่า 50°C ปริมาณของ phyllocatin ลดต่ำลง เนื่องจากเกิดการสลายตัวด้วยกระบวนการ deacylation (หมู่ acyl หลุดออกไป) เปลี่ยนเป็น betanin แล้วเกิดการสลายตัวของ betanin ด้วยปฏิกิริยา hydrolysis กลายเป็น betalamic acid ที่มีสีเหลือง และ cyclo-dopa ที่ไม่มีสี ทำให้ปริมาณเบต้าไซยานินลดลง และในสัปดาห์ที่ 10 betanin, isobetanin และ hydrocyanin มีปริมาณลดลง เนื่องจากเกิดการสลายตัวด้วยปฏิกิริยา hydrolysis กลายเป็น betalamic acid ที่มีสีเหลือง แต่ในทางกลับกันพบว่า phyllocatin มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเวลา 0 สัปดาห์ เนื่องจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (น้อยกว่า 10°C) ทำให้ betalamic acid และ cyclo-dopa ที่เกิดจากการสลายตัวในช่วงแรกของการเก็บรักษาเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับเป็น phyllocatin อีกครั้ง ทำให้ปริมาณเบต้าไซยานินเพิ่มขึ้น (Herbach et al., 2006)
2. ค่าสีที่เปลี่ยนแปลงไป ( $\Delta E^*$ ) : พบว่าทุกตัวอย่างของการศึกษาที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30°C และ 50 °C มีสีที่แตกต่างกันเล็กน้อย ในขณะที่ตัวอย่างที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °C และ 100 °C สีเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีที่มีความแตกต่างมาก ( $1.5 < \Delta E^* < 3$ ) ในสัปดาห์ที่ 2 เป็นสีที่มีความแตกต่าง ( $\Delta E^* < 1.5$ ) ในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในข้อที่ 1 ที่พบว่า phyllocatin ที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูง มีการสลายตัวในช่วงสัปดาห์แรก และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาในงานของ Gengatharan, Dykes และ Choo (2015) แสดงให้เห็นว่า การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °C ทำให้เบต้าไซยานินเกิดการสลายตัวในช่วงแรกของการเก็บรักษา ส่งผลให้เบต้าไซยานินมีปริมาณลดลงและมีสีที่เปลี่ยนแปลงไป แต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ช่วยให้เบต้าไซยานินที่สลายตัวไปเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับมาเป็นเบต้าไซยานินอีกครั้ง ดังนั้นการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเบต้าไซยานินได้

### c) ค่าแอกทีวิตี (water activity ; $a_w$ )

ค่า  $a_w$  เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ betanin นอกจากนั้น การลดค่า  $a_w$  เช่น การเติมน้ำตาลลงในสารละลายหรืออาหารที่มีเบต้าไซยานิน ทำให้เบต้าไซยานินมีความคงตัวดีขึ้น เนื่องจากน้ำตาลไปแย่งจับน้ำในระบบ ซึ่งมีผลให้เบต้าไซยานินไม่สูญเสียน้ำตาลในโมเลกุล จึงไม่สลายตัวไปเป็น betalamic acid ที่มีสีเหลือง และ cyclo-dopa ที่เป็นสารไม่มีสี (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000)

### d) แสง

แสงสามารถกระตุ้นอิเล็กตรอนที่พันธะคู่ของเบต้าไซยานิน ทำให้สารเกิดการสลายตัวและมีสีแดงลดลง จากการศึกษาของ Cai และคณะ (1998) ได้ศึกษาเสถียรภาพของเบต้าไซยานินในดอกผักโขม พบว่าการเก็บในภาวะที่มีแสงทำให้เกิดการสลายตัวของเบต้าไซยานินมากกว่าภาวะที่ไม่มีแสง นอกจากนั้น Wong และ Siow (2015) ได้ศึกษาเสถียรภาพของเบต้าไซยานินในน้ำผลไม้เนื้อแก้วมังกรแดง ที่การเก็บในสภาวะที่มีโดนแสงและไม่มีแสง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า น้ำแก้วมังกรแดงในสภาวะที่ถูกแสงมีปริมาณเบต้าไซยานินลดลงมากกว่าการเก็บรักษาในสภาวะที่ไม่ถูกแสง เนื่องจากแสงเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดการสลายตัวของเบต้าไซยานิน

### e) ผลของสารอื่นๆ

กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) จะมีผลในการป้องกันการเปลี่ยนสีของเบตาเลนโดยเมื่อให้ความร้อนสูง เช่น การฆ่าเชื้อระดับสเตอริไลซ์ เมื่อมีการเติมกรดแอสคอร์บิกความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ทำให้ค่าครึ่งชีวิตของเบต้าไซยานินเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (Herbach et al., 2006) ส่วนโลหะต่างๆ เช่น เหล็ก ( $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) ดีบุก ( $Sn^{2+}$ ) อลูมิเนียม ( $Al^{3+}$ ) โครเมียม ( $Cr^{3+}$ ) และทองแดง ( $Cu^{2+}$ ) เป็นต้น มีผลในการลดความคงตัวของสารเบต้าไซยานิน ซึ่งพบว่าเหล็กจะมีผลมากกว่าโครเมียม นอกจากนี้ยังปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของสารกลุ่ม betalain ได้แก่ แสง ออกซิเจน เอนไซม์ เป็นต้น (Azeredo Henriette, 2009; Herbach et al., 2006)

## 2.3.5 การสกัดสารให้สีในกลุ่ม Betalain

การสกัด (extraction) เป็นขั้นตอนแรกของการวิเคราะห์ปริมาณ Betalain ทั้งหมดและ Betalain แต่ละชนิด วิธีการสกัดที่ดีควรสกัดเอาสารที่ต้องการออกมาจากเซลล์ของพืชได้ในปริมาณ



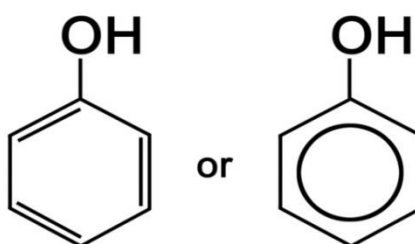
สูงที่สุด โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารและการปนเปื้อนของสารอื่นน้อยที่สุด และต้องเป็นวิธีการที่ไม่ซับซ้อน ไม่อันตราย มีค่าใช้จ่ายต่ำ หรือใช้เวลาสกัดไม่นาน (ทัตดาว ภาชีผล, 2557)

โดยทั่วไปการสกัดเริ่มจากนำพืชมาบดหรือปั่นให้มีขนาดเล็กลง แล้วนำไปสกัดด้วยตัวทำละลาย ซึ่งใช้ได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการสกัด ทั้งนี้เมทานอลเป็นตัวทำละลายที่นิยมมากที่สุด เนื่องจากสกัดปริมาณ betalain ได้มากกว่าการใช้น้ำและช่วยแยกโปรตีนที่ละลายน้ำได้ออกมาได้ดี สารสกัดที่ได้จึงมีความบริสุทธิ์มากขึ้น สำหรับเอทานอลและน้ำมีความเหมาะสมสำหรับการนำสารสกัดมาใช้ในอาหาร การเติมเอทานอลช่วยลดความหนืดจากมิวซิเลจและช่วยตกตะกอนเพคตินออกจากสารสกัด (Herbach et al., 2006; Stintzing et al., 2002) ส่วนการสกัดเบต้าไซยานินด้วยน้ำ ทำได้ทั้งน้ำเย็นหรือน้ำที่อุณหภูมิห้อง จัดเป็นวิธีที่ง่าย มีประสิทธิภาพสูงและมีต้นทุนต่ำ การสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริก เป็นแนวทางหนึ่งที่ได้รับการนิยมน เนื่องจากช่วยรักษาเสถียรภาพของเบต้าไซยานิน โดยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันจากเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส อย่างไรก็ตาม กรดอาจทำให้พันธะในโมเลกุลของแอซิดอะซิเลตเตดเบต้าไซยานิน (acid acylated betacyanin) เกิดการสลายได้ ดังนั้นการสกัดจึงควรใช้กรดอ่อนหรือใช้กรดในปริมาณเล็กน้อย

นอกจากชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัด ปริมาณของเบต้าไซยานินที่สกัดได้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อัตราส่วนของวัตถุดิบต่อตัวทำละลายที่ใช้สกัด เวลาในการสกัด วิธีที่ใช้สกัดและวิธีการปฏิบัติเบื้องต้นในการสกัด เป็นต้น

## 2.4 สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญที่พบได้ตามธรรมชาติ มีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวน มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ต่ออยู่ โดยสารประกอบฟีนอลพื้นฐาน คือ สารฟีนอล (phenol) มีสูตรเคมี  $C_6H_5OH$  ในโมเลกุลประกอบด้วยวงแหวนเบนซิน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ (ดังแสดงในรูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.8 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิก

ที่มา : Freeman และ Beattie (2008)

Tenore และคณะ (2012) ได้ศึกษาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในเนื้อและเปลือกของแก้วมังกรแดง พบว่ามีสารประกอบฟีนอลิกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.3** ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกที่สำคัญในเนื้อและเปลือกของแก้วมังกรแดง

<p><b>กลุ่มเบต้าไซยานิน (C18)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Betanidin-5-O-b-sophoroside (Bougainvillein)</li> <li>- Betanidin--O-b-glucoside (Betanin)</li> <li>- Isobetanidin-5-O-b-glucoside (Isobetanin)</li> <li>- Betanidin--O-(60-O-malonyl)-b-glucoside (Phyllocactin)</li> <li>- Isobetanidin-O-(60-O-malonyl)-b-glucoside (Isophyllocactin)</li> <li>- Betanidin--O-(60-O-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl)-b-glucoside</li> <li>- Iso-betanidin-5-O-(60-O-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl)-b-glucoside</li> <li>- Betanidin-5-O-(60-O-3-hydroxy-butyryl)-b-glucoside</li> </ul>
<p><b>กลุ่มของฟลาโวนอยด์ (flavonoids)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Isorhamnetin triglycoside</li> <li>- Quercetin-3-O-rutinoside</li> <li>- Flavonol glycoside</li> <li>- Kaempferol-3-O-rutinoside</li> <li>- Isorhamnetin-3-O-rutinoside</li> <li>- Isorhamnetin-3-O-glucoside</li> </ul>
<p><b>กลุ่มของกรดฟีนอลิก (phenolic acid)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Gallic acid</li> <li>- Protocatechuic acid</li> <li>- p-Hydroxybenzoic acid</li> <li>- Vanillic acid</li> <li>- Caffeic acid</li> <li>- Syringic acid</li> <li>- p-Coumaric acid</li> </ul>

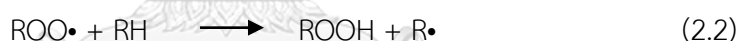
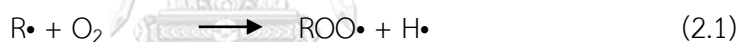
ที่มา : Tenore, Novellino และ Basileb (2012)

สารประกอบฟีนอลิกเป็นสารที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพ เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ ต้านการแพ้ และมีคุณสมบัติในการสลายลิ้มเลือด รวมเป็นสารต้านการก่อมะเร็ง และสามารถลดความดันโลหิตในการสลายลิ้มเลือด และที่สำคัญมีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Tsao, 2010)

## 2.4.1 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

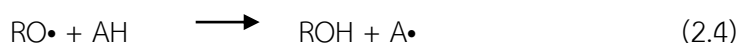
### 2.4.1.1 อนุมูลอิสระ (free radical)

อนุมูลอิสระ หรือ อนุมูลเสรี (R•) หมายถึง อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electrons) อย่างน้อย 1 ตัวโคจรรอบวงนอกสุด อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออก ทำให้อนุมูลอิสระไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว จึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบๆ โดยดึงหรือให้อิเล็กตรอนโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไปเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อไป (ดังสมการ 2.1 และ 2.2) (บุหริน, 2556 และ Mehta & Gowder, 2015)



### 2.4.1.2 สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ โมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆ ได้ โดยสารต้านอนุมูลอิสระจะเข้ายุติปฏิกิริยาลูกโซ่เหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยถูกออกซิไดซ์ ดังแสดงในสมการ 2.3 และ 2.4 (Mehta & Gowder, 2015)



โดย R• และ RO• คือ อนุมูลอิสระ และ AH คือ สารต้านอนุมูลอิสระ

กลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลิกมี 3 กลไก คือ (1) เป็นสารที่ทำหน้าที่จับกับแร่ธาตุที่เป็นประจุบวกสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (chelating agent) (2) เป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain breaking antioxidant) และ (3) ทำหน้าที่เปลี่ยนรูป

วิตามินอีให้กลับมาใหม่ (regenerate  $\alpha$ -tocopherol) (โอภา วัชระคุปต์, ปรีชา บุญจุง และ จันทนา บุญยะ, 2549)

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา (Fathordoobady, Mirhosseini, Selamat, & Manap, 2016; H. Kim et al., 2010; Nurliyana et al., 2010; Tenore et al., 2012) พบว่าสารเบต้าไซยานินจากแก้วมังกรอยู่ในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ มีกลไกในการต้านอนุมูลอิสระโดยหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ คือ ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนหรือให้ไฮโดรเจนและกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ

#### 2.4.2 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์

สารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) หมายถึง สารประกอบเคมีที่ได้จากธรรมชาติหรือจากการสังเคราะห์ เป็นสารที่เติมลงไปในอาหาร บรรจุภัณฑ์อาหาร พื้นผิวที่สัมผัสอาหาร (food contact surfaces) หรือ ในสภาพแวดล้อมที่แปรรูปอาหาร เพื่อต่อต้านหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ โดยหน้าที่หลักของสารต้านจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร คือ ใช้เป็นวัตถุกันเสีย เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย (Davidson & Zivanovic, 2003) ในการนำสารต้านจุลินทรีย์มาใช้ให้อาหารเพื่อลดการเสื่อมเสียของอาหารที่เกิดจากการเน่าเสียของจุลินทรีย์และเพื่อช่วยให้อาหารปลอดภัยจากจุลินทรีย์

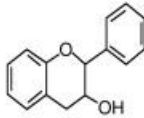
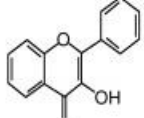
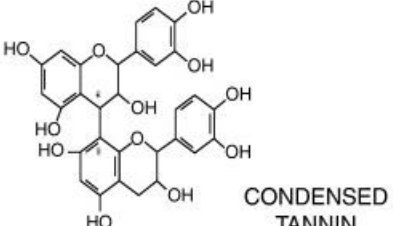
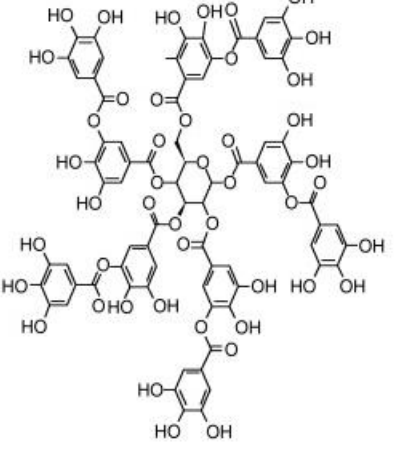
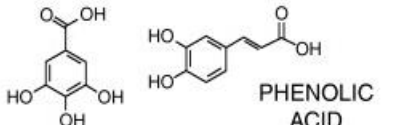
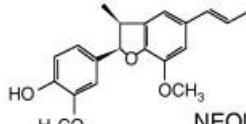
Davidson, Critzer และ Taylor (2012) ให้คำแนะนำสำหรับการนำสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาใช้ในอาหารว่าควรมีสมบัติ ดังนี้ (1) มีประสิทธิภาพที่ความเข้มข้นต่ำในรูปแบบธรรมชาติของสาร (2) ประหยัด (3) ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัสกับผลิตภัณฑ์ (4) ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียได้หลากหลาย และ (5) มีความปลอดภัย

สารประกอบฟีนอลิกนอกจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ยังมีสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อ เอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่ผนังเซลล์ และแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้ สารที่เข้าไปจะไปทำลายกลไกการทำงานของเซลล์ เกิดการเสียสมดุลภายในของเซลล์ สารในเซลล์รั่วไหลออกมาข้างนอกเซลล์ จึงเกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Moreno et al., 2008)

โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารประกอบฟีนอลิกจะขึ้นอยู่กับตำแหน่งและจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group; -OH) ที่ประกอบกับอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ยิ่งมีหมู่ (-OH) เป็นองค์ประกอบหลายตำแหน่ง จะเกิดปฏิกิริยา hydroxylation เข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้มากขึ้น เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์ จึงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์มากกว่าสารที่มีไฮดรอกซิลเป็นองค์ประกอบน้อยกว่า นอกจากนั้นลักษณะของพันธะ ความยาวของสายคาร์บอน

และโครงสร้างชนิด aglycones และ glycoside ก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบฟีนอลิก (Cabezas-Pizarro, Redondo-Solano, Umaña-Gamboa, & Arias-Echandi, 2018; Coppo & Marchese, 2014; Daglia, 2012) จากโครงสร้าง สายคาร์บอนที่เป็นองค์ประกอบ ตำแหน่ง และจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล ทำให้สารประกอบฟีนอลิกแต่ละชนิดมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 2.9



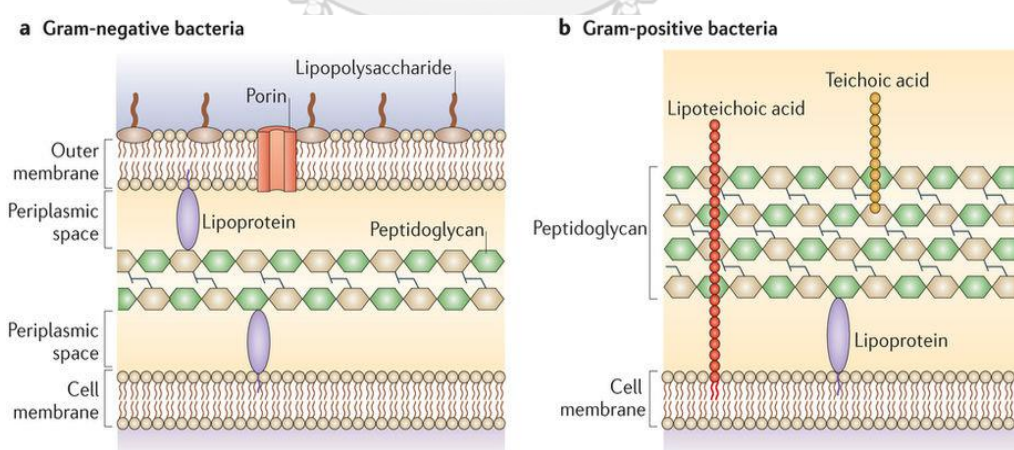
 <p>FLAVAN-3-OL</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p>	<p><i>V.cholerae</i> - <i>S.mutans</i> - <i>C.jejuni</i>  <i>C.perfringes</i> - <i>E.coli</i> - <i>B.Cereus</i>  <i>H.pylori</i> - <i>S.aureus</i> - <i>L.acidophilus</i>  <i>A.naeslundii</i> - <i>P.oralis</i> - <i>P.gingivalis</i>  <i>P.melaninogenica</i> - <i>F.nucleatum</i> -  <i>C.pneumonia</i></p> <p>Adenovirus- Enterovirus -Flu virus</p>
 <p>FLAVONOL</p>	<p>ANTIFUNGAL</p>	<p><i>Candida albicans</i>  <i>Microsporium gypseum</i>  <i>Trichophyton mentagrophytes</i>  <i>Trichophyton rubrum</i></p>
 <p>CONDENSED TANNIN</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p>	<p><i>S.mutans</i>  <i>E.coli</i>  <i>S.aureus</i></p> <p>influenza A virus  type -1 herpes simplex virus (HSV)</p>
 <p>HYDROLYSABLE TANNIS</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p> <p>ANTIVIRAL</p> <p>ANTIFUNGAL</p>	<p>Different strains of :  <i>Salmonella</i> - <i>Staphylococcus</i>  <i>Helicobacter</i> - <i>E.coli</i> - <i>Bacillus</i>  <i>Clostridium</i> - <i>Campylobacter</i>  <i>Lysteria</i></p> <p>Epstein-Barr virus  Herpes virus  HSV -1 and HSV -2,</p> <p><i>Candida parapsilosis</i></p>
 <p>PHENOLIC ACID</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p>	<p><i>S.aureus</i> - <i>L.monocytogenes</i>  <i>E.coli</i> - <i>P.aeruginosa</i></p>
 <p>NEOLIGNAN</p>	<p>ANTIBACTERIAL</p>	<p>Different strains of :  <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>

รูปที่ 2.9 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกและความไวต่อจุลินทรีย์

ที่มา : Maria (2012)

มีรายงานว่าสารกลุ่มฟลาโวนอล เช่น quercetin สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดี เนื่องจาก quercetin สามารถเข้าไปแย่งจับเอนไซม์ GyrB ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเซลล์ *E. coli* ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการสร้างพลังงานภายในเซลล์ถูกยับยั้ง (Hilliard et al., 1995; Plaper et al., 2003) ในขณะที่สารกลุ่มกรดฟีนอลิก เช่น gallic acid, caffeic acid และ ferulic acid มีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดี เนื่องจากยับยั้ง  $\alpha$ -hemolysin ที่เป็นสารพิษที่พบเฉพาะใน *S. aureus* ได้ โดย gallic acid จะมีผลต่อสมบัติการยึดเกาะ (adhesion properties) ในขณะที่ caffeic acid จะทำลายเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าไปทำลายกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ของ *S. aureus* (Luis, Silva, Sousa, Duarte, & Domingues, 2014)

Tenore และคณะ (2012) ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของเนื้อและเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บ พบว่า สารสกัดจากแก้วมังกรแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดีกว่าชนิดแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีโครงสร้างผนังเซลล์เป็นเปปติโดไกลแคน 90 เปอร์เซ็นต์ และกรดไทโคอิก (ดังแสดงในรูปที่ 2.10) ซึ่งผนังเซลล์นี้มีประสิทธิภาพในการเลือกผ่านเข้าออกของสารต่ำ (Scherrer & Gerhardt, 1971) ทำให้ไวต่อการยับยั้งด้วยสารสกัดได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่า โดยมีองค์ประกอบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเพิ่มความแข็งแรงให้เซลล์ และยังพบว่ามีช่องพอริน (porin) ซึ่งไม่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าออก (Matu & van Staden, 2003; West, 1983) นอกจากนั้นสารสกัดที่ได้ยังยับยั้งการเจริญของยีสต์และราได้อีกด้วย



รูปที่ 2.10 เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (a) และแบคทีเรียแกรมบวก (b)

ที่มา : Brown, 2015

จากคุณสมบัติและประโยชน์ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรที่เป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก ซึ่งสกัดได้จากธรรมชาติ จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร แต่จากสมบัติของสารสกัดจากธรรมชาติที่ไม่คงตัว และอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงของสีได้ในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นการนำสารสกัดมาใช้เพียงอย่างเดียวอาจมีประสิทธิภาพไม่ดีเพียงพอ ปัจจุบันจึงได้มีงานวิจัยสนใจการนำวัตถุดิบเจือปนอาหารที่มีความปลอดภัยมาใช้ร่วมกับสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสกัดดังกล่าว

## 2.5 โซเดียมแลกเตต

โซเดียมแลกเตต (sodium lactate) มีชื่อทางเคมีว่า sodium 2-hydroxypropanoate มีลักษณะเป็นของเหลวค่อนข้างข้นหนืด คล้ายน้ำเชื่อม สีไม่มีสี มีกลิ่นอ่อนๆ ที่เฉพาะตัว และสามารถละลายน้ำได้ดี ซึ่งโซเดียมแลกเตต (INS 325) มีการนำมาใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร โดยจัดให้อยู่ในกลุ่มสารปรับความเป็นกรด-ด่าง (acid regulator) (Codex Alimentarius Commission, 2016) และถูกจัดเป็นสารที่ผ่านการรับรองโดยองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาว่าสามารถใช้เติมลงไปในอาหารได้อย่างปลอดภัย ได้รับรองว่าเป็น GRAS ไม่จำกัดปริมาณการใช้ แต่จะให้ใช้เท่าที่จำเป็น (The United States Food and Drug Administration, 2014)

### 2.5.1 ความปลอดภัยของโซเดียมแลกเตต

เมื่อโซเดียมแลกเตตเข้าไปในร่างกาย จะอยู่ในรูปของสารละลายแอมคิลเลทตั้งเอเจนท์ (alkylating agent) และเกิดการเผาผลาญเป็นไบคาร์บอเนต (bicarbonate หรือ hydrogen-carbonate ion หรือ  $\text{HCO}_3^-$ ) ซึ่งเป็นสารประกอบอนินทรีย์ (inorganic compound) ในเลือดที่มีฤทธิ์เป็นด่าง และมีหน้าที่เป็นสารอิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) ที่ช่วยรักษาสมดุลของน้ำ รักษาความเป็นกรด-ด่างของเลือดให้คงที่ และทำให้เกิดสมดุลระหว่างอิเล็กโทรไลต์ภายนอกและภายในเซลล์ โดยร่างกายจะนำสารไบคาร์บอเนตไปที่ปอด และปอดจะเปลี่ยนสารนี้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วขับออกนอกร่างกายทางการหายใจออก นอกจากนั้น ไตยังเป็นตัวคอยช่วยรักษาสมดุลของสารนี้โดยการขับสารนี้ออกทางปัสสาวะ (Hartmanns, 2014)

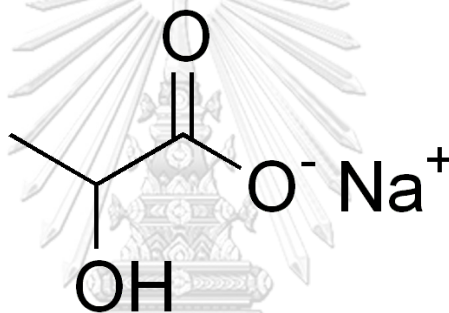
องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้จัดโซเดียมแลกเตตให้อยู่ในกลุ่มวัตถุเจือปนอาหารที่มีความปลอดภัย ไม่จำกัดปริมาณการใช้ แต่จะให้ใช้เท่าที่จำเป็น และระบบการตรวจสอบความปลอดภัยสินค้าอาหารของสหรัฐอเมริกา (Food Safety and Inspection Service : FSIS) ได้แนะนำการเติมโซเดียมแลกเตตที่มีจุดประสงค์เพื่อใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร ว่าไม่ควรเติม



มากกว่า 4.8% ของปริมาณอาหาร (FSIS, 2000) นอกจากนั้นสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของประเทศไทยได้จัดโซเดียมแลกเตตเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ชนิดแร่ธาตุให้อยู่ในกลุ่มโซเดียม โดยกำหนดปริมาณสูงสุดที่ใช้ตามคำแนะนำให้บริโภค 1 วัน ต้องไม่เกิน 2,400 mg (คำนวณเป็นโซเดียม) (ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2548)

### 2.5.2 สมบัติของโซเดียมแลกเตต

โซเดียมแลกเตตเป็นสารประกอบเคมีประเภทเกลือโซเดียมของกรดแลคติก มีสูตรทางเคมีคือ  $C_3H_5NaO_3$  และโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 2.11 เป็นผลผลิตจากกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีส่วนประกอบของนม หรือพืชที่เป็นแหล่งของน้ำตาล เช่น ข้าวโพด บีท หรือมันฝรั่ง ซึ่งมีคุณสมบัติดังแสดงในตารางที่ 2.4



รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของโซเดียมแลกเตต

ตารางที่ 2.4 สมบัติของโซเดียมแลกเตต

สมบัติ	
มวลโมเลกุล	112.06 g/mol
ความหนาแน่น	1.33 g/mL, 1.31 g/mL (60 % syrup)
จุดหลอมเหลว	161- 162 °C (322- 324 °F; 434-435 K) 17 °C (60 % syrup)
จุดเดือด	113 °C (235 °F; 386 K) (60 % syrup)
ความสามารถในการละลายน้ำ	> 1.5 g/mL

จากคุณสมบัติของโซเดียมแลกเตตที่ละลายน้ำได้ดี จึงเป็นที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้ Sodium L-lactate 60% (w/w) ที่เป็นของเหลวชั้นหนึ่มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ใช้ในบะหมี่ ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากแป้งสาลีเพื่อช่วยปรับปรุงความเหนียวนุ่ม เนื้อสัตว์สดต่างๆ เช่น เนื้อปลา, เนื้อไก่ และผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง รวมถึงอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมยา

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโซเดียมแลกเตตมีสมบัติ ดังนี้

1. เป็นวัตถุกันเสีย เนื่องจากมีสมบัติในการลดค่า  $a_w$  และเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (Bingol & Bostan, 2007; P. C. Houtsma, de Wit, & Rombouts, 1993; Shelef, 1994)
2. ปรับปรุงคุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่น สี เนื้อสัมผัส และกลิ่นรส (Bingol & Bostan, 2007)
3. เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Sallam & Samejima, 2004)
4. ปรับสมดุลกรด-ด่างของผลิตภัณฑ์อาหาร (Bingol & Bostan, 2007)

Sallam และ Samejima (2004) ศึกษาการเติมโซเดียมแลกเตตลงในเนื้อวัว แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 °C เป็นเวลา 21 วัน พบว่า (1) โซเดียมแลกเตตมีความสามารถชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อวัว ได้แก่ *Lactic acid bacteria*, *L. monocytogenes*, *E. coli* และ *Clostridium botulinum* (2) ยังคงคุณภาพทางเคมีของเนื้อวัว และ (3) รักษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของเนื้อวัวได้ โดยมีค่า pH เพิ่มขึ้น 0.01±0.03 จึงช่วยให้เนื้อวัวสดมีอายุการเก็บรักษามากกว่า 15 วัน ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมมีอายุการเก็บรักษา 8 วัน

Bingol และ Bostan (2007) ศึกษาผลของเติมโซเดียมแลกเตตต่อคุณภาพด้านจุลินทรีย์และอายุการเก็บรักษาของไส้กรอก โดยการเติมโซเดียมแลกเตตที่ความเข้มข้น 0–1.8% ต่อปริมาณไส้กรอก ที่การเก็บรักษา 4 °C เป็นเวลา 60 วัน พบว่าการเติมโซเดียมแลกเตตไม่มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัส ค่าสี และไม่เปลี่ยนแปลงค่า pH ของผลิตภัณฑ์ นอกจากนั้นยังช่วยชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมแลกเตต การเจริญของจุลินทรีย์ในไส้กรอกยิ่งลดลง จึงสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของไส้กรอกได้

Bingol และคณะ (2013) ศึกษาการเติมโซเดียมแลกเตตลงในลูกชิ้น พบว่า การใช้โซเดียมแลกเตต 4% สามารถชะลอการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ 0.5-1.5 log CFU/g, ลดค่า  $a_w$  และ pH ของลูกชิ้นได้

### 2.5.3 สมบัติการต้านจุลินทรีย์

โซเดียมแลกเตตเป็นวัตถุเจือปนอาหารที่นิยมเติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากโซเดียมแลกเตตมีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งสามารถจำแนกกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งได้ ดังนี้

1. รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย โดยโมเลกุลของกรดที่อยู่ในรูปไม่แตกตัว (undissociated form) ของโซเดียมแลกเตตจะอยู่ในรูป Lipophilic form สามารถแพร่ผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ เข้าไปในภายในเซลล์และแตกตัวในรูปของกรดอยู่ภายในเซลล์ ทำให้ pH ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีค่าต่ำกว่าปกติ จุลินทรีย์เกิดความเครียดในการรักษาสสมดุลระหว่าง pH ภายในและภายนอกเซลล์ จึงทำให้กลไกการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ถูกยับยั้งและจุลินทรีย์ตายในที่สุด (Shelef, 1994; Stratford, 2000)
2. รบกวนการทำงานของระบบเมตาบอลิซึม (metabolism) โดยโมเลกุลของกรดที่แตกตัวอยู่ภายในเซลล์อาจมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับสารเมแทบอลอไลต์ ซึ่งจะเข้าไปทำปฏิกิริยาแทนที่แย่งจับกับตัวพา (carrier) ทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ต้องจับกับ carrier ไม่มีที่จับ ไม่เกิดการสร้างพลังงานภายในเซลล์ เกิดการสูญเสียพลังงานของเซลล์ ทำให้เซลล์ในช่วง Lag phase ยืดยาวออกไปเรื่อยๆ เนื่องจากขาดพลังงานที่ต้องใช้ในการเจริญเติบโต เกิดการลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (Wit de & Rombouts, 1990)
3. คุณสมบัติในการจับแร่ธาตุที่เป็นสารอาหารในการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่เกิดการสร้างเซลล์ มีผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์และทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Nanasombat, 2009)

จากการรายงานโซเดียมแลกเตตจะมีความสามารถในการการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีเมื่ออยู่ใน media ที่มีค่า pH ต่ำ เนื่องจากจะทำให้โซเดียมแลกเตตไม่เกิดการแตกตัวของกรด สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรียได้ดี ส่วนในเซลล์ของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งมีช่องพอริน (porin) ที่ไม่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าออก ดังนั้นการที่โซเดียมแลกเตตจะเข้าไปในเซลล์จะต้องอาศัยตัวพา (carrier-mediated transport) โดยอัตราการขนส่งจะขึ้นอยู่กับ proton gradient และ lactate gradient (Wit de & Rombouts, 1990)

Houtsma (1993) ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของโซเดียมแลกเตตโดยการวิเคราะห์ค่า Minimum inhibitory concentrations (MIC) ภายใต้การเจริญที่ pH 6.5 และอุณหภูมิ 20° C พบว่าโซเดียมแลกเตตสามารถต้านการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบและต้านการเจริญ

ยีสต์ได้ต่ำ โดยด้านการเจริญ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *Lactic acid bacteria*, *B. cereus*, *Salmonella* spp. และ *Zygosaccharomyces bailii* ซึ่งมีค่า MIC เท่ากับ 268, 446, 625, 714 และ 1339 mM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาการเติมโซเดียมแลกเตตและโซเดียมคลอไรด์ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ พบว่าเนื้อสัตว์ที่เติมโซเดียมแลกเตตมีการเจริญของจุลินทรีย์น้อยกว่าเนื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ จากผลการศึกษา Houtsma แนะนำให้เติมโซเดียมแลกเตตแทนการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เนื่องจากให้ค่า pH ที่ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ ไม่มีผลต่อกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานกว่า

Houtsma (1996) ศึกษาผลของ pH (5.7-7.0) และอุณหภูมิ (4-37 °C) ต่อค่า MIC ของโซเดียมแลกเตตต่อจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย พบว่าโซเดียมแลกเตตด้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่ pH ต่ำ โดยที่ pH 5.7 มีค่า MIC  $\geq$  268 mM แต่อย่างไรก็ตามค่า pH ไม่มีผลต่อค่า MIC ของ *S. aureus*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis* และ *Lactic acid bacteria*

Nanasombat และ Chooprang (2009) ศึกษาค่า MIC ของโซเดียมแลกเตตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีการปรับ pH ที่ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7 พบว่า ที่ค่า pH ต่ำ (4.5-5.0) สามารถด้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่าที่ pH สูง (5.5-7) โดยแสดงค่า MIC เท่ากับ 23.9 – 47.8 mg/mL และ 47.80 – 191.25 mg/mL ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการใช้โซเดียมแลกเตตร่วมกับสารสกัดจากธรรมชาติ โดย Schelegueda และคณะ (2012) ได้ศึกษาการใช้โซเดียมแลกเตตร่วมกับโคโตซานซึ่งเป็นสารสกัดจากธรรมชาติที่สกัดจากเปลือกกุ้ง เปรียบเทียบกับการใช้โพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับไนซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก ในการศึกษาค่า MIC และประเมินจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อปลา พบว่า การใช้โซเดียมแลกเตตร่วมกับโคโตซาน ทำให้ค่า MIC ของโคโตซานลดลง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ในเนื้อปลามากกว่าการใช้โคโตซานเพียงตัวเดียวและมากกว่าการใช้โพแทสเซียมซอร์เบตร่วมกับไนซิน

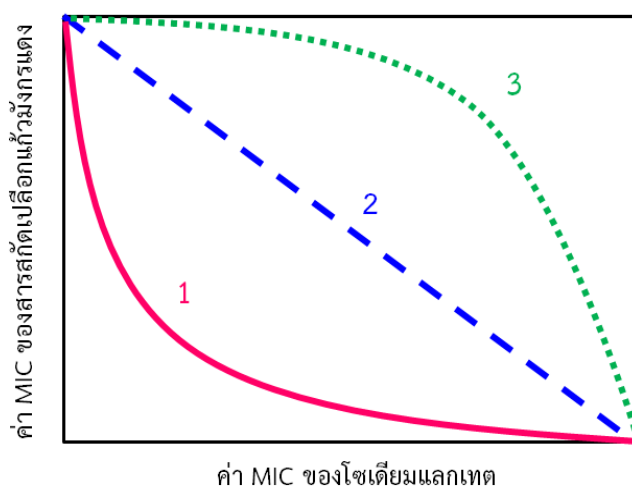
ในปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับนำวัตถุเจือปนอาหารในกลุ่ม GRAS มาใช้ร่วมกับสารสกัดจากธรรมชาติในการยับยั้งจุลินทรีย์และให้ประโยชน์อื่นๆ กับผลิตภัณฑ์อาหารได้รับความนิยมน่าจะเพิ่มขึ้น โดยการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันเพื่อหาสารที่เสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งจุลินทรีย์ เรียกว่า อันตรกิริยาระหว่างสารต้านจุลชีพ (antimicrobial interaction)

## 2.6 อันตรกิริยาระหว่างสารต้านจุลชีพ

อันตรกิริยาระหว่างสารต้านจุลชีพ เป็นการศึกษาเพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของการใช้สารร่วมกัน โดยการใช้ลักษณะของกราฟในการแสดงผล ซึ่งได้จากการนำค่าการต้านจุลินทรีย์ (MIC) ของสารทดสอบแต่ละตัวมาแปรความเข้มข้น เพื่อหาผลของการใช้สารทั้งสองตัวร่วมกัน ได้ลักษณะกราฟดังแสดงในรูปที่ 2.12 และ 2.13 แสดงผลแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ

- เส้นที่ 1 Synergistic effect หมายถึง สารทั้งสองชนิดมีการเสริมฤทธิ์กัน ก่อให้เกิดผลร่วมกัน โดยผลที่เกิดจะเกิดเป็นเท่าทวีคูณ (ต่ำกว่าเส้นของสารเดี่ยว)
- เส้นที่ 2 Additive effect หมายถึง สารต้านจุลชีพทั้งสองชนิดก่อให้เกิดผลร่วมกัน โดยผลที่เกิดเหมือนการนำสารสองชนิดมาบวกกัน
- เส้นที่ 3 Antagonistic effect หรือ Antagonism หมายถึง สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านกัน (สูงกว่าเส้นของสารเดี่ยว)

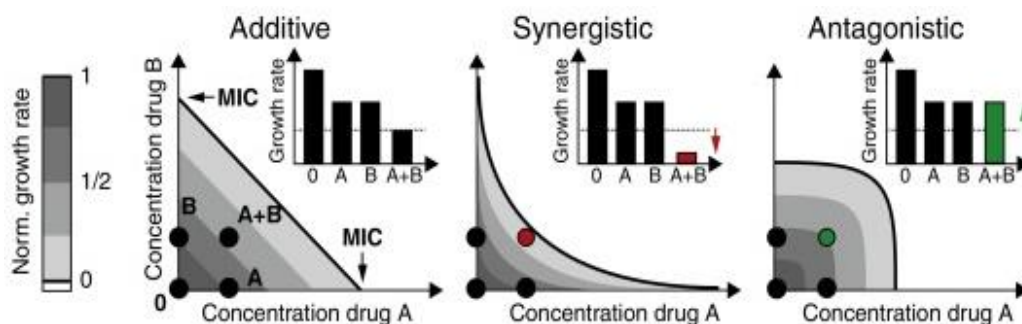
ในการศึกษาถ้าสารทั้งสองตัวแสดงผลเป็น Synergistic effect แสดงว่าเมื่อใช้สารทั้งสองตัวร่วมกันจะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้สารเพียงตัวเดียว และแสดงผล Antagonistic เมื่อใช้สารทั้งสองตัวร่วมกันแล้วให้ผลการยับยั้งที่น้อยกว่าการใช้สารเพียงตัวเดียว (Bollenbach, 2015)



รูปที่ 2.12 กราฟของอันตรกิริยาระหว่างสารต้านจุลชีพ

เมื่อ ( — ) แทนเส้นที่ 1, ( - - ) แทนเส้นที่ 2 และ ( ..... ) แทนเส้นที่ 3

ที่มา : ดัดแปลงจาก Bollenbach (2015)



รูปที่ 2.13 กราฟอันตรกิริยาของสารต้านจุลินทรีย์จากการนำค่า MIC ของสารแต่ละตัวมาแปรความเข้มข้น  
ที่มา : Bollenbach (2015)

## 2.7 คัสตาร์ดครีม

คัสตาร์ดครีม (custard cream) ดังแสดงในรูปที่ 2.14 มีส่วนประกอบหลักเป็นนมและไข่ นิยมใช้เป็นส่วนประกอบของขนมในการทำเพสตรี เค้ก และครีมพัฟ ซึ่งเป็นของหวานสัญชาติฝรั่งเศส ที่คนไทยรู้จักกันในชื่อแอสเครร์ ที่ใช้คัสตาร์ดครีมบีบใส่ใส่เข้าไปในช่องว่างของแป้งพัฟให้เต็ม (Arakawa et al., 2009) การทำคัสตาร์ดครีมโดยการผสมนมสด ไข่ น้ำตาล แป้ง วานิลลา และนำไปให้ความร้อนโดยการนึ่ง อบ หรือกวนบนเตาแบบรองน้ำ (double boiler หรือ bain-marie) แล้วคนจนขึ้นรูป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
Chulalongkorn University



รูปที่ 2.14 คัสตาร์ดครีม

## 2.7.1 การเสื่อมเสียของคัสตาร์ดครีม

### 2.7.1.1 การเสื่อมเสียทางกายภาพ

การสูญเสียความชื้นเป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียทางกายภาพ โดยทำให้เกิดการแข็งตัวของเนื้อมัน เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา สามารถแก้ไขโดยการเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมเพื่อคุมการผ่านเข้าออกของไอน้ำ

### 2.7.1.2 การเสื่อมเสียทางเคมี

การเกิดกลิ่นหืน (rancidity) เนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) และการเปลี่ยนแปลงสี เนื่องจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ประเภท Maillard reaction ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดระหว่างกรดอะมิโน และน้ำตาลแล็กโทส (lactose) ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน (thermal processing) และระหว่างการเก็บรักษา ทำให้ผลิตภัณฑ์จากนมมีสีคล้ำขึ้น

การแยกตัวของน้ำออกของผลิตภัณฑ์ (syneresis) เป็นการหดตัวของอาหารประเภทเจลเมื่อตั้งทิ้งไว้ เนื่องจากมีของเหลวบางส่วนไหลออกมาจากเจล หรืออาจเกิดขึ้นจากการแข็งตัวของน้ำนม เช่น การเกิดการจับน้ำออกของโยเกิร์ต วุ้น และสังขยา เป็นต้น

### 2.7.1.3 การเสื่อมเสียทางจุลินทรีย์

คัสตาร์ดครีมจัดว่าเป็นอาหารเน่าเสียง่าย (perishable food) เนื่องจากมีความชื้นสูงและมีส่วนประกอบหลักเป็นนม และไข่แดง ซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารสำคัญของจุลินทรีย์ มีค่า pH 5.8-6.6 และมีค่า  $a_w$  มากกว่า 0.85 (Voysey, 2011) จากส่วนประกอบและสมบัติทางเคมีของคัสตาร์ดครีม ทำให้เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากส่วนประกอบในการผลิตและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย ทำให้คัสตาร์ดครีมมีอายุการเก็บรักษาที่สั้น มีกลิ่น รส และลักษณะของอาหารเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนั้นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียยังเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของสหรัฐอเมริกา (The U.S. Centers for Disease Control and Prevention; CDC) (Langer et al., 2012) มีการรายงานโรคที่เกิดจากอาหารเป็นสื่อที่มาจากผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ นม โยเกิร์ต ชีส และขนมหวานจากนม เช่น คัสตาร์ดครีม มีส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่เอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารที่เกิดขึ้นก่อนกระบวนการผลิต ระหว่างกระบวนการผลิต การเก็บรักษา การขนส่ง และการวางขาย (Oliver, Jayarao, & Almeida,

2005) โดยจุลินทรีย์ก่อโรคที่สามารถเจริญได้ในคัสตาร์ดครีมและเป็นปัญหาต่อสุขภาพที่ได้รับความสนใจ ได้แก่ *B. cereus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* O157:H7 (Bennett, Walsh, & Gould, 2013) นอกจากนั้นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่พบส่วนใหญ่ในคัสตาร์ดครีมคือ *S. aureus*

*B. cereus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่อยู่ในกลุ่มที่สร้างสปอร์ สามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ ปนเปื้อนมาในอาหารประเภทธัญพืช หรืออาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบผลิตภัณฑ์นม ปะปนมากับอาหารแห้ง เช่น น้ำตาล และการสัมผัสกับผลิตภัณฑ์โดยตรง ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้เป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษที่ทำให้เกิดอาการอาเจียน (emetic syndrome) และ ถ่ายเหลว (diarrhea syndrome) (B.-Y. Kim, Lee, & Ha, 2011; H. C. Wong, Chang, & Fan, 1988)

*S. Typhimurium* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae ที่จัดอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobe คือ เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศ เจริญได้ดีกว่า และไม่สร้างสปอร์ ทำให้เกิดโรคซาลโมเนลโลซิส (salmonellosis) ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ (infection) ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดอาการลำไส้อักเสบ (gastroenteritis) แหล่งการปนเปื้อนมาจากไข่ นำนม และผลิตภัณฑ์จากนม (นิรียา รัตนปพนท์ และ พิมพ์เพ็ญ พร เฉลิมพงศ์, 2553)

*E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae และเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มโคลิฟอร์ม (coliform) ประเภท fecal coliform ซึ่งเป็นโคลิฟอร์มที่พบในอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น จึงใช้เป็นตัวชี้บ่งชี้สุขลักษณะของอาหารและน้ำ โดยชนิดที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษคือ Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) มีอาการทั่วไปคือ ท้องร่วง ปวดท้อง ไข้ต่ำ คลื่นไส้ และอ่อนเพลีย นอกจากนั้น Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) หรือ *E. coli* O157:H7 สามารถสร้างสารพิษประเภท verotoxin ที่ทำให้เกิดความเสียหายให้แก่เยื่อของลำไส้ ความรุนแรงคือทำให้เกิดลำไส้ใหญ่อักเสบจนตกเลือด (hemorrhagic colitis) อาการคือ ปวดท้องรุนแรง อุจจาระร่วงในระยะแรกและกลายเป็นมูกเลือดในระยะต่อมา อาจมีอาการอาเจียนและมีไข้ต่ำร่วมด้วย โดยอาหารที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ เนื้อบดหรือแฮมเบอร์เกอร์ดิบหรือไม่ค่อยสุก นอกจากนี้ยังอาจพบในหน่อไม้ฝรั่ง น้ำผลไม้ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไส้กรอกหมูปนเนื้อวัว ผักกาดหอม เนื้อสัตว์ป่า ไข่ และนํ้านมดิบ (Prevention, 2011)

*S. aureus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ชนิด intoxication ซึ่งเกิดจากบริโภคอาหารที่มีสารพิษ enterotoxin ที่เชื้อสร้างขึ้น ปนเปื้อนในปริมาณน้อยกว่า 1 µg จะสามารถทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยได้ มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคริวในช่องท้องและอ่อนเพลีย ผู้ป่วยบางรายมีอาการปวดศีรษะ เป็นตะคริวที่กล้ามเนื้อ และมีการเปลี่ยนแปลงความ



ต้นโลหิตเป็นระยะๆ รวมทั้งอาจมีการเดินของซีพอร์พิดปกติ ซึ่งโดยทั่วไปอาการจะดีขึ้นภายใน 2-3 วัน (Cotter, Hill, & Ross, 2005) โดย *S. aureus* เป็นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาจากการผลิตที่ไม่ถูกสุขลักษณะ ในการใช้มือสัมผัสกับอาหารโดยตรงในระหว่างการใส่ไส้คัสตาร์ดครีมลงในขนมชนิดต่างๆ รวมถึงการปนเปื้อนข้าม (cross contamination) ในระหว่างบรรจุ และการวางขาย

จากสมบัติของคัสตาร์ดครีมที่เป็นอาหารที่เน่าเสียง่าย มีอายุการเก็บรักษาที่สั้นและอันตรายที่เกิดจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารในคัสตาร์ดครีม จึงได้มีการกำหนดจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบในคัสตาร์ดครีมเพื่อเป็นตัวกำหนดมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ และมีการนำวิธีต่างๆ มาใช้ในกระบวนการผลิต รวมถึงการนำสารจากธรรมชาติมาใช้ เพื่อลดการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารและยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์

### 2.7.2 ข้อกำหนดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในคัสตาร์ดครีม

จากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในคัสตาร์ดครีมที่ทำให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภค หน่วยงานต่างๆ จึงได้มีการกำหนดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ไว้ จากประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 364) พ.ศ.2556 ได้ระบุสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในผลิตภัณฑ์ครีมและกำหนดปริมาณที่ตรวจพบ ดังนี้ (1) *Salmonella* spp. ไม่พบใน 25 กรัม (2) *S. aureus* ไม่พบใน 0.1 กรัม (3) *B. cereus* ไม่เกิน 100 ใน 1 กรัม (CFU/g) และ (4) *L. monocytogenes* ไม่พบใน 25 กรัม

### 2.7.3 การศึกษาวิธีการลดการเสื่อมเสียและลดการเจริญของจุลินทรีย์ในคัสตาร์ดครีม

จากอายุการเก็บรักษาที่สั้นและอันตรายที่เกิดจากปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในคัสตาร์ดครีม จึงได้มีการนำวิธีต่างๆ มาใช้ในกระบวนการผลิต เพื่อลดการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารและยืดอายุการเก็บรักษาคัสตาร์ดครีม

Cotter และคณะ (2005) ศึกษาผลการใช้วัตถุกันเสียสังเคราะห์ (biopreservatives) โดยการผลิตแบคทีเรียแบคทีริโอซิน เช่น นิสิน (nisin) ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ แต่วัตถุกันเสียที่ใช้มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์แบบแคบ (narrow antimicrobial activity) จึงไม่นิยมนำมาใช้

Arakawa และคณะ (2009) ศึกษาผลการใช้วัตถุกันเสียสังเคราะห์ที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ โดยการผลิตแบคทีเรียแบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกร่วมกับ

การใช้ไกลซีน (glycine) เพื่อลดการเสื่อมเสียของคัสตาร์ดครีม แต่แบคทีเรียชนิดนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์แบบแคบ จึงไม่นิยมนำมาใช้

Newton และคณะ (2012) ศึกษาผลการใช้ความร้อนโดยใช้ความร้อนต่ำ - เวลานาน (low temperature - long time; LTLT), วิธีใช้ความร้อนสูง - เวลาสั้น (high temperature - short time; HTST) และ Ultra high temperature (UHT) ร่วมกับสารเคมีในการเป็นวัตถุกันเสีย แต่วิธีนี้ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล รวมถึงความร้อนที่ใช้ทำให้กลิ่นรสและคุณค่าทางโภชนาการของอาหารลดลง

Choi และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลของการเติม thiamine dilaurylsulfate (TDS) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของวิตามินบี 1 ลงในคัสตาร์ดครีมเพื่อดำเนินการเจริญของ *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* และสปอร์ของ *B. cereus* โดยการเติม TDS ร้อยละ 0, 0.1, 0.5, 1 และ 2 ลงไปในคัสตาร์ดครีมที่มีการเติมเชื้อ ศึกษาเป็นเวลา 5 วัน ที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 °C พบว่า การใช้ TDS ร้อยละ 2 ทำให้การเจริญของ *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* และ *L. monocytogenes* ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงเท่ากับ 2.43, 2.37 และ 0.93 log CFU/g ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่อุณหภูมิ 25 °C มากกว่าที่อุณหภูมิ 4 °C แต่อย่างไรก็ตามจำนวนสปอร์ของ *B. cereus* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 25 °C

## 2.8 ช่องว่างทางวิชาการและสมมติฐานในงานวิจัย

จนถึงปัจจุบันยังไม่มียานวิจัยที่ศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ปลอดภัยที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารได้ รวมถึงยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตในผลิตภัณฑ์อาหาร งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดด้วยตัวทำละลายที่ปลอดภัยร่วมกับโซเดียมแลกเตตที่เหมาะสมสำหรับการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารและลดการเสื่อมเสียของคัสตาร์ดครีม ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดง และสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตต ไปใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ในอาหาร เพื่อลดการเสื่อมเสียของอาหารและลดอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดต่างๆ รวมถึงช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารในอุตสาหกรรมอาหารได้

**บทที่ 3**  
**วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงานวิจัย**

**3.1 วัตถุดิบ สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และอุปกรณ์**

**3.1.1 วัตถุดิบ**

- แก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดง เก็บเกี่ยวหลังจากออกดอก 30-40 วัน ในช่วงเดือน พฤษภาคม-ตุลาคม ปี พ.ศ. 2560 จากสวนเกษตรแก้วมังกรเก่งกับเฮง รั้งสิต คลอง 10 จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย
- Sodium lactate 60% (w/w), Food grade (Corbion purac, Thailand)
- แบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ทดสอบ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาคเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่

*Staphylococcus aureus* ATCC25923

*Bacillus cereus* ATCC6633

*Salmonella* Typhimurium ATCC1331

*Escherichia coli* ATCC25922

**3.1.2 สารเคมี**

- 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma Aldrich, USA)
- 2,4,6-TRIS (2-PYRIDYL)-S-TRIAZINE (Sigma Aldrich, USA)
- Absolute Ethanol 99.9% (QReC, New Zealand)
- Acetic acid (QReC, New Zealand)
- Acetonitrile HPLC grade (RCI Labscan, Thailand)
- Ascorbic acid (Ajax Finechem, Australia)
- Betanin HPLC grade (Sigma Aldrich, USA)
- Caffeic acid HPLC grade (Sigma-Aldrich, Germany)
- Ferrous sulfate (QReC, New Zealand)
- Ferulic acid HPLC grade (Sigma-Aldrich, Germany)
- Folin and Ciocalteu's phenol reagent (Merck, Germany)

- Gallic acid (Sigma Aldrich, USA)
- Hydrochloric acid (QReC, New Zealand)
- Iron (III) Chloride hexahydrate (QReC, New Zealand)
- Methanol (QReC, New Zealand)
- Methanol HPLC grade (QReC, New Zealand)
- Phenolphthalein (Merck, Germany)
- Pyrogallol HPLC grade (Sigma-Aldrich, Germany)
- Rutin HPLC grade (Sigma-Aldrich, Germany)
- Sodium acetate hydrate (Ajax Finechem, Australia)
- Sodium carbonate anhydrous (Loba Chemie, India)
- Sodium chloride (Ajax Finechem, Australia)
- Trifluoroacetic acid : TFA HPLC grad (Sigma-Aldrich, Germany)

### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Baird-Parker Agar (Himedia, India)
- Egg Yolk Tellurite Emulsion (Himedia, India)
- Eosin Methylene Blue Agar, Levine (Himedia, India)
- Mueller-Hinton Agar (Himedia, India)
- Mueller Hinton Broth (Himedia, India)
- Nutrient Agar (Himedia, India)
- Nutrient Broth (Himedia, India)
- Plate Count Agar (Himedia, India)
- Tryptone Soya Broth (Himedia, India)
- Xylose-Lysine Deoxycholate Agar (Himedia, India)
- Compact Dry (R) X-BC (Nissui, Japan)

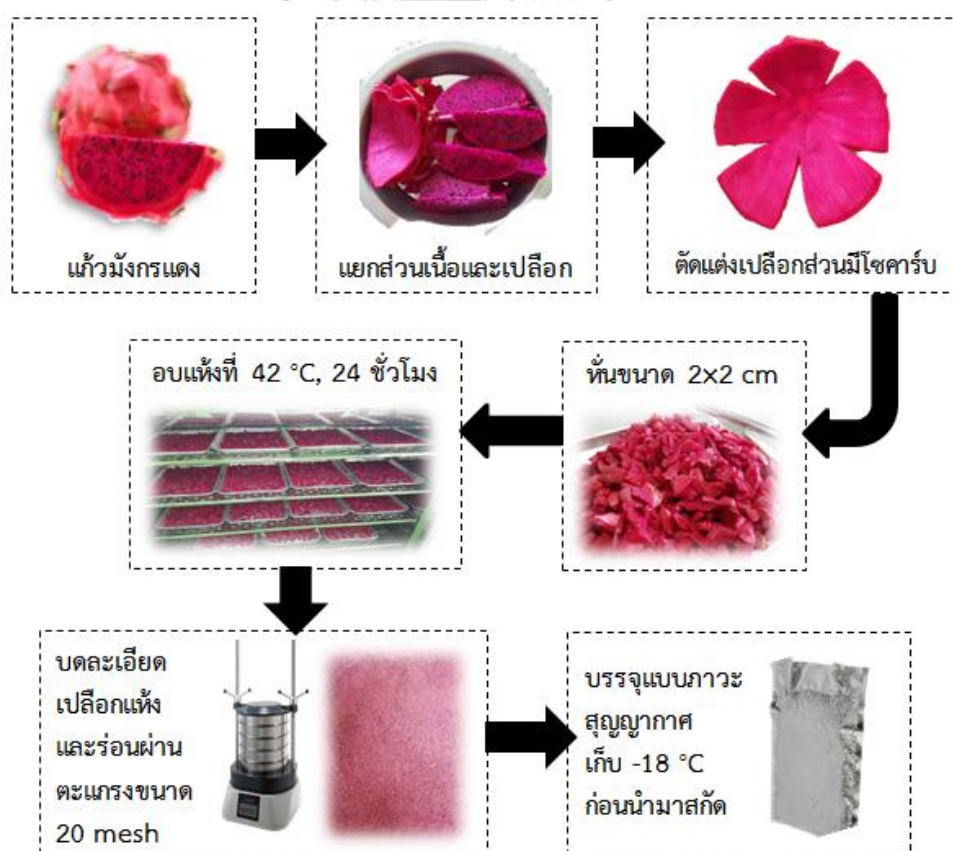
### 3.1.4 อุปกรณ์ (เครื่องมือ)

- เครื่อง Autoclave (Tomy รุ่น SX700, Japan)
- เครื่อง Centrifuge (Hettich zentrifugen รุ่น 19, Germany)
- เครื่อง Centrifuge (Refrigerated centrifuge รุ่น Z36HK, Germany)
- เครื่อง Chroma Meters (Model CR-400 series, Minolta, Japan)
- เครื่อง Freeze dryer (Labconco® Mobile Freeze Dryer Lyophilizer Vacuum รุ่น 77540, USA)
- เครื่อง HPLC (Agilent, 1200 series, Germany)
- เครื่อง Hot air oven (Mettmert, รุ่น DO 6062, Germany)
- เครื่อง pH meter (Mettler toledo, Switzerland)
- เครื่อง Refractometer (Master-Alpha Series, รุ่น Atago, USA)
- เครื่อง Rotary evaporator (Buchi Rotavapor รุ่น R-114, Germany)
- เครื่อง Texture analyser (iCON รุ่น TA.XT2i, USA)
- เครื่อง UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic, รุ่น Genesys 10 uv, USA)
- เครื่อง Vacuum sealer (Multivac, รุ่น A300/16, Germany)
- เครื่อง Vortex mixer (CTL, รุ่น CTL-107, Japan)
- เครื่อง Water bath (Mettmert, รุ่น WNB 22, Germany)
- เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าตตินิยม 2 ตำแหน่ง (ML1602 Mettler Toledo, Switzerland)
- เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าตตินิยม 4 ตำแหน่ง (ML204 Mettler Toledo, Switzerland)
- เครื่องปั่นผสม (Philips, Cucina Scan 1000, Singapore)
- ตู้บ่ม (Heraeus, รุ่น B5042, Germany)
- ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (WiseCube® fuzzy control system, India)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Model BioUltra4, TelStar, Spain)
- เต้าไฟฟ้า (Imarflex, รุ่น IF-404, China)
- ตู้แช่เยือกแข็ง อุณหภูมิ -60 °C (Model, รุ่น TFA-ARC270, Thailand)
- ตู้เย็น 4 °C (Panasonic, รุ่น SF-PC997, Thailand)
- งานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ขนาด 15x90 mm (Himedia, India)

## 3.2 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.2.1 การเตรียมตัวอย่างเปลือกแก้วมังกรแดง

การเตรียมตัวอย่างเปลือกแก้วมังกรแดงเพื่อนำไปสกัดโดยตัดแปลงจากวิธีของ Fathordoobady และคณะ (2016) และอรุษา เขาวนลิขิต และคณะ (2553) ผลแก้วมังกรแดงสดที่มีระยะเวลาการสุก 30-40 วันหลังจากออกดอก จากสวนเกษตรแก้วมังกรเก่งกับเฮง จังหวัดปทุมธานี ถูกขนส่งมายัง ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำผลสดแก้วมังกรแดงมาล้างและผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำมีดมาปอกเปลือกแยกส่วนเนื้อและเปลือกส่วนมีโซคาร์บออกจากกัน จากนั้นนำเปลือกมาหั่นเป็นชิ้นขนาด 2x2 cm และนำมาอบแห้งโดยใช้ตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเปลือกที่ผ่านการอบแห้งมาบดละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 20 mesh (อนุภาคขนาด น้อยกว่า 0.8 mm) แล้วนำมาบรรจุใส่ถุงออลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต โดยบรรจุแบบภาวะสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 °C ก่อนนำมาสกัดในขั้นตอนต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 3.1

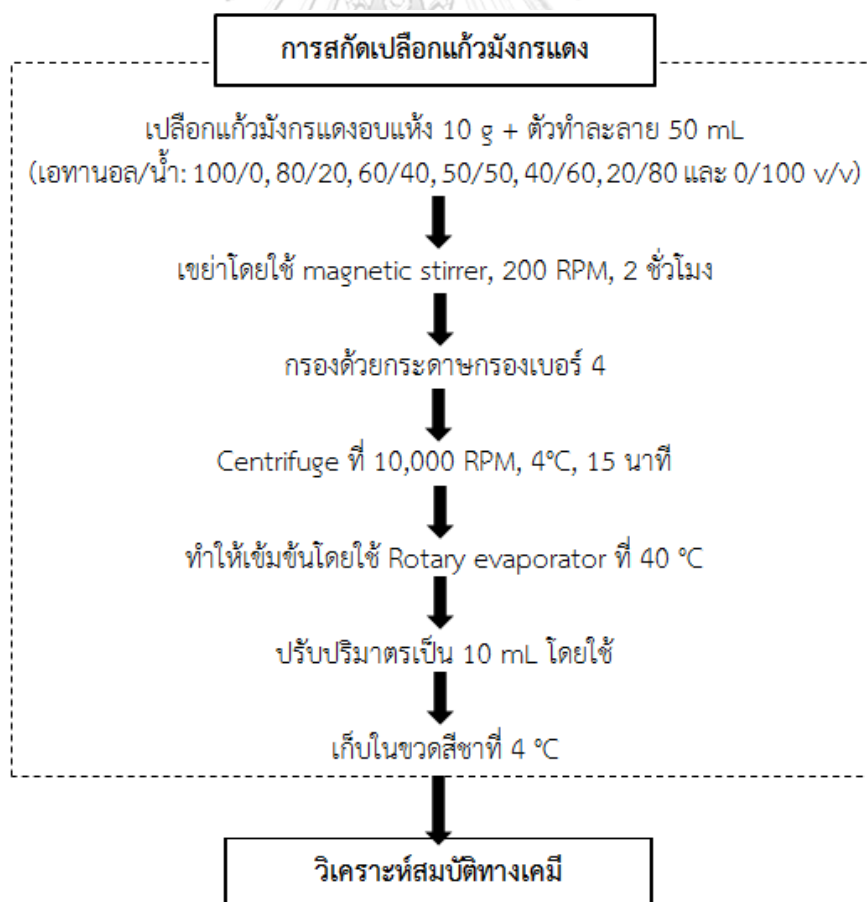


รูปที่ 3.1 การเตรียมตัวอย่างเปลือกแก้วมังกรแดง

### 3.2.2 การศึกษาวิธีการสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงโดยใช้เอทานอลและน้ำ

#### 3.2.2.1 การสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บ

การสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงโดยดัดแปลงจากวิธีของ Fathordoobady และคณะ (2016) และอรุษา เขาวนลิขิต และคณะ (2553) ดังแสดงในรูปที่ 3.2 นำเปลือกแก้วมังกรแดงที่ผ่านการอบแห้ง  $10 \pm 0.01$  g มาสกัดโดยใช้วิธีการแช่ในสารละลายเอทานอลผสมกับน้ำ 50 mL ที่อัตราส่วนต่างๆ (เอทานอล/น้ำ: 100/0, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80 และ 0/100 v/v) โดยใช้ magnetic stirrer ที่ 200 รอบ/นาที (revolutions per minute; RPM) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนที่เป็นส่วนใส (supernatant) ไประเหยเอทานอลออกภายใต้ภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  ใน Rotary evaporator หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปรับให้มีปริมาตร 10 mL โดยใช้ น้ำ DI (deionized water) และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ขั้นต่อไป



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการสกัดสารจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บ

### 3.2.2.2 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารสกัดเข้มข้นจากข้อ 3.2.2.1

- 3.2.2.2.1 ปริมาณเบต้าไซยานิน (betacyanin content) ตามวิธีของ Stintzing และคณะ (2002) (ภาคผนวก ข.4)
- 3.2.2.2.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic compounds) โดย Folin-Ciocalteu colorimetry ตามวิธีของ Waterhouse (2002) (ภาคผนวก ข.5)
- 3.2.2.2.3 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity ดัดแปลงตามวิธีของ Brand-Williams และคณะ (1995) (ภาคผนวก ข.6)
- 3.2.2.2.4 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ดัดแปลงตามวิธีของ Fathordoobady และคณะ (2016) (ภาคผนวก ข.7)

### 3.2.3 การสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและศึกษาสมบัติของสารสกัด

เลือกอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากวิธีการสกัดที่ให้ปริมาณเบต้าไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดจากข้อ 3.2.2 โดยใช้วิธีการสกัดเดียวกับข้อ 3.2.2.1 โดยหลังจากได้สารสกัดเข้มข้นแล้ว นำสารสกัดเข้มข้นที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 ถึง -60 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นบรรจุผงสารสกัดใส่ถุงออลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -40 °C ก่อนนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป

#### 3.2.3.1 การวัดปริมาณผลผลิตที่สกัดได้

ตามวิธีของ Fathordoobady และคณะ (2016) โดยคำนวณ % ของผลผลิตที่สกัดได้ (ต่อปริมาณเปลือกส่วนมีโซคาร์บที่ผ่านการอบแห้ง) คำนวณจากค่าเฉลี่ยการทดลอง 3 ซ้ำ โดยบันทึกค่าน้ำหนักแห้ง และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากสารสกัด จากสูตรคำนวณ (3.1) ดังนี้

$$\% \text{ ผลผลิตที่ได้จากสารสกัด} = \frac{\text{น้ำหนักที่สกัดได้}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างแห้งเริ่มต้น}} \times 100 \quad (3.1)$$

#### 3.2.3.2 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

- 3.2.3.2.1 การวิเคราะห์ค่าสี (L\*, a\*, b\*, C\* และ H°) โดยใช้เครื่อง Hunter lab ตามวิธีของ (ภาคผนวก ก.1)



3.2.3.2.2 การหาปริมาณความชื้น โดยใช้เครื่อง Hot air oven ตามวิธีของ AOAC, 1999 (ภาคผนวก ก.2) แล้วคำนวณปริมาณความชื้นตามสมการที่ 3.2

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักถ้วย}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.2.3.2.3 วัดค่าปริมาณน้ำอิสระด้วยเครื่อง Water activity (AQUA Lab) ตามวิธีของ (ภาคผนวก ก.3)

3.2.3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีต่างๆ ตามข้อ 3.2.2.2.1 - 3.2.2.2.4

3.2.3.4 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดง โดยเลือกใช้ค่าความเข้มข้นช่วง 0.49-250 mg/mL ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษา ของ กมลลักษณ์ มาสาโรง และ วรพจน์ สุนทรสุข (2557) ที่ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ (crude extract) จากเปลือกแก้วมังกรขาว

3.2.3.4.1 ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดโดยวิธี Agar well diffusion ตามวิธีของ Lorian (1996) และ Rauha และคณะ (2000) (ภาคผนวก ค.2)

3.2.3.4.2 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ Minimum inhibitory concentrations (MIC) ด้วยวิธี Broth dilution ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998) (ภาคผนวก ค.3)

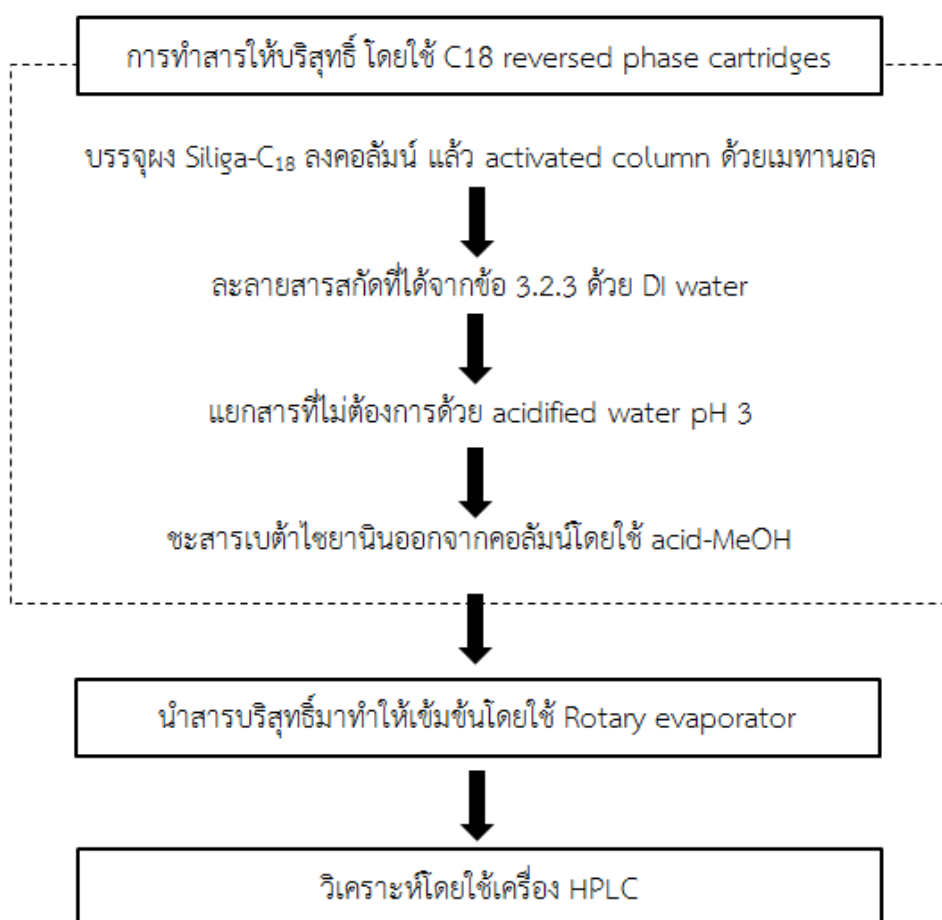
3.2.3.4.3 ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ Minimum bactericidal concentrations (MBC) ด้วยวิธี Broth dilution ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998) (ภาคผนวก ค.4)

### 3.2.4 การระบุชนิดและปริมาณสารองค์ประกอบในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC

ระบุชนิดและปริมาณสารจากสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงในข้อ 3.2.3 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC) วิเคราะห์ที่อาคารมหามกุฏ ชั้น 15 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่อง HPLC (Agilent, 1200 series, Germany) ระบบ PDA-HPLC system และคอลัมน์ C18 VertiSep™ UPS 4.6x50 mm, 3 μm

### 3.2.4.1 วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบเบต้าไซยานิน

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Stintzing และคณะ (2002) (ภาคผนวก ข.7) มีวิธีการเตรียมสารสกัดและการวิเคราะห์ ดังแสดงในรูปที่ 3.3 แล้วนำมาวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 538 nm โดยใช้ 0.1% trifluoroacetic acid ที่ละลายใน Milli-Q<sup>®</sup> water (v/v) และ 80% acetonitrile ที่ละลายใน Milli-Q<sup>®</sup> water (v/v) เป็น mobile phase



รูปที่ 3.3 วิธีการเตรียมสารสกัดและการวิเคราะห์ชนิดเบต้าไซยานิน

### 3.2.4.2 ระบุชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก

ดัดแปลงจากวิธีของ Karimi และคณะ (2012) โดยเตรียมสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่ได้จากข้อ 3.2.3 ด้วย Milli-Q<sup>®</sup> water แล้วนำมาวิเคราะห์ที่ความยาวคลื่น 254 nm โดยใช้ deionized water pH 2.5 และ acetonitrile เป็น mobile phase เพื่อหาชนิดของสารประกอบฟีนอลิกจากการเปรียบเทียบค่าหน่วงเวลา (retention time, RT) ของสารมาตรฐาน (gallic acid, caffeic acid,

ferulic acid, pyrogallol และ rutin) และหาปริมาณโดยคำนวณจากสมการที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานแต่ละชนิด (ภาคผนวก ข.8)

### 3.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของโซเดียมแลกเตต

โดยเลือกใช้ค่าความเข้มข้นช่วง 0.06-15% (14.02-1795 mM) ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาของ Houtsma, Wit และ Rombouts (1996)

3.2.5.1 ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ Minimum inhibitory concentrations (MIC) ด้วยวิธี Broth dilution ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998) (ภาคผนวก ค.3)

3.2.5.2 ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ Minimum bactericidal concentrations (MBC) ด้วยวิธี Broth dilution ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998) (ภาคผนวก ค.4)

### 3.2.6 การศึกษาผลที่เสริมฤทธิ์กัน

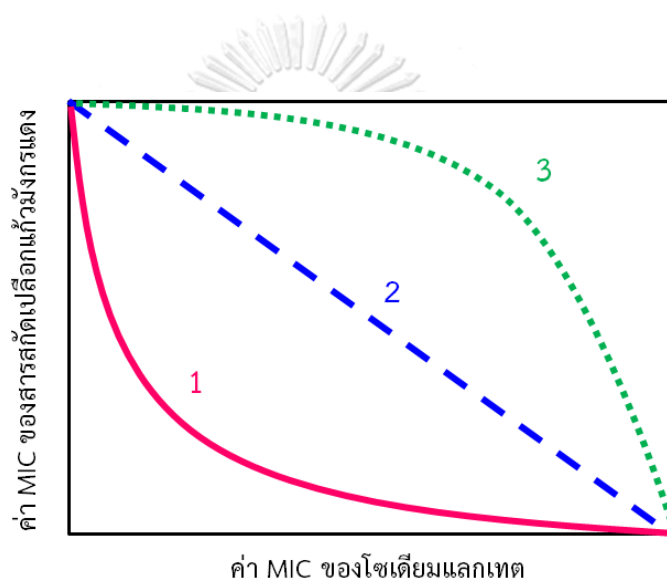
การศึกษาผลที่เสริมฤทธิ์กัน (synergistic interaction) ระหว่างสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและโซเดียมแลกเตต ดัดแปลงจากวิธีของ Bollenbach (2015) และ Ait-Dra และคณะ (2017) มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของการใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตต โดยศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์จากการวิเคราะห์ค่า Minimum inhibitory concentrations (MIC) และฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์จากการวิเคราะห์ Minimum bactericidal concentrations (MBC) ด้วยวิธี Broth dilution (ภาคผนวก ค.7) โดยช่วงค่าความเข้มข้นที่เลือกใช้ของสารแต่ละตัวแสดงดังนี้

1. สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง : ใช้ค่าความเข้มข้นที่น้อยกว่าค่า MBC ครั้งหนึ่งที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 3.2.3.4.3 (ค่า MBC ที่สูงที่สุดของแบคทีเรียทดสอบที่ทนสารมากที่สุด)
2. โซเดียมแลกเตต : ใช้ค่าความเข้มข้นที่น้อยกว่าค่า MIC ครั้งหนึ่งที่ได้จากการวิเคราะห์ในข้อ 3.2.5.1 (ค่า MIC ของแบคทีเรียทดสอบแต่ละสายพันธุ์)

ในการศึกษานี้จะกำหนดค่าความเข้มข้นของโซเดียมแลกเตตคงที่และแปรความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง ดังแสดงใน (ภาคผนวก ค.7) เพื่อต้องการลดความเข้มข้นของสารสกัดโดยสารสกัดเป็นสารให้สีหากใช้ค่าความเข้มข้นที่สูงอาจเกิดลักษณะที่ไม่เป็นที่ยอมรับต่อผู้บริโภค รวมถึงทำให้เกิดความสิ้นเปลืองในการสกัด นอกจากนี้โซเดียมแลกเตตซึ่งเป็นวัตถุเจือปนอาหารสามารถหาได้ง่ายและมีราคาต่ำกว่า

โดยผลของการศึกษาจะพิจารณาจากลักษณะของกราฟ ซึ่งได้จากการนำค่า MIC ของสารทดสอบแต่ละตัวมาแปรความเข้มข้น เพื่อหาผลที่เสริมฤทธิ์กันระหว่างสารสกัดและโซเดียมแลกเทต ดังแสดงในรูปที่ 3.4 และนำกราฟที่ได้มาเปรียบเทียบกับเส้นกราฟค่า MIC ของสารเดี่ยว (ลักษณะเส้นที่ 2) ถ้ากราฟของสารผสมแสดงเป็นลักษณะของ

- เส้นที่ 1 Synergistic แสดงว่า สารทั้งสองชนิดมีการเสริมฤทธิ์กัน (เส้นกราฟต่ำกว่าเส้นของสารเดี่ยว)
- เส้นที่ 2 Additive แสดงว่า สารทั้งสองชนิดก่อให้เกิดผลร่วมกัน
- เส้นที่ 3 Antagonistic แสดงว่า สารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านกัน (เส้นกราฟสูงกว่าเส้นของสารเดี่ยว)



รูปที่ 3.4 Synergistic Interaction

ในการศึกษาถ้าสารผสมแสดงผลเป็นกราฟเส้นที่ 1 Synergistic แสดงว่า สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและโซเดียมแลกเทตเสริมฤทธิ์กัน จะทำให้ได้อัตราส่วนของสารผสมระหว่างสารสกัดและโซเดียมแลกเทต ที่นำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนที่ 3.2.7 โดยอัตราส่วนที่เลือกใช้พิจารณาจากค่า MBC ที่ได้จากการทดสอบผลที่เสริมฤทธิ์กันของแบคทีเรียทดสอบสายพันธุ์ที่ทนสารมากที่สุด

### 3.2.7 การศึกษาผลของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตต่อสมบัติของคัสตาร์ดครีม

ศึกษาผลของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและโซเดียมแลกเตตต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของคัสตาร์ดครีมระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน โดยเลือกค่าความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและโซเดียมแลกเตตที่ได้จากการศึกษาผลที่เสริมฤทธิ์กันในช่วง 3.2.6 เลือกใช้ค่าฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์ (MBC) เพื่อใช้เติมลงในคัสตาร์ดครีม โดยคำนวณปริมาณที่ใช้ต่อน้ำหนักคัสตาร์ดครีม 100 g ดังแสดงวิธีคำนวณใน (ภาคผนวก ค.7)

วิเคราะห์สมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ ของคัสตาร์ดครีม (ตัวอย่างควบคุม) และคัสตาร์ดครีมที่เติมสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตต (ใช้อัตราส่วนของสารผสมที่ได้จากข้อ 3.2.6) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7

#### 3.2.7.1 การเตรียมคัสตาร์ดครีม

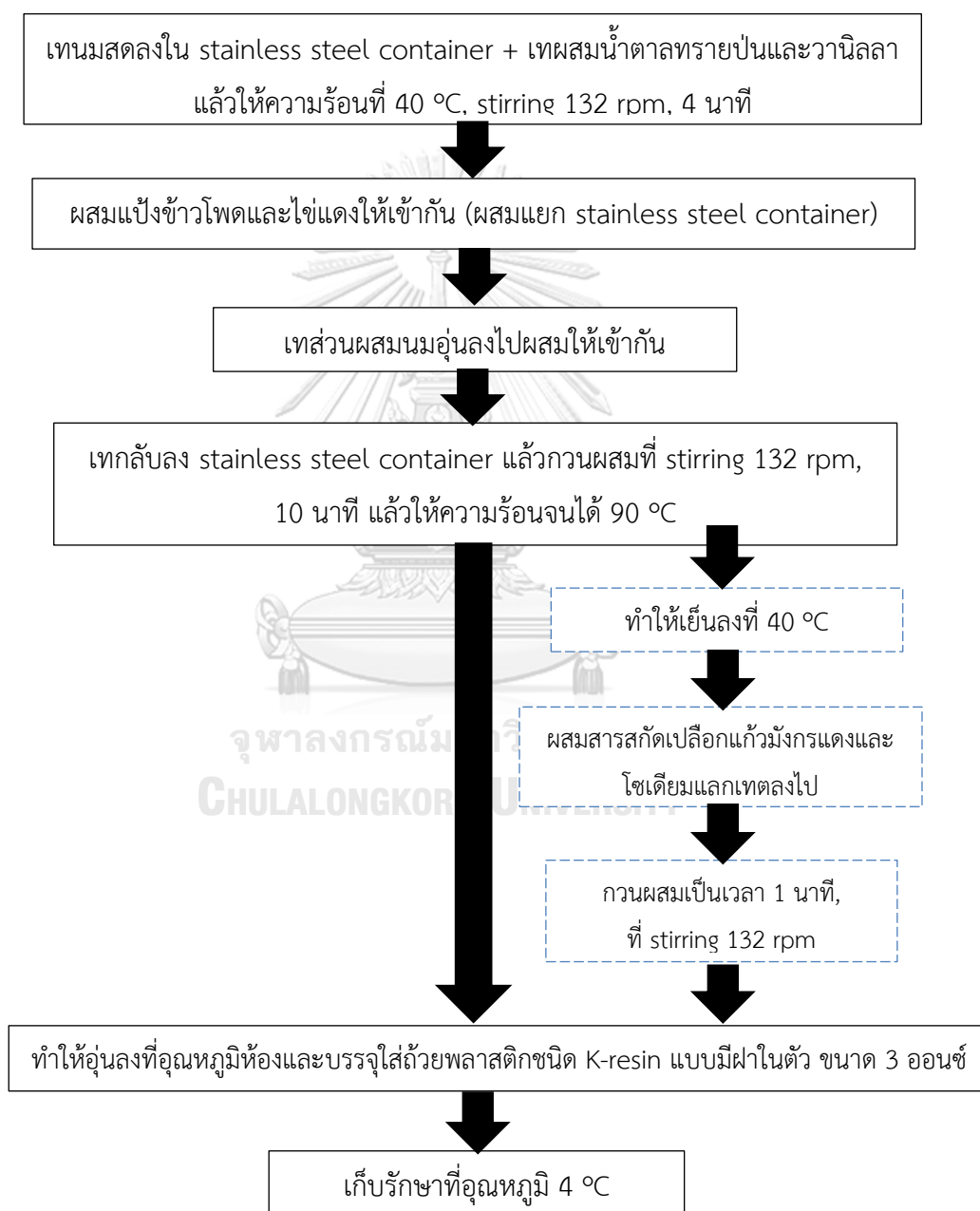
การเตรียมคัสตาร์ดครีม ดัดแปลงจากวิธีของ Bauer media group (2014) และ Seuvre และคณะ (2008) ในการศึกษาแบ่งออกเป็นคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม และคัสตาร์ดครีมตัวอย่างที่ศึกษา โดยมีส่วนผสมดังแสดงในตารางที่ 3.1 และมีวิธีการเตรียมดังแสดงในรูปที่ 3.5

**ตารางที่ 3.1** สูตรการเตรียมคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมตัวอย่างที่ศึกษา สำหรับการเตรียม 1 กิโลกรัม

ส่วนผสม	ตัวอย่างควบคุม	ตัวอย่างที่ศึกษา
นมสดรสจืด (mL)	750	750
น้ำตาลทรายขาว (g)	150	150
แป้งข้าวโพด (g)	50	50
ไข่ไก่ (เฉพาะไข่แดง) (ฟอง)	6	6
วานิลลาสกัดชนิดผง (g)	1	1
สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง (g)	-	อัตราส่วนที่ได้จากการศึกษาในข้อที่ 3.2.6
โซเดียมแลกเตต (mL)	-	

ในขั้นตอนนี้จะแบ่งการเก็บคัสตาร์ดครีมออกเป็น 2 ส่วน คือ

1. สำหรับศึกษาสมบัติทางกายภาพและเคมี เพื่อนำมาวิเคราะห์ ในข้อ 3.2.7.2-3.7.2.3
  - คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (CT)
  - คัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดและโซเดียมแลกเตต (CT+RE+SL)
2. สำหรับศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ในการวิเคราะห์ข้อ 3.7.2.4



รูปที่ 3.5 การเตรียมคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ศึกษา

เมื่อ (□) แทนการเตรียมตัวอย่างควบคุม และ (□□) แทนขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ศึกษาที่เพิ่มขึ้น

### 3.2.7.2 สมบัติทางกายภาพ

3.2.7.2.1 วัดค่าสีด้วยเครื่อง Chroma meter โดยใช้ระบบ L\* a\* b\* (CIE LAB) และคำนวณค่าความแตกต่างของสี ( $\Delta E^*$ ) ตามวิธีของ (ภาคผนวก ก.1)

3.2.7.2.2 วัดค่าปริมาณน้ำอิสระด้วยเครื่อง Water activity (AQUA Lab) ตามวิธีของ (ภาคผนวก ก.3)

3.2.7.2.3 วิเคราะห์ลักษณะทางเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง Texture analyser โดยดัดแปลงจากวิธีของ Shaikh และคณะ (2017) (ภาคผนวก ก.4)

การวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสแบบวิเคราะห์เค้าโครงเนื้อสัมผัส (Texture profile analysis: TPA) ด้วยเครื่อง Texture analyser (iCON รุ่น TA.XT2i, USA) หัววัดรหัส P/0.5 วิเคราะห์ค่าเนื้อสัมผัสจากกราฟ TPA ได้แก่ ความแข็ง (hardness) การรวมตัวกัน (cohesiveness) พลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวอาหาร (chewiness) และความเหนียวหนึบ (gumminess)

### 3.2.7.3 สมบัติทางเคมี

3.2.7.3.1 วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter ตามวิธีของ (ภาคผนวก ข.1)

3.2.7.3.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก ตามวิธีของ AOAC (2002) ตามวิธีของ (ภาคผนวก ข.2)

3.2.7.3.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำที่แยกตัวออกจากผลิตภัณฑ์ (%syneresis) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Shaikh และคณะ (2017) (ภาคผนวก ข.4)

3.2.7.3.4 วิเคราะห์ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีของ (ภาคผนวก ข.5-7)

### 3.2.7.4 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยการเติมแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ลงในคัสตาร์ดครีมที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.7.1 (ส่วนที่ 2) ตามวิธีของ (ภาคผนวก ค.8 และ ค.9) จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Bacillus cereus* ATCC6633) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Salmonella* Typhimurium ATCC1331 และ *Escherichia coli* ATCC25922)

การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Choi และคณะ (2015) โดยนำเชื้อทดสอบจากหลอดเชื้อบริสุทธิ์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค streak plate บนอาหารวุ้น บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกลงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ประมาณ 2-3 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างเซลล์ด้วยสารละลายนอร์มัลซาลาไลน์ (sodium chloride 0.85% solution) และปรับความขุ่นให้

ได้เท่ากับสารละลาย McFarland no. 0.5 ทำให้ได้เชื้อความเข้มข้นประมาณ  $1.5 \times 10^8$  colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/mL)

ในขั้นตอนนี้จะเตรียมเชื้อผสม (culture cocktail) ของเชื้อทดสอบ 4 สายพันธุ์ โดยปิเปตเชื้อที่ปรับความเข้มข้นไว้ อย่างละ 1 mL สำหรับ *S. aureus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* และ 0.1 mL สำหรับ *B. cereus* ลงในหลอดทดลองเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) และเติมเชื้อผสมที่เตรียมไว้ลงในคัสตาร์ดครีมที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.7.1 (ส่วนที่ 2) ปริมาตร 1 mL ลงในคัสตาร์ดครีม 100 g จะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อในอาหาร เท่ากับ  $1 \times 10^6$  CFU/mL สำหรับ *S. aureus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* และ  $1 \times 10^5$  CFU/mL สำหรับ *B. cereus* หลังจากนั้นตั้งคัสตาร์ดครีมที่ผ่านการเติมเชื้อไว้ในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสารผสม (ใช้อัตราส่วนของสารผสมที่ได้จากข้อ 3.2.6) มาเติมลงในคัสตาร์ดครีมที่อุณหภูมิห้อง ( $22 \pm 2$  °C) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2$  °C เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7

คัสตาร์ดครีมที่ใช้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ มี 3 ตัวอย่าง ได้แก่

1. คัสตาร์ดครีมสูตรควบคุม
2. คัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อผสม
3. คัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อผสมและสารผสม

นำแต่ละตัวอย่างมาตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

Plate Count Agar	สำหรับ จำนวนจุลินทรีย์รวม
Baird-Parker Agar	สำหรับ <i>Staphylococcus aureus</i>
Xylose-Lysine Deoxycholate Agar	สำหรับ <i>Salmonella Typhimurium</i>
Eosin Methylene Blue Agar, Levine	สำหรับ <i>Escherichia coli</i>
Compact dry X-BC	สำหรับ <i>Bacillus cereus</i>

โดยมีวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดตามวิธีของ (ภาคผนวก ค.9)

### 3.2.8 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DNMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทาการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Package for the Social Science (SPSS software, version 16.0)



## บทที่ 4

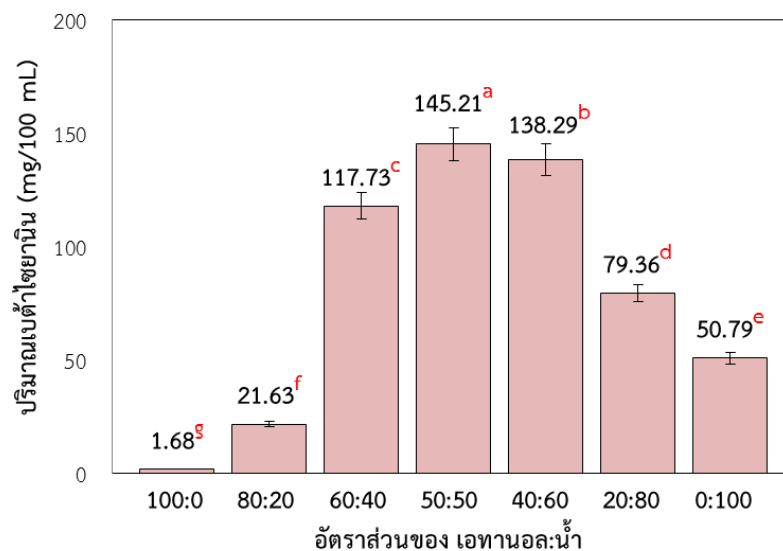
### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาวิธีการสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงโดยใช้เอทานอลและน้ำ

ในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อหาอัตราส่วนตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดสารจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บในรูปสารละลายเข้มข้น เพื่อให้ได้ปริมาณเบต้าไซยานินและสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงสุด ซึ่งจากการศึกษาวิธีการสกัดโดยใช้เอทานอลและน้ำที่อัตราส่วนแตกต่างกัน (เอทานอล/น้ำ : 100/0, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80 และ 0/100 v/v) พบว่า สารสกัดมีปริมาณเบต้าไซยานิน อยู่ในช่วง 1.68-145.21 mg/100 mL ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด อยู่ในช่วง 11.40-281.68 mgGAE/100 g และปริมาณฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ 2.25-69.6% และ 1.01-29.98 mM FeSO<sub>4</sub>/100 g ตามลำดับ

##### 4.1.1 ปริมาณเบต้าไซยานิน

จากการศึกษาพบว่าปริมาณเบต้าไซยานินของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บโดยใช้เอทานอลผสมน้ำที่อัตราส่วนแตกต่างกัน มีปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 ปริมาณเบต้าไซยานินของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

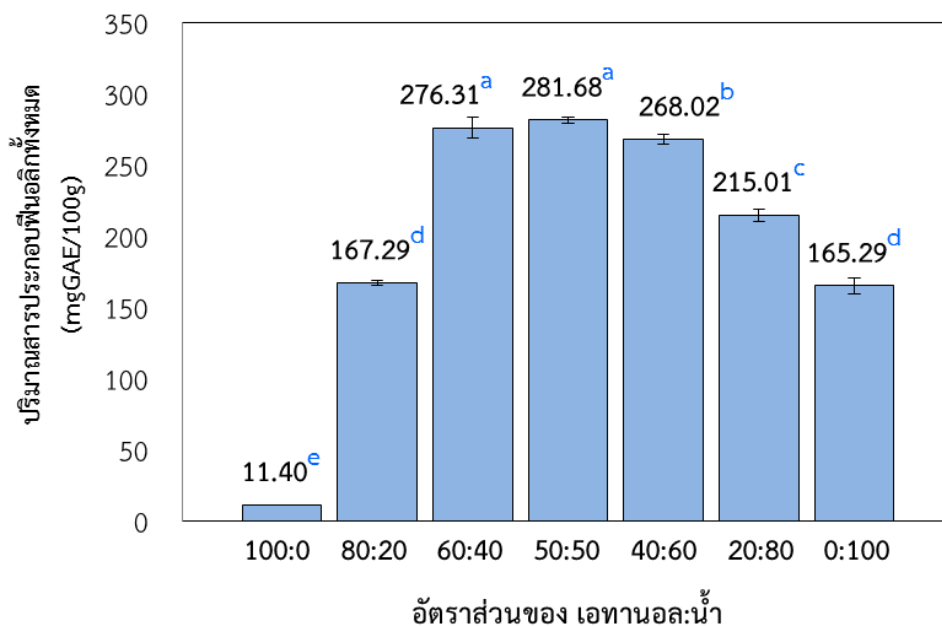
เมื่อ : a-g แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณเบต้าไซยานินที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

โดยพบว่า เมื่ออัตราส่วนของน้ำเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 50 (v/v) ปริมาณเบต้าไซยานินของสารสกัดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ( $50.79 \pm 2.03$ - $145.21 \pm 1.10$  mg/100 mL) และมีแนวโน้มลดลงเมื่ออัตราส่วนของน้ำมากกว่า 50 (v/v) ( $145.21 \pm 1.10$ - $1.68 \pm 0.12$  mg/100 mL) เนื่องจากสมบัติการละลายน้ำได้ดีและโครงสร้างที่เป็น hydrophilic ของเบต้าไซยานิน ทำให้หมู่ hydroxyl (-OH) ของสารจับกับน้ำเกิดเป็น hydrogen bond ได้ดีขึ้น (Fathordoobady et al., 2016) ดังนั้น เมื่อเพิ่มอัตราส่วนของน้ำจึงทำให้เบต้าไซยานินละลายออกมาได้มากขึ้น แต่การใช้น้ำในอัตราส่วนที่มากกว่า 50 (v/v) ทำให้ pectin และ mucilage ของเปลือกแก้วมังกรถูกสกัดออกมาด้วย (Malviya, 2011) ทำให้สารสกัดมีปริมาณเบต้าไซยานินลดลง จากผลการศึกษาที่ได้ พบว่าวิธีการสกัดที่ใช้อัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำที่ 50:50 (v/v) ให้ปริมาณเบต้าไซยานินสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เท่ากับ  $145.21 \pm 1.10$  mg/100 mL เนื่องจากมีส่วนผสมของน้ำที่ใช้ในการดึงสารเบต้าไซยานินออกมา และเอทานอลที่สามารถตกตะกอน pectin และลดความหนืดของ mucilage ได้ นอกจากนั้นจากสมบัติของ betalain ที่มีความคงตัวใน neutral pH จึงต้องผสมน้ำลงไปในการสกัด เพื่อไม่ให้ pH ของสารสกัดที่ได้ต่ำจนเกินไป (Faridah, Holinesti, & Syukri, 2015; Herbach et al., 2006; Stintzing et al., 2002) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Naderi และคณะ (2012) และ Fathordoobady และคณะ (2016) ที่แนะนำว่าการใช้เอทานอลร้อยละ 50 เหมาะสมต่อการสกัดสารเบต้าไซยานินจากเปลือกแก้วมังกรแดง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

#### 4.1.2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.2 โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน Gallic acid พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของน้ำจาก 0 ถึง 50 (v/v) ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) (จาก  $165.29 \pm 5.59$  เพิ่มขึ้นเป็น  $281.68 \pm 2.15$  mgGAE/100 g) เนื่องจากสมบัติ hydrophilic ของสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก เช่น phenolic acids, flavonoids และ betacyanin ที่เป็นสารองค์ประกอบในเปลือกแก้วมังกรแดงถูกชะออกมาได้ดี แต่อย่างไรก็ตามการใช้อัตราส่วนของน้ำมากกว่า 50 หรือใช้อัตราส่วนเอทานอลน้อยกว่า 50 (v/v) ทำให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง (จาก  $281.68 \pm 2.15$  ลดลงเหลือ  $11.40 \pm 0.36$  mgGAE/100 g)



**รูปที่ 4.2** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่แตกต่างกัน  
 เมื่อ : a-e แสดงค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากการศึกษาในงานวิจัยที่ผ่านมากล่าวว่าการใช้ปริมาณน้ำและเอทานอลควรอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้ความเข้มข้นของสารไม่มากหรือน้อยจนเกินไป ทำให้สารที่ต้องการออกมาได้ดี (Cuevas-Valenzuela, Gonzalez-Rojas, Wisniak, Apelblat, & Perez-Correa, 2014) แสดงให้เห็นว่าการใช้เอทานอลและน้ำที่อัตราส่วน 50/50 (v/v) เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเปลือกแก้วมังกรแดง

#### 4.1.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยการคำนวณหาร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บที่สกัดด้วยเอทานอลผสมกับน้ำที่อัตราส่วนแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าการวิเคราะห์โดยวิธี DPPH ให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บที่สกัดด้วยเอทานอลผสมกับน้ำที่อัตราส่วนที่แตกต่างกันที่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงสุด 3 อันดับแรก ได้แก่

60:40, 50:50 และ 80:20 มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เท่ากับ  $69.66 \pm 0.32\%$ ,  $53.77 \pm 0.48\%$  และ  $46.54 \pm 1.68\%$  ตามลำดับ

**ตารางที่ 4.1** ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนเมื่อทดสอบด้วยวิธี FRAP ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดจากอัตราส่วนตัวทำละลายที่แตกต่างกัน

อัตราส่วนตัวทำละลาย (Ethanol:Water)	DPPH (%Inhibition)	FRAP (mM FeSO <sub>4</sub> /100 g)
100:0	$2.25 \pm 0.54^f$	$1.01 \pm 0.09^f$
80:20	$46.54 \pm 1.68^c$	$14.89 \pm 0.45^d$
60:40	$69.66 \pm 0.32^a$	$29.22 \pm 0.50^{ab}$
50:50	$53.77 \pm 0.48^b$	$29.98 \pm 0.63^a$
40:60	$46.18 \pm 1.64^c$	$28.67 \pm 0.54^{ab}$
20:80	$12.64 \pm 0.38^d$	$17.69 \pm 0.18^c$
0:100	$6.32 \pm 0.41^e$	$12.85 \pm 0.61^e$

หมายเหตุ : a-f แสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแต่ละวิธีที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

การทดสอบด้วยวิธี FRAP เมื่อแสดงค่าเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน FeSO<sub>4</sub> พบว่าการสกัดด้วยเอทานอลกับน้ำที่อัตราส่วนที่ต่างกันที่ให้อิเล็กตรอนได้ดีที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ 50:50, 60:40 และ 40:60 โดยมีค่า FRAP เท่ากับ  $29.98 \pm 0.63$ ,  $29.22 \pm 0.50$  และ  $28.67 \pm 0.54$  mM FeSO<sub>4</sub>/100 g ตามลำดับ แต่เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ พบว่าทั้งสามอัตราส่วนนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) โดยผลจากการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าเปลือกแก้วมังกรแดงที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง ทำให้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงด้วยเช่นกัน และจากโครงสร้างของสารเบต้าไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกแก้วมังกรแดง มีโครงสร้างเป็นสารประกอบไกลโคไซด์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอน หรือให้อิโตรเจน และกำจัดออกซิเจนที่อยู่ในรูปแอกทีฟ ทำให้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Wu et al., 2006)

นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละวิธียังขึ้นอยู่กับค่าโมลาร์แอบซอร์ปทิวิตี (molar absorptivity:  $\epsilon$ ) จำนวนของหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group: OH) โครงสร้างโมเลกุลของสารนั้นๆ (Stratil และคณะ, 2006) และอะตอมของวงแหวนเบนซีนของสารประกอบฟีนอลิกซึ่งมีผลในการลดค่าความหนาแน่นอิเล็กตรอน (electron density) ของหมู่ไฮดรอกซิล ส่งผลให้ค่าการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนแปลงไปได้ในแต่ละวิธีการทดสอบ นอกจากนี้การวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารเบต้าไซยานินเป็นการวัดค่าความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (electron-donor ability) ซึ่งขึ้นอยู่กับความแตกต่างของโครงสร้างของสารเบต้าไซยานิน (Cai et al., 2003) ที่ประกอบด้วยกลุ่ม Imino และหมู่ไฮดรอกซิลที่มีผลต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเข้มข้นจากเปลือกแก้วมังกรแดงด้วยเช่นกัน (Wu et al., 2006) โดยปกติแล้วโครงสร้างของเบต้าไซยานินจะมีจำนวนการเกิดปฏิกิริยาของหมู่ไฮดรอกซิลเท่ากับ 1 แต่ถ้าโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปจะทำให้คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเปลี่ยนแปลงไปด้วย ยกตัวอย่างเช่นถ้าโครงสร้างของเบต้าไซยานินอยู่ในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ โครงสร้างของเบต้าไซยานินจะเกิดปฏิกิริยาดีไกลโคซิเลชัน (deglycosylation) โดยสูญเสียโมเลกุลน้ำตาลออกไปจากโครงสร้างและทำให้มีจำนวนการเกิดปฏิกิริยาของหมู่ไฮดรอกซิลเท่ากับ 2 (Herbach et al., 2006) ซึ่งทำให้คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลของสารมีจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลที่สามารถให้โปรตอนเพิ่มขึ้น (Fukumoto & Mazza, 2000; Son & Lewis, 2002)

จากผลการศึกษาวิธีการสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บโดยใช้เอทานอลและน้ำที่อัตราส่วนแตกต่างกัน พบว่าปริมาณเบต้าไซยานิน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีความเข้มข้นของเอทานอลและน้ำที่เหมาะสมในการสกัดคล้ายกัน กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของน้ำหรือเอทานอลเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณเบต้าไซยานิน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งและจะลดลง เนื่องจากสารองค์ประกอบในเปลือกแก้วมังกรแดงเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกมีสมบัติละลายน้ำได้ดี และความเข้มข้นของเอทานอลจะมีความสัมพันธ์กับสภาพขั้ว (polarity) ของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งสามารถสกัดสารเบต้าไซยานิน สารประกอบกลุ่มฟีนอลิก และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดที่สภาพความเป็นขั้วอยู่ในระดับปานกลาง (Cuevas-Valenzuela et al., 2014) โดยผลที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับทฤษฎีที่กล่าวมา พบว่า การใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่ 50:50 (v/v) ในการสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงให้ปริมาณเบต้าไซยานิน ( $145.21 \pm 1.10$  mg/100 mL) ปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมด ( $281.68 \pm 2.15$  mgGAE/100 g) และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP ( $29.98 \pm 0.63$  mM FeSO<sub>4</sub>/100 g) สูงที่สุด และการ

ใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่ 60:40 (v/v) ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH สูงที่สุด ( $69.66 \pm 0.32\%$ )

#### 4.2 การสกัดสารจากเปลือกแก้วมังกรแดงและศึกษาสมบัติของสารสกัด

จากผลการศึกษาวิธีการสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บในข้อ 4.1 ได้เลือกวิธีการสกัดที่ใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่ 50:50 (v/v) มาใช้ในการสกัดสารจากเปลือกแก้วมังกรแดง เนื่องจากให้ปริมาณเบต้าไซยานินและปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยนำสารสกัดที่อยู่ในรูปของผงแห้งจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ดังแสดงในรูปที่ 4.3 มาศึกษาสมบัติของสารสกัด ดังนี้



รูปที่ 4.3 สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง

##### 4.2.1 สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดจากอัตราส่วนของเอทานอลต่อน้ำที่ 50:50 (v/v) มีสมบัติทางกายภาพและเคมีดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมีของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง

สมบัติทางกายภาพ	
% ผลผลิตที่ได้จากการสกัด	15.98 ± 1.22% ของน้ำหนักแห้ง (dry weight)
ปริมาณน้ำอิสระ ( $a_w$ )	0.25 ± 0.02
ปริมาณความชื้น (%ความชื้น)	
• Dry matter	9.62 ± 0.14
• Wet matter	90.38 ± 0.14
ค่าสี	
• L*	27.04 ± 0.31
• a*	14.14 ± 0.35
• b*	-7.75 ± 0.23
• Chroma	16.13 ± 0.28
สมบัติทางเคมี	
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	4.72 ± 0.04
ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	
• ปริมาณเบต้าไซยานิน	53.80 ± 1.15 mg/100 g dry wt.
• ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	387.67 ± 26.74 mgGAE/100 g dry wt.
•ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ	
○ DPPH	19.92 ± 0.25 IC <sub>50</sub> (mg/mL)
○ FRAP	2290.90 ± 3.04 μM FeSO <sub>4</sub> /100 g dry wt.

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

โดยสารสกัดที่ได้ให้ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการสกัดเท่ากับ ร้อยละ  $15.98 \pm 1.22$  (เทียบกับ ปริมาณเปลือกแก้วมังกรแดงที่ผ่านการอบแห้ง) มีปริมาณความชื้น และค่า  $a_w$  เท่ากับ  $9.62 \pm 0.14\%$  ของน้ำหนักแห้ง และ 0.25 ตามลำดับ เมื่อศึกษาค่าสีด้วยระบบ CIE  $L^* a^* b^*$  พบว่าสารสกัดจาก เปลือกแก้วมังกรแดงมีค่าความสว่าง สว่าง ( $L^*$ ) เท่ากับ  $27.04 \pm 0.31$  ค่าสีแดง ( $+a^*$ ) เท่ากับ  $14.14 \pm 0.35$  ค่าสีเหลือง ( $b$ ) เท่ากับ  $-7.75 \pm 0.23$  และมีค่าความเข้มของสี (chroma) เท่ากับ  $16.13 \pm 0.28$  แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมีสีแดงเข้ม ซึ่งเกิดจากสารเบต้าไซยานินที่เป็นสารให้สีแดงที่เป็น สารองค์ประกอบในเปลือกแก้วมังกรแดง นอกจากนี้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดได้มีฤทธิ์ เป็นกรด (ค่า pH เท่ากับ  $4.72 \pm 0.04$ ) เนื่องจากสารเบต้าไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัด มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ และจัดเป็นอนุพันธ์ของ betalamic acid (Moreno et al., 2008) จึง ทำให้สารสกัดที่ได้มีค่า pH ต่ำกว่า 7 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ กมลลักษณ์ (2557) ที่ศึกษาการ สกัดเปลือกแก้วมังกรโดยใช้ น้ำในการสกัด รายงานว่าสารสกัดที่ได้มีค่า pH เท่ากับ 4.88

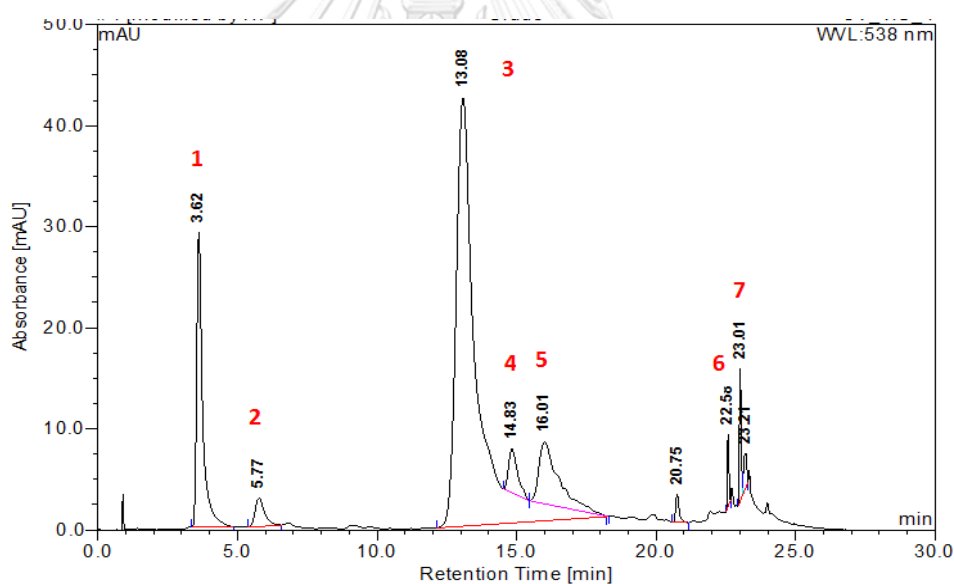
จากการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดมีปริมาณเบต้าไซยานิน และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ  $53.80 \pm 1.15$  mg/100 g dry wt. และ  $387.67 \pm 26.74$  mgGAE/100 g dry wt. ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานปริมาณเบต้าไซยานินที่ศึกษาในแก้วมังกรที่ปลูกในประเทศไทย โดยมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ คณิงนิตย์ (2558) ที่สกัดเปลือกแก้วมังกรขาวโดยใช้เอทานอลร้อยละ 50 พบว่ามีปริมาณเบต้าไซยานิน  $33.85$  mg/100 g ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานว่าเปลือกแก้วมังกรแดงมีปริมาณเบต้าไซยานิน มากกว่าแก้วมังกรขาว และการศึกษาของ กรรณิการ์ (2552) สกัดสารจากเปลือกแก้วมังกรแดงโดยใช้ เอนไซม์ช่วยในการสกัด พบว่ามีปริมาณเบต้าไซยานิน เท่ากับ  $61.65$  mg/100 g FM. นอกจากนี้ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบใกล้เคียงกับการรายงานของ ภขมน (2556) พบว่าสารสกัด เปลือกแก้วมังกรแดงที่ผสมแป้งมันสำปะหลังดัดแปรที่อบแห้งที่อุณหภูมิต่างๆ มีปริมาณ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดอยู่ในช่วง  $529.62$ - $696.91$  mg/100 g dry wt.

เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดด้วยวิธี DPPH ซึ่งแสดงในรูปความเข้มข้นของ สารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้กำจัดอนุมูลอิสระ DPPH ได้ 50% ( $IC_{50}$ ) และวิธี FRAP โดยเปรียบเทียบกับ ความเข้มข้นของสารมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟต มีค่าเท่ากับ  $19.92 \pm 0.25$   $IC_{50}$  (mg/mL) และ  $2290.90 \pm 3.04$   $\mu$ M  $FeSO_4$ /100 g dry wt. ตามลำดับ จากผลการศึกษาสารสกัดมีค่า  $IC_{50}$  ต่ำ แสดง ว่ามีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือเป็นสารต้านออกซิเดชันได้สูง ซึ่งใกล้เคียงกับ การศึกษาของ ภขมน (2556) พบว่าสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่ผสมแป้งมันสำปะหลังดัดแปรมี ปริมาณ DPPH ( $IC_{50}$ ) เท่ากับ  $11.52$  mgGAE/100 mL และการศึกษาของ Ramli และคณะ (2014) ที่สกัดเปลือกแก้วมังกรแดงด้วยน้ำและนำไปทำแห้งแบบผ่นฝอย (spray dry) มีค่า FRAP เท่ากับ  $200.83$   $\mu$ M  $Fe^{2+}$ /g dry wt.



#### 4.2.2 การระบุชนิดและปริมาณสารองค์ประกอบในสารสกัดด้วยเทคนิค HPLC

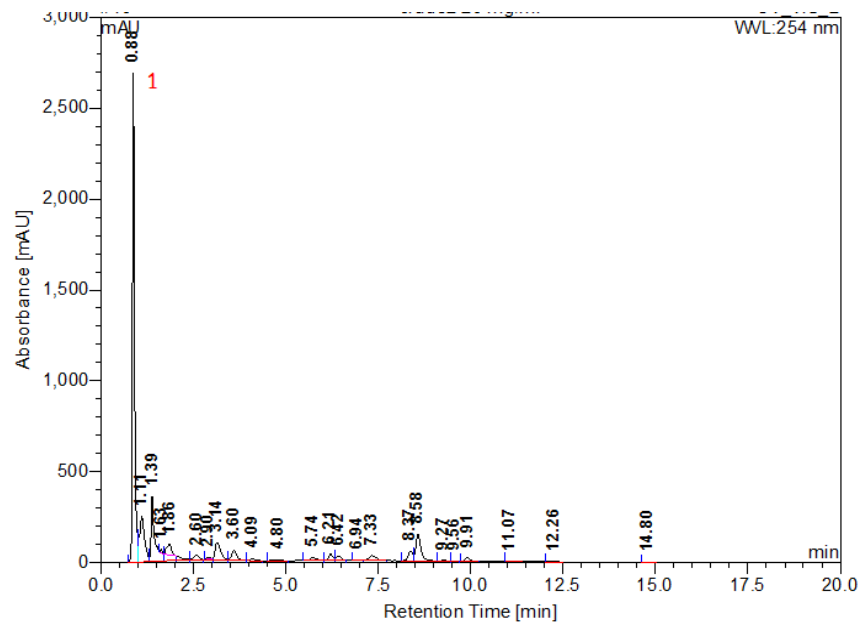
จากการศึกษาการวิเคราะห์ชนิดของสารองค์ประกอบกลุ่มเบต้าไซยานินในสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงด้วยวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.4 พบว่า สารสกัดมีองค์ประกอบหลักของเบต้าไซยานินจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ betanin (peak 1), isobetanin (peak 2), phyllocactin (peak 3), butyrylbetanin (peak 4), isophyllocactin (peak 5), 20-apisylphyllocactin (peak 6) และ 20-apisyl-isophyllocactin (peak 7) ซึ่งองค์ประกอบของเบต้าไซยานินทั้ง 7 ชนิดนี้ พบว่าเป็นชนิดเดียวกันกับองค์ประกอบของเบต้าไซยานินจากการศึกษาในงานวิจัยที่ผ่านมา (Fathordoobady et al., 2016; Herbach et al., 2006; Stintzing et al., 2002; Wybraniec & Mizrahi, 2005) จากการศึกษพบว่าในสารสกัดมีเบต้าไซยานินชนิด phyllocactin เป็นองค์ประกอบมากที่สุด รองลงมาคือ betanin และ isophyllocactin ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการศึกษาของ Fathordoobady และคณะ (2016) ที่พบว่า ชนิดของเบต้าไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในเปลือกแก้วมังกรแดง คือ phyllocactin



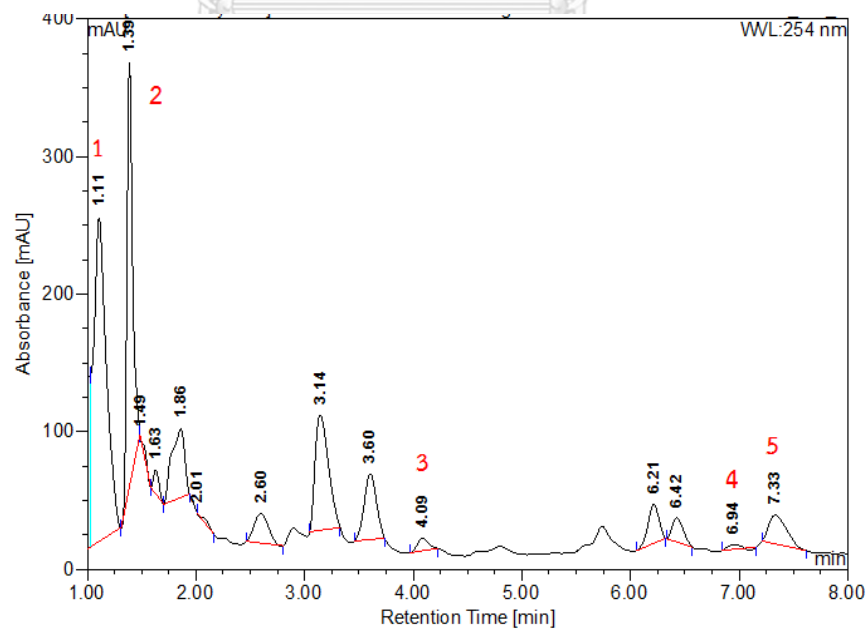
รูปที่ 4.4 โครมาโทแกรมสารกลุ่มเบต้าไซยานินของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำที่อัตราส่วน 50:50 (v/v)

นอกจากนั้น จากการศึกษชนิดและปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงด้วยเอทานอลและน้ำที่อัตราส่วน 50:50 (v/v) ด้วยวิธี HPLC ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และ 4.6 พบว่าสารสกัดมีองค์ประกอบของ gallic acid (peak 1), caffeic acid (peak 3), ferulic acid (peak 5), rutin (peak 4) และ pyrogallol (peak 2) และสารองค์ประกอบแต่ละตัวมีปริมาณ เท่ากับ  $6931 \pm 172.30$ ,  $19.75 \pm 1.19$ ,  $37.21 \pm 1.95$ ,  $884.38 \pm 28.74$  และ  $4.82 \pm 0.50$

mg/100 g dry wt. ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.3) โดยสารองค์ประกอบแต่ละตัวมีโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 4.7 ซึ่งผลจากการศึกษาสอดคล้องกับการรายงานของ Tenore และคณะ (2012)



รูปที่ 4.5 โครมาโทแกรมสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำที่อัตราส่วน 50:50 (v/v)

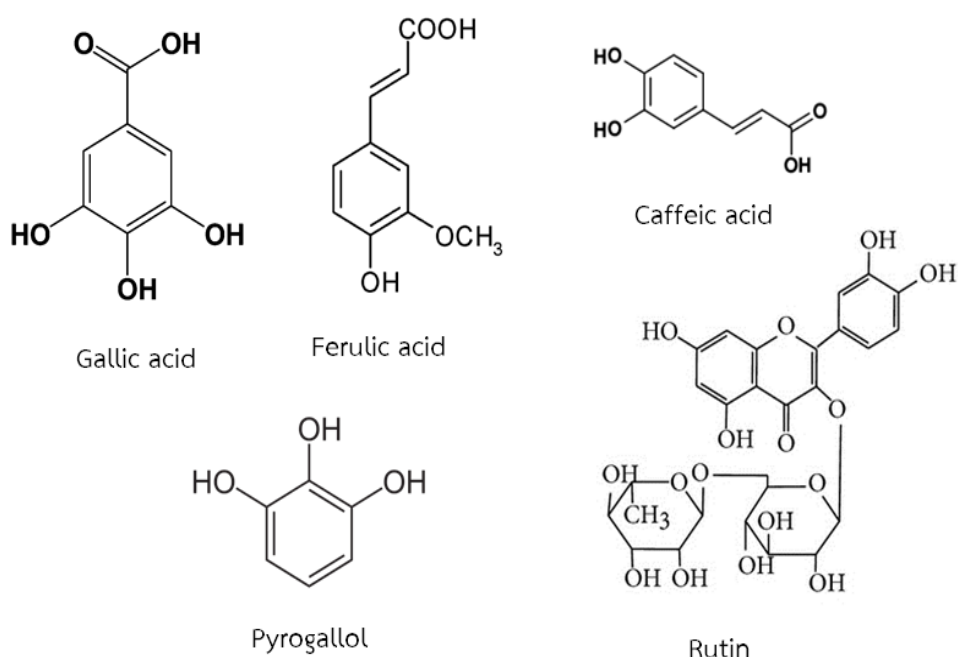


รูปที่ 4.6 โครมาโทแกรมของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่สกัดด้วยเอทานอลและน้ำที่อัตราส่วน 50:50 (v/v) แบบขยาย ที่ค่าหน่วยเวลา (retention time) 1.00 – 8.00 นาที

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC

ชนิดของสารประกอบฟีนอลิก	ปริมาณ	หน่วย
<b>กลุ่มของกรดฟีนอลิก</b>		
- gallic acid	6931 ± 172.30	mg/100 g dry wt.
- caffeic acid	19.75 ± 1.19	mg/100 g dry wt.
- ferulic acid	37.21 ± 1.95	mg/100 g dry wt.
<b>กลุ่มของฟลาโวนอยด์</b>		
- pyrogallol	884.38 ± 28.74	mg/100 g dry wt.
- rutin	4.82 ± 0.50	mg/100 g dry wt.
- quercetin	nd	mg/100 g dry wt.

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



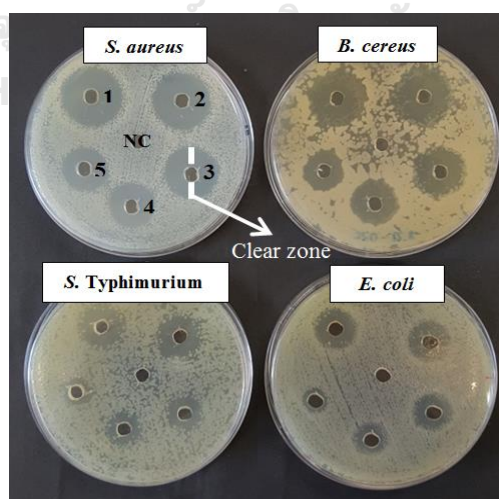
รูปที่ 4.7 โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกที่พบในสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง

### 4.2.3 สมบัติการต้านจุลินทรีย์

การศึกษาหัวข้อนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหาร 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง โดยศึกษาจากวิธี Agar well diffusion และ วิธี Broth dilution ดังนี้

#### 4.2.3.1 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดโดยวิธี Agar well diffusion

ผลจากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงด้วยวิธี Agar well diffusion ดังแสดงในรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* ได้ดี โดยบ่งชี้ได้จากขนาดวงใส (clear zone) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากถึง 21 mm และขนาดวงใสแปรผันตามความเข้มข้นของสารสกัดที่ทดสอบ จากตารางที่ 4.4 พบว่า การใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *B. cereus* ได้ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 0.08 mg/mL ขณะที่เชื้อ *S. Typhimurium* และ *E. coli* ไม่แสดงบริเวณการยับยั้ง และความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ทุกชนิด คือ 0.32 mg/mL จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 0.32-5.00 mg/mL สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ *B. cereus*, *S. Typhimurium* และ *E. coli* ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณการยับยั้งอยู่ในช่วง  $14.12 \pm 0.04$ - $21.06 \pm 0.14$ ,  $12.05 \pm 0.10$ - $17.72 \pm 0.17$ ,  $5.97 \pm 0.11$ - $13.25 \pm 0.32$  และ  $3.09 \pm 0.37$ - $10.72 \pm 0.25$  mm ตามลำดับ



รูปที่ 4.8 ขนาดบริเวณการยับยั้ง (mm) ของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

5 ความเข้มข้น ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง

เมื่อ 1=5.00, 2=2.50, 3=1.25, 4=0.63, 5=0.32 mg/mL และ NC= Negative control

ตารางที่ 4.4 เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณการยับยั้ง (mm) ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อแบคทีเรียที่ทดสอบแต่ละสายพันธุ์

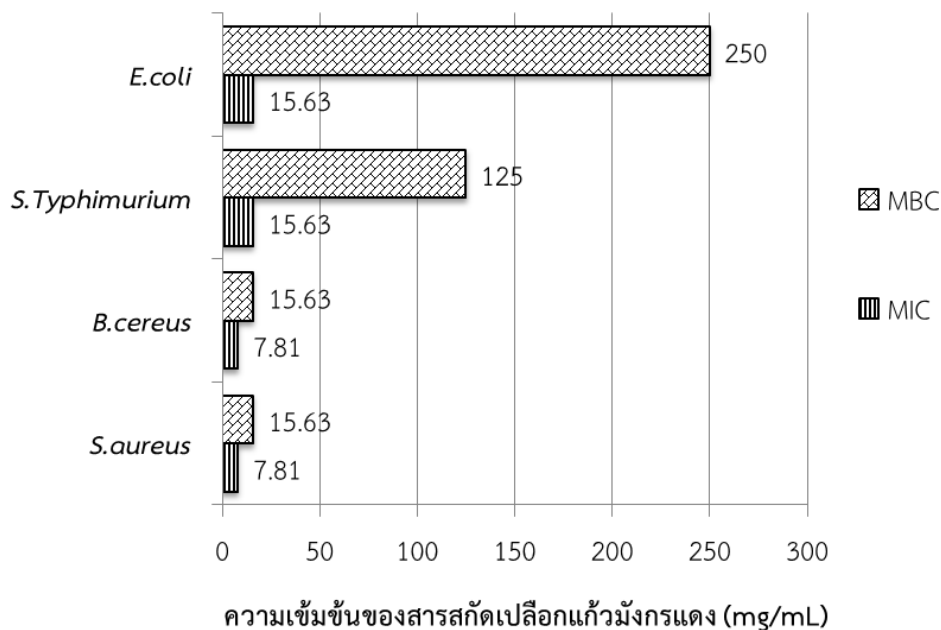
ความเข้มข้น (mg/mL)	บริเวณการยับยั้ง (mm) ของแบคทีเรียที่ทดสอบแต่ละสายพันธุ์			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
5.00	21.06 ± 0.14 <sup>Aa</sup>	17.72 ± 0.17 <sup>Ba</sup>	13.25 ± 0.32 <sup>Ca</sup>	10.72 ± 0.25 <sup>Da</sup>
2.50	19.97 ± 0.07 <sup>Ab</sup>	16.69 ± 0.53 <sup>Bb</sup>	10.96 ± 0.22 <sup>Cb</sup>	9.02 ± 0.08 <sup>Db</sup>
1.25	18.04 ± 0.06 <sup>Ac</sup>	15.54 ± 0.18 <sup>Bc</sup>	9.27 ± 0.23 <sup>Cc</sup>	8.03 ± 0.07 <sup>Db</sup>
0.63	16.95 ± 0.12 <sup>Ad</sup>	14.27 ± 0.27 <sup>Bd</sup>	8.37 ± 0.12 <sup>Cd</sup>	5.42 ± 0.16 <sup>Dc</sup>
0.32	14.12 ± 0.04 <sup>Ae</sup>	12.05 ± 0.10 <sup>Be</sup>	5.97 ± 0.11 <sup>Ce</sup>	3.09 ± 0.37 <sup>Dd</sup>
0.16	10.88 ± 0.29 <sup>Af</sup>	6.92 ± 0.96 <sup>Bf</sup>	2.08 ± 0.10 <sup>Cf</sup>	0.00 ± 0.00
0.08	5.51 ± 0.60 <sup>Ag</sup>	4.80 ± 0.27 <sup>Bg</sup>	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

หมายเหตุ : <sup>A-D</sup> แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานบริเวณการยับยั้งของแบคทีเรียที่ทดสอบแต่ละสายพันธุ์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (แนวนอน) ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

<sup>a-g</sup>: แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานบริเวณการยับยั้งของแบคทีเรียที่ทดสอบสายพันธุ์เดียวกันที่ความเข้มข้นแตกต่างกันเดียวกัน (แนวตั้ง) ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.2.3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ (MIC) และการฆ่าจุลินทรีย์ (MBC)

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดด้วยวิธี Broth dilution โดยการวิเคราะห์ค่า MIC และ MBC ของสารสกัดในช่วงความเข้มข้น 0.49-250 mg/mL (กมลลักษณะ มาสาโรจ และ วรพจน์ สุนทรสุข, 2557) ดังแสดงผลในรูปที่ 4.9 พบว่าแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* และ *B. cereus* มีค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด เท่ากับ 7.81 และ 15.63 mg/mL ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *S. Typhimurium* และ *E. coli* มีค่า MIC และ MBC สูงที่สุด เท่ากับ 15.63 และ 250 mg/mL ตามลำดับ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงแสดงแนวโน้มในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งบ่งชี้ได้จากค่า MBC ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทดสอบที่พบว่าแบคทีเรียแกรมบวกมีค่า MBC ต่ำกว่าแบคทีเรียแกรมลบ 16 เท่า

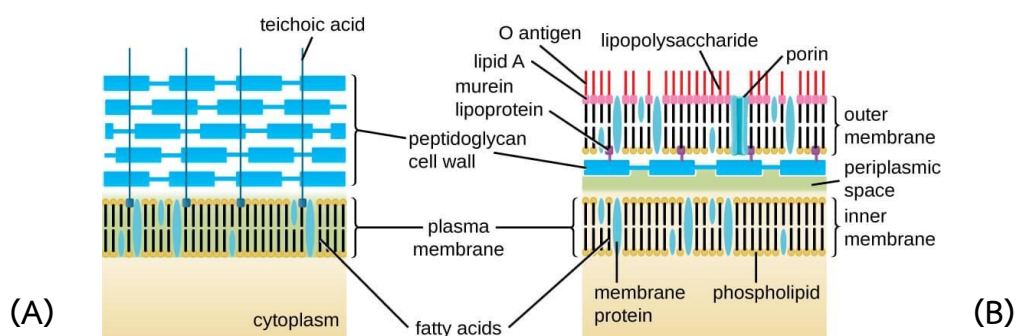


รูปที่ 4.9 ค่า MIC และค่า MBC ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์

จากผลการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงทั้ง 2 วิธี แสดงให้เห็นว่าสารสกัดสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียที่ทดสอบชนิดแกรมบวกและแกรมลบ เนื่องจากสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก (phenolic compound) ซึ่งมีความสามารถในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย โดยยับยั้งเอนไซม์ที่ผนังเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ของแบคทีเรียทำให้กรดอะมิโนรั่วไหลออกจากเซลล์ สารจึงซึมผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำลายกลไกการทำงานภายในของเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ก่อให้เกิดการเสียมดูลภายในเซลล์ และสารในเซลล์รั่วไหลออกมา ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Moreno et al., 2008) และอีกหนึ่งกลไกคือทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มโปรตีนของแบคทีเรีย ทำให้สมบัติในการเลือกผ่านเข้าออกของสารเปลี่ยนแปลง รวมถึงทำให้สารภายในเซลล์รั่วไหลออกมา ซึ่งมีผลทำให้ยับยั้งการเจริญของเซลล์และเซลล์ตายในที่สุด (Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001; Yong, Dykes, Lee, & Choo, 2018) โดยสารประกอบกลุ่มฟีนอลิกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น เมื่อมีคาร์บอนต่อกันเป็นสายยาว (Xie, Chen, Xiao, & Liu, 2017) หรือมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เป็นองค์ประกอบหลายตำแหน่ง เนื่องจากจะทำให้เกิดปฏิกิริยา hydroxylation ทำให้สารเข้าไปในเซลล์มากยิ่งขึ้น (Cabezas-Pizarro et al., 2018; Coppo & Marchese, 2014) ซึ่งผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงด้วยวิธี HPLC พบว่าสารสกัดมี

สารกลุ่มเบต้าไฮยานินเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิลหลายตำแหน่งเป็นองค์ประกอบ และมีคาร์บอนต่อกันเป็นสายยาว (C18) จึงแสดงความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ได้ โดยยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด ซึ่งผลจากการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Moreno และคณะ 2008 ที่พบว่าสารสกัดที่สกัดโดยใช้น้ำสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Luis และคณะ (2014) รายงานว่า gallic acid และ caffeic acid มีความสามารถในการยับยั้ง  $\alpha$ -hemolysin ที่เป็นสารพิษที่พบเฉพาะใน *S. aureus* โดย gallic acid จะมีผลต่อสมบัติการยึดเกาะของ *S. aureus* ในขณะที่ caffeic acid จะทำลายเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าไปทำลายกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ของ *S. aureus* ซึ่งจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ที่ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด ก็พบว่าสารสกัดมี gallic acid และ caffeic acid เป็นองค์ประกอบด้วย

นอกจากนี้ จากผลการศึกษาายังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน เนื่องจากโครงสร้างของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ทำให้สารประกอบฟีนอลิกซึมผ่านเซลล์ของแบคทีเรียต่างกัน โดยสารสกัดสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*) ได้ดีกว่าชนิดแกรมลบ (*S. Typhimurium* และ *E. coli*) เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีโครงสร้างผนังเซลล์เป็นเปปติโดไกลแคนร้อยละ 90 และกรดไทโคอิก ซึ่งผนังเซลล์นี้มีประสิทธิภาพในการเลือกผ่านเข้าออกของสารต่ำ (Scherrer & Gerhardt, 1971) สารประกอบกลุ่มฟีนอลิกจึงเข้าไปได้ง่าย ทำให้ไวต่อการยับยั้งด้วยสารสกัดได้ง่ายกว่าแบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีโครงสร้างผนังเซลล์ที่ซับซ้อนกว่า โดยมีองค์ประกอบของไลโปโพลีแซคคาไรด์ซึ่งเพิ่มความแข็งแรงให้เซลล์และยังพบว่ามีช่องพอริน (porin) ซึ่งไม่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าออก ดังแสดงในรูปที่ 4.10 (Matu & van Staden, 2003) โดยผลจากการศึกษาที่ได้นี้ตรงกับการศึกษาของ Tenore และคณะ (2012) ที่พบว่าสารเบต้าไฮยานินที่สกัดได้จากเปลือกแก้วมังกรแดงสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ รวมถึงยับยั้งการเจริญของยีสต์และราได้อีกด้วย



รูปที่ 4.10 เซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (A) และแบคทีเรียแกรมลบ (B)

ที่มา : Brown, 2015



### 4.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของโซเดียมแลกเทต

ในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของโซเดียมแลกเทต (60% w/w) จากวิธี Broth dilution ใช้ค่าความเข้มข้นช่วง 0.06-15% (Pauline C. Houtsma, Wit de , & Rombouts, 1996) โดยการวิเคราะห์ค่า MIC และ MBC ซึ่งได้ผลของการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4.5 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าโซเดียมแลกเทตมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงค่า MIC และ MBC ของโซเดียมแลกเทตอยู่ในช่วง 1.88-7.5% และ 7.5- มากกว่า 30% ตามลำดับ โดยโซเดียมแลกเทตแสดงความสามารถในการยับยั้งและฆ่า *S. aureus* ได้ดีที่สุด เนื่องจากมีค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด (1.88 และ 7.5% ตามลำดับ) และมีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ได้น้อยที่สุด ซึ่งพบว่ามีค่า MBC ที่มากกว่า 30% ผลการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Houtsma (1993, 1996) และ Nanasombat และ Chooprang (2009) ที่ศึกษาค่า MIC ของโซเดียมแลกเทตในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ pH 7 พบว่า *S. aureus* มีค่า MIC ต่ำที่สุด นอกจากนั้นจากการศึกษาของ Jay และคณะ (2005) ระบุว่าโซเดียมแลกเทตมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (bacteriostatic) มากกว่ามีฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์ (bactericidal) จะเห็นได้จากผลการศึกษาว่าโซเดียมแลกเทตมีค่า MIC อยู่ในช่วง 1.88-7.5% แต่มีค่า MBC ที่มากกว่า 30%

ตารางที่ 4.5 ค่า MIC และ ค่า MBC ของโซเดียมแลกเทต

แบคทีเรียทดสอบ	ความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต (%)	
	MIC	MBC
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.88	7.5
<i>Bacillus cereus</i>	7.5	30
<i>Salmonella Typhimurium</i>	7.5	15
<i>Escherichia coli</i>	7.5	> 30

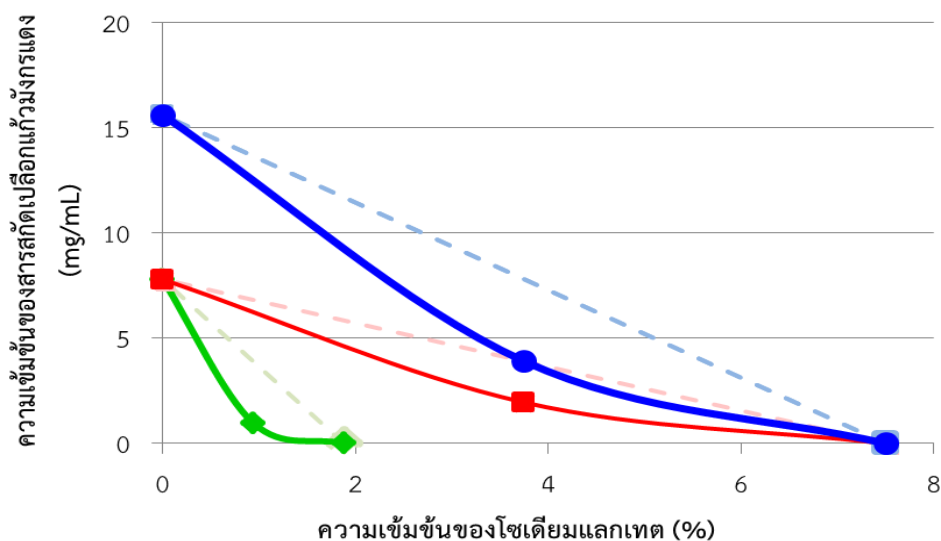
โดยกลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ของโซเดียมแลกเทต เนื่องจากโมเลกุลของกรดที่อยู่ในรูปไม่แตกตัว (undissociated form) ของโซเดียมแลกเทตจะอยู่ในรูป Lipophilic form โดยกลไกในการยับยั้งคือรบกวนและขัดขวางการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ การรบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ แบคทีเรีย จึงสามารถแพร่ผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อเข้าไปภายในเซลล์และแตกตัวอยู่



ในรูปของกรดอยู่ภายในเซลล์ ทำให้ pH ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์มีค่าต่ำกว่าปกติ จุลินทรีย์จึงเกิดความเครียดในการรักษาสมดุลระหว่าง pH ภายในและภายนอกเซลล์ จึงทำให้กลไกการทำงานต่างๆ ภายในเซลล์ถูกยับยั้งและจุลินทรีย์ตายในที่สุด (Shelef, 1994; Stratford, 2000) นอกจากนี้ยังมีกลไกในการรบกวนการทำงานของระบบเมตาบอลิซึม (metabolism) โดยโมเลกุลของกรดที่แตกตัวอยู่ภายในเซลล์อาจมีโครงสร้างคล้ายคลึงกันกับสารเมแทบอไลต์ (metabolite) ซึ่งจะเข้าไปทำปฏิกิริยาแทนที่แย่งจับกับตัวพา (carrier) ทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมที่ต้องจับกับ carrier ไม่มีที่จับ ไม่เกิดการสร้างพลังงานภายในเซลล์ เกิดการสูญเสียพลังงานของเซลล์ ทำให้เซลล์ในช่วง Lag phase ยืดยาวออกไปเรื่อยๆ เนื่องจากขาดพลังงานที่ต้องใช้ในการเจริญ จึงเกิดการลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ (Wit de & Rombouts, 1990) รวมถึงคุณสมบัติของโซเดียมแลกเตตในการจับแร่ธาตุที่เป็นสารจำเป็นในการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์ไม่เกิดการสร้างเซลล์ มีผลกระทบต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์และทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Nanasombat, 2009)

#### 4.4 การศึกษาผลที่เสริมฤทธิ์กัน

จากผลการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและโซเดียมแลกเตตเพื่อหาผลที่เสริมฤทธิ์กัน โดยนำค่า MIC ของสารผสมระหว่างสารสกัดและโซเดียมแลกเตตมาสร้างกราฟ (ดังแสดงในรูปที่ 4.11) พบว่ากราฟของการใช้สารทั้งสองร่วมกันอยู่ตำแหน่งที่ต่ำกว่าเส้นกราฟที่ใช้สารตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียว ซึ่งแสดงว่าสารผสมดังกล่าวมีฤทธิ์ที่เสริมกัน (synergistic effect) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้สารใดสารหนึ่งเพียงตัวเดียว และเมื่อพิจารณาจากตารางที่ 4.6 พบว่าการใช้โซเดียมแลกเตตที่ค่าคงที่ (ค่าที่น้อยกว่าค่า MIC ของโซเดียมแลกเตต) ทำให้ค่า MIC ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงลดลง โดยค่า MIC และ MBC ของสารผสมลดลงมากกว่า ร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับค่า MIC และ MBC ของการใช้สารตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียว จากผลการศึกษาที่ได้สามารถลดการใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและโซเดียมแลกเตตในการยับยั้งจุลินทรีย์ลงได้ 4-8 เท่า (จาก 7.81-15.63 ลดเหลือ 0.98-3.91 mg/mL) และ 2 เท่า (1.88-7.5 ลดเหลือ 0.94-3.75%) ตามลำดับ



**รูปที่ 4.11** ผลที่เสริมฤทธิ์กันของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเทตจากการวิเคราะห์ค่า MIC ของสารแต่ละตัวและการใช้สารร่วมกัน เมื่อ (— — —) แทนการใช้สารสกัดหรือโซเดียมแลกเทตเพียงตัวเดียว, (————) แทนการใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเทต; (◆) แทนค่า MIC ของ *S. aureus*, (■) แทนค่า MIC ของ *B. cereus*, (●) แทนค่า MIC ของ *S. Typhimurium* และ *E. coli*

จากตารางที่ 4.6 แสดงค่า MIC และค่า MBC ของสารผสมของแบคทีเรียทดสอบแต่ละสายพันธุ์ โดยค่า MIC และ MBC ของแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*) มีค่าต่ำกว่าค่า MIC และ MBC ของแบคทีเรียแกรมลบ (*S. Typhimurium* และ *E. coli*) แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเทตสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบชนิดแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ โดยยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด และ *E. coli* เป็นจุลินทรีย์แกรมลบที่ทนต่อสารที่ทดสอบมากที่สุดในการศึกษานี้ ซึ่งต้องใช้สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตในปริมาณที่สูงจึงจะสามารถฆ่าเชื้อ *E. coli* ได้

**ตารางที่ 4.6** ค่า MIC และ ค่า MBC ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง โซเดียมแลกเทต และสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเทตที่ความเข้มข้นคงที่ต่อแบคทีเรียที่ทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ

แบคทีเรียทดสอบ	ค่าการวิเคราะห์	สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง (mg/mL)		โซเดียมแลกเทต (%)	
		ใช้ตัวเดียว	สารผสม	ใช้ตัวเดียว	สารผสม
<i>S. aureus</i>	MIC	7.81	0.98	1.88	0.94
	MBC	15.63	1.95	7.5	0.94
<i>B. cereus</i>	MIC	7.81	1.95	7.5	3.75
	MBC	15.63	3.91	30	3.75
<i>S. Typhimurium</i>	MIC	15.63	3.91	7.5	3.75
	MBC	125	62.5	15	3.75
<i>E. coli</i>	MIC	15.63	3.91	7.5	3.75
	MBC	250	125	> 30	3.75

จากคุณสมบัติผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกและลบที่แตกต่างกัน จึงทำให้สารผสมแสดงฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียแกรมบวกที่ผนังเซลล์มีคุณสมบัติในการเลือกผ่านสารน้อยกว่าแบคทีเรียแกรมลบ จึงทำให้เบต้าไซยานินซึ่งเป็นสารสำคัญในสารสกัดที่มีสมบัติเป็นไอออนที่ชอบรวมกับน้ำ (hydrophilic) สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเข้าไปทำลายกลไกภายในเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เกิดการเสียสมดุลภายในเซลล์ และสารในเซลล์รั่วไหลออกมา จึงทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Moreno et al., 2008; Tenore et al., 2012; Yong et al., 2018) รวมถึงโมเลกุลที่ไม่แตกตัวของโซเดียมแลกเทตก็สามารถแพร่ผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียได้ โดยเข้าไปรบกวนการทำงานของระบบเมตาบอลิซึม จับแร่ธาตุที่เป็นสารจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ และทำให้เกิดการเสียสมดุลภายในเซลล์ ซึ่งจะทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด (Nanasombat, 2009; Shelef, 1994; Stratford, 2000; Wit de & Rombouts, 1990) ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีไลโปโพลีแซคคาร์ไรต์ที่เพิ่มความแข็งแรงให้เซลล์ มีช่องพอร์รินซึ่งไม่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าออก (Matu & van Staden, 2003) ทำให้สารสกัดและโซเดียมแลกเทตเข้าไปได้น้อยกว่า จึงมีประสิทธิภาพในกว่ายับยั้งจุลินทรีย์ได้น้อยกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

ผลจากการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาในข้อที่ 4.2.3 และ 4.3 ที่ศึกษาสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดและโซเดียมแลกเทต ซึ่งพบว่าสารแต่ละชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

ได้ดีกว่าแกรมลบ โดยยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด เมื่อนำสารทั้งสองมาใช้ร่วมกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ จึงให้ผลร่วมกันในการยับยั้ง *S. aureus* และแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ดีขึ้น (จากการใช้ความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดลดลง) ผลที่ได้นี้อาจเนื่องมาจากการเติมสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทำให้ค่า pH ต่ำลง เนื่องจากสมบัติของสารสกัดที่เป็นอนุพันธ์ของ betalamic acid (Moreno et al., 2008) และจากการศึกษาที่ผ่านมารายงานว่าโซเดียมแลกเตตจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดีขึ้นเมื่อ pH ของระบบลดลง (Nanasombat, 2009) ดังนั้นเมื่อใช้สารทั้งสองร่วมกันจึงมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นในการยับยั้งจุลินทรีย์ นอกจากนี้กลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแต่ละตัวอาจจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ รวมถึงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารจากธรรมชาติและเกลือโซเดียมแลกเตตในการทำงานร่วมกันเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Sokolova และคณะ, 2005) โดยผลที่ได้จากการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Schelegueda และคณะ (2012) ที่ศึกษาผลที่เสริมฤทธิ์กันระหว่างโซเดียมแลกเตตและโคโตซานซึ่งเป็นสกัดจากธรรมชาติที่ได้จากกุ้ง พบว่าการใช้โซเดียมแลกเตตร่วมกับโคโตซานทำให้ได้ค่า MIC ของโคโตซานลดลง และสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์ในเนื้อปลามากกว่าการใช้โคโตซานเพียงตัวเดียว เนื่องจากโซเดียมแลกเตตและโคโตซานมีปฏิสัมพันธ์ไฟฟ้าสถิตร่วมกันแล้วทำให้ระบบมี pH ลดลงจึงออกฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ดีขึ้น

ผลที่ได้จากการศึกษาในข้อนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงและโซเดียมแลกเตตมีฤทธิ์ที่เสริมกัน ทำให้ได้สัดส่วนของสารผสมระหว่างสารสกัดและโซเดียมแลกเตต โดยพิจารณาจากค่า MBC ของแบคทีเรียที่ทนสารมากที่สุดในการศึกษา เนื่องจากค่าที่เลือกใช้สามารถฆ่าจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ ในการศึกษานี้ *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่ทนสารมากที่สุด โดยมีค่า MBC ของสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตต เท่ากับ 125 mg/mL และ 3.75% ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.6) แต่จากความเข้มข้นของสารสกัดที่มีค่ามากกว่า 100 mg/mL ซึ่งอาจไม่เหมาะสมหากนำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร เนื่องจากสารสกัดเป็นสารที่ให้สี เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงอาจทำลักษณะปรากฏของอาหารไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รวมถึงยังทำให้เกิดความสิ้นเปลืองหากต้องใช้สารสกัดในปริมาณมาก

ในการศึกษาจึงเลือกค่า MBC ของ *S. Typhimurium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทนสารรองลงมาจาก *E. coli* แต่ที่ค่าความเข้มข้นดังกล่าวไม่สามารถฆ่า *E. coli* ได้ ดังนั้นจึงศึกษาการหาฤทธิ์ที่เสริมกันเพิ่มเติม โดยการประเมินการใช้สารผสมระหว่างสารสกัดที่กำหนดความเข้มข้นคงที่ที่ 62.5 mg/mL และแปรความเข้มข้นของโซเดียมแลกเตต เพื่อหาอัตราส่วนระหว่างสารผสมที่สามารถแสดงฤทธิ์ฆ่า *E. coli* ได้ จากการศึกษาพบว่าการใช้โซเดียมแลกเตต 60% ร่วมกับสารสกัด 62.5 mg/mL สามารถแสดงฤทธิ์ฆ่า *E. coli* ได้ และเมื่อนำสารผสมทั้งสองชนิดมาคำนวณเทียบต่อ

ปริมาณของอาหาร 100 g ทำให้ได้อัตราส่วนของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงต่อโซเดียมแลกเทตเท่ากับ 6.25:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาในคัสตาร์ดครีมต่อไป

#### 4.5 การศึกษาผลของการใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเทตต่อสมบัติของคัสตาร์ดครีม

ในการศึกษาผลของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเทตต่อสมบัติของคัสตาร์ดครีมซึ่งประกอบไปด้วยคัสตาร์ดครีม (ตัวอย่างควบคุม) และคัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.25 (mg/mL) และ 1 (ตัวอย่างที่ศึกษา) ระหว่างการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน โดยศึกษาสมบัติทางกายภาพ สมบัติทางเคมี และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ โดยมีผลของการศึกษา ดังนี้

##### 4.5.1 สมบัติทางกายภาพ

จากการศึกษาค่าสี ดังแสดงในตารางที่ 4.7 คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทต มีค่า  $L^*$  (ความสว่าง) เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $77.89 \pm 0.09$  และ  $33.81 \pm 0.29$  ตามลำดับ มีค่า  $a^*$  (ค่าสีแดงและสีเขียว) เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $-0.79 \pm 0.04$  และ  $24.37 \pm 0.50$  ตามลำดับ และมีค่า  $b^*$  (ค่าสีน้ำเงินและสีเหลือง) เท่ากับ  $22.55 \pm 0.17$  และ  $-1.56 \pm 0.03$  ตามลำดับ พบว่าสีของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมมีความสว่างและมีสีเหลือง และคัสตาร์ดครีมที่ศึกษามีสีแดงและมีความเข้มสูงกว่า เนื่องจากสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงเป็นสารให้สีแดงม่วง เมื่อใส่ลงไปนคัสตาร์ดครีมจึงมีสีแดง ดังแสดงในรูปที่ 4.12 โดยค่า  $a^*$  ในตัวอย่างควบคุมมีแนวโน้มลดลงและค่า  $b^*$  มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ตัวอย่างที่ศึกษาค่า  $a^*$  และ  $b^*$  มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น นอกจากนั้น ค่า  $\Delta E^*$  เป็นค่าความแตกต่างของสีระหว่างตัวอย่างคัสตาร์ดครีมก่อนเก็บรักษา (วันที่ 0) กับตัวอย่างคัสตาร์ดครีมที่ผ่านการเก็บรักษาในแต่ละวัน (วันที่ 1-7) ซึ่งถ้าค่า  $\Delta E^*$  มาก แสดงว่า ตัวอย่างมีสีแตกต่างจากตัวอย่างเริ่มต้นมาก จากการศึกษาพบว่าคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงสีมากกว่าตัวอย่างที่ศึกษา ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติของโซเดียมแลกเทตที่ช่วยให้สารสกัดจากธรรมชาติมีความเสถียรมากยิ่งขึ้น จึงทำให้คัสตาร์ดครีมที่ศึกษามีค่า  $\Delta E^*$  เพิ่มขึ้นน้อยกว่า โดยการเปลี่ยนแปลงของค่าสีดังกล่าว เกิดจากสารเบต้า-ไซยานินที่เป็นสารให้สีในคัสตาร์ดครีมเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากโครงสร้างไม่เสถียร โดยเกิดการสลายตัวของเบต้าไซยานินในระหว่างการเก็บรักษาเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารสีเหลือง และสารไม่มีสี (Gengatharan et al., 2015; Herbach et al., 2006; Stintzing & Carle, 2004) ซึ่งสัมพันธ์กับค่า

L\* และค่า b\* ที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น การศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Gengatharan และคณะ (2016) ที่ศึกษาการเติมสารสกัดแก้วมังกรแดงลงในนม แล้วเก็บรักษาที่ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณเบต้าไฮยานินมีค่าลดลง เนื่องจากเกิดการสลายตัวไปเป็น betalamic acid ที่มีสีเหลือง และ cyclo-dopa ที่เป็นสารไม่มีสี จึงทำให้ค่า  $\Delta E^*$  มีค่าเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้น

**ตารางที่ 4.7** ค่าสีของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทต ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาเก็บ (วัน)	ค่าการวิเคราะห์			
	L*	a*	b*	$\Delta E^*$
<b>คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม</b>				
0	77.89 ± 0.09 <sup>C</sup>	-0.79 ± 0.04 <sup>A</sup>	22.55 ± 0.17 <sup>D</sup>	-
1	76.90 ± 1.59 <sup>C</sup>	-0.18 ± 0.13 <sup>C</sup>	21.65 ± 0.46 <sup>C</sup>	1.81 ± 1.10 <sup>C</sup>
3	83.94 ± 0.45 <sup>A</sup>	-0.68 ± 0.11 <sup>C</sup>	24.43 ± 0.31 <sup>B</sup>	6.34 ± 0.41 <sup>A</sup>
5	84.34 ± 0.34 <sup>A</sup>	-0.44 ± 0.09 <sup>B</sup>	24.76 ± 0.20 <sup>AB</sup>	6.83 ± 0.29 <sup>A</sup>
7	82.62 ± 0.66 <sup>B</sup>	-0.50 ± 0.14 <sup>B</sup>	25.18 ± 0.69 <sup>A</sup>	5.47 ± 0.68 <sup>B</sup>
<b>คัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดและโซเดียมแลกเทต</b>				
0	33.81 ± 0.29 <sup>d</sup>	24.37 ± 0.50 <sup>b</sup>	-1.56 ± 0.03 <sup>b</sup>	-
1	34.62 ± 0.71 <sup>c</sup>	24.31 ± 2.97 <sup>b</sup>	-1.95 ± 0.96 <sup>b</sup>	2.53 ± 1.20 <sup>b</sup>
3	35.62 ± 0.02 <sup>b</sup>	27.67 ± 2.21 <sup>a</sup>	-0.91 ± 0.10 <sup>a</sup>	4.20 ± 1.18 <sup>a</sup>
5	35.33 ± 0.03 <sup>bc</sup>	28.07 ± 0.08 <sup>a</sup>	-0.65 ± 0.03 <sup>a</sup>	4.12 ± 0.42 <sup>a</sup>
7	36.39 ± 0.93 <sup>a</sup>	27.88 ± 1.17 <sup>a</sup>	-0.44 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.58 ± 0.14 <sup>a</sup>

หมายเหตุ : ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

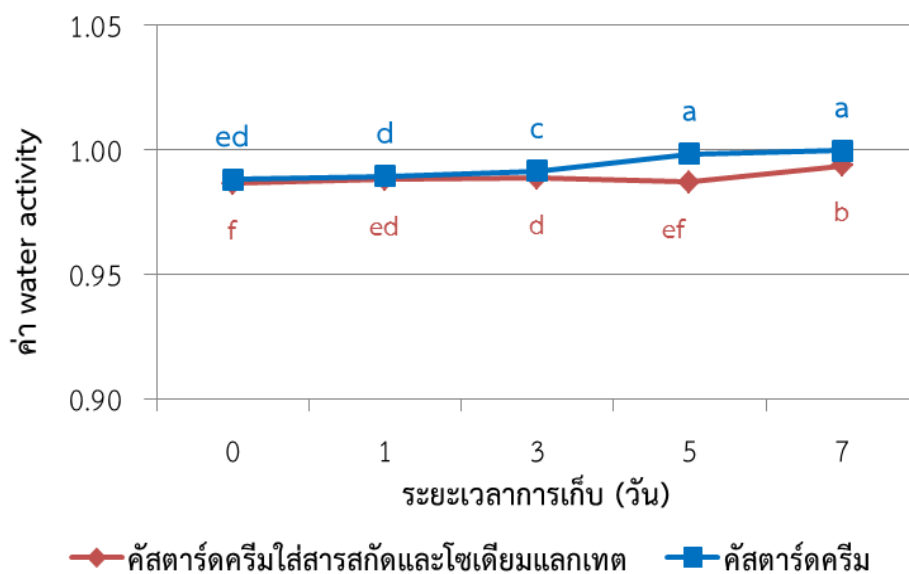
A-D : แสดงความแตกต่างในแนวตั้งของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

a-d : แสดงความแตกต่างในแนวตั้งของคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดและโซเดียมแลกเทตที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.12 คัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตต (A)  
และคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (B)

ค่าวอเตอร์แอกทีวิตี้ (water activity;  $a_w$ ) เป็นค่าที่แสดงระดับพลังงานของน้ำ มีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษา การเสื่อมเสีย และความปลอดภัยของอาหาร จากการศึกษาได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ค่าวอเตอร์แอกทีวิตี้ของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตตระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน  
เมื่อ : a-f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ค่า  $a_w$  ของแต่ละตัวอย่างมีค่ามากกว่า 0.85 ซึ่งจัดเป็นอาหารสดที่เน่าเสียได้ง่าย ค่า  $a_w$  เริ่มต้น (วันที่ 0) ของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลก

เทต มีค่าเท่ากับ 0.988 และ 0.986 ตามลำดับ โดยค่า  $a_w$  ของตัวอย่างควบคุมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ตั้งแต่วันที่ 1 ในขณะที่คัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทต มีค่า  $a_w$  เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ในวันที่ 3 ทั้งนี้เนื่องจากสมบัติของโซเดียมแลกเทตที่สามารถลดค่า  $a_w$  ได้ จึงทำให้ค่า  $a_w$  ของคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทต มีค่า  $a_w$  เพิ่มขึ้นช้ากว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการศึกษาของ Bingol และคณะ (2013) ที่ศึกษาการเติมโซเดียมแลกเทตลงในลูกชิ้น พบว่า การใช้โซเดียมแลกเทต 4% สามารถลดค่า  $a_w$  ของลูกชิ้นได้

นอกจากนั้นลักษณะทางเนื้อสัมผัสก็ยังเป็นลักษณะทางกายภาพที่สำคัญที่ส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของการเติมสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตต่อค่า texture profile analysis ดังตารางที่ 4.8 พบว่าคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมมีค่า hardness (แรงสูงสุดที่เกิดขึ้นระหว่างการเคี้ยวครั้งแรก) ค่า gumminess (พลังงานที่ทำให้อาหารกิ่งของแข็งแตกออกจนสามารถกลืนได้) เพิ่มขึ้น และค่า cohesiveness (พลังงานยึดเกาะกันภายในเนื้ออาหาร) ค่า chewiness (พลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวอาหาร) ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยค่า hardness ในตัวอย่างควบคุมมีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และมีค่าสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 ในขณะที่ตัวอย่างที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตมีค่าลดลงและเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 5 ซึ่งสัมพันธ์กับค่าการแยกตัวของน้ำ (%syneresis) ในคัสตาร์ดครีม โดยเมื่อน้ำออกจากผลิตภัณฑ์จะทำให้เกิดการแข็งของเนื้อครีมส่งผลให้ค่า hardness สูงขึ้น นอกจากนั้นคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตมีค่า gumminess และค่า chewiness ลดลง และเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 และ 7 ในขณะที่ค่า cohesiveness ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น จากการศึกษาพบว่าการเติมสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อสัมผัสของคัสตาร์ดครีมและแตกต่างกับตัวอย่างควบคุมตั้งแต่วันเริ่มต้น (วันที่ 0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และคัสตาร์ดครีมที่ได้มีเสถียรภาพมากกว่าตัวอย่างควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเนื่องจากโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ยังไม่เกิดการแข็งของเนื้อครีม ซึ่งผลที่ได้นี้อาจจะมาจากสมบัติของโซเดียมแลกเทตที่มีคุณสมบัติในการปรับปรุงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ (Bingol & Bostan, 2007) และสมบัติในการเป็นสารช่วยรักษาความชุ่มชื้นของผลิตภัณฑ์ (humectant) ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการแยกตัวของน้ำจากอาหาร จึงทำให้เนื้อสัมผัสของอาหารชุ่มชื้น ไม่แห้ง และมีความยืดหยุ่น (United States Department of Agriculture, 2015)



**ตารางที่ 4.8** ลักษณะเนื้อสัมผัสของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (CT) และคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตต (CT+RD+SL) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

TPA	อายุการเก็บรักษา (วัน)				
	0	1	3	5	7
<b>Hardness (N)</b>					
CT	26.16±0.91 <sup>c</sup>	27.26±0.80 <sup>c</sup>	28.18±2.26 <sup>bc</sup>	30.08±0.11 <sup>b</sup>	33.57±3.61 <sup>a</sup>
CT+RD+SL	12.18±0.00 <sup>d</sup>	7.00±0.25 <sup>f</sup>	7.00±0.67 <sup>f</sup>	8.85±0.15 <sup>ef</sup>	9.85±0.07 <sup>de</sup>
<b>Cohesiveness</b>					
CT	0.61±0.01 <sup>b</sup>	0.55±0.03 <sup>bc</sup>	0.48±0.02 <sup>c</sup>	0.50±0.08 <sup>c</sup>	0.50±0.05 <sup>c</sup>
CT+RD+SL	0.81±0.02 <sup>a</sup>	0.76±0.07 <sup>a</sup>	0.73±0.07 <sup>a</sup>	0.74±0.02 <sup>a</sup>	0.77±0.02 <sup>a</sup>
<b>Gumminess (N)</b>					
CT	13.16±1.63 <sup>b</sup>	13.52±1.53 <sup>b</sup>	16.53±0.49 <sup>a</sup>	16.40±0.85 <sup>a</sup>	16.82±3.32 <sup>a</sup>
CT+RD+SL	9.84±0.22 <sup>c</sup>	5.34±0.37 <sup>de</sup>	5.11±0.18 <sup>e</sup>	6.53±0.08 <sup>de</sup>	7.59±0.24 <sup>d</sup>
<b>Chewiness</b>					
CT	11.11±0.85 <sup>a</sup>	7.85±1.28 <sup>b</sup>	7.07±2.26 <sup>bc</sup>	4.87±0.53 <sup>de</sup>	3.77±0.91 <sup>ef</sup>
CT+RD+SL	5.75±0.41 <sup>cd</sup>	1.41±0.07 <sup>g</sup>	0.87±0.21 <sup>g</sup>	2.25±0.06 <sup>fg</sup>	2.54±0.12 <sup>fg</sup>

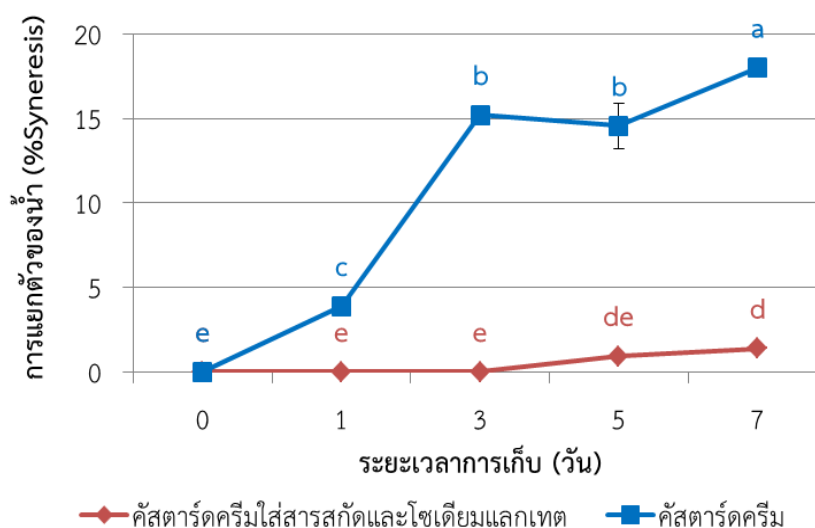
หมายเหตุ : a-g แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของลักษณะเนื้อสัมผัสลักษณะเดียวกันที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

#### 4.5.2 สมบัติทางเคมี

สมบัติทางเคมีเป็นสมบัติที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบภายในของอาหารและการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือการเกิดปฏิกิริยาเคมี ในการศึกษานี้ได้ผลของการศึกษา ดังนี้

การแยกตัวของน้ำ (%syneresis) เป็นการหดตัวของอาหารประเภทเจลหรือครีมเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งเกิดจากการจับกันของน้ำและเวย์โปรตีนภายในนมลดลง ทำให้มีน้ำออกมารอบๆ ผลิตภัณฑ์ ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (Al-Kadamany, Khatat, Haddad, & Toufeili, 2003) จากผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.14



**รูปที่ 4.14** การแยกตัวของน้ำของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมที่ใสสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน  
เมื่อ : a-e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

พบว่า %syneresis เริ่มต้น (วันที่ 0) ของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมใสสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตไม่มีความแตกต่างกัน และตั้งแต่วันที่ 1 คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมมี %syneresis เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเทียบกับคัสตาร์ดครีมใสสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทต โดยในวันที่ 1 คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมมี %syneresis เท่ากับ 3.89% และเพิ่มขึ้นเป็น 15.20% ในวันที่ 3 ในขณะที่คัสตาร์ดครีมใสสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเทตไม่เกิดการแยกตัวของน้ำใน 1-3 และเริ่มเกิดในวันที่ 5 โดยมี %syneresis เท่ากับ 0.94% จากการศึกษาพบว่าคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมมีการแยกตัวของน้ำออกมารอบนอกผลิตภัณฑ์ที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่าตั้งแต่วันที่ 3 ดังแสดงในรูปที่ 4.15 ซึ่งสอดคล้องกับค่า hardness ที่เพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 3 คัสตาร์ดครีมที่มีน้ำออกมาทำให้เกิดการแข็งตัวของเนื้อครีม ซึ่งลักษณะนี้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (โดยสังเกตจากผู้วิจัย)



**รูปที่ 4.15** การแยกตัวของน้ำของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ในวันที่ 3

โดยการเกิด %syneresis อย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 เนื่องจากปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้โปรตีนเข้าใกล้จุด isoelectric point ดังนั้น คัสตาร์ดครีมจึงอุ้มน้ำได้น้อยลง (La Torre, Tamine, and Muir, 2003) ในขณะที่คัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตตไม่สามารถสังเกตลักษณะการขับน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 7 วัน โดยผลที่ได้นี้อาจเกิดจากเบต้าไฮยานินที่เป็นสารสำคัญในสารสกัดสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนและอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) กับโปรตีนในนมได้ ทำให้โปรตีนในนมมีเสถียรภาพในระหว่างการเก็บรักษา (Gengatharan, Dykes, & Choo, 2017) นอกจากนี้จากคุณสมบัติของโซเดียมแลกเตตที่เป็นสารดูดความชื้น (humectant) จึงช่วยกักเก็บน้ำไว้ในผลิตภัณฑ์และไม่เกิดการขับน้ำออกจากเนื้อครีม โดยผลจากการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Gengatharan, Dykes และ Choo (2017) ที่ศึกษาการเติมสารสกัดจากแก้วมังกรแดงลงในโยเกิร์ต แล้วเก็บรักษาที่ 4 °C เป็นเวลา 14 วัน พบว่าโยเกิร์ตที่เติมสกัดเริ่มเกิดการขับน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ตั้งแต่วันที่ 4 และมี %syneresis ต่ำกว่าโยเกิร์ตที่ไม่เติมสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า pH และปริมาณกรดแลคติกของคัสตาร์ดครีมในระหว่างการเก็บรักษา ดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าค่า pH ของคัสตาร์ดครีมของทั้งสองตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ซึ่งค่า pH ที่ลดลงในตัวอย่งคัสตาร์ดครีมควบคุมสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติกและการเจริญของจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตตมีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ  $5.82 \pm 0.01$  ซึ่งต่ำกว่าค่า pH ของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม เนื่องจากเบต้าไฮยานินเป็นสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบและจัดเป็นอนุพันธ์ betalamic acid รวมถึงส่วนประกอบของกรดฟีนอลิก เช่น กรดแกลลิก กรดคาเฟอิก ที่เป็นสารองค์ประกอบในสารสกัด จึงทำให้ค่า pH ต่ำ (Moreno et al., 2008) เมื่อพิจารณาจากผลที่

ศึกษา พบว่า คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมและคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตตมีค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ตั้งแต่วันที่ 3 และ 5 ตามลำดับ และเมื่อเทียบจากวันเริ่มต้นค่า pH ลดลง 0.40 และ 0.30 ตามลำดับ จะเห็นว่าคัสตาร์ดครีมสูตรที่ศึกษามีการลดลงของค่า pH ที่ช้ากว่า เนื่องมาจากสมบัติของโซเดียมแลกเตตที่เป็นสารควบคุมความเป็นกรด-ด่าง จึงทำให้ค่า pH ค่อยๆ ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sallam และ Samejima (2004) ที่ศึกษาการเติมโซเดียมแลกเตตลงในเนื้อวุ้น แล้วเก็บรักษาที่ 2 °C เป็นเวลา 21 วัน พบว่า เนื้อวุ้นมีค่า pH เพิ่มขึ้น  $0.01 \pm 0.03$  และการศึกษาของ Bingol และ Bostan (2007) ศึกษาผลของเติมโซเดียมแลกเตตในไส้กรอกที่ความเข้มข้น 0-1.8% แล้วเก็บรักษาที่ 4 °C เป็นเวลา 60 วัน พบว่าค่า pH ของผลิตภัณฑ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งนี้ในตัวอย่างคัสตาร์ดครีมมีค่า pH เปลี่ยนแปลงมากกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ อาจจะเป็นผลมาจากส่วนประกอบภายในอาหารและสารองค์ประกอบของสารสกัดที่เติมลงไป รวมถึงความเข้มข้นของโซเดียมแลกเตตที่เลือกใช้

**ตารางที่ 4.9** ค่า pH และปริมาณกรดแลคติก (%) ของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (CT) และคัสตาร์ดครีมที่ใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตต (CT+RD+SL) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลาการเก็บ (วัน)	ค่า pH		ปริมาณกรดแลคติก (%)	
	CT+RD+SL	CT	CT+RD+SL	CT
0	5.82 ± 0.01 <sup>e</sup>	6.52 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.03 <sup>f</sup>
1	5.81 ± 0.01 <sup>e</sup>	6.51 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>e</sup>
3	5.81 ± 0.00 <sup>e</sup>	6.49 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>e</sup>
5	5.79 ± 0.01 <sup>f</sup>	6.48 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.28 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>de</sup>
7	5.76 ± 0.01 <sup>g</sup>	6.46 ± 0.02 <sup>d</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>d</sup>

หมายเหตุ : a-g แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าทางเคมีชนิดเดียวกันที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

นอกจากการเติมสารสกัดและโซเดียมแลกเตตลงในคัสตาร์ดเพื่อศึกษาผลของการเก็บรักษาแล้ว การเติมสารสกัดจากธรรมชาติก็ยังช่วยเพิ่มคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของคัสตาร์ดครีมทั้ง

สองตัวอย่าง (ดังแสดงในตารางที่ 4.10) พบว่าปริมาณเบต้าไซยานิน ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ค่า DPPH และค่า FRAP มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น

**ตารางที่ 4.10** ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (CT) และคัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตต (CT+RD+SL) ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	การเก็บรักษา (วัน)				
	0	1	3	5	7
<b>ปริมาณเบต้าไซยานิน (mg/100 g)</b>					
CT	nd	nd	nd	nd	nd
CT+RD+SL	2.60±0.02 <sup>a</sup>	2.50±0.02 <sup>b</sup>	2.38±0.01 <sup>c</sup>	2.21±0.01 <sup>d</sup>	2.13±0.00 <sup>e</sup>
<b>ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (mg/100 g)</b>					
CT	5.15±0.00 <sup>d</sup>	4.86±0.30 <sup>de</sup>	4.52±0.39 <sup>e</sup>	3.95±0.08 <sup>f</sup>	2.31±0.27 <sup>g</sup>
CT+RD+SL	18.88±0.20 <sup>a</sup>	18.45±0.35 <sup>ab</sup>	18.35±0.34 <sup>b</sup>	18.22±0.08 <sup>bc</sup>	17.84±0.22 <sup>c</sup>
<b>DPPH (%Inhibition)</b>					
CT	3.38±0.00 <sup>d</sup>	2.10±0.53 <sup>e</sup>	1.51±0.13 <sup>fg</sup>	1.00±0.13 <sup>fg</sup>	0.87±0.23 <sup>g</sup>
CT+RD+SL	27.82±0.64 <sup>a</sup>	27.67±0.26 <sup>a</sup>	26.71±0.49 <sup>b</sup>	26.93±0.30 <sup>b</sup>	23.06±0.09 <sup>c</sup>
<b>FRAP (µM FeSO<sub>4</sub>/100 g)</b>					
CT	nd	nd	nd	nd	nd
CT+RD+SL	91.63±0.76 <sup>a</sup>	91.84±0.85 <sup>a</sup>	89.45±0.00 <sup>ab</sup>	89.10±0.32 <sup>b</sup>	87.28±3.63 <sup>b</sup>

หมายเหตุ : a-g แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดเดียวกันที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) และ nd : แสดงการไม่ตรวจพบ

โดยคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมไม่พบปริมาณเบต้าไซยานิน ในขณะที่คัสตาร์ดครีมใส่สารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตตมีปริมาณเบต้าไซยานินลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการสลายตัวในระหว่างเก็บรักษา ซึ่งเป็นผลมาจากการลดลงของค่า pH และการเพิ่มขึ้นของค่า  $a_w$  ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrolysis ของ betanin เกิดการสลายตัวไปเป็น betalamic acid ที่มีสีเหลือง และ cyclo-dopa ที่เป็นสารไม่มีสี (Vergas et al, 2000) รวมถึงการผลิต hydrogen peroxide ของแบคทีเรียแลคติกก็ทำให้เกิดการสลายตัวของเบต้าไซยานินด้วยเช่นกัน (Talwalkar & Kailasapathy, 2006)

นอกจากนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มลดลง ซึ่งเป็นผลจากการสลายตัวของเบต้าไซยานิน รวมถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการวิเคราะห์ค่า DPPH และ FRAP มีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน โดยจากสมบัติของสารสกัดที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อนำไปเติมลงไป ในอาหารจึงทำให้อาหารมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน และการลดลงของปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ก็เป็นผลมาจากการสลายตัวของเบต้าไซยานินที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เนื่องจากเบต้าไซยานินเป็นสารองค์ประกอบหลักในสารสกัดที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Gengatharan, Dykes, & Choo, 2017; Gengatharan et al., 2015)

จากการศึกษาผลของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตต่อสมบัติทางกายภาพและเคมีของคัสตาร์ดครีม พบว่า ลักษณะทางกายภาพและเคมีมีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปน้อยกว่าคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม และยังไม่เกิดการแยกตัวของน้ำออกจากผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน ในขณะที่คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมเกิดการแข็งตัวของเนื้อครีมและเกิดการแยกตัวของน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ตั้งแต่วันที่ 3 ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (สังเกตจากผู้วิจัย) ดังนั้น การเติมสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตตจึงสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาทางกายภาพและเคมีของคัสตาร์ดครีมได้มากกว่า 7 วัน ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C

#### 4.5.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

ในการศึกษานี้แบ่งคัสตาร์ดครีมที่ใช้ในการศึกษาออกเป็น 3 ตัวอย่าง ได้แก่ คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) คัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสม (สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง 6.25% และโซเดียมแลกเตต 1%) โดยมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารที่เติมลงไป ในคัสตาร์ดครีม และประเมินผลขององค์ประกอบของอาหาร (food matrix) ต่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของสารผสม โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ทดสอบในแต่ละตัวอย่าง ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ดังแสดงในตารางที่ 4.11

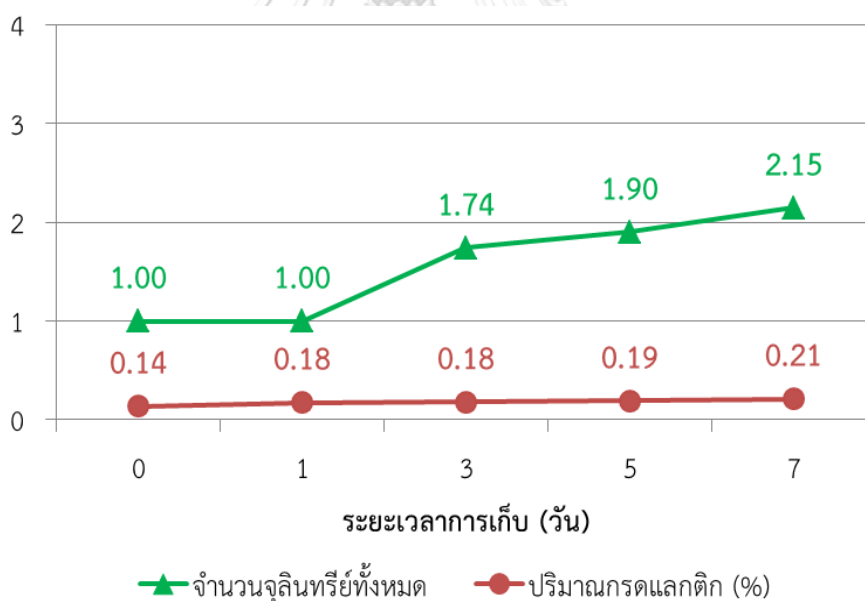
**ตารางที่ 4.11** การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ (log CFU/g) ของคัสตาร์คริมตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) คัสตาร์คริมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์คริมที่เติมเชื้อและใส่สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับไซโตซิลแลกเทต ในระหว่างการรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

ระยะเวลา การเก็บ (วัน)	จำนวนจุลินทรีย์ log CFU/g											
	ตัวอย่าง ควบคุม		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>S. Typhimurium</i>		<i>E. coli</i>			
	ไม่เติมเชื้อ	เติมเชื้อ	เติมเชื้อ	เติมเชื้อ	เติมเชื้อ	เติมเชื้อ	เติมเชื้อ	เติมเชื้อ	เติมเชื้อ	เติมเชื้อ		
0	1.00±0.00	5.79±0.03 <sup>a</sup>	5.74±0.08 <sup>a</sup>	4.46±0.33 <sup>b</sup>	4.55±0.04 <sup>ab</sup>	4.54±0.01 <sup>c</sup>	5.06±0.03 <sup>ab</sup>	5.63±0.03 <sup>a</sup>	5.70±0.04 <sup>a</sup>			
1	1.00±0.00	5.75±0.03 <sup>a</sup>	5.78±0.06 <sup>a</sup>	4.58±0.04 <sup>b</sup>	4.79±0.00 <sup>a</sup>	4.11±0.00 <sup>d</sup>	4.98±0.08 <sup>ab</sup>	5.44±0.01 <sup>b</sup>	5.41±0.00 <sup>b</sup>			
3	1.74±0.06	5.74±0.03 <sup>a</sup>	5.45±0.10 <sup>b</sup>	3.00±0.00 <sup>d</sup>	4.83±0.00 <sup>a</sup>	4.10±0.02 <sup>d</sup>	4.89±0.00 <sup>b</sup>	5.70±0.06 <sup>a</sup>	5.64±0.02 <sup>a</sup>			
5	1.90±0.08	5.34±0.00 <sup>bc</sup>	5.25±0.00 <sup>c</sup>	2.00±0.00 <sup>e</sup>	3.37±0.09 <sup>c</sup>	3.15±0.21 <sup>e</sup>	4.87±0.02 <sup>b</sup>	5.26±0.00 <sup>c</sup>	5.32±0.06 <sup>c</sup>			
7	2.15±0.04	5.10±0.01 <sup>d</sup>	5.05±0.06 <sup>d</sup>	1.15±0.21 <sup>f</sup>	3.31±0.01 <sup>c</sup>	3.13±0.25 <sup>e</sup>	5.17±0.12 <sup>a</sup>	5.24±0.04 <sup>c</sup>	5.24±0.04 <sup>c</sup>			

หมายเหตุ : a-g แสดงค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



จากการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ดังแสดงในตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.16 พบว่า จำนวนจุลินทรีย์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 (จาก 1.00 เป็น 1.74 log CFU/g) ซึ่งสัมพันธ์กับค่า pH ที่ลดลงและปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์หลักที่เพิ่มขึ้นนี้น่าจะเป็นกลุ่มแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารจากผลิตภัณฑ์นมเกิดการเสื่อมเสีย (Arakawa et al., 2008) ซึ่งจะพบการเพิ่มจำนวนประชากรไปพร้อมกับปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ จากผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C มีอายุการเก็บรักษาได้มากกว่า 7 วัน โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ เท่ากับ  $2.15 \pm 0.04$  log CFU/g ซึ่งคุณภาพด้านจุลินทรีย์ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษายังอยู่ในระดับที่เป็นไปตามมาตรฐาน ทั้งนี้ น่าจะเป็นผลมาจากอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ 4 °C สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี ประกอบกับการผลิตคัสตาร์ดครีมในการศึกษานี้ผลิตปริมาณน้อยและอุปกรณ์ที่ใช้มีความสะอาด รวมถึงวัตถุดิบที่ใช้มาจากการผลิตรอบเดียวกัน จึงทำให้จุลินทรีย์ในคัสตาร์ดครีมมีการปนเปื้อนเริ่มต้นน้อย



**รูปที่ 4.16** จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g) และปริมาณกรดแลคติก (%) ในคัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน

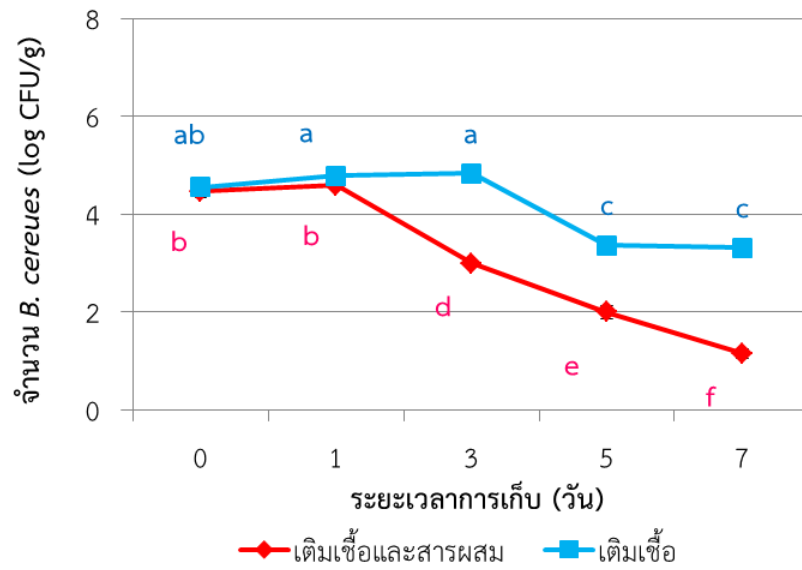
เมื่อเติมเชื้อผสม (culture cocktail) ความเข้มข้น  $10^5$ - $10^6$  CFU/mL ของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ ลงในคัสตาร์ดครีม เพื่อศึกษาผลของการใช้สารผสมต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ พบว่าการเติมสารผสมสามารถลดจำนวนของ *B. cereus* และ *S. Typhimurium* ได้ แต่ไม่



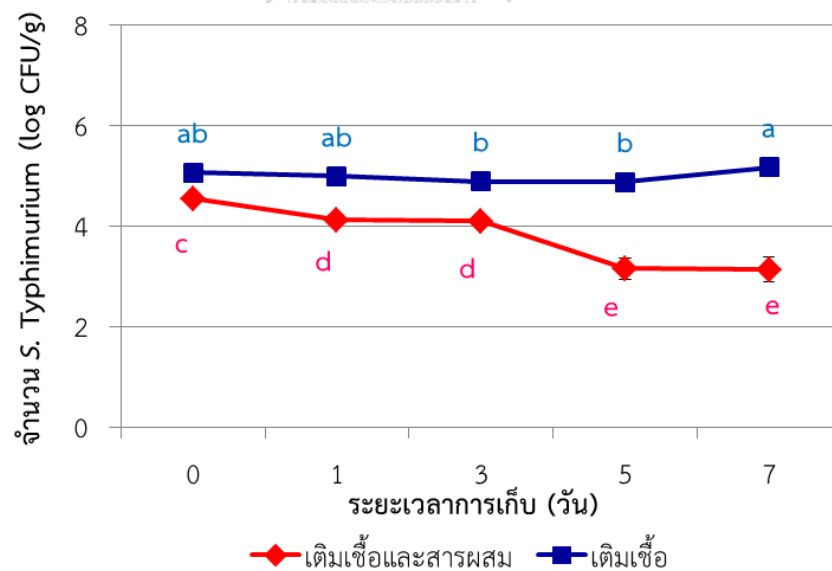
สามารถลดจำนวนของ *S. aureus* และ *E. coli* โดยผลที่ได้นี้แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแตกต่างกับการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro test) ซึ่งอาจเป็นผลจากการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารออกฤทธิ์สำคัญ (active compound) และองค์ประกอบของอาหาร ที่ทำให้ค่าความเข้มข้นลดลงต่ำกว่าค่า MBC ในหลอดทดลอง โดยผลการศึกษาของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์แสดงดังนี้

จากการศึกษาพบว่า *B. cereus* ในคัสตาร์ดครีมที่เติมสารผสมและไม่เติมสารผสม มีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $4.46 \pm 0.33$  และ  $4.55 \pm 0.04$  log CFU/g ตามลำดับ และมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น โดยคัสตาร์ดครีมที่เติมสารผสมมีจำนวน *B. cereus* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 เท่ากับ 0.21, 1.83, 1.37 และ 2.16 log CFU/g ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 4.17) และ *S. Typhimurium* ในคัสตาร์ดครีมที่เติมสารผสมมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ตั้งแต่วันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 เท่ากับ 0.52, 0.87, 0.79, 1.72 และ 2.04 log CFU/g ตามลำดับ (ดังแสดงในรูปที่ 4.18) บ่งชี้ว่าสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตทที่เติมลงในคัสตาร์ดครีมสามารถลดจำนวนของ *B. cereus* และ *S. Typhimurium* ได้ โดยมีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงจากเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 74 และ 31 ตามลำดับ ซึ่งสามารถลด *B. cereus* ได้ดีที่สุด ทั้งนี้การที่สารผสมในคัสตาร์ดครีมแสดงฤทธิ์ในการยับยั้ง *B. cereus* ได้มากกว่าแบคทีเรียที่ทดสอบสายพันธุ์อื่นๆ เนื่องจากค่า MBC ของสารผสมที่เลือกใช้สูงกว่าค่า MBC ของ *B. cereus* ซึ่งเพิ่มค่า MBC ของสารสกัดและโซเดียมแลกเตท เท่ากับ 16 เท่า ทำให้สารที่ออกฤทธิ์มีมากพอที่จะยับยั้งเชื้อได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Holzappel (2002) และ Leroy และ Vuyst (2004) ที่แนะนำว่าการปฏิบัติทางจุลินทรีย์นิยมใช้ค่า MBC มากกว่าหรือเท่ากับ 10 เท่าของค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารที่ได้จากการทดสอบในการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหาร เนื่องจากสารบางชนิดอาจเกิดปฏิกิริยากับองค์ประกอบของอาหาร ที่ทำให้ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ลดลง

ในขณะที่ *S. Typhimurium* ที่เพิ่มค่า MBC ของสารสกัดและโซเดียมแลกเตท เท่ากับ 1 และ 16 เท่า ตามลำดับ แสดงฤทธิ์ยับยั้งน้อยกว่า *B. cereus* เนื่องจากสมบัติของสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนในนมได้ (Jakobek, 2015; Yildirim Elikoglu & Erdem, 2017; Yuksel, Avci, & Erdem, 2010) โดยจากส่วนประกอบหลักของคัสตาร์ดครีมที่ทำจากนม ซึ่งมีโปรตีนเคซีน (casein) เป็นองค์ประกอบสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนได้ดีกับสารประกอบฟีนอลิก เนื่องจากโปรตีนนมประกอบด้วยกรดอะมิโนโพรลีนจำนวนมาก (proline-rich proteins) ซึ่งกรดอะมิโนชนิดนี้ทำให้โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนมีความยืดหยุ่น จึงทำให้หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เข้าถึงพันธะเพปไทด์ได้ง่าย (Luck et al., 1994; O'Connell & Fox, 2001; Simon et al., 2003) ดังนั้นเมื่อสารออกฤทธิ์สำคัญส่วนหนึ่งเกิดปฏิกิริยาดังที่กล่าวมาทำให้ค่าความเข้มข้นลดลงต่ำกว่าค่า MBC แต่ก็สามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งได้ บ่งชี้ว่าความเข้มข้นของของสารออกฤทธิ์สำคัญต่อเชื้อ *S. Typhimurium* ยังคงมีค่าความเข้มข้นอยู่ระหว่างค่า MIC และ MBC

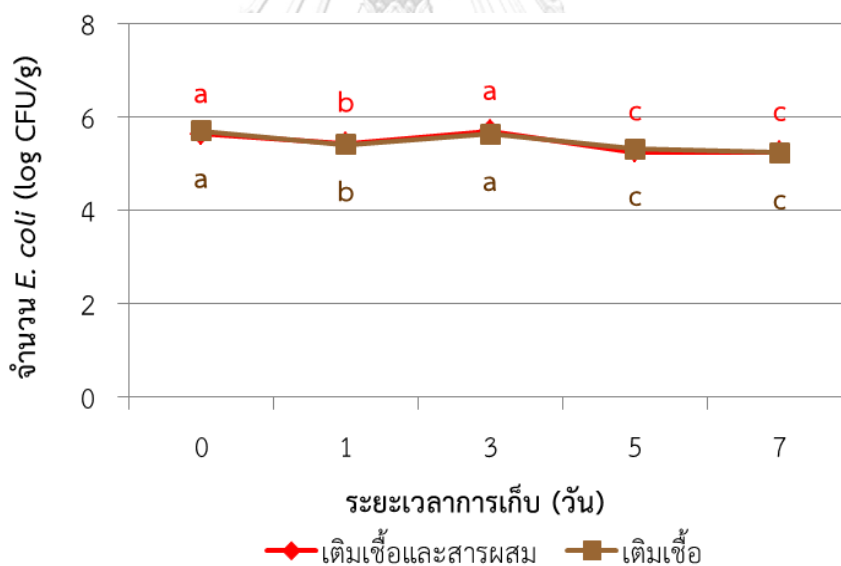


รูปที่ 4.17 จำนวน *B. cereus* ของคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสม ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน  
 เมื่อ : a-f แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.18 จำนวน *S. Typhimurium* ของคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสมในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน  
 เมื่อ : a-e แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่าจำนวน *E. coli* ในคัสตาร์ดครีมที่เติมสารผสมและไม่เติมสารผสม มีแนวโน้มลดลงอย่างไม่มีความแตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) เมื่อระยะเวลาการศึกษาเพิ่มขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 4.19) แสดงว่าการใช้สารผสมไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษานี้เลือกใช้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดและโซเดียมแลกเตทจากค่า MBC ของ *E. coli* โดยไม่ได้เพิ่มจำนวนเท่าของความเข้มข้น และจากสมบัติของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่มีสารองค์ประกอบเป็นสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งมีรายงานว่าสามารถเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนในนมได้ (Jakobek, 2015; Yildirim Elidikoglu & Erdem, 2017; Yuksel et al., 2010) จึงทำให้ค่าความเข้มข้นของสารลดลงต่ำกว่าค่า MBC เริ่มต้น ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลงหรือไม่เกิดการยับยั้งเลย นอกจากนั้นจากการรายงานของ Coppo และ Marchese (2014) กล่าวว่า quercetin สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดี เนื่องจากเข้าไปแย่งจับเอนไซม์ GyrB ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเซลล์ของ *E. coli* ทำให้กระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและการสร้างพลังงานภายในเซลล์ถูกยับยั้ง ซึ่งสัมพันธ์กับการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่ไม่พบ quercetin เป็นองค์ประกอบในสารสกัด



**รูปที่ 4.19** จำนวน *E. coli* ของคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสม ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน  
เมื่อ : a-c แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\leq 0.05$ )

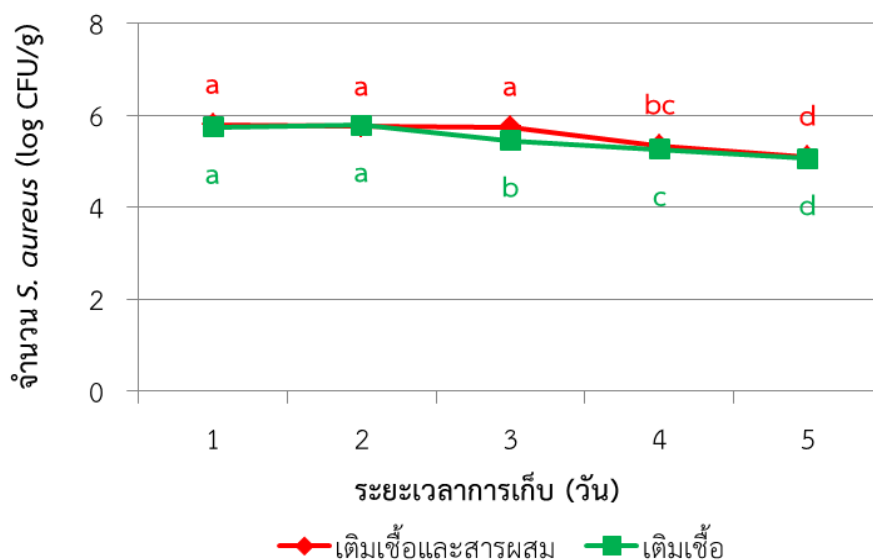
สำหรับ *S. aureus* ในคัสตาร์ดครีมที่เติมสารผสมและไม่เติมสารผสม มีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ  $5.79\pm 0.03$  และ  $5.74\pm 0.08$  log CFU/g ตามลำดับ พบว่าการเปลี่ยนแปลง

จำนวนจุลินทรีย์ในทั้งสองตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกัน ( $p>0.05$ ) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 4.20) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าสารผสมไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ในคัสตาร์ดครีม ซึ่งในการศึกษานี้เพิ่มค่า MBC ของสารสกัดและโซเดียมแลกเตต มากกว่า 60 เท่า พบว่าการใช้สารผสมไม่แสดงการยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในหลอดทดลองที่สารสกัดและโซเดียมแลกเตตสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด โดยผลจากการศึกษาดังกล่าวมีสมมติฐานในการอธิบายดังนี้

จากการเกิดปฏิกิริยาเคมีระหว่างโปรตีนและสารประกอบฟีนอลิกดังที่กล่าวมาและจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับสารประกอบฟีนอลิกกลุ่มกรดฟีนอลิก (phenolic acid) ได้แก่ gallic acid, caffeic acid และ ferulic acid เนื่องจากสารกลุ่มนี้มีความเข้มข้นสูงและประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิลจำนวนมาก ซึ่งสารกลุ่มกรดฟีนอลิกนี้มีการรายงานว่าเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในการยับยั้ง *S. aureus* โดย gallic acid และ caffeic acid สามารถยับยั้ง  $\alpha$ -hemolysin ที่เป็นสารพิษที่พบเฉพาะใน *S. aureus* ได้ โดย gallic acid มีผลต่อสมบัติการยึดเกาะ ในขณะที่ caffeic acid ทำลายเสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าไปทำลายกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ของ *S. aureus* (Luis, Silva, Sousa, Duarte, & Domingues, 2014) จากองค์ประกอบของสารสกัดที่มีกรดฟีนอลิกเป็นองค์ประกอบและจากการเกิดปฏิกิริยาของสารกับโปรตีนในนมที่เป็นส่วนประกอบหลักของคัสตาร์ดครีม จึงส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารกลุ่มนี้ที่เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญต่อ *S. aureus* ลดลง โดยสารที่เหลือจากการทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของอาหารแล้ว จะเป็นตัวที่แสดงฤทธิ์ร่วมกับโซเดียมแลกเตตในการยับยั้งจุลินทรีย์ในคัสตาร์ดครีม แต่เนื่องจากสารกลุ่มนี้ไม่ใช่สารประกอบหลักในสารสกัด แสดงว่าฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ที่ลดลงอาจจะไม่ได้มาจากสมมติฐานในข้อนี้เป็นหลัก

ปัจจัยอีกประการหนึ่งที่อาจส่งผลให้สารไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* ในคัสตาร์ดครีม อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบของคัสตาร์ดครีมที่ประกอบด้วยไข่แดง ซึ่งมี lecithin ที่เป็นลิพิด ประเภทฟอสโฟลิพิด (phospholipid) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีการรายงานว่า lecithin สามารถจับกับ protoplasmic membrane ของ *S. aureus* ได้ และมีผลต่อความสามารถในการเลือกผ่านสารและความคงทนของเซลล์แบคทีเรีย จากการศึกษานี้ของ Butler และ Randal (1955) ที่ศึกษา antagonistic effect ระหว่าง soybean lecithin กับยาต้านจุลินทรีย์ polymyxin พบว่า *S. aureus* ยังคงทนต่อ polymyxin ในขณะที่เชื้ออื่นๆ มีจำนวนลดลง เนื่องจาก lecithin เข้าไปจับกับไขมันที่เซลล์ของแบคทีเรียแล้วทำให้เซลล์มีความแข็งแรงมากยิ่งขึ้น สารต้านจุลินทรีย์จึงไม่สามารถผ่านเข้าไปยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรียได้ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์ lecithinase ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ hydrolyses lecithin ในไข่แดง สามารถกระตุ้นให้ *S. aureus* สร้าง Delta-Toxin ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษในอาหารได้ (Kapral, 1976; Sharaf, El-Sayed, & Abosaif, 2014)

จากสมมติฐานที่กล่าวมาอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้สารออกฤทธิ์สำคัญไม่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ในคัสตาร์ดครีมได้ ซึ่งบ่งชี้ว่าการใช้สารผสมในโมเดลอาหารชนิดนี้ไม่เหมาะต่อการยับยั้ง *S. aureus* เนื่องจากใช้ค่าความเข้มข้นสูงกว่า 60 เท่าของ MBC ก็ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้ง



รูปที่ 4.20 จำนวน *S. aureus* ของคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อ และคัสตาร์ดครีมที่เติมเชื้อและสารผสม ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน  
เมื่อ : a-d แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

จากผลที่ได้จากการศึกษาทางจุลินทรีย์แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดจากเปลือกแก้วมังกร แดงร่วมกับโซเดียมแล็กเตทมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. Typhimurium* ได้มากกว่า 2 log CFU/g (เมื่อเทียบจำนวนจุลินทรีย์จากวันที่ 0 ถึงวันที่ 7) ในขณะที่ *S. aureus* และ *E. coli* ไม่เห็นความแตกต่าง เนื่องจากอาจเกิดปฏิกิริยาทางเคมีระหว่างสารประกอบฟีนอลิกกับองค์ประกอบของคัสตาร์ดครีม จึงทำให้ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์สำคัญลดลงและไม่แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งสองสายพันธุ์ รวมถึงองค์ประกอบของคัสตาร์ดครีมอาจส่งผลต่อสมบัติของเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งทำให้สมบัติการต้านสารของเซลล์เปลี่ยนไป ในการศึกษาต่อไป ถ้าต้องการให้สารออกฤทธิ์ครอบคลุมทุกเชื้อที่ทดสอบควรเพิ่มความเข้มข้นของสารผสมให้สูงขึ้นเป็นค่า 10 เท่าของ MBC (Holzapfel, 2002; Leroy & De Vuyst, 2004) เพื่อให้สารส่วนหนึ่งไปทำปฏิกิริยามากพอกับอาหาร และเหลือสารที่สำคัญที่ออกฤทธิ์มากพอในการยับยั้งจุลินทรีย์

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิธีการสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บในรูปสารละลายเข้มข้น โดยการเปรียบเทียบอัตราส่วนของตัวทำละลายผสมระหว่างเอทานอลและน้ำ พบว่าอัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร สามารถสกัดสารเบต้าไซยานิน ( $145.21 \pm 1.10$  mg/100 mL) และให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกได้สูงที่สุด ( $281.68 \pm 2.15$  mgGAE/100 g dry wt.) เมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP เท่ากับ  $53.77 \pm 0.48\%$  (ให้ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ) และ  $29.98 \pm 0.63$  mM FeSO<sub>4</sub>/100 g dry wt. ตามลำดับ

เมื่อนำเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บมาสกัดด้วยเอทานอลและน้ำ ที่อัตราส่วน 50:50 โดยปริมาตร แล้วนำสารสกัดเข้มข้นที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งให้อยู่ในรูปของผงแห้ง และนำมาศึกษาสมบัติของสารสกัด โดยมีปริมาณเบต้าไซยานิน เท่ากับ  $53.80 \pm 1.15$  mg/100 g dry wt., สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด  $387.67 \pm 26.74$  mgGAE/100 g dry wt. และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP  $19.92 \pm 0.25$  mg/mL (IC<sub>50</sub>) และ  $2290.90 \pm 3.04$  μM FeSO<sub>4</sub>/100 g dry wt. ตามลำดับ มีองค์ประกอบทางเคมีประกอบด้วย betacyanin, gallic acid, caffeic acid, ferulic acid, rutin และ pyrogallol มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรครามาตรฐาน ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium* และ *Escherichia coli* ที่ความเข้มข้นของสารสกัด 5 mg/mL มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของฤทธิ์ยับยั้งอยู่ในช่วง  $10.72 \pm 0.25$ - $21.06 \pm 0.14$  mm และมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 7.81-15.63 mg/mL และ 15.63-250 mg/mL ตามลำดับ โดยสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด

เมื่อประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของโซเดียมแล็กเทต พบว่ามีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 1.88-7.5% และ 7.5- มากกว่า 30% ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแล็กเทต พบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์เสริมกัน โดยสารผสมแสดงค่า MIC และ MBC ลดลงจากความเข้มข้นเดิมมากกว่าร้อยละ 50 สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก (*S. aureus* และ *B. cereus*) ได้ดีกว่าแกรมลบ (*S. Typhimurium* และ *E. coli*) และยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด และเลือกใช้อัตราส่วนของสารสกัดต่อโซเดียมแล็กเทตที่เป็นค่า MBC ของ *E. coli* เท่ากับ 6.25:1 ในการประยุกต์ใช้ในคัสตาร์ดครีม

จากการศึกษาผลของการเติมสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแล็กเทต (6.25% และ 1%) ต่อสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 7 วัน พบว่า คัสตาร์ดครีมมีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ มีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงน้อยกว่า คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุม และไม่เกิดการขับน้ำออกจากผลิตภัณฑ์เมื่อเก็บรักษา 7 วัน ที่อุณหภูมิ

4 °C ในขณะที่คัสตาร์ดครีมตัวอย่างควบคุมเกิดการแข็งตัวของเนื้อครีมและเกิดการขับน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ตั้งแต่วันที่ 3 การเติมสารสกัดร่วมกับโซเดียมแลกเตตจึงสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาทางกายภาพและเคมีของคัสตาร์ดครีมได้มากกว่า 7 วัน ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เมื่อพิจารณาการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เติมลงไปในคัสตาร์ดครีม พบว่าสามารถลดจำนวน *B. cereus* และ *S. Typhimurium* ได้มากกว่า 2 log CFU/g ตามลำดับ แต่ไม่สามารถลดจำนวน *S. aureus* และ *E. coli* ได้ เนื่องจากผลขององค์ประกอบอาหารในการเกิดปฏิกิริยากับสารออกฤทธิ์สำคัญในสารผสม จากการพิจารณาสมบัติที่ได้จากการศึกษาพบว่าการใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตสามารถนำมาประยุกต์ในคัสตาร์ดครีมได้ โดยสามารถยืดอายุการเสื่อมเสียทางกายภาพและเคมีได้ รวมถึงลดอันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหาร (*S. Typhimurium* และ *B. cereus*) ได้ ซึ่งทำให้คัสตาร์ดครีมมีความปลอดภัย

#### ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดงส่วนมีโซคาร์บสามารถใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านจุลินทรีย์ได้ดี รวมถึงใช้เป็นสารให้สีในอุตสาหกรรมอาหารได้ โดยการนำสารผสมมาใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารแล้ว ยังสามารถใช้ประโยชน์จากสมบัติเชิงหน้าที่ในการเป็นสารให้สีที่เหมาะสมและสารควบคุมความเป็นกรด-ต่างได้นอกจากนั้นจากการศึกษาที่พบว่าการใช้สารผสมไม่สามารถลดจำนวน *S. aureus* ในคัสตาร์ดครีมได้ ซึ่งผลดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสมบัติของสารให้ออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ต่อเชื้อดังกล่าวได้ ยกตัวอย่างเช่น การประเมินสารเสริมฤทธิ์ชนิดอื่นๆ ที่สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบ หรือการนำสารผสมไปใช้ในผลิตภัณฑ์อื่นๆ โดยจะต้องไม่เกิดปฏิกิริยากับองค์ประกอบของอาหาร หรือมีผลต่อโครงสร้างของจุลินทรีย์ เป็นต้น และที่สำคัญจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงร่วมกับโซเดียมแลกเตตลงในอาหารได้จริง ซึ่งสามารถใช้ผลการศึกษาเป็นแนวทางในการใช้สารสกัดจากธรรมชาติหรือวัตถุเจือปนอาหารชนิดอื่นๆ ที่มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายกัน ในอาหารที่มีส่วนประกอบจากนมหรืออาหารที่มีส่วนประกอบคล้ายกันต่อไปได้

รายการอ้างอิง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**



## รายการอ้างอิง

- กมลลักษณ์ มาสำโรง และ วรพจน์ สุนทรสุข. (2557). ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและต้านแบคทีเรียของสารสกัดเปลือกแก้วมังกร. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 45(2), 269-272.
- กรรณิการ์ สอนโยธา. (2552). ผลของการใช้เอนไซม์ต่อสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปลือกและเนื้อแก้วมังกรพันธุ์เนื้อสีแดง *Hyrocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คณินนิตย์ ธรรมวงษ์. (2549). การสกัดเบต้าไซยานินจากเปลือกแก้วมังกรเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง. *สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง*.
- ทัตดาว ภาชีผล. (2557). ปีตาเลน: การสกัดและการวิเคราะห์. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 42(4), 718-729.
- นวัตกรรมทำแล้วรวย. (2561). *เบต้า มิลค์ นมพร้อมไขมันรสสารสกัดเปลือกแก้วมังกร* [ออนไลน์]. สืบค้นจาก <https://cheechongruay.smartsme.co.th/content/22094> [25 พฤษภาคม 2561].
- นิธิยา รัตนานพนธ์ และ พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2553). Salmonella/ซาลโมเนลลา [ออนไลน์]. สืบค้นจาก <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1123/salmonella> [24 พฤษภาคม 2561].
- บุหรีน พันธุ์สุวรรณค์. (2556). อนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 21(3), 276-686.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. (2556). *มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ฉบับที่ 364* [ออนไลน์]. สืบค้นจาก [http://food.fda.moph.go.th/data/tradermain/Manual\\_of\\_Law\\_364\\_\(Update30-6-16\).pdf](http://food.fda.moph.go.th/data/tradermain/Manual_of_Law_364_(Update30-6-16).pdf) [10 ธันวาคม 2559].
- ประกาศสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2548). *ข้อกำหนดการใช้วัตถุเจือปนอาหาร* [ออนไลน์]. สืบค้นจาก <http://food.fda.moph.go.th/data/news/2556/560902/Update%20Food%20Additives.pdf> [15 ธันวาคม 2559].
- มณฑนา วีระวัฒนากร. (2556). ปฏิกริยาเคมีระหว่างโปรตีนและพอลิฟีนอลและผลต่อระบบชีวภาพของปฏิกริยา. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 18(1), 210-218.
- ภขมน พิษญาจิตติพงษ์. (2556). *การผลิตและสมบัติทางชีวภาพของสีผสมอาหารจากเปลือกแก้วมังกรพันธุ์เนื้อผลสีแดง (Hylocereus polyrhizus)*. วิทยานิพนธ์ปริญญา มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

- สุรพงษ์ โกสิยะจินดา. (2545). *แก้วมังกร พืชเศรษฐกิจ* [ออนไลน์]. สืบค้นจาก [kanchanapisek.or.th/kp6/Ebook/BOOK38/pdf/book38\\_4.pdf](http://kanchanapisek.or.th/kp6/Ebook/BOOK38/pdf/book38_4.pdf) [15 ธันวาคม 2559].
- อรุษา เขาวนลิขิต, ประเสริฐ เตชชีวพงศ์ และ ปริญญา ตั้งเจริญกิจ (2553). ความคงตัวของเบต้าไซยนินจากเปลือกแก้วมังกร. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 41(3), 409-412.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทนา บุญยรัตน์ และ มาลีรัตน์ อัดดีสินทอง. (2549). *สารต้านอนุมูลอิสระ*. กรุงเทพมหานคร, พี.เอส.ปริ้นท์, 190 หน้า.
- Ait Dra, L., Ait Sidi Brahim, M., Boualy, B., Aghraz, A., Barakate, M., Oubaassine, S., Markouka, M., & Larhsini, M. (2017). Chemical composition, antioxidant and evidence antimicrobial synergistic effects of *Periploca laevigata* essential oil with conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products*, 109, 746-752.
- Al-Kadamany, E., Khattar, M., Haddad, T., & Toufeili, I. (2003). Estimation of shelflife of concentrated yogurt by monitoring selected microbiological and physicochemical changes during storage. *LWT - Food Science and Technology*, 36(4), 407-414.
- Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi, K., & Saito, T. (2008). Microbial community analysis of food-spoilage bacteria in commercial custard creams using culture-dependent and independent methods. *Journal of Dairy Science*, 91, 2938-2946.
- Arakawa, K., Kawai, Y., Iioka, H., Tanioka, M., Nishimura, J., Kitazawa, H., Tsurumi, K., & Saito, T. (2009). Effects of gassericins A and T, bacteriocins produced by *Lactobacillus gasserii*, with glycine on custard cream preservation. *Journal of Dairy Science*, 92(6), 2365-2372.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). (1999). *Official methods of analysis* (16 Ed.). Washington.
- Azeredo Henriette, M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(12), 2365-2376.
- Bauer media group. (2014). *Puff tart and pastry*: Minna. Bangkok

- Bennett, S. D., Walsh, K. A., & Gould, L. H. (2013). Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clinical Infectious Diseases*, 57(3), 425-433.
- Bingol, E. B., & Bostan, K. (2007). Effect of sodium lactate on the microbiological quality and shelf life of sausages. *Research Article*, 31(5), 333-339.
- Bingol, E. B., Cetin, O., Colak, H., & Hampikyan, H. (2013). Effects of sodium lactate on the presence of *Staphylococcus aureus* and enterotoxins in cig kofte (raw meatball). *Research Article*, 37, 719-726.
- Bollenbach, T. (2015). Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. *Current Opinion in Microbiology*, 27, 1-9.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 28.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature reviews. Microbiology*, 13(10), 620-630.
- Cabezas-Pizarro, J., Redondo-Solano, M., Umana-Gamboa, C., & Arias-Echandi, M. L. (2018). Antimicrobial activity of different sodium and potassium salts of carboxylic acid against some common foodborne pathogens and spoilage associated bacteria. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 56-61.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (1998). Colorant properties and stability of *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(11), 4491-4495.
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (2003). Antioxidant activity of betalains from plants of the *Amaranthaceae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2288-2294.
- Choi, M.-R., Jeong, S.-G., Liu, Q., Ban, G.-H., Lee, S.-Y., Park, J.-W., & Kang, D.-H. (2015). Effect of thiamine dilaurylsulfate against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* spores in custard cream. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 320-324.

- Codex Alimentarius Commission. (2016). Food additive details, Sodium lactate (325) (online). Retrieved 3 January 2017, from <http://www.fao.org/gsfonline/additives/details.html?id=84>
- Coppo, E., & Marchese, A. (2014). *Antibacterial Activity of Polyphenols* (Vol. 15).
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777.
- Cuevas-Valenzuela, J., Gonzalez-Rojas, A., Wisniak, J., Apelblat, A., & Perez-Correa, J. R. (2014). Solubility of (+)-catechin in water and water-ethanol mixtures within the temperature range 277.6–331.2K: Fundamental data to design polyphenol extraction processes. *Fluid Phase Equilibria*, 382, 279-285.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Davidson, P., Critzer, F., & Taylor, T. (2012). *Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods* (Vol. 4).
- Davidson, P., & Zivanovic, S. (2003). *The use of natural antimicrobials*.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A. R., & Paredes-Lopez, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173-289.
- E Newton, A., J Fairbanks, A., Golding, M., Andrewes, P., & Gerrard, J. (2012). *The role of the Maillard reaction in the formation of flavour compounds in dairy products - Not only a deleterious reaction but also a rich source of flavour compounds* (Vol. 3).
- Esquivel, P. (2016). 4 - Betalains *handbook on natural pigments in food and beverages* (pp. 81-99): Woodhead Publishing.
- Faridah, A., Holinesti, R., & Syukri, D. (2015). Betalains from red pitaya peel (*Hylocereus polyrhizus*): extraction, spectrophotometric and HPLC-DAD identification, *Bioactivity and Toxicity Screening* (Vol. 14).

- Fathordoobady, F., Mirhosseini, H., Selamat, J., & Manap, M. Y. A. (2016). Effect of solvent type and ratio on betacyanins and antioxidant activity of extracts from *Hylocereus polyrhizus* flesh and peel by supercritical fluid extraction and solvent extraction. *Food Chemistry*, 202, 70-80.
- Freeman. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *Plant Pathology and Microbiology*, 149, 1-12.
- Fukumoto, L. R., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W.-S. (2017). The effect of pH treatment and refrigerated storage on natural colourant preparations (betacyanins) from red pitahaya and their potential application in yoghurt. *LWT*, 80, 437-445.
- Gengatharan, A., Dykes Gary, A., & Choo Wee, S. (2015). Stability of betacyanin from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and its potential application as a natural colourant in milk. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(2), 427-434.
- Harris, N. N., Javellana, J., Davies, K. M., Lewis, D. H., Jameson, P. E., Deroles, S. C., Calcott, K. E., Gould, K. S., & Schwinn, K. E. (2012). Betalain production is possible in anthocyanin-producing plant species given the presence of DOPA-dioxygenase and L-DOPA. *BMC Plant Biology*, 12(1), 34.
- Hatlestad, G. J., Sunnadeniya, R. M., Akhavan, N. A., Gonzalez, A., Goldman, I. L., McGrath, J. M., & Lloyd, A. M. (2012). The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nature Genetics*, 44, 816.
- Herbach, K. M., Rohe, M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Structural and chromatic stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton & Rose) betacyanins as affected by the juice matrix and selected additives. *Food Research International*, 39(6), 667-677.
- Hilliard, J., M Krause, H., I Bernstein, J., Fernandez, J., Nguyen, V., Ohemeng, K., & F Barrett, J. (1995). *A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA Gyrase* (Vol. 390).

- Holzappel, W. H. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75(3), 197-212.
- Houtsma, P. C., de Wit, J. C., & Rombouts, F. M. (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.
- Houtsma, P. C., Wit de , J. C., & Rombouts, F. M. (1996). Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate and sodium chloride for spoilage organisms and pathogens at different pH values and temperatures. *Journal of Food Protection*, 59(12), 1300-1304.
- Ines 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* 3(1). 272-281
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567.
- Jay., J. M., Loessner., M. J., & Golden., D. A. (2005). *Modern Food Microbiology*. Springer Science+Business Media Inc: New York.
- Kapral, F. A. (1976). Effect of fatty acids on *Staphylococcus aureus* delta-toxin hemolytic activity. *Infection and Immunity*, 13(1), 114-119.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Oskoueian, A., & Jaafar, H. Z. (2012). Phenolic compounds characterization and biological activities of *Citrus aurantium* Bloom. *Molecules*, 17, 1203-1218.
- Kim, B.-Y., Lee, J.-Y., & Ha, S.-D. (2011). Growth characteristics and development of a predictive model for *Bacillus cereus* in fresh wet noodles with added ethanol and thiamine. *Journal of Food Protection*, 74(4), 658-664.
- Kim, H., Choi, H.-K., Yong Moon, J., Kim, Y.-S., Mosaddik, A., & Cho, S. (2010). Comparative antioxidant and antiproliferative activities of red and white pitayas and their correlation with flavonoid and polyphenol content. *Journal of Food Science*, 76, 38-45.

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. E. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453-462.
- Langer, A. J., Ayers, T., Grass, J., Lynch, M., Angulo, F. J., & Mahon, B. E. (2012). Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws—United States, 1993–2006. *Emerging Infectious Diseases*, 18(3), 385-391.
- 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.
- Lorian, V. (1996). *Antibiotics in laboratory medicine* (Philadelphia: Baltimore & M. W. a. Wilkins. Eds. 4th ed.).
- Luis, A., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., & Domingues, F. (2014). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, 30(1), 69-79.
- Luo, H., Cai, Y., Peng, Z., Liu, T., & Yang, S. (2014). Chemical composition and in vitro evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel. *Chemistry Central Journal*, 8, 1-1.
- M. Herbach, K., C. Stintzing, F., & Carle, R. (2004). Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya [*Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose] monitored by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric analyses. *European Food Research and Technology*, 219(4), 377-385.
- Malviya, R. (2011). *Extraction characterization and evaluation of selected mucilage as pharmaceutical excipient* (Vol. 41).
- Matu, E. N., & van Staden, J. (2003). Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 35-41.
- Mehta, S. K., & Gowder, S. J. T. (2015). *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*.

- Moreno, D. A., Garcia-Viguera, C., Gil, J. I., & Gil-Izquierdo, A. (2008). Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 261-280.
- Nanasombat, S. (2009). Control of pathogenic bacteria in raw pork using organic acid salts in combination with freezing and thawing. *Journal of Agricultural Science*, 43(3), 576-583.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1998). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eighth informational supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards document M100-S9*. Wayne, PA (USA): National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1999). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighth Informational Supplement. National Committee for Clinical Laboratory Standards document M100-S9*. Wayne, PA (USA): National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Nurliyana, R., Syed Zahir, I., Mustapha Suleiman, K., Aisyah, M. R., & Kamarudin, K. R. (2010). Antioxidant study of pulps and peels of dragon fruits: A comparative study. *International Food Research Journal*, 17, 367-375.
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M., & Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(2), 115-129.
- Phongtongpasuk, S., Poadang, S., & Yongvanich, N. (2016). Environmental-friendly method for synthesis of silver nanoparticles from dragon fruit peel extract and their antibacterial activities. *Energy Procedia*, 89, 239-247.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., & Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(2), 530-536.
- Prevention, C. f. D. C. a. (2011). Diarrheagenic E. coli (non shigatoxin producing E. coli). Retrieved 1 June 2018, from [http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/diarrheagenic\\_ecoli/technical.html](http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/diarrheagenic_ecoli/technical.html).



- Progress in Biophysics and Biophysical Chemistry*. (1995). (J. A. V. Butler & J. T. Randall Eds. 1st ed.).
- Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12.
- Sallam, K. I., & Samejima, K. (2004). Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *LWT - Food Science and Technology*, 37(8), 865-871.
- Scherrer, R., & Gerhardt, P. (1971). Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology*, 107(3), 718-735.
- Seuvre, A. M., Turci, C., & Voilley, A. (2008). Effect of the temperature on the release of aroma compounds and on the rheological behaviour of model dairy custard. *Food Chemistry*, 108(4), 1176-1182.
- Shaikh, M., Mohsin Ali, T., & Hasnain, A. (2017). Utilization of chemically modified pearl millet starches in preparation of custards with improved cold storage stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 360-366.
- Sharaf, E. F., El-Sayed, W. S., & Abosaif, R. M. (2014). Lecithinase producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. *Journal of Taibah University for Science*, 8(3), 207-215.
- Shelef, L. A. (1994). Antimicrobial effects of lactates: A Review. *Journal of Food Protection*, 57(5), 445-450.
- Son, S., & Lewis, B. A. (2002). Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 468-472.
- Stintzing, F. C., & Carle, R. (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15(1), 19-38.

- Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2002). Betacyanins in fruits from red-purple pitaya, *Hylocereus polyrhizus* (Weber) Britton & Rose. *Food Chemistry*, 77(1), 101-106.
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247-269.
- Stratford, M. (2000). *Traditional preservatives organic acids* (C. A. Batt & M.-L. Tortorello Eds. 2 ed.). Encyclopedia of Food Microbiology: Academic Press, New York.
- Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2006). A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3(3), 117-124.
- Tenore, G. C., Novellino, E., & Basile, A. (2012). Nutraceutical potential and antioxidant benefits of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) extracts. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 129-136.
- The United States Food and Drug Administration. (2014). Food Additive Status List (online). Retrieved 3 January 2017, from <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm0.html>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- Voysey, P. V. (2011). Microbial update in bakery product. *International Food Hygiene*, 22(1).
- Waterhouse, A. L. (2002). *Determination of total phenolics* (R. E. Wrolstad Ed.). New York: John Wiley and Sons.
- West, P. A. (1983). Microbiology: An Introduction. Gerard J. Tortora , Berdell R. Funke , Christine L. Case. *The Quarterly Review of Biology*, 58(2), 255-256.
- Wit de, J. C., & Rombouts, F. M. (1990). Antimicrobial activity of sodium lactate. *Food Microbiology*, 7(2), 113-120.
- Wong, H. C., Chang, M. H., & Fan, J. Y. (1988). Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(3), 699-702.

- Wong, Y.-M., & Siow, L.-F. (2015). Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) juice and concentrate as models. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 3086-3092.
- Wu, L.-c., Hsu, H.-W., Chen, Y.-C., Chiu, C.-C., Lin, Y.-I., & Ho, J.-a. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95(2), 319-327.
- Wybraniec, S., & Mizrahi, Y. (2005). Generation of decarboxylated and dehydrogenated betacyanins in thermally treated purified fruit extract from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) monitored by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6704-6712.
- Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., & Liu, L. (2017). Antibacterial activity of polyphenols: Structure-activity relationship and influence of hyperglycemic condition. *Molecules*, 22(11).
- Yıldırım Elikoglu, S., & Erdem, Y. K. (2017). Interactions between milk proteins and polyphenols: Binding mechanisms, related changes and the future trends in dairy industry. *Journal Food Reviews International*.
- Yong, Y. Y., Dykes, G., Lee, S. M., & Choo, W. S. (2018). Effect of refrigerated storage on betacyanin composition, antibacterial activity of red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and cytotoxicity evaluation of betacyanin rich extract on normal human cell lines. *LWT- Food Science and Technology*, 91, 491-497.
- Yuksel, Z., Avci, E., & Erdem, Y. K. (2010). Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chemistry*, 121(2), 450-456.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

**ภาคผนวก ก**  
**วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ**

**ก.1 การวิเคราะห์ค่าสี**

เครื่องมือ เครื่อง Chroma meter (Model CR-400 series, Minolta, Japan) ระบบ CIE LAB

วิธีวิเคราะห์

1. ปรับมาตรฐานเครื่องวัดสี
2. วัดสีตัวอย่าง และบันทึกค่า  $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$   
โดย ค่า  $L^*$  แสดงถึง ค่าความสว่าง (lightness) มีค่าตั้งแต่ 0-100  
ค่า  $a^*$  แสดงถึง ค่าสีแดงและเขียว (redness/greenness)  
ค่า  $b^*$  แสดงถึง ค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน (yellowness/blueness)
3. คำนวณค่าความต่างสี ( $\Delta E^*$ ), hue angle ( $h^\circ$ ) และ Chroma ( $C^*$ ) ดังสมการ

ในการคำนวณค่า  $\Delta E^*$  สามารถคำนวณได้ดังสมการ (ก.1.1)

$$\Delta E^* = [(L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2]^{1/2} \quad (\text{ก.1.1})$$

ในการคำนวณค่า  $h^\circ$  สามารถคำนวณได้ดังสมการ (ก.1.2)

$$h^\circ = \arctan (b^*/a^*) \quad (\text{ก.1.2})$$

ในการคำนวณค่า  $C^*$  สามารถคำนวณได้ดังสมการ (ก.1.3)

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{1/2} \quad (\text{ก.1.3})$$

**ก.2 การหาปริมาณความชื้น**

เครื่องมือ Hot air oven ตามวิธีของ AOAC, 1999

วิธีวิเคราะห์

1. อบอุ่นสำหรับใส่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ทิ้งภาชนะให้เย็นในโถดูดความชื้น (ไม่เกิน 2 ชั่วโมง) แล้วบันทึกค่าน้ำหนักที่แน่นอน 4 ตำแหน่ง
3. ชั่งตัวอย่าง 2 g ใส่ลงในภาชนะ แล้วบันทึกค่าน้ำหนักที่แน่นอน 4 ตำแหน่ง
4. นำภาชนะที่บรรจุตัวอย่างไปอบใน Hot air oven ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
5. ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น (ไม่เกิน 2 ชั่วโมง) แล้วบันทึกค่าน้ำหนักที่แน่นอน 4 ตำแหน่ง
6. หาปริมาณความชื้นได้จากสมการ

$$\% \text{ Moisture content} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักหลังอบ}}{\text{น้ำหนักก่อนอบ} - \text{น้ำหนักถั่ว}} \times 100$$

$$\% \text{ วัตถุแห้ง (Dry matter, DM)} = 100 - (\% \text{ Moisture content})$$

### ก.3 การวัดปริมาณน้ำอิสระ ( $a_w$ )

เครื่องมือ เครื่องวัด Water activity (AQUA Lab)

วิธีวิเคราะห์

1. ทำการ Calibrate เครื่องโดยใช้ผงถ่านเป็นสารละลายมาตรฐาน
2. ใส่ตัวอย่างประมาณ 2-3 g ในถั่วตัวอย่าง แล้วเกลี่ยให้กระจาย
3. นำถั่วตัวอย่างใส่เครื่องวัดค่า และรอหน้าจอแสดงผลค่า  $a_w$  ที่ 25 °C บันทึกค่าที่วัดได้

### ก.4 การวัดลักษณะทางเนื้อสัมผัส

ดัดแปลงจากวิธีของ Shaikh และคณะ (2017)

เครื่องมือ Texture analyser (iCON รุ่น TA.XT2i, USA)

อุปกรณ์ ½” Stainless Cylinder รหัสหัววัด P/0.5 (รูปที่ ก.4.1)



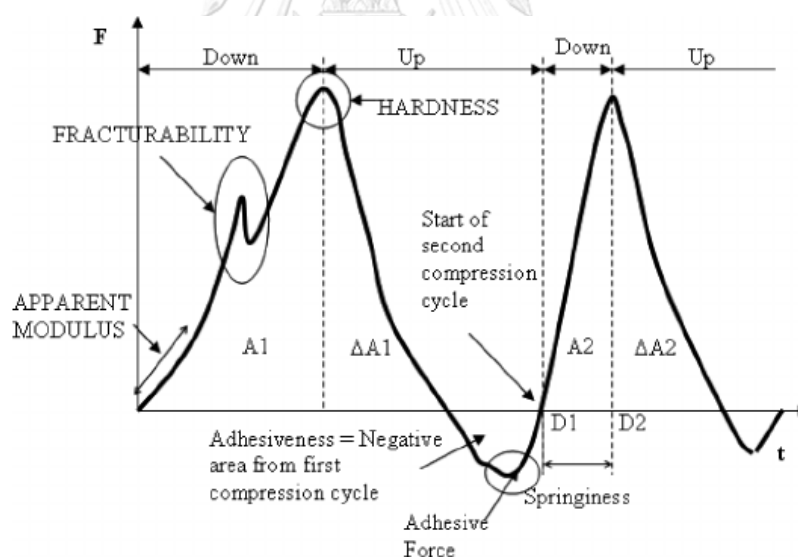
รูปที่ ก.4.1 หัววัดรหัส P/0.5

วิธีวิเคราะห์

1. ติดตั้งเครื่องคอมพิวเตอร์เข้ากับเครื่องวัดเนื้อสัมผัส
2. ประกอบหัววัด P/0.5 เข้ากับเครื่องวัดลักษณะทางเนื้อสัมผัส
3. ทำการ Calibrate force
4. เลือกรูปแบบการวิเคราะห์ ดังตาราง

Texture profile analysis: TPA	
Test speed	5 mm/s
Post-test speed	10 mm/s
Target mode	Strain
- Strain	70%
- Time	5 s
Trigger type	Button
Tare mode	Auto

- วางตัวอย่างลงบนบนแท่นวาง แล้วกด Run a test
- วิเคราะห์ค่าเนื้อสัมผัสจากกราฟ TPA ได้แก่ ความแข็ง (hardness) การเกาะติดผิว (adhesiveness) การรวมตัวกัน (cohesiveness) ความยืดหยุ่น (springiness index) และความเหนียวหนึบ (gumminess) ดังรูปที่ ก.4.2



รูปที่ ก.4.2 Texture profile

ที่มา : Szczesniak (2002)

**ภาคผนวก ข**  
**วิธีวิเคราะห์ทางเคมี**

**ข.1 การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) AOAC**

เครื่องมือ เครื่อง pH meter (Mettler toledo, Switzerland)

วิธีวิเคราะห์

1. ปรับเทียบมาตรฐานเครื่อง pH meter ด้วยบัฟเฟอร์ pH 4 และ 7
2. ชั่งตัวอย่างคัสตาร์ดครีม 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่น 45 mL ลงไปผสม
3. ตบด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 60 วินาที
4. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
5. นำส่วนใสมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้เครื่อง pH meter อ่านค่าและบันทึกผล

**ข.2 การวัดปริมาณกรดที่มีอยู่ทั้งหมดภายในอาหาร (Titratable acidity : TA) : AOAC 2000**

- สารเคมี
1. 0.1% Phenolphthalein
  2. 0.1 N Sodium hydroxide (NaOH)

วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างคัสตาร์ดครีม 5 g แล้วเติมน้ำกลั่น 25 mL ลงไปผสม
2. ปั่นผสมกัน โดยใช้เครื่อง Vortex mixer เป็นเวลา 1 นาที
3. เทตัวอย่างที่ปั่นผสมแล้วลงขวดชมพูขนาด 125 mL
4. หยด 0.1% Phenolphthalein ลงไป 2-3 หยด แล้วเขย่าให้เข้ากัน
5. ไทเทรตตัวอย่างด้วย 0.1 N NaOH จนถึงจุดยุติ (เมื่อตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีชมพู และเมื่อตั้งทิ้งไว้ 30 วินาที ต้องไม่เปลี่ยนสี)
6. บันทึกปริมาณ 0.1 N NaOH ที่ใช้ไป แล้วคำนวณ % Titratable acidity ดังสมการ

$$\% \text{ Titratable acidity} = \frac{N \times V \times \text{meq.wt}}{V_c} \times 100$$

เมื่อ	N	แทนค่า ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH
	V	แทนค่า ปริมาณของสารละลาย NaOH ที่ใช้ไป (mL)
	Meg.wt	แทนค่า mill equivalent weight ของกรดแลคติก (0.09)
	V <sub>c</sub>	แทนค่า ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้



### ข.3 การหาปริมาณน้ำที่แยกตัวออกจากตัวอย่าง (%syneresis)

ดัดแปลงจากวิธีของ Shaikh และคณะ (2017)

#### วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างคัสตาร์ดครีม 5 g ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 15 mL
2. นำมาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 6,300 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที
3. บันทึกส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง และคำนวณ %syneresis ตามสมการที่ ข.3

$$\% \text{ Syneresis} = \frac{\text{น้ำหนักของส่วนใส (g)}}{\text{น้ำหนักคัสตาร์ดครีม (g)}} \times 100 \quad (\text{ข.3})$$

### ข.4 ปริมาณเบต้าไซยานิน (betacyanin content)

อ้างอิงจาก Stintzing และคณะ (2002) โดยวิธีวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer โดยใช้ความยาวคลื่น 538 nm และคำนวณปริมาณเบต้าไซยานินทั้งหมดจากสูตร (ข.4) ดังนี้

$$\text{Total betacyanins content (mg/100 ml)} = A \times (\text{MW}) \times V \times \text{DF} \times \frac{100}{\text{€}} \quad (\text{ข.4})$$

เมื่อ	A	แทนค่า ค่าการดูดกลืนแสงที่มากที่สุด (ความยาวคลื่น = 538)
	MW	แทนค่า น้ำหนักโมลโมเลกุลของเบต้าไซยานิน (550 g/mol)
	V	แทนค่า ปริมาตรของสารสกัด
	DF	แทนค่า dilution fraction
	€	แทนค่า ค่าเฉลี่ยมวล (โมลาร์) ของการดูดกลืนแสง (60,000 mol/L <sup>-1</sup> cm)
	L	แทนค่า path length (1 cm)

### ข.5 ปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic compounds)

วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetry ตามวิธีของ Waterhouse (2002)

#### สารเคมี

- Folin-Ciocalteu's phenol reagent
- Gallic acid
- Sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

### การเตรียมสาร

1. 10% Folin : นำ Folin reagent 1 mL เจือจางด้วย DI water 10 mL
2. 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  : ชั่ง  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 ml
3. สารละลายมาตรฐาน Gallic acid
4. เตรียม Gallic acid ความเข้มข้น 50 mg/100 mL โดยชั่ง Gallic acid 0.0125 g ละลายด้วย DI water แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 mL เจือจางสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (เตรียม 5 mL) ดังตาราง

Conc. mg/100 mL	Stock solution (mL)	DI water (mL)
5	0.5	4.5
10	1	4
15	1.5	3.5
20	2	3
25	2.5	2.5
30	3	2

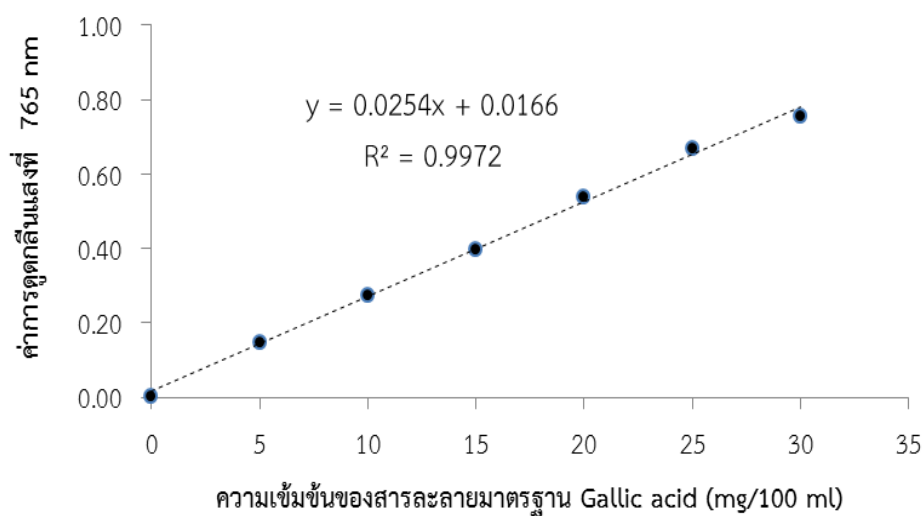
5. สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง : นำสารสกัดมาเจือจางด้วย DI water ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/mL

### วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ ที่ความยาวคลื่น 765 nm (ใช้ DI water เป็น Blank)

1. ผสมสารละลาย 10% Folin-Ciocalteu phenol reagent 400  $\mu\text{L}$  กับสารละลายมาตรฐาน Gallic acid หรือสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง 200  $\mu\text{L}$
2. เติม DI water ลงไป จนครบ 4.6 mL (เติม DI water 4 mL) แล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
3. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ลงไป 1 mL
4. ตั้งทิ้งไว้ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm รายงานผลเป็น (mgGAE/100 g)

ผลของกราฟมาตรฐานที่ได้



รูปที่ ข.5 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ข.6 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity

ดัดแปลงตามวิธีของ Brand-Williams และคณะ (1995)

สารเคมี

- Absolute Ethanol 99.9%
- DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
- Ascorbic acid

การเตรียมสาร

1. 80% Ethanol
2. 0.1 mM DPPH : ชั่ง DPPH อย่างละเอียด 0.004 g ละลายด้วย Absolute Ethanol 99.9% เล็กน้อย แล้วใช้ 80%Ethanol ปรับปริมาตรครบ 100 mL
3. สารละลายมาตรฐาน Ascorbic acid
4. เตรียม Ascorbic acid ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยชั่ง Ascorbic acid 0.005 g ละลายด้วย 80%Ethanol แล้วปรับปริมาตรเป็น 5 mL แล้วเจือจางสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ (เตรียม 1 mL) ดังตาราง

Conc. mg/mL	Stock solution (mL)	DI water (mL)
0.05	0.05	0.95
0.10	0.10	0.90
0.15	0.15	0.85
0.20	0.20	0.80
0.25	0.25	0.75
0.30	0.30	0.70
0.35	0.35	0.65

5. สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง : นำสารสกัดมาเจือจางด้วย DI water ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/mL

#### วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ ที่ความยาวคลื่น 515 nm

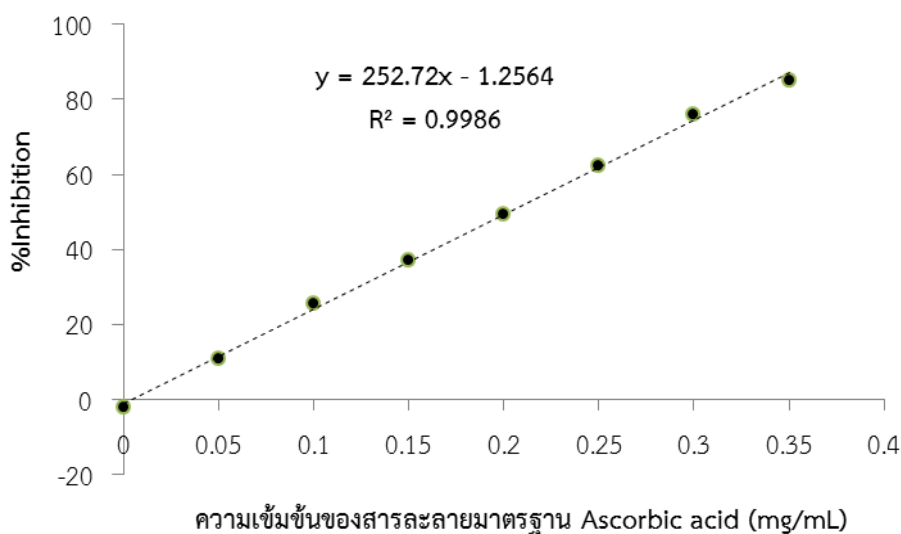
- Blank : 80% Ethanol
  - $A_{\text{Control}}$  : DPPH solution (ไม่มีตัวอย่าง) = 3.9 DPPH + 0.1 mL 80% EtOH
1.  $A_{\text{test}}$  : นำสารสกัด 0.1 mL ผสมกับ 3.9 mL 0.1 mM DPPH, ผสมด้วย Vortex 20 วินาที
  2. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
  3. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm
  4. คำนวณค่า Inhibition (%) of DPPH absorbance ตามสมการ

$$\text{Inhibition (\% of DPPH absorbance)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{test}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

เมื่อ  $A_{\text{Control}}$  : ค่าดูดกลืนแสงของ control (DPPH)

$A_{\text{test}}$  : ค่าดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง

ผลของกราฟมาตรฐานที่ได้



รูปที่ ข.6 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี DPPH

ข.7 ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ดัดแปลงตามวิธีของ Fathordoobady และคณะ (2016)

สารเคมี

- Hydrochloric acid : HCl
- Iron (III) Chloride hexahydrate :  $\text{FeCl}_3$
- 2,4,6-TRIS (2-PYRIDYL)-S-TRIAZINE : TPTZ
- Sodium acetate hydrate :  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- Acetic acid
- Ferrous sulfate :  $\text{FeSO}_4$

การเตรียมสาร

1. 40 mM HCl : ใช้ HCl 7.8 mL ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL แล้วปิเปตสารที่ได้มา 4 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL
2. 10 mM TPTZ : ชั่ง TPTZ 0.0312 g นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วย 40 mM HCl จนครบ 10 mL
3. 20 mM  $\text{FeCl}_3$  : ชั่ง  $\text{FeCl}_3$  0.0540 g นำมาละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 mL

4. Acetate buffer pH 3.6 : ชั่ง Sodium acetate hydrate 0.31 g แล้วนำมาละลายด้วย Acetic acid 1.6 mL และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL
5. FRAP reagent : เตรียมอัตราส่วน 1:1:10 เมื่อเตรียมเสร็จแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาวิเคราะห์
6. สารละลายมาตรฐาน 1 mM  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$   
เตรียม Ferrous sulfate ความเข้มข้น 1 mM โดยชั่ง  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0.0278 g ละลายด้วย DI water ที่บ่ม 37°C แล้วปรับปริมาตรเป็น 10 ml และเจือจางสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังตาราง

Conc. mM	Stock solution (mL)	DI water (mL)
0.1	0.5	4.5
0.2	1	4
0.3	1.5	3.5
0.4	2	3
0.5	2.5	2.5

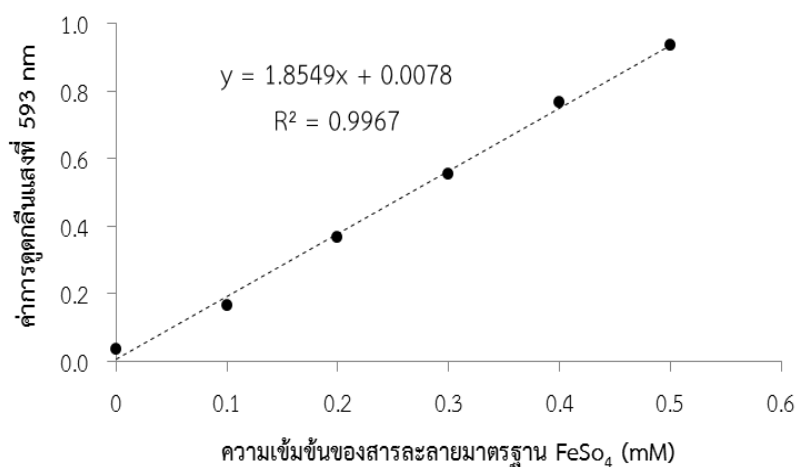
7. สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง : นำสารสกัดมาเจือจางด้วย DI water ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/mL

#### วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ ที่ความยาวคลื่น 593 nm (ใช้ DI water เป็น Blank)

1. นำสารสกัดเปลือกแก้วมังกร 40  $\mu\text{L}$  ผสมกับสารละลาย FRAP 1.8 mL
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 nm
3. นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาสมบัติการต้านออกซิเดชันโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4$ ) รายงานค่าเป็น  $\text{mmoleFeSO}_4/100 \text{ g sample}$

ผลของกราฟมาตรฐานที่ได้



รูปที่ ข.7 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี FRAP

ข.8 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบเบต้าไซยานิน ด้วยเครื่อง HPLC

โดยดัดแปลงจากวิธีของ Stintzing และคณะ (2002)

สารเคมี

- Betanin HPLC grade
- Trifluoroacetic acid : TFA
- Methanol A.R. Grade
- Hydrochloric acid : HCl
- Acetonitrile HPLC grade

การเตรียมสาร

1. Acidified water pH 2 และ 3 : เตรียม 1 L : เติม TFA (Trifluoroacetic acid) ลงไปใน DI water
2. Acidified MeOH ในอัตราส่วน 95:5 (v/v) : เตรียม 500 mL
  - ผสม MeOH 475 mL กับ Acidified water pH 2 ปริมาตร 25 mL
3. 0.1 N HCl : เตรียม 100 mL
  - ใช้ HCl 0.84 mL หยดลงในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 100 mL

วิธีวิเคราะห์

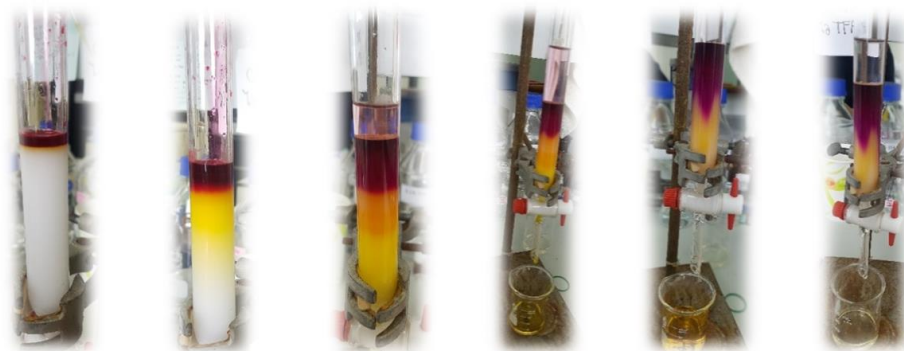
1. การทำสารให้บริสุทธิ์ : การกำจัดสารที่ไม่ต้องการโดยใช้ C18 reversed phase cartridges
  - 1.1. การเตรียม Column : C18-reversed cartridges (ขนาด 12x2 นิ้ว)

- นำผง Siliga-C<sub>18</sub> ละลายด้วยเมทานอลแล้วทำการ Activated Column ด้วยเมทานอล 3 ครั้ง หลังจากนั้นชะ Column ด้วย Acidified water pH 3, 3 ครั้ง (ครั้งละ 40 mL)

1.2. การเตรียมตัวอย่าง : ชั่งสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง 1 g ละลายด้วย DI water เล็กน้อย แล้วนำสารละลายตัวอย่างมาปรับให้ได้ pH เท่ากับ 3 โดยการเติม 0.1 N HCl

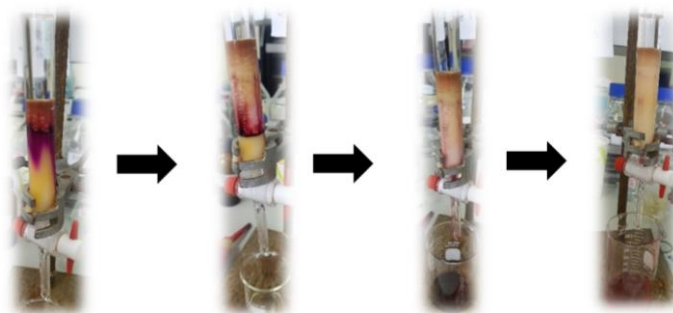
1.3. การแยกสารที่ไม่ต้องการโดยการใช้ Acidified water pH 3

- ชะน้ำตาลและกรดออกโดยใช้ Acidified water pH 3 ใช้ชะจนกว่าชั้นของสีเหลืองหมด (สังเกตจากน้ำจะเป็นสีขาว, เมื่อถึงช่วงชั้นสีขาว)
- สารที่แยกได้จะแบ่งออกเป็น 3 ชั้น (จากล่างขึ้นบน) ดังนี้
  - ชั้นที่ 1 : สีเหลืองเข้ม
  - ชั้นที่ 2 : สีเหลืองอ่อน
  - ชั้นที่ 3 : สีม่วงแดง (สารเบต้าไซยานิน)



รูปที่ ข.8.1 การทำบริสุทธิ์สารสกัดและแยกสารที่ไม่ต้องการออก

1.4. ใช้ Acid-MeOH ในการชะคอลัมน์เพื่อนำสารเบต้าไซยานินที่ติดอยู่ภายในคอลัมน์ที่ออกมา ชะจนกว่าสีม่วงแดงจะหมดจากคอลัมน์ (เก็บสารสีม่วงแดงที่ต้องการ) และสารที่เหลืออยู่ในคอลัมน์ (สีน้ำตาล) เป็นพวกเกลือที่ไม่ต้องการ



รูปที่ ข.8.2 การชะสารเบต้าไซยานินออกจากคอลัมน์



## 2. การเตรียมสารบริสุทธิ์

นำสารบริสุทธิ์ไปทำให้เข้มข้นโดยใช้ Rotary Evaporator ที่ 40°C แล้วนำสารที่ได้จากการทำให้เข้มข้นมาละลายด้วย Milli-Q water (5 mL) จนได้ pH 5-6 และนำสารบริสุทธิ์ที่ได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

## 3. การเตรียมสารมาตรฐาน Betanin (HPLC grade)

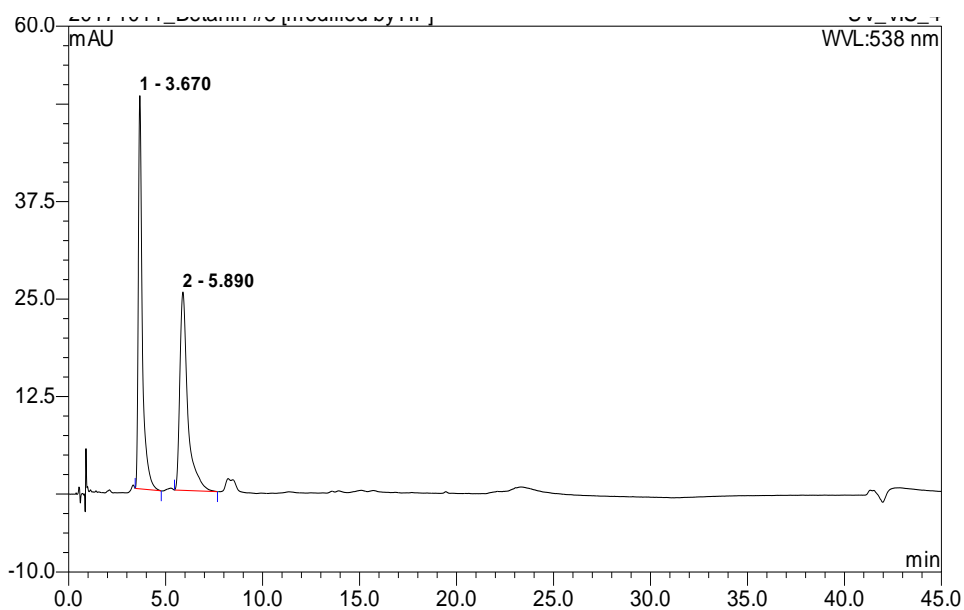
เตรียมที่ความเข้มข้น 20 mg/mL โดยชั่งผง betanin 0.02 g (20 mg) ละลายใน Milli Q water 1 mL แล้วดูดสารผ่านตัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน ใส่ขวดเล็กสีชา เพื่อนำไปวิเคราะห์ HPLC

## 4. การวิเคราะห์ HPLC

สภาวะของเครื่อง

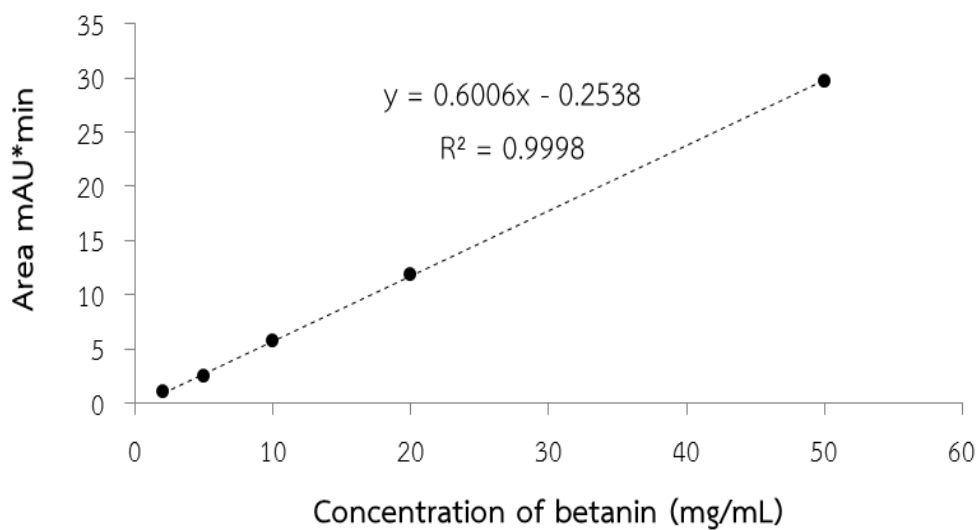
- ระบบ : PDA-HPLC system (Agilent, 1200 series, Germany)
- คอลัมน์ : C18 VertiSep™ UPS 4.6 x 50 mm, 3 μm
- วัฏภาคเคลื่อนที่
  - A : 0.1% TFA in Milli Q water (v/v)
  - B : 80% acetonitrile in Milli Q water (v/v)
  - Gradient : A 0.1% TFA in Milli Q water (v/v)
    - (a) first 10 min with 90% A
    - (b) 80% A at 20 min
    - (c) 20% A at 30 min
    - (d) Re-equilibrated at 40 min to the first condition
- การแยก : ที่ความยาวคลื่น 538 nm, 25°C
- อัตราการเคลื่อนที่ : 1 mL/min
- ปริมาตรที่ฉีด : 10 μL

จากการฉีดสารละลาย Betanin เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วงเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข.8 (3)



รูปที่ ข.8.3 โครมาโทแกรม HPLC ของ Betanin

ผลของกราฟมาตรฐานที่ได้



รูปที่ ข.8.4 กราฟมาตรฐานของ Betanin ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

## ข.9 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารในกลุ่ม Polyphenol compound

ดัดแปลงตามวิธีการของ Karimi และคณะ (2012)

### สารเคมี

- Acetonitrile
- Trifluoroacetic acid HPLC grade
- Gallic acid HPLC grade
- Caffeic acid HPLC grade
- Ferulic acid HPLC grade
- Pyrogallol HPLC grade
- Rutin HPLC grade

### ภาวะของการวิเคราะห์

- คอลัมน์ : C18 VertiSep™ UPS 4.6 x 50 mm, 3 μm
- วัฏภาคเคลื่อนที่ :
  - ตัวทำละลาย (A) : Deionized water (pH 2.5 ปรับโดยใช้ trifluoroacetic acid)
  - ตัวทำละลาย (B) : Acetonitrile

ระยะเวลา (นาที)	ตัวทำละลาย A : H <sub>2</sub> O (pH 2.5)	ตัวทำละลาย B : Acetonitrile
0	85%	15%
50	85%	-
55	-	15%

- อัตราเร็ว : 0.6 mL/min
- การแยก : ที่ความยาวคลื่น 254 nm, 25°C
- ระยะเวลา : 60 นาที

### วิธีการเตรียมสารสกัดจากเปลือกแก้วมังกรแดง

1. ละลายสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง 20 mg ใน Milli-Q® water 1 mL (ความเข้มข้น 20 mg/mL)
2. นำสารละลายในข้อ 1 ไปกรองผ่านกระดาษกรอง What man เบอร์ 4

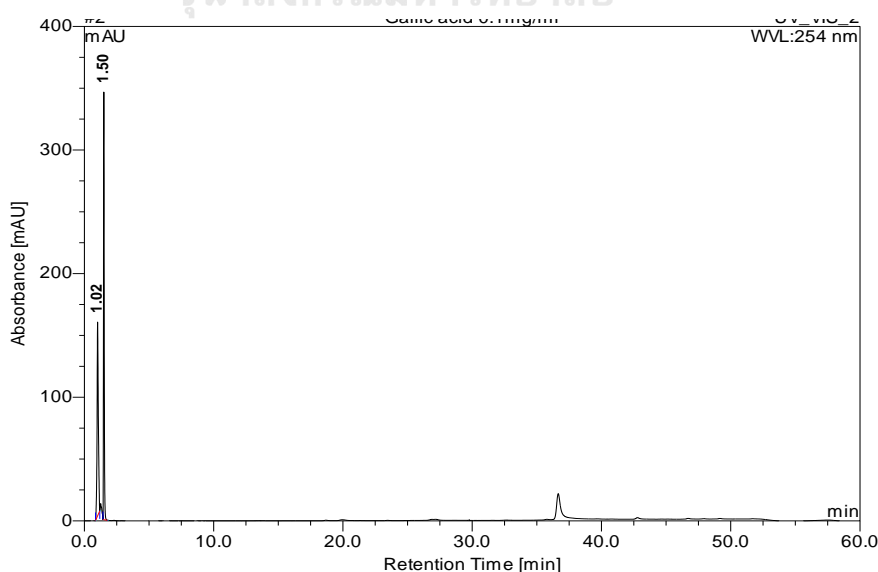
3. กรองสารละลายในข้อ 2 ผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการตรวจวัดวิเคราะห์โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ตามภาวะการวิเคราะห์ข้างต้น
4. นำรูปของโครมาโทแกรม ที่ได้จากการประมวลผลไปเทียบค่าหน่วยเวลากับโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานที่ได้จากการข้อ ข.8.1 – ข.8.5 หาชนิดและคำนวณหาปริมาณของสารมาตรฐานแต่ละชนิด โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน รายงานค่าเป็น mg /100 g dry wt

### วิธีการเตรียมสารละลายมาตรฐานและการสร้างกราฟมาตรฐาน

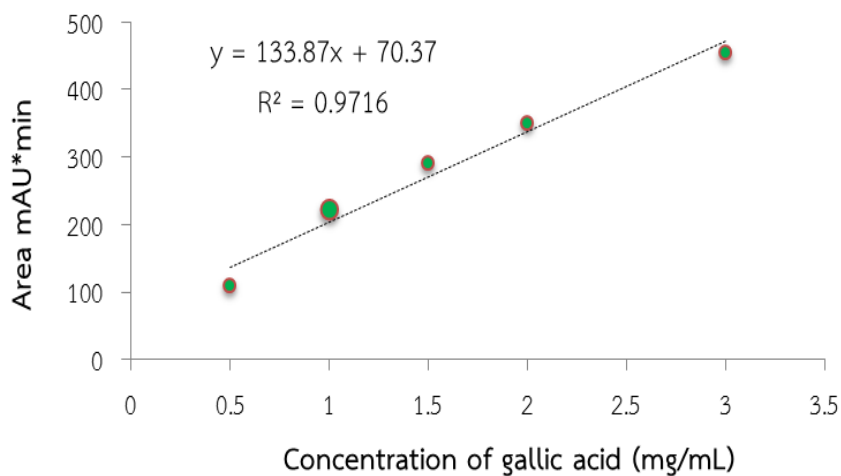
#### ข.9.1 Gallic acid

1. ละลาย Gallic acid 10 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 mg/mL)
2. ปิเปตสารละลาย Gallic acid ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.3, 0.2, 0.15, 0.1 และ 0.05 mg/mL ตามลำดับ
3. กรองสารละลายในข้อ 2 ผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการตรวจวัดวิเคราะห์โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ตามภาวะการวิเคราะห์ข้างต้น

จากการฉีดสารละลาย Gallic acid เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วยเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข.9.1 (1)



รูปที่ ข.9.1 (1) โครมาโทแกรม HPLC ของ Gallic acid

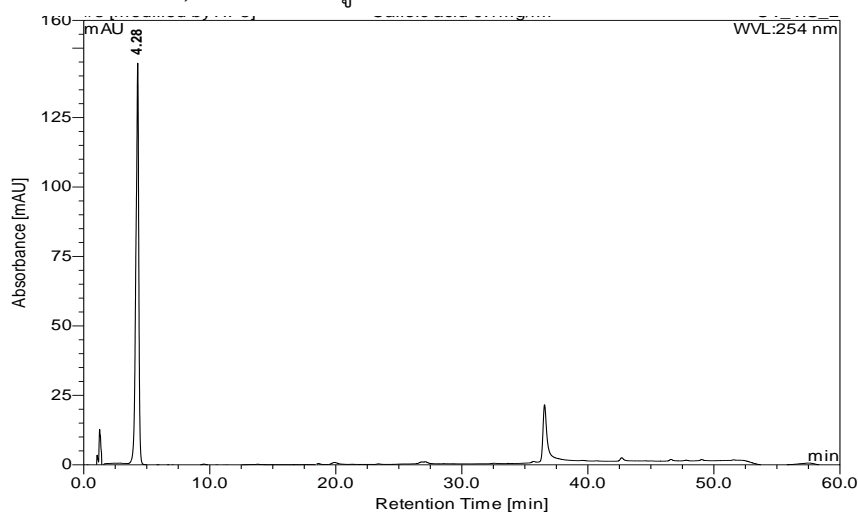


รูปที่ ข.9.1 (2) กราฟมาตรฐานของ Gallic acid ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

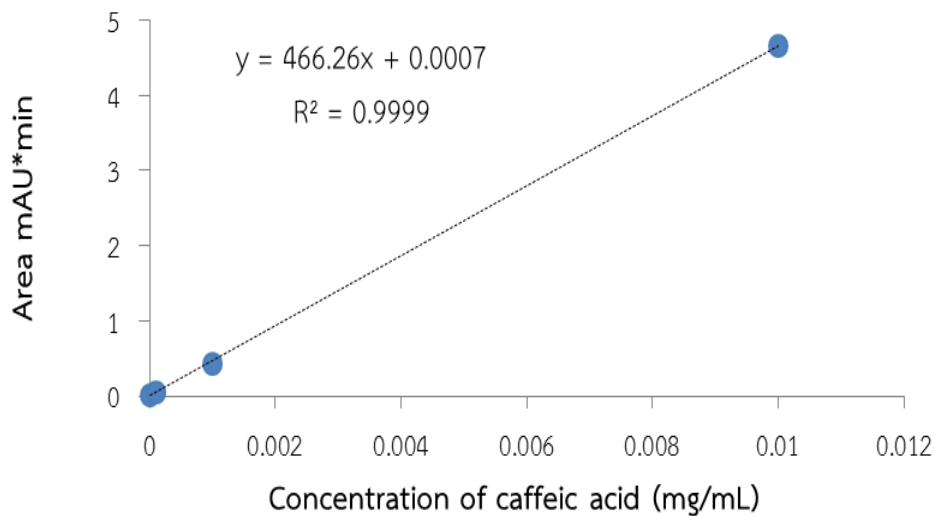
### ข.9.2 Caffeic acid

1. ละลาย Caffeic acid 2 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 mg/mL)
2. ปิเปตสารละลาย Caffeic acid ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01, 0.001, 0.0001 และ 0.00001 mg/mL ตามลำดับ
3. กรองสารละลายในข้อ 2 ผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการตรวจวัดวิเคราะห์โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ตามภาวะการวิเคราะห์ข้างต้น

จากการฉีดสารละลาย Caffeic acid เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วงเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข.9.2 (1)



รูปที่ ข.9.2 (1) โครมาโทแกรม HPLC ของ Caffeic acid

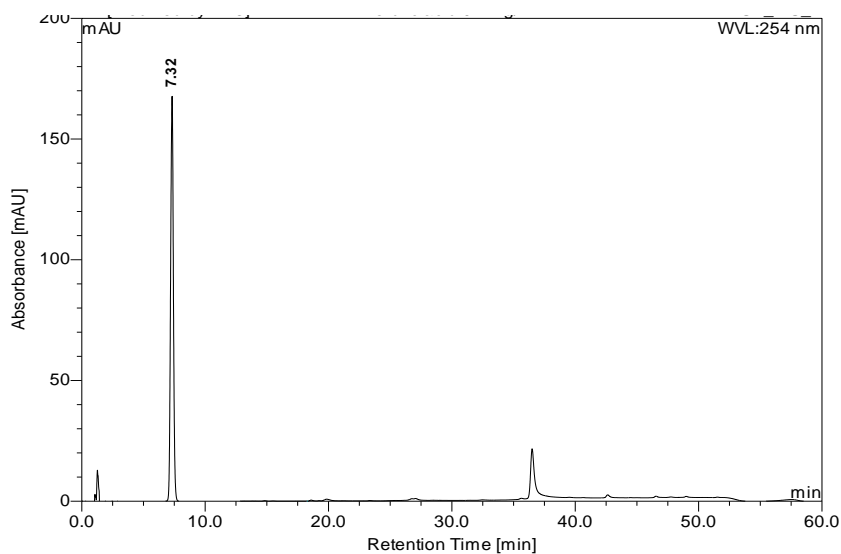


รูปที่ ข.9.2 (2) กราฟมาตรฐานของ Caffeic acid ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

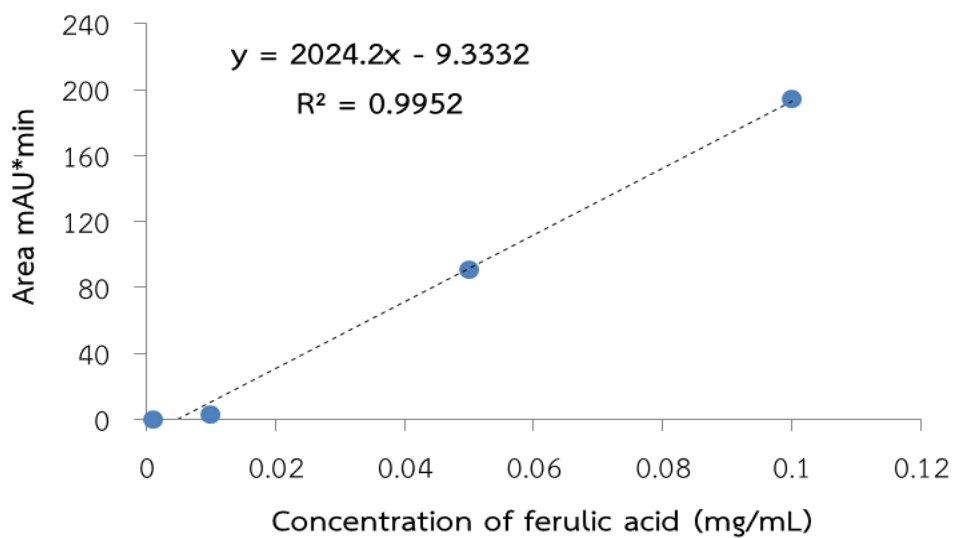
### ข.9.3 Ferulic acid

1. ละลาย Ferulic acid 2 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 mg/mL)
2. ปิเปตสารละลาย Ferulic acid ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.1, 0.05, 0.01 และ 0.001 mg/mL ตามลำดับ
3. กรองสารละลายในข้อ 2 ผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการตรวจวัดวิเคราะห์โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ตามภาวะการวิเคราะห์ข้างต้น

จากการฉีดสารละลาย Ferulic acid เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วงเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข.9.3 (1)



รูปที่ ข.9.3 (1) โครมาโทแกรม HPLC ของ Ferulic acid



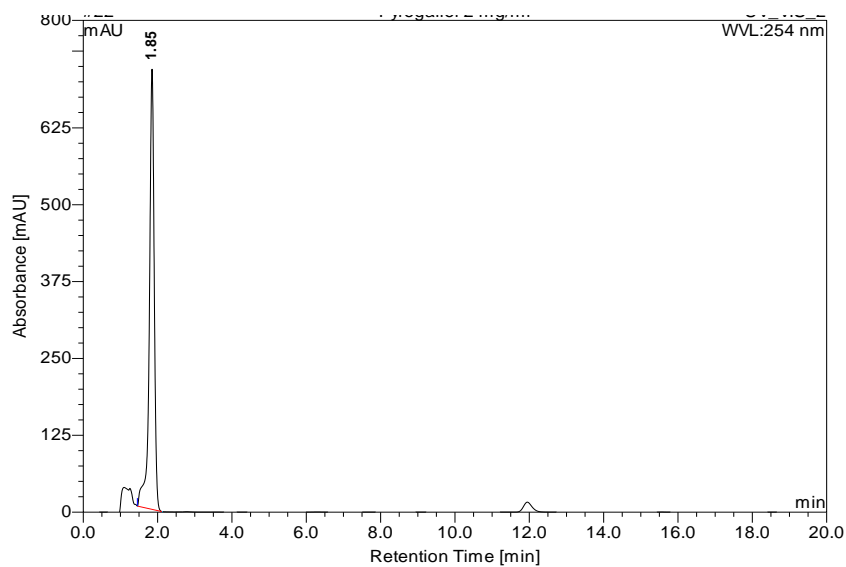
รูปที่ ข.9.3 (2) กราฟมาตรฐานของ Ferulic acid ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

#### ข.9.4 Pyrogallol

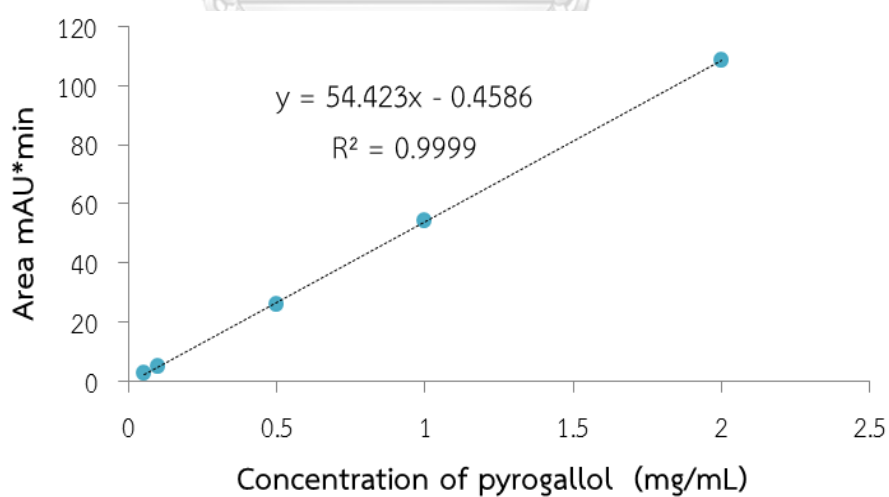
1. ละลาย Pyrogallol 10 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 mg/mL)
2. ปิเปตสารละลาย Pyrogallol ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2, 1, 0.5, 0.1 และ 0.05 mg/mL ตามลำดับ

3. กรองสารละลายในข้อ 2 ผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการตรวจวัดวิเคราะห์โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ที่ตามภาวะการวิเคราะห์ข้างต้น

จากการฉีดสารละลาย Pyrogallol เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วยเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข.9.4 (1)



รูปที่ ข.9.4 (1) โครมาโทแกรม HPLC ของ Pyrogallol



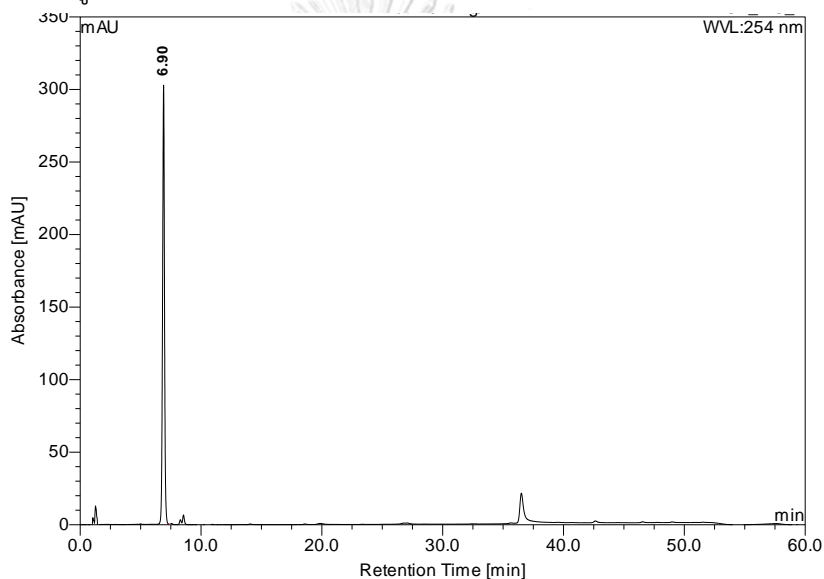
รูปที่ ข.9.4 (2) กราฟมาตรฐานของ Pyrogallol ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC



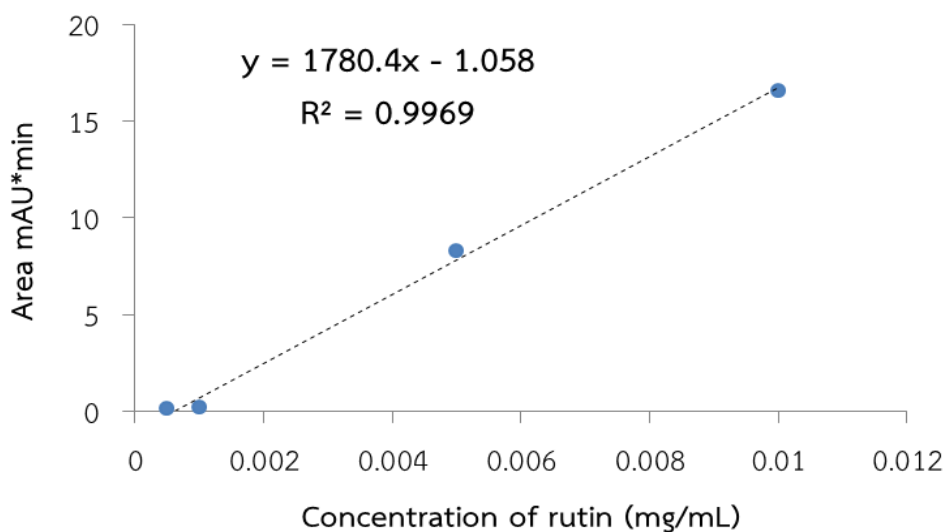
### ข.9.5 Rutin

1. ละลาย Rutin 2 mg ใน methanol HPLC grade 1 mL (มีความเข้มข้นเท่ากับ 2 mg/mL)
2. ปิเปตสารละลาย Rutin ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.01, 0.005, 0.001 และ 0.0005 mg/mL ตามลำดับ
3. กรองสารละลายในข้อ 2 ผ่าน micro filter membrane ขนาด 0.45 micron ก่อนฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทำการตรวจวัดวิเคราะห์โดยมีภาวะของการวิเคราะห์ตามภาวะการวิเคราะห์ข้างต้น

จากการฉีดสารละลาย Rutin เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโทแกรมที่มีค่าหน่วงเวลา (retention time, RT) แสดงดังรูปที่ ข.9.5 (1)



รูปที่ ข.9.5 (1) โครมาโทแกรม HPLC ของ Rutin



รูปที่ ข.9.5 (2) กราฟมาตรฐานของ Rutin ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC

**ภาคผนวก ค**  
**วิธีวิเคราะห์ทางชีวภาพ**

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาคเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Bacillus cereus* ATCC6633) แบคทีเรียแกรมลบ (*Salmonella Typhimurium* ATCC1331 และ *Escherichia coli* ATCC25922)

**ค.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ**

ดัดแปลงจากวิธีของ Choi (2015)

อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

1. 0.85% Sodium chloride : NaCl (Ajax Finechem, Australia)
  - ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
2. Nutrient Agar : NA (Himedia, India)
  - ชั่ง Nutrient Agar 28.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ
3. Plate Count Agar : PCA (Himedia, India)
  - ชั่ง Plate Count Agar 23.50 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ
4. Nutrient Broth : NB (Himedia, India)
  - ชั่ง Nutrient Broth 13.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
5. Tryptone Soya Broth : TSB (Himedia, India)
  - ชั่ง Tryptone Soya Broth 30.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

### วิธีวิเคราะห์

1. นำเชื้อทดสอบจากหลอดเชื้อบริสุทธิ์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Streak Plate บนอาหารแข็งบนอาหารวุ้น NA และสำหรับ *Salmonella* Typhimurium ใช้ PCA
2. นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
3. เลือกเชื้อเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด ประมาณ 2-3 โคโลนี โดยเชื้อทดสอบจะถูกทำการ active culture และเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง (Bauer และคณะ 1966) สำหรับเชื้อ *Salmonella* Typhimurium จะเลี้ยงในอาหาร TSB
4. นำเชื้อทดสอบมาปั่นล้างเซลล์ที่ 4000×g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C 1 รอบ และล้างด้วย NSS 2 รอบ
5. นำเชื้อที่ล้างเซลล์แล้วมาปรับความขุ่น ให้ได้เท่ากับสารละลาย McFarland no. 0.5 โดยใช้สารละลายนอร์มัลซาลีน (sodium chloride 0.85% solution) จะทำให้ได้เชื้อประมาณ  $1.5 \times 10^8$  colony forming unit ต่อมิลลิลิตร (CFU/mL)

### **ค.2 ตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงโดยวิธี Agar well diffusion**

ดัดแปลงจากวิธีของ Lorian (1996) และ Rauha และคณะ (2000)

#### อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

1. Mueller-Hinton agar : MHA (Himedia, India)
  - ชั่ง Mueller Hinton agar 38.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ
2. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
  - นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

### วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายเปลือกแก้วมังกรแดง โดยนำสารสกัดมาละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมให้ได้ความเข้มข้น 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.32, 0.16 และ 0.08 mg/mL
2. ใช้สำลีพันปลายไม้ที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่เตรียมไว้จากข้อ ค.1 (ความเข้มข้นเชื้อ  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) แล้วนำไป swap บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) แล้วทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3. ใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm เจาะลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมในข้อ 2
4. เติมสารสกัดที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ลงในหลุมที่เจาะไว้ 20  $\mu\text{L}$  โดยยา tetracycline เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (Positive Control) และใช้น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นตัวควบคุมเชิงลบ (Negative Control)
5. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}\text{C}$  เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
6. อ่านผล เส้นผ่าศูนย์กลางของฤทธิ์ยับยั้ง (clear zone) โดยแล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบหลุมด้วยเครื่องมือวัดเป็นหน่วย mm

$$\text{Clear zone (mm)} = \text{เส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone} - 0.6 \text{ mm}$$

### ค.3 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง ด้วยวิธี Broth dilution

ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998)

#### อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

1. 0.85% Sodium chloride : NaCl (Ajax Finechem, Australia)
  - ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที
2. Mueller-Hinton broth : MHB (Himedia, India)
  - ชั่ง Mueller Hinton Broth 21.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที
3. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
  - นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121  $^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที

#### วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายเปลือกแก้วมังกรแดง โดยนำสารสกัดมาละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1,000 mg/mL
2. นำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ ค.1 (มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) มาเจือจางเชื้อโดยใช้สารละลายนอร์มัลซาลิน (sodium chloride 0.85% solution) ให้มีปริมาณ  $1 \times 10^6$  CFU/mL

3. ปิเปตสารสกัดที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ที่ความเข้มข้น 1,000 mg/mL ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงในหลุม 96 wells plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MHB) อยู่ 100  $\mu$ L (จะทำให้ได้ความเข้มข้นหลุมแรกเท่ากับ 250 mg/mL)
4. เจือจางสารสกัดด้วยการทำ two fold dilution จนมีความเข้มข้น 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 และ 0.49 mg/mL ตามลำดับ และปิเปตสารละลายในหลุมสุดท้ายทิ้ง 100  $\mu$ L เพื่อให้มีปริมาตรเท่ากับหลุมอื่นๆ (จะเหลืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและสารสกัดอยู่ในหลุม อย่างละ 50  $\mu$ L)
5. ปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงหลุมทุกหลุม (ใช้หลุมที่มีสารสกัด 250 mg/mL ปริมาตร 100  $\mu$ L ผสมกับเชื้อ 100  $\mu$ L เป็น negative control และใช้หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้ออย่างละ 100  $\mu$ L เป็น positive control)
6. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37  $^{\circ}$ C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
7. วิเคราะห์ค่าโดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมไม่ขุ่น (เปรียบเทียบกับ negative control และ positive control) อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลอดนี้ เป็นค่า MIC ของการทดลองค่า (MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้)

#### การคำนวณความเข้มข้น (หลุมแรก)

- สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงที่เตรียม มีความเข้มข้น 1,000 mg/mL  
 ปริมาตรแต่ละหลุมมีทั้งหมด เท่ากับ 200  $\mu$ L
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (50  $\mu$ L) + สารสกัด (50  $\mu$ L) + เชื้อ (100  $\mu$ L)
- เมื่อคิดความเข้มข้นของสารสกัด
- ในหลุมทดสอบแรก สารสกัดมีความเข้มข้น  $\frac{50}{200} \times 1,000$
  - ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดที่หลุมแรก เท่ากับ 250 mg/mL

#### ค.4 การวิเคราะห์ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง ด้วยวิธี Broth dilution

ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998)

##### อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

1. Nutrient Agar : NA (Himedia, India)
  - ชั่ง Nutrient Agar 28.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ
2. Plate Count Agar : PCA (Himedia, India)
  - ชั่ง Plate Count Agar 23.50 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ

##### วิธีวิเคราะห์

1. นำทุกหลุมจากการทดสอบค่า MIC (จากข้อ ค.3) ที่ไม่มีเชื้อเจริญ (หลุมที่ใส) ไป streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และสำหรับ *Salmonella Typhimurium* ใช้ PCA
2. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
3. สังเกตผลการเจริญของเชื้อ ถ้าความเข้มข้นใดไม่มีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าที่ความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC (MBC คือ ความเข้มข้นยาที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้)

#### ค.5 การวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) ของโซเดียมคลอไรด์ด้วยวิธี Broth dilution

ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998)

##### อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

1. 0.85% Sodium chloride : NaCl (Ajax Finechem, Australia)
  - ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
2. Mueller-Hinton broth : MHB (Himedia, India)
  - ชั่ง Mueller Hinton Broth 21.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

3. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
  - นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมแลก โดยใช้ 60% Sodium lactate
2. นำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ ค.1 (มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) มาเจือจางเชื้อโดยใช้สารละลายนอร์มัลซาลิน (sodium chloride 0.85% solution) ให้มีปริมาณ  $1 \times 10^6$  CFU/mL
3. ปิเปตโซเดียมแลกที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ที่ความเข้มข้น 60% ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงในหลุม 96 wells plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MHB) อยู่ 100  $\mu$ L (จะทำให้ได้ความเข้มข้นหลุมแรกเท่ากับ 15%)
4. เจือจางโซเดียมแลกด้วยการทำ two fold dilution จนมีความเข้มข้น 15, 7.5, 3.75, 1.88, 0.94, 0.47, 0.23, 0.12 และ 0.06 % ตามลำดับ และปิเปตสารละลายในหลุมสุดท้ายทั้ง 100  $\mu$ L เพื่อให้มีปริมาตรเท่ากับหลุมอื่นๆ (จะเหลืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลวและโซเดียมแลกเทตอยู่ในหลุม อย่างละ 50  $\mu$ L)
5. ปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงหลุมทุกหลุม (ใช้หลุมที่มีโซเดียมแลกเทต 15% ปริมาตร 100  $\mu$ L ผสมกับเชื้อ 100  $\mu$ L เป็น negative control และใช้หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้ออย่างละ 100  $\mu$ L เป็น positive control)
6. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
7. วิเคราะห์ค่าโดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมไม่ขุ่น (เปรียบเทียบกับ negative control และ positive control) อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลุมนี้ เป็นค่า MIC ของการทดลองค่า (MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้)

#### การคำนวณความเข้มข้น (หลุมแรก)

โซเดียมแลกเทตเริ่มต้น มีความเข้มข้น	60 %
ปริมาตรแต่ละหลุมมีทั้งหมด เท่ากับ	200 $\mu$ L
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (50 $\mu$ L) + โซเดียมแลกเทต (50 $\mu$ L) + เชื้อ (100 $\mu$ L)	

#### เมื่อคิดความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต

- ในหลุมทดสอบแรก โซเดียมแลกเทตมีความเข้มข้น  $\frac{50}{200} \times 60 \%$
- ดังนั้น ความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทตที่หลุมแรก เท่ากับ 15 %

## ค.6 การวิเคราะห์ฤทธิ์การฆ่าจุลินทรีย์โดยการวิเคราะห์ Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) ของโซเดียมแลกเทต ด้วยวิธี Broth dilution

ตามวิธีของ NCCLS (1999) และ NCCLS (1998)

### อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

1. Nutrient Agar : NA (Himedia, India)
  - ชั่ง Nutrient Agar 28.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ
2. Plate Count Agar : PCA (Himedia, India)
  - ชั่ง Plate Count Agar 23.50 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ

### วิธีวิเคราะห์

1. นำทุกหลุมจากการทดสอบค่า MIC (จากข้อ ค.6) ที่ไม่มีเชื้อเจริญ (หลุมที่ใส) ไป streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และสำหรับ *Salmonella Typhimurium* ใช้ PCA
2. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
3. สังเกตผลการเจริญของเชื้อ ถ้าความเข้มข้นใดไม่มีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าที่ความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC (MBC คือ ความเข้มข้นยาที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้)

## ค.7 การศึกษาผลที่เสริมฤทธิ์กัน (Synergistic Interaction) ระหว่างสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงและโซเดียมแลกเทต

โดยการวิเคราะห์ค่า Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) และ Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) ด้วยวิธี Broth dilution test (ตามวิธีของ Bollenbach, 2015 และ Ait-Dra และคณะ, 2017) ซึ่งใช้อ้างอิงความเข้มข้นของสารสกัดจาก (ภาคผนวก ค.3 – 4) และของโซเดียมแลกเทตจาก (ภาคผนวก ค.5 – 6)

### อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

1. 0.85% Sodium chloride : NaCl (Ajax Finechem, Australia)
  - ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที



2. น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
  - นำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
3. Mueller-Hinton broth : MHB (Himedia, India)
  - ชั่ง Mueller Hinton Broth 21.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที
4. Nutrient Agar : NA (Himedia, India)
  - ชั่ง Nutrient Agar 28.00 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ
5. Plate Count Agar : PCA (Himedia, India)
  - ชั่ง Plate Count Agar 23.50 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 45 °C แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ

#### วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลาย
  - สารละลายเปลือกแก้วมังกรแดง โดยนำสารสกัดมาละลายด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เตรียมให้ได้ความเข้มข้น 1,000 mg/mL (ได้ความเข้มข้นหลุมแรก เท่ากับ 125 mg/mL)
  - สารละลายโซเดียมแลกเตต โดยใช้ 60% Sodium lactate มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น ดังแสดงในตาราง

ความเข้มข้นที่เตรียม (%)	ความเข้มข้นที่ได้ (%)
30	3.75
7.52	0.94

2. นำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ ค.1 (มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) มาเจือจางเชื้อโดยใช้สารละลายนอร์มัลซาลิน (sodium chloride 0.85% solution) ให้มีปริมาณ  $1 \times 10^6$  CFU/mL
3. ปิเปตสารละลายเปลือกแก้วมังกรแดงที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ปริมาตร 50  $\mu$ L ลงในหลุม 96 wells plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (MHB) อยู่ 100  $\mu$ L

4. เจือจางด้วยการทำ two fold dilution จนมีความเข้มข้น 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.95, 0.98 และ 0.49 mg/mL สำหรับสารละลายเปลือกแก้วมังกรแดง และปิเปตสารละลายในหลุมสุดท้ายทั้ง 75  $\mu$ L เพื่อให้มีปริมาตรเท่ากับหลุมอื่นๆ (จะเหลืออาหารเลี้ยงเชื้อเหลือ 50  $\mu$ L และสารสกัดอยู่ในหลุม 25  $\mu$ L)
5. ปิเปตโซเดียมแลกเทตความเข้มข้นคงที่ ลงทุกหลุมปริมาตร 25  $\mu$ L โดยแต่ละเชื้อใช้ความเข้มข้น ดังแสดงในตาราง

แบคทีเรียทดสอบ	ความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต (%)	
	ที่เตรียม	ที่ได้
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.52	0.94
<i>Bacillus cereus</i>	30	3.75
<i>Salmonella</i> Typhimurium	30	3.75
<i>Escherichia coli</i>	30	3.75

6. ปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงหลุมทุกหลุม (ใช้หลุมที่มีสารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดง 125 mg/mL และโซเดียมแลกเทตที่ความเข้มข้นคงที่ ปริมาตรรวมกัน 100  $\mu$ L ผสมกับเชื้อ 100  $\mu$ L เป็น negative control และใช้หลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกับเชื้ออย่างละ 100  $\mu$ L เป็น positive control)
7. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
8. วิเคราะห์ค่าโดยสังเกตหลุมสุดท้ายที่ไม่มีจุลินทรีย์เจริญหรืออาหารเลี้ยงเชื้อในหลุมไม่ขุ่น (เปรียบเทียบกับ negative control และ positive control) อ่านปริมาณของสารทดสอบของหลุมนี้ เป็นค่า MIC ของการทดลองค่า (MIC คือ ค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารสกัดที่ใช้ทดสอบที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบได้)
9. นำทุกหลุมจากการทดสอบค่า MIC ที่ไม่มีเชื้อเจริญ (หลุมที่ใส) ไป streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และสำหรับ *Salmonella* Typhimurium ใช้ PCA
10. บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง
11. สังเกตผลการเจริญของเชื้อ ถ้าความเข้มข้นใดไม่มีเชื้อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าที่ความเข้มข้นนั้นเป็นค่า MBC (MBC คือ ความเข้มข้นยาที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้)

### การคำนวณความเข้มข้น

สารสกัดเปลือกแก้วมังกรแดงเริ่มต้น มีความเข้มข้น	1,000 mg/mL
ปริมาตรแต่ละหลุมมีทั้งหมด เท่ากับ	200 $\mu$ L
- อาหารเลี้ยงเชื้อ (50 $\mu$ L) + สารสกัด (25 $\mu$ L) + โซเดียมแลกเทต (25 $\mu$ L) + เชื้อ (100 $\mu$ L)	

เมื่อคิดความเข้มข้นของสารสกัด (หลุมแรก)

- ในหลุมทดสอบแรก สารสกัดมีความเข้มข้น  $\frac{25}{200} \times 1,000$  mg/mL
- ดังนั้น ความเข้มข้นของสารสกัดที่หลุมแรก เท่ากับ 125 mg/mL

เมื่อคิดความเข้มข้นของโซเดียมแลกเทต (ทุกหลุม)

- เตรียมที่ความเข้มข้น 30% เมื่อใส่หลุมจะมีความเข้มข้น  $\frac{25}{200} \times 30\%$  เท่ากับ 3.75%
- เตรียมที่ความเข้มข้น 7.52% เมื่อใส่หลุมจะมีความเข้มข้น  $\frac{25}{200} \times 7.52\%$  เท่ากับ 0.94%

เมื่อคิดต่อปริมาณคัสตาร์ดครีม 100 g

- สารสกัดที่ได้ 62.5 mg/mL เมื่อเทียบ mL เป็น g จะได้ 6,250 mg/100 g
- โดยปกติทางกฎหมายจะคิดการเติม 60% โซเดียมแลกเทตเป็น 1% ในอาหาร ดังนั้น ต้องใช้สารสกัด 6.25 g และโซเดียมแลกเทต 1 mL ในคัสตาร์ดครีม 100 g

### ค.8 การเติมเชื้อแบคทีเรียลงในคัสตาร์ดครีม (Choi 2015)

#### การเตรียมสารละลาย

- 0.85% Sodium chloride (NaCl) (Ajax Finechem, Australia)
  - ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

#### วิธีวิเคราะห์

- นำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ ค.1 (มีปริมาณเชื้อเท่ากับ  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL) มาปิเปตลงลงในหลอดทดลองเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อย่างละ 1 mL สำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* และ 0.1 mL สำหรับ *Bacillus cereus* แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)
- เติมเชื้อผสมที่เตรียมจากข้อ 1 ปริมาตร 0.25 mL ลงในคัสตาร์ดครีม 25 g ที่อุณหภูมิห้อง ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อในอาหาร เท่ากับ  $1 \times 10^6$  CFU/mL (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli*) และ  $1 \times 10^5$  CFU/mL (*Bacillus cereus*)

3. เก็บรักษาคัสตาร์ดครีมที่อุณหภูมิ  $4 \pm 2^{\circ} \text{C}$  เป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในวันที่ 0, 1, 3, 5 และ 7

#### ค.9 การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ตามวิธีของ AOAC (2005)

##### อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย

1. 0.85% Sodium chloride : NaCl (Ajax Finechem, Australia)
  - a. ชั่ง NaCl 0.85 g ละลายในน้ำกลั่น 100 mL และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ  $121^{\circ} \text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที
2. Plate Count Agar : PCA (Himedia, India)
  - ชั่ง Plate Count Agar 23.50 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุในขวด Duran และนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ  $121^{\circ} \text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ  $45^{\circ} \text{C}$
3. Baird-Parker Agar : BPA (Himedia, India)
  - ชั่ง Baird-Parker Agar (BPA) 63.00 g ละลายในน้ำกลั่น 950 mL บรรจุในขวด Duran แล้วนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ  $121^{\circ} \text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ  $45^{\circ} \text{C}$  เท Egg Yolk Tellurite Emulsion (Himedia, India) 10 mL ลงในขวด Duran เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ
4. Xylose-Lysine Deoxycholate Agar : XLD Agar (Himedia, India)
  - ชั่ง Xylose-Lysine Deoxycholate Agar 56.68 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุในขวด Duran แล้วนำไปให้ความร้อนโดยใช้ microwave ให้เดือด (จนอาหารเลี้ยงเชื้อละลายเป็นวุ้น) และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ  $45^{\circ} \text{C}$  แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ
5. Eosin Methylene Blue Agar, Levine : EMB agar (Himedia, India)
  - ชั่ง Eosin Methylene Blue Agar 37.46 g ละลายในน้ำกลั่น 1000 mL บรรจุในขวด Duran แล้วนำไปฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ  $121^{\circ} \text{C}$  เป็นเวลา 15 นาที และตั้งทิ้งไว้ใน water bath จนอุณหภูมิลดลงเหลือ  $45^{\circ} \text{C}$  แล้วเทลงจานเพาะเชื้อ

##### วิธีวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างคัสตาร์ดครีม 25 g ใส่ลงใน Stomacher bag ด้วยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) แล้วเจือจางตัวอย่างด้วย 0.85% Sodium chloride ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 225 mL

2. นำตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมในข้อ 1 เข้าเครื่อง Stomacher ตบเป็นเวลา 2 นาที จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 1:10
3. เจือจางสารละลายตัวอย่างเป็นลำดับ 10 เท่า โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 mL ใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุ 0.85% Sodium chloride 9 mL
4. ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer ได้เป็นตัวอย่างที่มีความเจือจาง 1:100 แล้วเจือจางต่อไปเป็นลำดับ 1:1000 และ 1:10000
5. การตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด
  - 5.1 ด้วยวิธี Pour plate
    - 5.1.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 mL ลงในจานเพาะเชื้อ (petri dish)
    - 5.1.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่เป็นวุ้นหลอมละลายที่ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงจนถึง 45 °C เทลงในจานเพาะเชื้อในข้อ 5.1.1 ปริมาตร 20 mL หมุนเขย่าให้เข้ากัน แล้วปล่อยให้อาหารแข็งตัว
  - 5.2 ด้วยเทคนิค Spread plate
    - 5.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 mL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA, XLD agar และ EMB agar
    - 5.2.2 ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยสารละลายตัวอย่างให้กระจายทั่วผิวน้ำอาหารเลี้ยงเชื้อ
  - 5.3 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 mL ลงบน Compact dry X-BC
6. บ่มจานเพาะเชื้อและ Compact dry X-BC ที่อุณหภูมิ 35±1 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
7. ตรวจนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดในช่วง 25-250 โคโลนี แล้วคำนวณเป็นปริมาณจุลินทรีย์ของแต่ละชนิดและปริมาณจุลินทรีย์รวม รายงานค่าเป็น colony-forming units/mL (CFU/mL)
 

- Plate Count Agar	: จุลินทรีย์รวม
- Baird-Parker Agar	: <i>Staphylococcus aureus</i>
- Xylose-Lysine Deoxycholate Agar	: <i>Salmonella</i> Typhimurium
- Eosin Methylene Blue Agar, Levine	: <i>Escherichia coli</i>
- Compact dry X-BC	: <i>Bacillus cereus</i>

### ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวทรงพร คำคม เกิดวันที่ 28 ธันวาคม พ.ศ.2535 ที่จังหวัดนครสวรรค์ สำเร็จ การศึกษาระดับชั้นปริญญาตรี สาขา วิชาวิทยาศาสตร์การอาหารเพื่อสุขภาพ ภาควิชาโภชนวิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ปี พ.ศ. 2557 และเข้าศึกษาต่อระดับชั้นปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ภาคการศึกษาปลาย ปี พ.ศ. 2558 ได้นำเสนอ ผลงานทางวิชาการ ในหัวข้อ “Effect of ethanol/water extraction ratio on betacyanin content of red dragon fruit (Hylocereus polyrhizus) peel and inhibition of the extract against pathogenic bacteria” ใน การประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Food Innovation Asia conference 2018 (FIAC 2018) ระหว่างวันที่ 14-18 มิถุนายน 2561 ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค บางนา กรุงเทพฯ

ได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัย ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษก สมโภช (The 90 th Anniversary of Chulalongkorn University Scholarship)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**