รหัสโครงการ SUT3-305-55-24-02

รายงานการวิจัย

โปรไบโอติกและเชอร์รี่เปรี้ยวหมักเสริมสุขภาพ
(Probiotic and functional fermented sour cherry)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-305-55-24-02

รายงานการวิจัย

โปรไบโอติกและเชอร์รี่เปรี้ยวหมักเสริมสุขภาพ
(Probiotic and functional fermented sour cherry)

คณะผู้วิจัย
หัวหน้าโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณพ.ศ. 2555-2556
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555-2556 ที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งขอบคุณหน่วยงานอาคารศูนย์เครื่องมือ 1 อาคารศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัยทดลอง ตลอดจนศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นแหล่งให้ข้อมูลประกอบงานวิจัยและเอกสารอ้างอิงต่างๆ เพื่อจัดทำรายงานการวิจัยเล่มนี้ให้ลุล่วงสำเร็จไปได้ด้วยดี

ผศ.ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

กันยายน 2558

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ดอง (pickled fruits and vegetables) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีอยู่ในผักและผลไม้แต่ละชนิด ช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่เฉพาะตัวของอาหารหมักดอง ยืดอายุการเก็บรักษา ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และจุลินทรีย์ก่อโรค ทั้งยังช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีน กรดอะมิโน วิตามิน และกรดไขมันที่จำเป็นได้ โดยกระบวนการดองแบบพื้นบ้านนั้นไม่มีการเติมกล้าเชื้ออาจได้ผลิตภัณฑ์ผลไม้ดองที่ไม่มีคุณภาพ เกิดฟอง ฝ้า หรือมีกลิ่นเหม็นได้ การเติมกล้าเชื้อจะช่วยควบคุมกระบวนการดองให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ จากการคัดแยกกล้าเชื้อในเซอร์รี่เปรี้ยวได้จุลินทรีย์ที่แตกต่างกันทั้งหมด 12 ไอโซเลท พบว่า NCR-7 และ NCR-12 มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติก ให้ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) เป็นลบ การใช้น้ำตาล (O/F test) พบว่า NCR-7 เกิดออกซิเดชั่นและหมักน้ำตาลกลูโคสได้ ส่วน NCR-12 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ในกรณีที่ไอโซเลทอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 และ *Salmonella* sp. รวมถึงผลิต protease และ cellulase ได้ การยืนยันสายพันธุ์ด้วย API 50 CHL medium ทำให้ทราบว่า NCR-7 มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ร้อยละ 99.90 ส่วน NCR-12 มีคุณสมบัติเป็น *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ร้อยละ 99.90 ผลการดองเซอร์รี่เปรี้ยวโดยเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 (NCR-7) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 6 และ 7% (w/v) มีการผลิตเอนไซม์ protease cellulase และแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 และ *Salmonella* sp. ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง (pH 2.0) ไม่มีการผลิตเอนไซม์ และแบคเทอริโอซิน แต่สภาวะ pH 4.0 มีการผลิต protease cellulase และแบคเทอริโอซิน ส่วนเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 (NCR-12) ที่น้ำเกลือความเข้มข้น 5 6 และ 7% (w/v) มีการผลิต protease และแบคเทอริโอซิน ในสภาวะความเข้มข้นของเกลือ 5% (w/v) สามารถผลิต cellulase ได้ ที่ความเป็นกรดสูง (pH 2.0) ไม่มีการผลิตเอนไซม์และแบคเทอริโอซิน ส่วนที่ pH 4.0 มีการผลิต protease cellulase และแบคเทอริโอซินอีกด้วย และแบคที่เรียดังกล่าวถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) และเป็นโปรไบโอติก (probiotic) จึงนำไปทดสอบความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นด้วยวิธี Acid tolerance Bile salt tolerance และ hydrophobicity assay พบว่า NCR-7 สามารถเจริญและทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในช่วง pH 2-4 และทนต่อ Bile salt 0.3 – 1% ได้ดีกว่า NCR-12 และยังพบว่า NCR-7 มีความสามารถในการยึดเกาะ (% Hydrophobicity) เท่ากับ 34.20% ซึ่งสูงกว่า NCR-12 ที่มีค่าเท่ากับ 3.46% ซึ่ง %Hydrophobicity ต่ำกว่า 40% เป็นระดับที่ต่ำกว่าที่จะได้รับพิจารณาความเป็น Hydrophobicity อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกจะมีการทดสอบอื่นๆร่วมด้วย จากนั้นใช้ NCR-7 ในการผลิตเซอร์รี่เปรี้ยวดอง เพื่อให้มีคุณภาพสม่ำเสมอ ค่า pH ของกระบวนการดองทั้งสองแบบสูงขึ้นแต่ไม่เกินค่ามาตรฐานของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองกำหนดไว้ (≤3.50) การดองโดยการเติมกล้าเชื้อส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของฟลาโวนอยด์ ในขณะที่การดองแบบธรรมชาติและการดองโดยการเติมกล้าเชื้อมีผลให้ปริมาณสารฟีนอลิก แอนโทไซยานิน วิตามินซีลดลงอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามยังคงมีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อสิ้นสุดการดองปริมาณยีสต์และราไม่เกินมาตรฐานกำหนด (≤ 2 Log cfu/g) นอกจากนี้เซอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อยังคงรักษาคุณสมบัติทางกายภาพได้ ไม่เละ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นหอม ดังนั้น NCR-7 จึงสามารถใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์เซอร์รี่เปรี้ยวดองที่มีคุณภาพ และความปลอดภัยตามมาตรฐานกำหนดได้เป็นอย่างดี

Abstract

Pickled fruits and vegetables produced by lactic acid bacteria (LAB) fermentation have modified specific flavors, extended shelf life, spoilage and pathogenetic microorganisms inhibition as well as an increase of protein, amino acids, vitamins and essential fatty acids. Conventional pickling without a starter culture occasionally results in low quality products, froth, translucence and bad smells in comparison to pickling done with a starter culture, which is controllable and affects the efficiency of the process as well as the quality of products. Due to micro-flora screening from sour cherry, two isolates (NCR-7 and NCR-12) out of twelve isolates indicated lactic acid characteristics, especially negative catalase production. The glucose (O/F test) utilization of NCR-7 was found under both aerobic and anaerobic conditions, but the NCR-12 under anaerobic condition only. According to the bacteriocin and enzyme production of these two isolates, inhibition occurred in *E.coli* and *Salmonella* sp. as well as protease and cellulase. NCR-7 was further identified by API CHL 50 medium, with the finding being *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* with high precision at 99.90%. The NCR-12 was *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* at 99.90%. Therefore, pickled sour cherries with *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 were cultured with salt at 5, 6 and 7%(w/v), which the production of protease cellulase and bacteriocin to inhibit the growth of both pathogens, under pH 4.0 the enzyme and bacteriocin production was found. The *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 (NCR-12) was cultured with salt at 5, 6 and 7% (w/v), resulting in the production of protease and bacteriocin. At 5%(w/v) salt, it produced cellulase. Meanwhile, at pH 4.0 protease cellulase and bacteriocin found. Those bacteria are considered safe (Generally Recognized as Safe, GRAS) as probiotic bacteria. Therefore, testing the preliminary probiotic properties by acid tolerance, bile salt tolerance and hydrophobicity assay showed that NCR-7 growth and tolerance under acidic conditions in a range of pH 2.0-4.0 and tolerance under bile salt at 0.3-1.0% was more than that of NCR-12. NCR-7 was capable and found hydrophobicity (34.20%), which was higher than that of NCR-12 (3.46%). However, probiotic properties will be confirmed along with the other test. Using NCR-7 for sour cherry pickling was performed to control the standard of quality. The pH of the processes with and without NCR-7 was higher, but did not exceed the pickled fruit and vegetables standard value ($\leq$ 3.50). Consequently, it was shown that the quantity of phenolic compounds, anthocyanin and vitamin C decreased continuously, while NCR-7 affected flavonoid increase. The amount of yeast and mold did not exceed the standard ($\leq$ 2 Log cfu/g) at the end of the pickling. Besides, the sour cherries pickled with NCR-7 maintained possession of their physical properties. Therefore, NCR-7 could potentially be used as a starter culture and can control the quality and safety standards of sour cherries pickling.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ-ฉ
สารบัญภาพ	ช-ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ข้อตกลงเบื้องต้น	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	3
แหล่งที่มาของข้อมูล	3
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	7
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	11
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	14
บทที่ 4 บทสรุป	40
สรุปผลการวิจัย	40
ข้อเสนอแนะ	42
บรรณานุกรม	43
ภาคผนวก	45
ประวัติผู้วิจัย	54

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	กลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักดองผักและผลไม้	4
ตารางที่ 2	สารเคมีและองค์ประกอบที่พบในสารสกัดจากผลเชอร์รี่เปรี้ยว	7
ตารางที่ 3	ผลการทดสอบไอโซเลทจากผลเชอร์รี่เปรี้ยวสด	15
ตารางที่ 4	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	21
ตารางที่ 5	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	21
ตารางที่ 6	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	22
ตารางที่ 7	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	22
ตารางที่ 8	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	23
ตารางที่ 9	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	23
ตารางที่ 10	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	24
ตารางที่ 11	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	24
ตารางที่ 12	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25
ตารางที่ 13	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	25
ตารางที่ 14	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	25
ตารางที่ 15	ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	26
ตารางที่ 16	ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	27

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 17 ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. 27 *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 27

ตารางที่ 18 ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E.coli* ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด 27

ตารางที่ 19 ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด 28

ตารางที่ 20 ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 34

ตารางที่ 21 ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง 37

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแล็กติก NCR-7 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium	16
รูปที่ 2 ผลการทดสอบแบคทีเรียกรดแล็กติก NCR-12 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium	17
รูปที่ 3 การเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	18
รูปที่ 4 การเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	19
รูปที่ 5 การเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารละลายโซเดียม (NaCl)	19
รูปที่ 6 การเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด	20
รูปที่ 7 ความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด (Acid tolerance) ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ความสามารถในการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะกรดของ NCR-7 (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7) และ NCR-12 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. d*elbrueckii* NCR-12) ที่ปรับความเป็นกรดที่ pH 2 และ pH 4	29
รูปที่ 8 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (Bile salt tolerance) ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีน้ำดี (Bile salt) ของ NCR-7 (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7) และ NCR-12 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12) ที่ปรับความเข้มข้นน้ำดี (Bile salt) เท่ากับ 0.3% 0.5% และ 1.0%	29
รูปที่ 9 %Hydrophobicity ของแบคทีเรียกรดแล็กติก NCR-7 (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7) และ NCR-12 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12)	31
รูปที่ 10 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนไประหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7	32

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำ (soluble solid) ในระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 33

รูปที่ 12 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolic content) ระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 34

รูปที่ 13 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid) ระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 35

รูปที่ 14 ปริมาณแอนโทไซยานินระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 35

รูปที่ 15 สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphynyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 36

รูปที่ 16 ปริมาณวิตามินซีที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 36

รูปที่ 17 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดองเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง (มผช. 160-2546) 38

รูปที่ 18 จำนวนยีสต์และราในผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดองเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง (มผช. 160-2546) 38

รูปที่ 19 คุณลักษณะทางกายภาพของการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 39

รูปที่ 20 กราฟมาตรฐานของ Gallic acid 51

รูปที่ 21 กราฟมาตรฐานของ Catechin 51

รูปที่ 22 ผลการทดสอบการจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ของกล้าเชื้อรหัส NCR-7 52

รูปที่ 23 ผลการทดสอบการจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ของกล้าเชื้อรหัส NCR-12 53

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

เกษตรกรรมเป็นอาชีพหลักของคนไทย จึงทำให้ประเทศไทยมีวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่บริโภคภายในประเทศ และส่งออกจำนวนมาก อย่างไรก็ตามยังมีผักผลไม้สดที่เหลือจากการบริโภคและส่งออกจำนวนมาก ดังนั้นการนำผลผลิตทางการเกษตรมาแปรรูปจะช่วยลดปัญหาการเน่าเสียทางสรีรวิทยาร่วมกับจุลินทรีย์อีกหลายชนิด ยกระดับราคาผลิตผล เพิ่มมูลค่าของผลิตผลทางการเกษตรมาเป็นอาหารระดับอุตสาหกรรม ที่สามารถรับวัตถุดิบเพื่อผลิตเป็นอาหารจำนวนมากได้ และสามารถขยายตลาดการค้าออกไปสู่ต่างประเทศ ซึ่งการแปรรูปผัก ผลไม้มีหลายวิธีได้แก่ การทำแห้ง การดอง การใช้ความร้อน การใช้ความเย็น รวมถึงการใช้รังสี เป็นต้น จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่า การดอง (pickles) เป็นกรรมวิธีถนอมรักษาอาหารและแปรรูปที่นิยมอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อนและไม่ต้องการความชำนาญในการใช้เครื่องมือ นอกจากนี้การดองยังเป็นการทำให้ผลิตภัณฑ์มีรส กลิ่น เปลี่ยนไปจากเดิม เป็นการเพิ่มความหลากหลายให้กับผลิตภัณฑ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำกรรมวิธีการดองมาประยุกต์ในการดองเชอร์รี่เปรี้ยว (*Malpighia glabra* L.) หรือเชอร์รี่ไทย เป็นผลไม้รสเปรี้ยวที่มีวิตามินซีปริมาณ 2,000 มิลลิกรัม/100 กรัม ของน้ำหนักเปียก (กองโภชนาการ กรมอนามัย, 2530) เป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลต่างๆ เช่น chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, salicylic acid, tannic acid และ trans-cinnamic acid ซึ่งมีความสามารถในการเป็น antimicrobial (Chen & Chung, 2000; Chrzanowski et al., 2007; Kim & Padilla-Zakour, 2004; Kim et al., 2005; Pigeon et al., 2010) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) ที่พบในเชอร์รี่เปรี้ยวเป็นสารประกอบฟีนอลิคที่เรียกว่า flavonoids มีอยู่หลายประเภท ได้แก่ cyaniding 3-sophoroside, cyanidin 3-glucosylrutinoside, cyanidin 3-glucoside และ cyanidin 3-rutinoside แล้วยังพบ cyanidin 3-arabinosylrutinoside, pelargonidin 3-glucoside และ peonidin 3-rutinoside (Kirakosyan et al., 2010 ;Kim et al., 2005) นอกจากนี้ flavonoids ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli Proteus vulgaris Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella pneumoniae* (Bylka, Matlawska & Pilewski, 2004; Piccolella et al., 2008; Rauna et al ., 2000; Tural & Koca, 2008) นอกจากคุณสมบัติเป็น antioxidant แล้ว ฟีนอลิคยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย ได้แก่ antiallergic anticarcinogenic antimicrobial antimutagenic และ anti-inflammatory (Kim et al., 2005; Pedisic et al., 2007; Kuehl et al., 2010) จะเห็นได้ว่าผลเชอร์รี่เปรี้ยวล้วนประกอบไปด้วยสารพฤกษเคมีที่มีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นกรรมวิธีในการแปรรูปด้วยการดองที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน จึงเป็นวิธีการที่สะดวกและสามารถทำได้ง่ายในระดับครัวเรือนไปจนถึงอุตสาหกรรม ซึ่งในอุตสาหกรรมผลไม้ดองนั้นมักจะใช้กระบวนการให้ความร้อน หรือ pasteurize เพื่อเพิ่มความมั่นใจ และความปลอดภัยในอาหาร อย่างไรก็ตามผลไม้บางชนิดจะมีความไวต่อความร้อน ทำให้คุณภาพของสีและเนื้อสัมผัสเกิดการเปลี่ยนแปลง และมีคุณลักษณะที่ไม่ดี ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นผลไม้หรือวัตถุดิบที่ดองส่วนใหญ่จะปราศจากการให้ความร้อนหรือการให้ความร้อนเพียงเล็กน้อย แต่ไม่เพียงพอสำหรับการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ของเชอร์รี่เปรี้ยวหรือวัตถุดิบนั้นๆ โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแล็กติก (lactic acid bacteria) ที่อยู่ในผลไม้เมื่อเวลาผ่านไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติและกลิ่นรสที่เฉพาะตัวแตกต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียสาย

พันธุ์นี้จะทำให้เกิดการหมักดอง เป็นการถนอมรักษาอาหาร ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารให้นานขึ้นและสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage bacteria) ทั้งยังช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีน วิตามิน กรดอะมิโน และกรดไขมันที่จำเป็น นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแล็กติกถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) และเป็นโปรไบโอติก (probiotic)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นถึงความสำคัญของการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกจากผลเชอร์รี่เปรี้ยว ที่มีประโยชน์มากมายตามที่กล่าวข้างต้น ซึ่งการหมักดองโดยอาศัยกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกนั้นจะสามารถควบคุมปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นในกระบวนการหมักดอง ลดระยะเวลา ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความสม่ำเสมอ รวมทั้งยังสามารถผลิตเอ็นไซม์ย่อยธาตุอาหารหลัก (macronutrient) และผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารในระหว่างกระบวนการหมักได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการคัดแยกกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้หมักดองในกระบวนการผลิตเชอร์รี่เปรี้ยวหมักเสริมสุขภาพ ให้มีคุณภาพและความปลอดภัย ตลอดจนสามารถนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อผลิตเชอร์รี่เปรี้ยวดองด้วยกล้าเชื้อบริสุทธิ์
2) เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก
3) เพื่อศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง
4) เพื่อทราบปัจจัยในกระบวนการผลิตที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

ขอบเขตของการวิจัย

นำผลเชอร์รี่เปรี้ยว (*Malpighia glabra* L.) ไปคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก ที่มีคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อและมีความเป็นโปรไบโอติก นั่นคือคุณสมบัติ acid tolerance bile tolerance hydrophobicity assay และ antibacterial activity โดยมีการทดสอบหาการเจริญเติบโต (growth curve) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม รวมถึงทดสอบภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 5-10%(w/v) และทดสอบความสามารถในการผลิตสารเมทาบอไลท์ ได้แก่ เอนไซม์ และแบคเทอริโอซิน และนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ที่เหมาะสมที่สุดในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์หมักดองไปใช้ในกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยวในน้ำเกลือเข้มข้น 7%(w/v) และติดตามคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางด้านกายภาพ จุลินทรีย์และเคมี รวมถึงวิเคราะห์องค์ประกอบหรือสารพฤกษเคมี (Phytochemicals) ของผลเชอร์รี่เปรี้ยวที่ผ่านการดอง ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ แอนโทไซยานิน และปริมาณวิตามินซี

ข้อตกลงเบื้องต้น

ไม่มี

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1) นักวิชาการที่ทำวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทผักและผลไม้
2) กลุ่มประชากรเป้าหมายที่ผลิตอาหารหมักดอง
3) กลุ่มผู้บริโภคอาหารหมักดอง

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองจากผักและผลไม้ มีอยู่หลากหลาย โดยแต่ละประเทศจะมีกรรมวิธีในการหมักดองแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่มีในแต่ละท้องถิ่นและวัฒนธรรมการบริโภค ทำให้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีลักษณะเฉพาะตัว ผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ดอง (pickled fruit and vegetables) เป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักกรดแล็กติก (lactic acid fermentation) จากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีอยู่ในผักผลไม้ชนิดนั้นๆ ซึ่งในกระบวนการหมักดองผักหรือผลไม้ จะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนน้ำตาลในผลไม้และในน้ำเกลือไปเป็นกรดแล็กติกซึ่งทำหน้าที่เป็นสารกันเสียหรือสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage bacteria) และที่ก่อโรคในอาหาร (pathogenic bacteria) รวมทั้งสารอินทรีย์อื่นๆ ที่เกิดขึ้นที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่นและรสชาติของผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้การหมักดองยังสามารถยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร กำจัดสารต้านโภชนาการ (antinutrient) ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีน กรดอะมิโนและกรดไขมันจำเป็น วิตามินที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ไทอะมิน ไรโบฟลาวิน ไนอะซิน เป็นต้น รวมถึงช่วยปรับปรุงเรื่องการย่อย (digestibility) (Karovicova and Kohajdova, 2003) และมีรายงานการวิจัยพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกบางสายพันธุ์เป็นโปรไบโอติก (probiotic) ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายคือช่วยปรับสมดุลและส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ (Deegan, Cotter, Hill and Ross, 2006) นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้ จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีความสำคัญต่อการแปรรูปหมักดองผักผลไม้ทางด้านกายภาพ ยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย และส่งผลดีต่อสุขภาพลำไส้ของผู้บริโภค ดังจะเห็นได้จากตารางที่ 1 แสดงกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีความเกี่ยวข้องในการหมักดองผักและผลไม้ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* *Lactobacillus brevis* *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus pentasaceus* เป็นต้น จะสังเกตได้ว่ามีความหลากหลายทางสปีชีส์ ขึ้นอยู่กับชนิดของผักผลไม้ที่นำมาใช้ในการแปรรูป อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือหรือส่วนผสมอื่นๆ ที่นำมาใช้ร่วมกับกระบวนการหมักดอง ซึ่งจะเป็นปัจจัยสำคัญที่บ่งบอกถึงแบคทีเรียกรดแล็กติกและลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งกรรมวิธีในการดองผลไม้ที่เกิดจากการหมักโดยแบคทีเรีย-กรดแล็กติก แบ่งออกเป็น 3 ประเภท

ประเภทของการหมักผักและผลไม้

1) การดองด้วยเกลือแห้ง (dry salted pickles)

เกลือที่ใช้ควรเป็นเกลือทะเลในรูปของเม็ดหรือผงก็ได้ เมื่อผักผลไม้ซึ่งเป็นวัตถุดิบถูกผสมกับเกลือแห้ง เกลือจะทำหน้าที่สกัดน้ำออกมาจากวัตถุดิบ นอกจากนี้น้ำหนักของวัตถุดิบจะเป็นตัวกดทับชั้นของวัตถุดิบให้อยู่ในน้ำเกลือ หลังจากนั้นกระบวนการหมักจะเริ่มขึ้นและพบฟองอากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปนิยมใช้เกลือประมาณร้อยละ 3-5 และใช้เวลาในการหมักดองประมาณ 8-20 วัน โดยขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของผักผลไม้ รวมถึงอุณหภูมิห้องที่ใช้บ่ม การหมักจะเสร็จสมบูรณ์เมื่อไม่พบฟองอากาศเกิดขึ้น หลังจากนั้นจะสามารถบรรจุผักผลไม้ดองที่ดองด้วยวิธีนี้ร่วมกับ น้ำส้ม เครื่องเทศ และน้ำมัน เป็นต้น ซึ่งผักและผลไม้ดองที่นิยมนำมาดองด้วยวิธีนี้ ได้แก่ กะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) แตงกวา (cucumber) ผักกาด (mustard leaf) ทุเรียน (durian) ไลม์ (lime) เป็นต้น

2) การดองด้วยน้ำเกลือ (Brined fruit and vegetable pickles)

การหมักดองโดยใช้น้ำเกลือนิยมใช้กับผักผลไม้ที่มีความชื้นน้อย โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำเกลือแตกต่างกันไปตามแต่ละผลิตภัณฑ์ เช่น แตงกวาดองใช้น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 5-8 (Maki, 2004) สำหรับมะกอกเขียว มะเขือยาว กะหล่ำปลี ขิง กระเทียม และมะม่วงใช้ความเข้มข้นของน้ำเกลือร้อยละ 6 (Ballesteros et al., 1999; Kacem and Karam, 2006; Tanganurat, Quinquis, Leelawatcharamas and Bolotin, 2009) โดยปกติผักและผลไม้ดองที่ดองแบบธรรมชาติเพื่อให้เกิดกรดแล็กติกมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำเกลือไม่เกินร้อยละ 8 เมื่อวัตถุดิบถูกจุ่มลงไปในน้ำเกลือ น้ำเกลือจะทำหน้าที่สกัดน้ำตาลออกมาจากผักและผลไม้โดยอาศัยหลักการออสโมติก การหมักจะเริ่มเกิดขึ้น แบคทีเรียกรดแล็กติกจะเริ่มเจริญใช้น้ำตาลที่ละลายอยู่ในน้ำเกลือ เพื่อผลิตกรดและสารชนิดต่างๆ มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด–ด่างลดลง และวัตถุดิบจะเริ่มอ่อนตัวลงภายใน 24 ชั่วโมง ผักและผลไม้ที่นิยมนำมาดองด้วยวิธีนี้ เช่น มะม่วง (Mango) ไลม์ (Lime) มะกอกเขียว (Green olive) มะกอกดำ (Black olive) ขนุน (Jackfruit) หัวไชเท้า (Radish) แตงกวา (Cucumber) หน่อไม้ (Bamboo shoot) หอมแดง (Red onion) และ กะหล่ำปลี (Cabbage) เป็นต้น

3. การดองแบบไม่เติมเกลือ (Non salted lactic acid bacteria product)

กระบวนการหมักดองจะเกิดขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก จะมีการผลิตกรดแล็กติกทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลง เกิดสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เจริญเติบโตไม่ได้ อาหารหมักดองด้วยวิธีการนี้ ได้แก่ Gundruk และ Sinki เป็นต้น

ตารางที่ 1 : กลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักดองผักและผลไม้

Sauerkraut	Kimchi	Pickles	Olives
Leuconostoc mesenteroides	*Leuconostoc mesenteroides*	*Leuconostoc mesenteroides*	*Leuconostoc mesenteroides*
Leuconostoc fallax	*Leuconostoc kimchii*	*Lactobacillus plantarum*	*Lactobacillus plantarum*
Lactobacillus plantarum	*Leuconostoc gelidum*	*Lactobacillus brevis*	*Lactobacillus brevis*
Lactobacillus brevis	*Leuconostoc inhae*	*Pediococcus pentasaceus*	
Pediococcus pentasaceus	*Leuconostoc citreum*		
	Lactobacillus plantarum		
	Lactobacillus brevis		
	Lactococcus lactis		
	Weissella kimchii		

ที่มา : Hutkins (2006)

จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกมีความสำคัญในกระบวนการหมักดองแล้วยังมีผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร ด้วยธรรมชาติของการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์นี้ เป็นข้อดีที่สามารถหลีกเลี่ยงการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมีหรือสารสังเคราะห์ที่อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งได้มากและมีประสิทธิภาพจึงเป็นที่สนใจ โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งส่วนใหญ่ปนเปื้อนมาจากผลิตผลทางการเกษตร ได้มีการพัฒนาการใช้ประโยชน์เพื่อเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักดองผักผลไม้ดองมาจนถึงปัจจุบัน

ดังนั้นการปรับปรุงเทคนิคการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักดองส่งผลให้เกิดการพัฒนากระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีคุณภาพและเก็บรักษาได้นานขึ้น บทบาทและกิจกรรมหลักของแบคทีเรียกรดแล็กติกต่อผลิตภัณฑ์อาหารคือ เปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ ขณะเดียวกันมีการสร้างสารต่อต้านสารจุลินทรีย์ เช่น แบคเทอริโอซิน ในปริมาณและประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ประโยชน์ของคุณสมบัติกล้าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในด้านการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์หรือด้านความปลอดภัยของอาหาร ทำให้อุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักโดยใช้กล้าเชื้อขยายวงกว้างและมีการแข่งขันสูง การใช้กล้าเชื้อต้องเป็นไปตามข้อกำหนด กล่าวคือต้องเป็นกล้าเชื้อที่บริสุทธิ์ไม่เป็นพิษ ไม่ทำให้เกิดโรคที่มาจากอาหาร หรือผลิตสารพิษที่ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ กล้าเชื้อที่ดีต้องมีกิจกรรมการหมักที่ดี เช่น การสร้างกรดซึ่งมีผลต่อกลิ่นรส มีผลต่อสีต่างๆ ที่ต้องการ มีความคงตัวของผลิตภัณฑ์สูง มีคุณสมบัติที่ทนต่อ bacteriophage และไม่สร้างสารที่มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการหมัก โดยคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแล็กติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่ต้องการอากาศ ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่ามีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่าง ลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และการผลิตกรดแล็กติก เจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียกรดแล็กติกมีทั้งหมด 12 Genera โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับการหมักดองอาหารมีอยู่ 7 สกุล จากทั้งหมด 12 สกุล ได้แก่ *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* และ *Lactobacillus* (เอกสารการสอนรายวิชาเทคโนโลยีอาหารหมักดอง โดย ผศ.ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มนี้ยังมักจะถูกพบว่าเป็นโปรไบโอติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายในด้านการป้องกันการเกิดโรคและอาการต่างๆ (Katja et al., 2006) เช่น กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะโปรไบโอติกสายพันธุ์ Lactic Acid Bacteria (LAB) ให้ผลดีในการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะ โรคท้องร่วง พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* GG สามารถป้องกันหรือบรรเทาอาการท้องร่วงในเด็กซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสโรตาได้ โรคลำไส้อักเสบ พบว่าโปรไบโอติกสามารถช่วยบรรเทาอาการอักเสบหลังการผ่าตัด ช่วยรักษาอาการเปื่อยของแผลในลำไส้และรักษาโรคลำไส้ อักเสบเรื้อรัง (Crohn 's Disease) และพบว่าสามารถป้องกันฟันผุพบว่าเด็กเล็กที่ดื่มนมที่มีส่วนผสมของ *Lactobacillus rhammosus* GG (LGG) มีปัญหาฟันผุที่น้อยลง (Goldin and Barry R., 2011)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าผลิตภัณฑ์ผักผลไม้ดองด้วยน้ำเกลือต้องอาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแล็กติกในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ ดังนั้นชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกและความเข้มข้นของเกลือที่เลือกใช้ รวมถึงอุณหภูมิและระยะเวลาในการหมักดอง จะขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่จะนำมาแปรรูปด้วย ซึ่งในท้องตลาดของไทยผลิตภัณฑ์ดองส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของผักผลไม้ เช่น ผักกาดดอง กะหล่ำปลีดอง มะดันดอง มะกอกดอง มะม่วงดอง มะนาวดอง เป็นต้น นอกจากวัตถุดิบข้างต้นแล้วผลไม้ไทย เช่น เชอร์รี่เปรี้ยวเป็นหนึ่งในผลไม้ที่อุดมด้วยคุณประโยชน์ แต่เป็นที่นิยมบริโภคน้อย หากนำมาแปรรูปด้วยการดองนอกจากจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาแล้วยังได้ประโยชน์ต่อการส่งเสริมสุขภาพอีกด้วย

เชอร์รี่เปรี้ยว (*Malpighia glabra* L.)

เชอร์รี่เปรี้ยว หรือ เชอร์รี่ไทย ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Malpighia glabra* L. อยู่ในวงศ์ *Malpighiaceae* เป็นพันธุ์ที่สามารถปลูกและเจริญได้ในเขตร้อน ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้พุ่มแตกกิ่งก้าน หรือไม้ยืนต้นไม่ทิ้งใบ ทรงพุ่มขนาดเล็กมีความสูงประมาณ 2-5 เมตร ชอบดินร่วนที่มีการระบายน้ำดี แสงแดดจัด สภาพอากาศร้อนชื้นทรงต้นไม่ใหญ่และกิ่งก้านเหนียว ออกดอกเป็นช่อ 3-5 ดอกต่อช่อ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.3 เซนติเมตร กลีบดอก 5 กลีบ ที่มีทั้งก้านเกสรตัวผู้และตัวเมีย อยู่ชิดติดกัน มีการผสมตัวเอง ผลจะแก่เก็บเกี่ยวได้หลังดอกบาน 3-4 สัปดาห์ ลักษณะผลมีรูปร่างเป็น 3 พู เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5 เซนติเมตร ผลสุกมีสีแดงหรือแดงปนเหลือง ส่วนเนื้อผลจะมีสีเหลือง ผลจะมีปริมาณวิตามินซีสูงสุดชนิดหนึ่ง โดยสูงกว่าส้มถึง 30-80 เท่า และการสะสมวิตามินซีสูงสุดหลังดอกบาน 16-18 วัน ถ้าผลสุกเต็มที่ปริมาณวิตามินซีจะต่ำลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และถ้าหลังการเก็บเกี่ยว ปล่อยให้ผลตากแดดเป็นเวลานานเกิน 4 ชั่วโมง ก็มีผลทำให้วิตามินซีในผลลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับประโยชน์คุณค่าทางโภชนาการของผลเชอรี่เปรี้ยว พบว่าเป็นผลไม้ที่มีวิตามินซีปริมาณ 2,000 มิลลิกรัม/100 กรัม (กองโภชนาการ กรมอนามัย, 2530) เป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลต่างๆ เช่น chlorogenic acid ferulic acid gallic acid caffeic acid p-coumaric acid salicylic acid tannic acid และ *trans*-cinnamic acid ซึ่งมีความสามารถในการเป็น antimicrobial (Chen & Chung, 2000; Chrzanowski et al., 2007; Kim & Padilla-Zakour, 2004; Kim et al., 2005; Pigeon et al., 2010) แอนโทไซยานิน (anthocyanins) ที่พบในเชอรี่เปรี้ยวเป็นสารประกอบฟีนอลิคที่เรียกว่า flavonoids มีอยู่หลายประเภท ได้แก่ cyaniding 3-sophoroside, cyanidin 3-glucosylrutinoside, cyanidin 3-glucoside และ cyanidin 3-rutinoside แล้วยังพบ cyanidin 3-arabinosylrutinoside, pelargonidin 3-glucoside และ peonidin 3-rutinoside (Kirakosyan et al., 2010 ;Kim et al., 2005) นอกจากนี้ flavonoids ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli P.vulgaris Pseudomonas aeruginosa* และ *Klebsiella pneumoniae* (Bylka, Matlawska & Pilewski, 2004; Piccolella et al., 2008; Rauna et al ., 2000; Tural & Koca, 2008) นอกจากคุณสมบัติเป็น antioxidant แล้ว ฟีนอลิคยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย ได้แก่ antiallergic anticarcinogenic antimicrobial antimutagenic และ anti-inflammatory (Kim et al., 2005; Pedisic et al., 2007; Kuehl et al., 2010) นอกจากประโยชน์ข้างต้นแล้วสาระสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในเชอร์รี่ยังส่งผลดีต่อสุขภาพ โดยมีวิตามินซีช่วยในการเจริญเติบโตของเด็กในการสร้างมวลกระดูก การเจริญเติบโตของฟันและผิวหนัง โดยพบว่าบทบาทที่สำคัญของวิตามินซีคือ ส่งเสริมการสังเคราะห์เส้นใยคอลลาเจน ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์กระดูก และฟัน รวมทั้งเซลล์ผิวหนัง วิตามินซีช่วยในการสมานตัวของแผล ลดความเครียดเสริมภูมิคุ้มกันของร่างกายป้องกันการติดเชื้อได้ง่าย และช่วยป้องกัน ลดความรุนแรงของไข้หวัด ต่อต้านสารอนุมูลอิสระที่อาจเกิดขึ้นได้จากการได้รับสารอนุมูลอิสระที่มาจากมลพิษต่างๆ เช่น ควันบุหรี่ ควันพิษ ไอเสียรถยนต์ เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีสารเคมีอื่นที่เป็นประโยชน์ที่มีอยู่ในผลเชอร์รี่เปรี้ยว ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 : สารเคมีและองค์ประกอบที่พบในสารสกัดจากผลเชอร์รี่เปรี้ยว

สารพฤกษเคมี	คุณประโยชน์ต่อร่างกาย
วิตามินซี	ช่วยในการเจริญเติบโต และเสริมพัฒนาการของกระดูก และฟันในเด็ก ลดอาการของโรคภูมิแพ้ และ โรคติดเชื้อบริเวณปอด
กลุ่มวิตามินบี เช่น บี1 และ บี2	ช่วยเสริมสร้างระบบประสาท
เบต้าแคโรทีน	ช่วยพัฒนาสายตา และเสริมสร้างด้านการมองเห็น
ฟลาโวนอยด์ เทอร์ปีนอยด์	ต่อต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย เสริมฤทธิ์เอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่ปกป้องร่างกายจากอนุมูลอิสระ
เหล็ก	เสริมสร้างระบบเลือด
แคลเซียม และ ฟอสฟอรัส	ช่วยเสริมสร้างพัฒนาการกระดูก และฟัน

ที่มา : ข่าวสารเกษตรศาสตร์ ปีที่ 52 ฉบับที่ 1 ปี 2550

วิธีเก็บรวบรวมข้อมูล

ตอนที่ 1 การคัดเลือกกล้าเชื้อ

1. การคัดแยกกล้าเชื้อจากผลเชอร์รี่เปรี้ยว (*Malpighia glabra* L.)

คัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกในผลเชอร์รี่เปรี้ยว (*Malpinghia glabra* L.) โดยการชั่งผลเชอร์รี่เปรี้ยว 25 กรัม ใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 %(w/v) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีบดด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่าง (stomacher) จะได้เชอร์รี่เปรี้ยวที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางสิบเท่าเป็นลำดับ (10-fold dilution) ให้ลดลง จนได้ระดับความเจือจางประมาณ 10^{-5} ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 1.0 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ผสมแคลเซียม-คาร์บอเนต ความเข้มข้น 1 %(w/v) หมุนจานเพาะเชื้อไปมาให้ตัวอย่างเข้ากันดีกับอาหารเลี้ยงเชื้อตามเทคนิค pour plates ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ใน candle jar ตรวจนับโคโลนีในระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 CFU/plate (ASTM, D5465-93 (1998)) เลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน 3 -5 โคโลนี นำไปแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง MRS ด้วยเทคนิค streak plat เก็บไอโซเลทบริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ใน MRS agar slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองในลำดับต่อไป

2. การศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

2.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระจกสไลด์ เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวให้กระจายบนหยดน้ำกลั่นเป็นฟิล์มบางๆ ทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ผ่านเปลวไฟโดยหงายด้านที่มีเชื้อขึ้น ผ่านด้านล่างของสไลด์ไปมาเหนือเปลวไฟ 2-3 ครั้ง แล้วย้อมด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเลตเป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 %(v/v) เพื่อล้างสีของคริสตัลไวโอเลตให้หลุดออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากหยดสารละลายซาฟรานินโอ ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสีแกรม ดูลักษณะเซลล์และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยลักษณะของแบคทีเรียกรดแล็กติกจะติดสีแกรมบวกรูปร่างเป็นท่อนยาว ท่อนสั้นหรือกลมหรือเกาะกันเป็นสายยาว

2.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase test)

เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมาวางบนสไลด์ หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 %(v/v) ลงบนเชื้อ สังเกตการณ์เกิดฟองแก๊สภายในเวลา 1 นาที ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมการทดลอง ถ้าเกิดฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ แต่ถ้าไม่เกิดฟองแก๊สแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสเลสได้ (catalase negative)

2.3 การทดสอบออกซิเดชั่นและเฟอร์เมนเตชั่นน้ำตาลกลูโคส (O/F test)

เขี่ยเชื้อซึ่งเป็นโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ แล้วแทง (stab) ลงในอาหาร Hugh Leifson medium แบบตั้งตรง จำนวน 2 หลอด ต่อ 1 ไอโซเลต โดย 1 หลอดจะถูกปิดผิวหน้าหลอดด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าทั้งหลอดที่ปิดและไม่ได้ปิดทับด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเกิดการหมักน้ำตาลขึ้น ให้ผลเป็นบวก

3. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

นำไอโซเลต ที่ผ่านการทดสอบการติดสีแกรมและการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์แล้วไปทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *B. cereus* TISTR 687 *S. aureus* TISTR 118 *E. coli* TISTR 780 และ *Salmonella* sp. ด้วยวิธี Agar well diffusion

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบ

เลี้ยงเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 *S. aureus* TISTR 118 *E. coli* TISTR 780 และ *Salmonella* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Muller Hinton บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 %(w/v) แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ Standard McFarland No. 1 เทียบเท่ากับปริมาณเซลล์ประมาณ $3x10^8$ CFU/ml เพื่อใช้สำหรับศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินจากไอโซเลตที่คัดกรองได้

3.2 การเตรียมสารแบคเทอริโอซินแบบหยาบจากไอโซเลทที่คัดกรองได้

เลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่คัดกรองได้ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar แยกส่วนใสด้วยวิธีการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3 การทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซินด้วยวิธี Agar well diffusion

เติมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ ได้แก่ *B. cereus* TISTR 687 *S. aureus* TISTR 118 *E. coli* TISTR 780 และ *Salmonella* sp. ในความเข้มข้น 1 %(v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Muller Hinton ที่หลอมละลาย เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100x15 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค pour plate แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยที่เจาะหลุมวุ้น (cork borer) โดยช่องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยดส่วนใส MRS ที่ได้จากการเลี้ยงไอโซเลตปริมาตร 40 µl ลงหลุม บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 4 ชนิด โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ (diameter of inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

4. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยใช้ loop เขี่ย single colony ใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 10 ml ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในcandle jar แยกส่วนใสด้วยวิธีการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสปริมาตร 40 µl หยดลงหลุมอาหารแข็งที่เจาะด้วยที่เจาะหลุมวุ้น (cork borer) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ amylase cellulase protease และ pectinase (อาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์ ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลายไอโอดีนเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดกรองการผลิตเอนไซม์ amylase cellulase และ pectinase เกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้นาน 5 นาที วัดขนาดส่วนใส (clear zone) ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละไอโซเลตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ swab โคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ให้ได้เซลล์ปริมาณมากใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงถ่ายสารละลายเซลล์จากหลอดนี้ด้วยปริมาตรที่แน่นอน (n) ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร (หลอดที่ 2) นี้มีความขุ่นเทียบกับ McFarland เบอร์ 2 ผสมกันจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 2n ใส่ลงใน API 50 CHL medium แล้วผสมให้เข้ากัน ใส่ API 50 CHL medium ที่มีเชื้อผสมอยู่ลงใน API 50 CH strips แต่ละหลุม ปิดทับผิวหน้าของแต่ละหลุมด้วยน้ำมันมิเนอรอล (mineral oil) นำ API kits บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และติดตามการเกิดปฏิกิริยาหลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API WEB (BIOMERIEUX) โดยถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง คือ ให้ผลเป็นบวก ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง คือ ให้ผลเป็นลบ ยกเว้นหลุมที่ 25 ที่จะให้ผลเป็นบวกเมื่อเปลี่ยนเป็นสีดำ

6. การศึกษาการเจริญและกิจกรรมของกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และความเป็นกรดสูง

6.1 การเตรียมเชื้อ NCR-7 และ NCR-12

นำเชื้อจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS broth บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%(w/v) โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วย McFarland standard No. 1 ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 CFU/ml เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

6.2 การศึกษาการเจริญ การผลิตเอนไซม์ และการผลิตแบคเทอริโอซินของ NCR-7 และ NCR-12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 6.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน MRS broth ที่มีการเติมเกลือ NaCl ปริมาณ 5 6 7 8 9 และ 10 %(w/v) รวมถึง MRS broth ที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นที่ 2 4 และ 6 ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (CFU/ml) ด้วยวิธี spread plate บน MRS agar วัดค่า pH การผลิตเอนไซม์ และการผลิตแบคเทอริโอซินที่ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 6 12 18 24 36 และ 48 ชั่วโมง

6.3 การเตรียมสารแบคเทอริโอซินแบบหยาบจากไอโซเลท

เลี้ยงแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่คัดกรองได้ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar จากนั้นแยกส่วนใสด้วยวิธีการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6.4 การทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซินด้วยวิธี Agar well diffusion

ใส่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคทดสอบ ได้แก่ *E. coli* TISTR 780 และ *Salmonella* sp. ในความเข้มข้น 1 %(v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Muller Hinton ที่หลอมละลาย เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100x15 มิลลิเมตร ผสมให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค pour plate แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว หลังจากนั้นเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยที่เจาะหลุมวุ้น (cork borer) โดยช่องมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยดส่วนใส MRS ที่ได้จากการเลี้ยงไอโซเลตปริมาตร 40 µl ลงหลุม บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ (diameter of inhibition zone) ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

6.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก

แยกส่วนใส MRS broth ที่ได้จากการเลี้ยงในแต่ละไอโซเลต ด้วยวิธีการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วปิเปตส่วนใสปริมาตร 40 µl หยดลงหลุมอาหารแข็งที่เจาะด้วยที่เจาะหลุมวุ้น (cork borer) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ protease และ cellulase จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไอโอดีนเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดกรองการผลิตเอนไซม์ cellulase เกลี่ยให้ทั่วทิ้งไว้นาน 5 นาที หลังจากนั้นวัดขนาดส่วนใส (clear zone) ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

7 การทดสอบความเป็น โปรไบโอติก

7.1 การเตรียมเชื้อ NCR-7 และ NCR-12

นำเชื้อจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS broth บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%(w/v) โดยปรับความหนาแน่นของเซลล์ด้วย McFarland standard No. 1 ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 CFU/ml เพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

7.2 Acid tolerance test

นำเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน MRS broth ที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นที่ 2 4 และ 6 ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (CFU/ml) ด้วยวิธี spread plate บน MRS agar ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 6 และ 24 ชั่วโมง

7.3 Bile tolerance test

นำเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน MRS broth ที่มีการเติม Bile salt (Oxgall, Fluka) ปริมาณ 0.3 0.5 และ 1.0 %(w/v) ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง บ่มใน candle jar ที่

อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก (CFU/ml) ด้วยวิธี spread plate บน MRS agar ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0 6 และ 24 ชั่วโมง

7.4 Hydrophobicity Assay

นำเชื้อที่เตรียมได้มาปรับความขุ่นด้วย 0.85 %NaCl ให้มีค่า O.D. ในช่วง 0.8-1.0 (A_0) โดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร จากนั้นเติมสารแขวนลอยเชื้อปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติม n-hexadecane ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้สารผสมเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จนเกิดการแยกชั้นระหว่างเฟสสองเฟส วัดค่า O.D. เฟสที่เป็นเนื้อเดียวกัน ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (A) คำนวณ cell surface hydrophobicity (%H) ด้วยสูตร [(A_0– A)/A_0) x 100]

ตอนที่ 2 การผลิตผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง

1. การดองเชอร์รี่เปรี้ยวแบบไม่เติมกล้าเชื้อ (conventional method)

ดองผลเชอร์รี่เปรี้ยว (*Malpighia glabra* L.) ในน้ำเกลือความเข้มข้น 7 %(w/v) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจคุณภาพทางเคมี และทางจุลชีววิทยา ณ ช่วงเวลาเริ่มต้น (0 hour) วันที่ 7 และวันที่ 14

2. การดองเชอร์รี่เปรี้ยวแบบเติมกล้าเชื้อ

ดองผลเชอร์รี่เปรี้ยว (*Malpighia glabra* L.) ในน้ำเกลือความเข้มข้น 7 %(w/v) โดยมีการเติมกล้าเชื้อ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วทำการตรวจคุณภาพทางเคมี และทางจุลชีววิทยา ณ ช่วงเวลาเริ่มต้น (0 hour) วันที่ 7 และวันที่ 14

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง

1. คุณภาพทางเคมี

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu

ทำการเจือจางตัวอย่างเชอร์รี่ดอง 100 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 เท่าในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (เพื่อใช้ตลอดการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี) ดูดสารที่ได้จากการเจือจาง 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1.58 มิลลิลิตร และ Folin reagent 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม Na_2CO_3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยควบคุมไม่ให้สัมผัสแสง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ปริมาณฟีนอลสามารถวัดเทียบได้กับสารมาตรฐานโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg GAE/g sample; GAE = Gallic acid Equivalent)

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu

ปิเปตตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร และเติม 5% $NaNO_2$ 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) 5 นาที หลังจากนั้นเติม 10 % ($AlCl_3$) 150 µl 1 M NaOH 0.5 ml และเติมน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ปริมาณ Flavonoids

สามารถวัดเทียบได้กับสารมาตรฐาน โดยใช้ Catechin เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg CTC/g sample; CTC = Catechin)

1.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity)

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

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม

เตรียมสารละลายโปตัสเซียมคลอดไรด์ 0.025 M ที่ pH 1.0 โดยละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัม ในน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร วัดค่า pH และปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้ pH 1.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และเตรียมสารละลายโซเดียมอะซีเตต 0.4 M ที่ pH 4.5 โดยละลายโซเดียมอะซีเตต 54.43 กรัม ในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร วัด pH และปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้ pH 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ชุดแรกนำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ละลายในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตร ที่ pH 1.0 ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที อีกชุดหนึ่งให้นำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ละลายในสารละลายโซเดียมอะซีเตต 5 มิลลิลิตร ที่ pH 4.5 ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่น แล้วคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน (Wrolstad et al., 2005)

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี (AOAC Method, 967.21)

ปิเปตสารละลายผสมของ Metaphosphoric acid และ Acetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการไทเทรตตัวอย่างกับสารละลาย Indophenol จนถึงจุดยุติสีชมพู อ่านค่าปริมาตร Indophenol ที่ใช้ไป แล้วคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอบิกในตัวอย่างด้วยสูตร ในกรณีการทำ blank จะปิเปตสารละลายผสมของ Metaphosphoric acid และ Acetic acid ปริมาตร 7 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วทำการไทเทรตกับสารละลาย Indophenol จนถึงจุดยุติสีชมพู อ่านค่าปริมาตร Indophenol ที่ใช้ไป แล้วคำนวณหักลบ Blank

2. คุณภาพทางจุลชีววิทยา

2.1 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count; TPC)

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

2.2 การตรวจวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacterial; LAB)

ชั่งตัวอย่างเชอร์รี่ดอง 25 กรัม ละลายและปั่นในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 %(w/v) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีบดด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่าง (stomacher) จะได้ตัวอย่างเชอร์รี่ดองที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับให้ลดลงทีละสิบเท่า (10-fold dilution) จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 1.0 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS หมุนจานเพาะเชื้อไปมาให้ตัวอย่างเข้ากันดีกับอาหารเลี้ยงเชื้อตามเทคนิค pour plates ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ใน candle jar ตรวจนับโคโลนีในระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 CFU/plate (ASTM, D5465-93 (1998))

2.3 **การตรวจวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา**

ชั่งตัวอย่างเชอร์รี่ดอง 25 กรัม ละลายและปั่นในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 %(w/v) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีบดด้วยเครื่องตีผสมตัวอย่าง (stomacher) จะได้ตัวอย่างเชอร์รี่ดองที่มีความเจือจางในระดับ 10^{-1} และทำการเจือจางเป็นลำดับให้ลดลงทีละสิบเท่า (10-fold dilution) จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่มีการเติม 10 % tartaric acid จากนั้นเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีในระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 CFU/plate (FDA Bacterial Analytical Manual; BAM Edition 8, Revision A /1998)

การออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และนำข้อมูลทั้งหมดของการวิจัยมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนโดย ANOVA และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple RangeTest (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16 (SPSS Inc., Illinois, USA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การคัดเลือกล้าเชื้อ และคุณสมบัติของกล้าเชื้อ

1. การคัดแยกกล้าเชื้อจากผลเซอร์รี่เปรี้ยว การจำแนกชนิดของกล้าเชื้อ และการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

ผลการศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria; LAB) จากผลเซอร์รี่เปรี้ยว (*Malpighia glabra* L.) ที่เป็นผลสด จำนวน 12 ไอโซเลท จากข้อมูลในตารางที่ 3 เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่าแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลทติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง (คิดเป็นร้อยละ 100) และการจำแนกคุณสมบัติของเชื้อที่แยกได้ตามคุณลักษณะทางชีวเคมี พบว่าได้ผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) เป็นบวก คิดเป็นร้อยละ 83.33 (จำนวน 10 ไอโซเลท) และมีผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสเป็นลบ คิดเป็นร้อยละ 6.67 (จำนวน 2 ไอโซเลท) ได้แก่ NCR-7 และ NCR-12 แสดงถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ไม่มีการสร้างเอ็นไซม์คาตาเลส จากการทดสอบการใช้น้ำตาล (O/F test) พบว่า NCR-7 เกิดออกซิเดชั่นและหมักน้ำตาลกลูโคสได้ ส่วน NCR-12 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ในกรณีที่ไอโซเลทอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ผลการทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *Bacillus cereus* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. พบว่าทั้ง NCR-7 และ NCR-12 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. ได้ โดย NCR-7 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ในการยับยั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. เท่ากับ 8.0±0.00 และ 9.5±0.00 ตามลำดับ ส่วน NCR-12 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) ในการยับยั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. เท่ากับ 6.4±0.00 และ 7.0±0.00 ตามลำดับ และเมื่อนำทั้ง 2 ไอโซเลทไปทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ amylase protease cellulase และ pectinase พบว่าทั้ง NCR-7 และ NCR-12 สามารถแสดงกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ protease เท่ากับ 9.5±0.00 และ 9.3±0.00 ตามลำดับ รวมถึงแสดงกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ cellulase เท่ากับ 7.0±0.00 และ 6.7±0.00 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 : ผลการทดสอบไอโซเลทจากผลเชอร์รี่เปรี้ยวสด

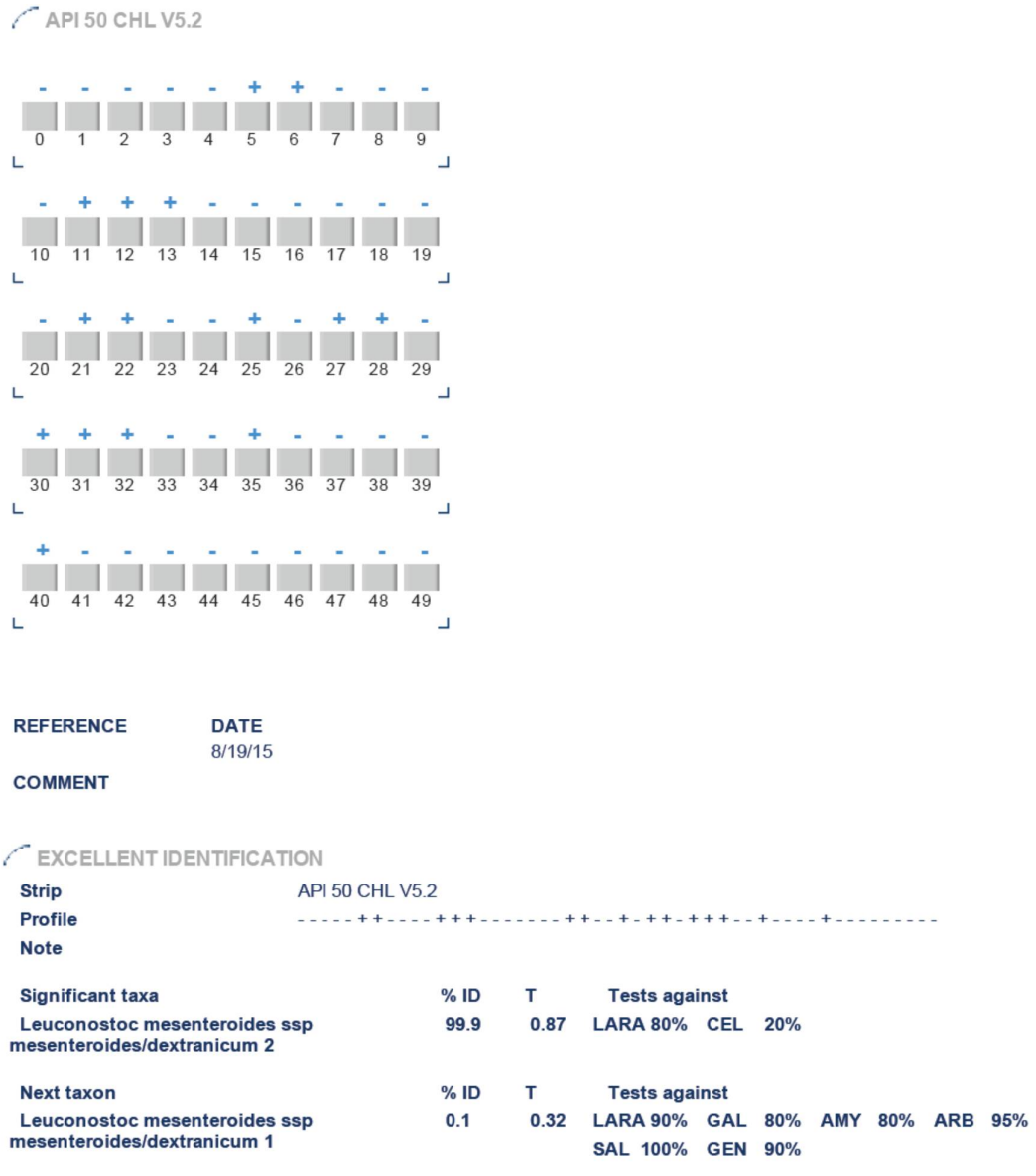
Isolate No.	Gram/Shape	Catalase test	O/F test	Antimicrobial production (clear zone; mm)				Enzyme production (clear zone; mm)			
				B. cereus	*S. aureus*	*E. coli*	*Salmonella* sp.	Amy	Pro	Cell	Pec
NCR-1	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-2	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-3	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-4	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-5	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-6	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-7	+/rod	-	+/+ fermentation	ND	ND	8.0±0.00	9.5±0.00	ND	9.5±0.00	7±0.00	ND
NCR-8	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-9	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-10	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-11	+/rod	+	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
NCR-12	+/rod	-	-/+ fermentation	ND	ND	6.4±0.00	7.0±0.00	ND	9.3±0.00	6.7±0.00	ND

หมายเหตุ : Amy หมายถึง amylase Pro หมายถึง protease Cell หมายถึง cellulase และ Pec หมายถึง pectinase

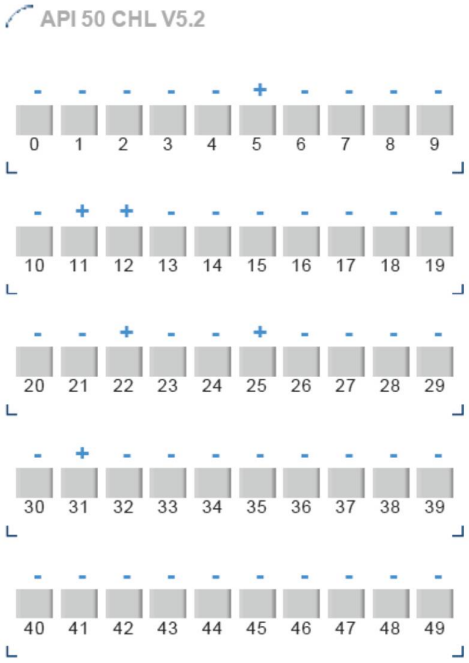
NE หมายถึง not examined (ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์)

ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวภาพข้างต้น พบว่าทั้ง 12 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากผลเซอร์รี่เปรี้ยว มีเพียง 2 ไอโซเลท ได้แก่ NCR-7 และ NCR-12 เท่านั้นที่แสดงคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นที่จัดว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม LAB และมีคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อ นอกจากนั้นยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ได้อีกด้วย และเมื่อนำทั้ง 2 ไอโซเลท ไปทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ผลการทดสอบจากรูปที่ 1 พบว่า NCR-7 มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* ร้อยละ 99.90 และจากรูปที่ 2 พบว่า NCR-12 มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ร้อยละ 99.90



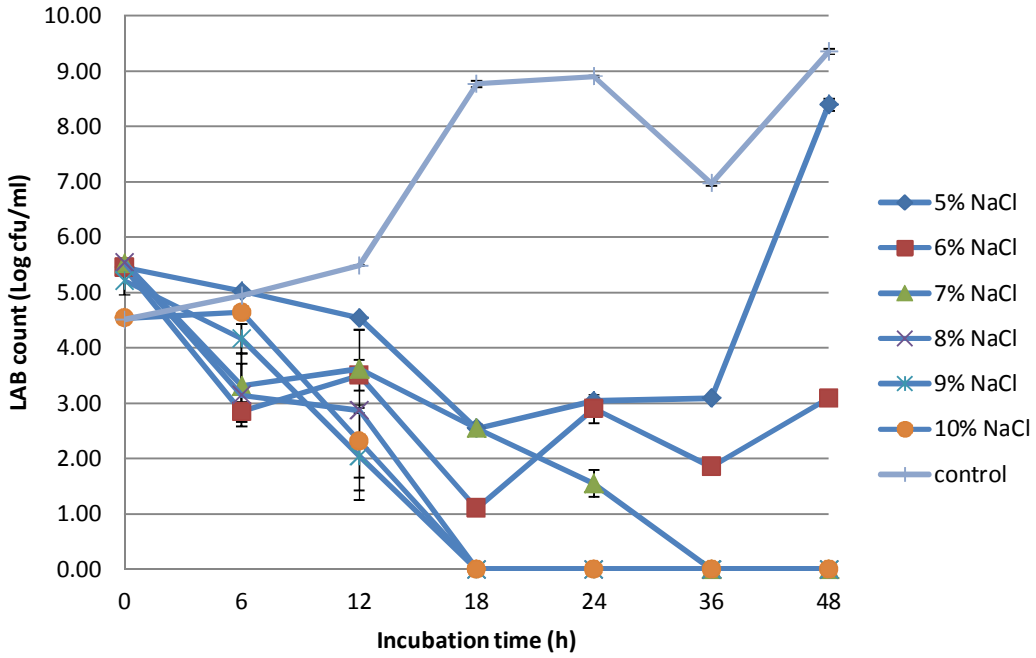
รูปที่ 1 : ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติก NCR-7 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium



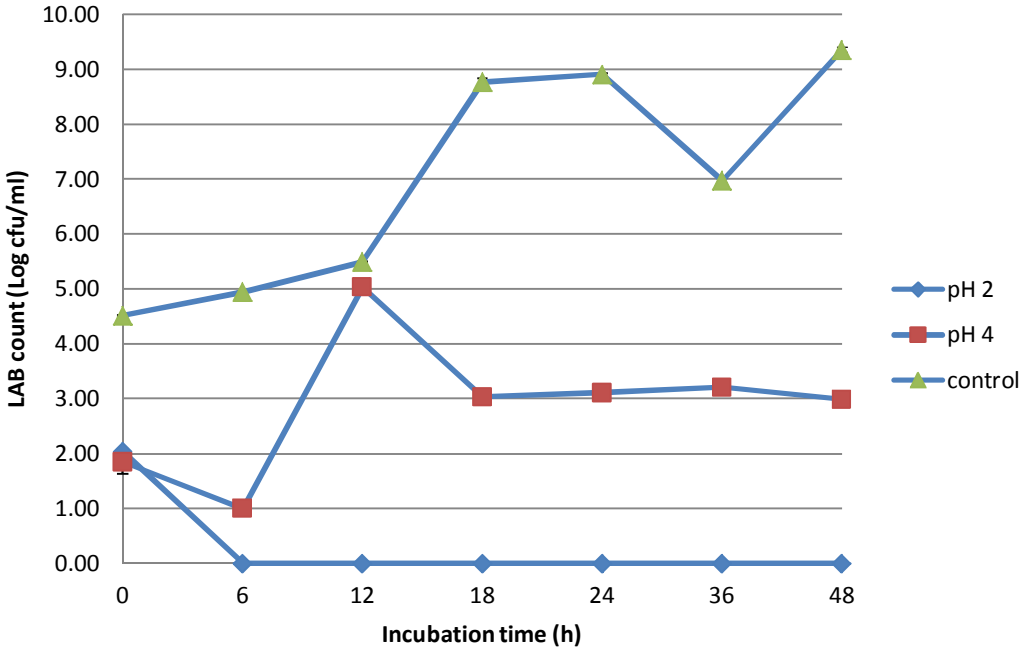
รูปที่ 2 : ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติก NCR-12 ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium

ผลจากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ได้กล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 เมื่อนำกล้าเชื้อทั้ง 2 ไปศึกษาการเจริญและกิจกรรมของกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5-8 %(w/v) และสภาวะความเป็นกรดที่ pH เท่ากับ 2 และ 4 ภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ที่สภาวะปกติ (control) และที่สภาวะความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5-8 %(w/v) พบว่าที่ความเข้มข้น

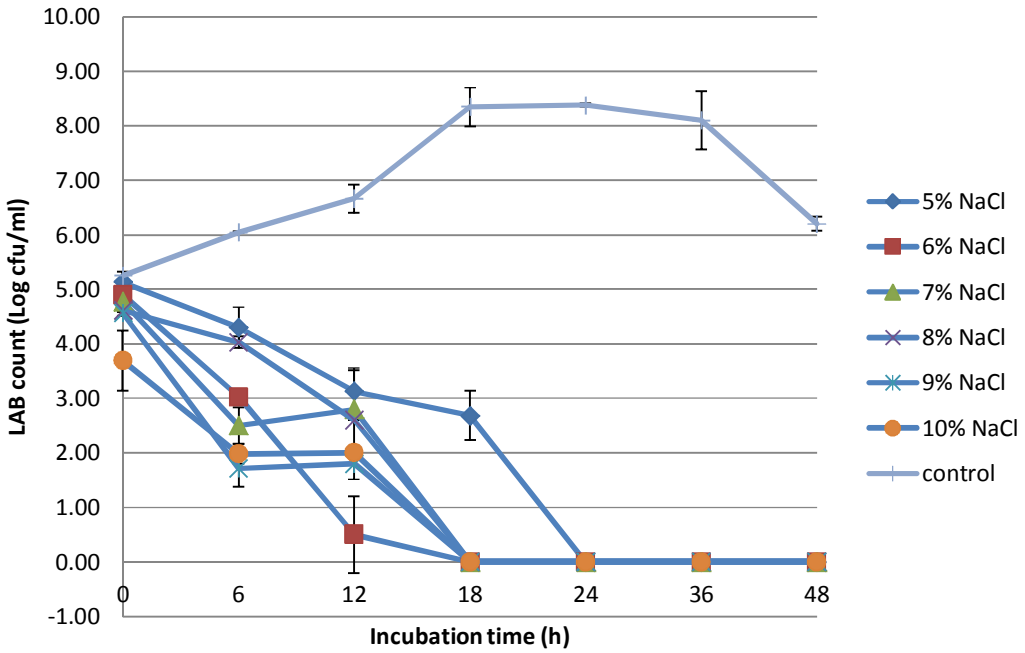
ของโซเดียมคลอไรด์ 5 %(w/v) มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด โดยสูงกว่าเกลือที่ความเข้มข้น 6 7 8 9 และ 10 %(w/v) (รูปที่ 3) และหลังจากชั่วโมงที่ 36 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) มีการเจริญเพิ่มขึ้นมากกว่า 4 log cycle นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น คือที่ความเข้มข้น 6 %(w/v) เชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ยังสามารถเจริญได้ กรณีการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 (รูปที่ 5) พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5-10 %(w/v) มีแนวโน้มการเจริญเติบโตลดลงหลังชั่วโมงที่ 12 อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) ยังคงมีการเจริญสูงสุดเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 6-10 %(w/v) และเมื่อศึกษาการเจริญและกิจกรรมของกล้าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่าง พบว่าการเจริญเติบโตของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรดที่ pH เท่ากับ 2 (รูปที่ 4) มีการเจริญเติบโตลดลงหลังชั่วโมงที่ 6 แต่ที่ pH เท่ากับ 4 เชื้อดังกล่าวมีการเจริญเพิ่มขึ้นหลังชั่วโมงที่ 6 โดยชั่วโมงที่ 12 มีการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด (รูปที่ 6) ที่ pH เท่ากับ 4 มีการเจริญดีกว่าที่ pH เท่ากับ 2 และพบว่าที่ pH เท่ากับ 4 มีการเจริญสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 ส่วนที่ pH เท่ากับ 2 มีการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่อง



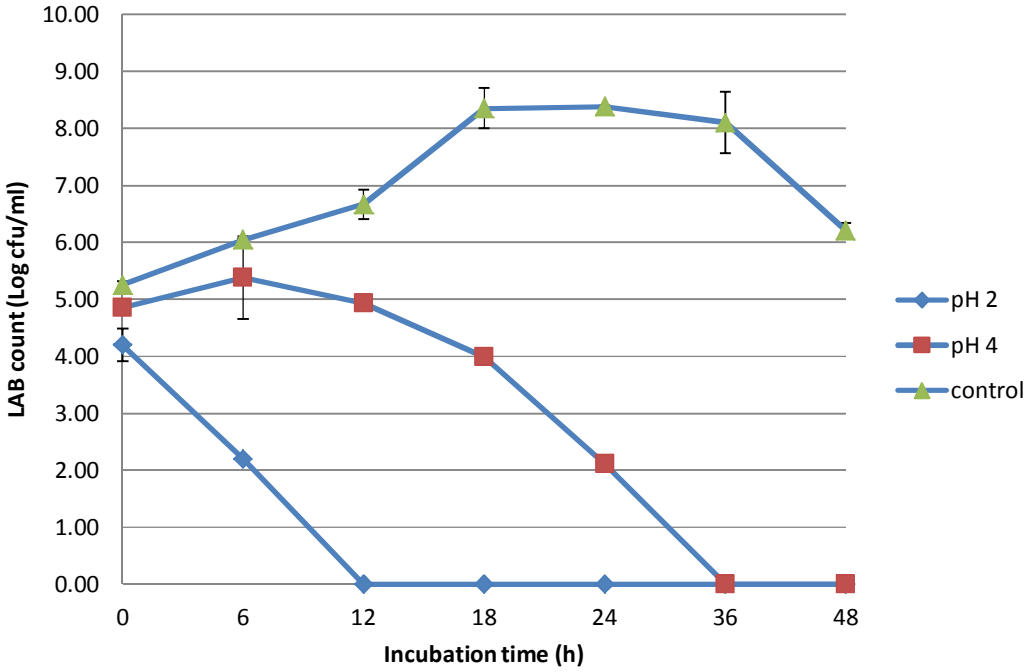
รูปที่ 3 : การเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)



รูปที่ 4 : การเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด



รูปที่ 5 : การเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)



รูปที่ 6 : การเจริญเติบโต (Growth curve) ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

2. การทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก และความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินของกล้าเชื้อที่จำแนกได้

การทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ protease และ cellulase ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ในสภาวะความเข้มข้นของเกลือความเข้มข้นต่างๆ จากตารางที่ 4 ซึ่งทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ protease ของเชื้อดังกล่าวที่ความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 5-10 %(w/v) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) พบว่าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีการผลิตเอนไซม์ protease สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยสังเกตจากขนาด clear zone ที่มากที่สุด คือเท่ากับ 8.0±0.20 มิลลิเมตร ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 %(w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ protease สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน โดยมีขนาดของ clear zone เท่ากับ 7.3±0.06 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %(w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ protease สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 โดยมีขนาดของ clear zone เท่ากับ 6.6±0.23 มิลลิเมตร โดยที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) จะพบการผลิตเอนไซม์ protease ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 24 36 และชั่วโมงที่ 48 ทั้งยังมีค่าเฉลี่ยของ clear zone สูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 48 เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของเกลือที่ความเข้มข้นอื่นๆ อีกด้วย ส่วนการทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 จากตารางที่ 5 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ cellulase สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 คือมี clear zone เท่ากับ 7.3±0.21 มิลลิเมตร ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 %(w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ cellulase สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน คือมี clear zone เท่ากับ 7.4±0.12 มิลลิเมตร และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %(w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ cellulase ที่ชั่วโมงที่ 12 18 และชั่วโมงที่ 24 แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของเกลือสูง ตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 8 9 และ

10 %(w/v) ไม่พบการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (ทั้งเอนไซม์ protease และ cellulase) จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 แสดงถึงความสามารถของเชื้อในการแสดงกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ในสภาวะที่มีเกลือ เชื้อจะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 5 6 และ 7 %(w/v) แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดได้ในสภาวะที่มีเกลือสูงตั้งแต่ที่ความเข้มข้นของเกลือ 8 9 และ 10 %(w/v)

ตารางที่ 4 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

Incubation time (hour)	Average of clear zone diameter (mm)						
	0% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl	10% Nacl
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	8.4±0.26	6.7±0.20	ND	7.1±0.10	ND	ND	ND
24	9.0±0.21	7.1±0.35	6.8±0.20	6.6±0.23	ND	ND	ND
36	7.5±0.15	7.2±0.15	7.2±0.15	ND	ND	ND	ND
48	9.6±0.25	8.0±0.26	7.3±0.06	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)
ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีหน่วยเป็น w/v

ตารางที่ 5 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

Incubation time (hour)	Average of clear zone diameter (mm)						
	0% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl	10% Nacl
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	6.6±0.17	ND	ND	ND
18	7.2±0.15	6.5±0.17	ND	6.6±0.06	ND	ND	ND
24	7.1±0.12	7.0±0.12	7.3±0.17	6.4±0.06	ND	ND	ND
36	7.0±0.21	7.2±0.10	6.5±0.06	ND	ND	ND	ND
48	7.3±0.12	7.3±0.21	7.4±0.12	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)
ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีหน่วยเป็น w/v

สำหรับการทดสอบกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ protease และ cellulase ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ในสภาวะที่เป็นกรด จากตารางที่ 6 และ 7 นั้น พบว่าไม่มีการผลิตทั้งเอนไซม์ protease และ cellulase ในสภาวะที่มี pH เท่ากับ 2 เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง ไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 แต่ที่สภาวะที่มี pH เท่ากับ 4 พบการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ในชั่วโมงที่ 18 24 36 และชั่วโมงที่ 48 โดยมีการผลิตเอนไซม์ protease สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมี

clear zone เท่ากับ 6.9±0.12 มิลลิเมตร และมีการผลิตเอนไซม์ cellulase สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมี clear zone เท่ากับ 7.1 ±0.12 มิลลิเมตร

ตารางที่ 6 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

Incubation time (hour)	Average of clear zone diameter (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	8.4±0.26	ND	6.7±0.17
24	9.0±0.21	ND	6.6±0.06
36	7.5±0.15	ND	6.9±0.12
48	9.6±0.25	ND	6.3±0.06

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 7 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

Incubation time (hour)	Average of clear zone diameter (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	7.2±0.15	ND	6.9±0.23
24	7.1±0.12	ND	6.9±0.12
36	7.0±0.21	ND	7.0±0.00
48	7.3±0.12	ND	7.1±0.12

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

คุณสมบัติการผลิตสารแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคนั้น ได้ทดสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซินของเชื้อที่จำแนกได้ทั้ง 2 ชนิด นั่นคือ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 กับจุลินทรีย์ก่อโรค 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบแล้วว่าไอโซเลทจากผลเชอร์รี่เปรี้ยวสด (ตารางที่ 3) มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดได้ จากตารางที่ 8 ซึ่งทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ในชั่วโมงที่ 24 36 และชั่วโมงที่ 48 ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 %(w/v) มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *E. coli* ที่ชั่วโมงที่ 24 และ 36 และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %(w/v) เชื้อมีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 18 และสำหรับการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp. จากตารางที่ 9 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 และ

6 %(w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *Salmonella* sp. ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %(w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 18 เช่นเดียวกันกับการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *E. coli* แต่อย่างไรก็ตามในสภาวะความเข้มข้นของเกลือ 8 9 และ 10 %(w/v) เชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. และสำหรับการทดสอบการผลิต แบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. ของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ในสภาวะความเป็นกรด จากตารางที่ 10 และ 11 พบว่าที่สภาวะความเป็นกรดสูง ที่ pH เท่ากับ 2 เชื้อไม่มีการสร้างแบคเทอริโอซินเพื่อมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิด แต่ที่ pH เท่ากับ 4 พบว่ามีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* ในชั่วโมงที่ 18 24 และชั่วโมงที่ 36 ทั้งยังมีการยับยั้ง *Salmonella* sp. ในชั่วโมงที่ 24 และ 36 อีกด้วย

ตารางที่ 8 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

Incubation time (hour)	Diameter of inhibition zone (mm)						
	0% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl	10% Nacl
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	6.4±0.00	ND	ND	ND
24	6.4±0.13	8.5±0.08	7.7±0.20	ND	ND	ND	ND
36	7.5±0.22	7.7±0.09	7.4±0.06	ND	ND	ND	ND
48	ND	9.4±0.09	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีหน่วยเป็น w/v

ตารางที่ 9 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียม-คลอไรด์ (NaCl)

Incubation time (hour)	Diameter of inhibition zone (mm)						
	0% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl	10% Nacl
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	7.4±0.19	ND	ND	6.5±0.16	ND	ND	ND
24	8.0±0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36	6.6±0.21	7.0±0.23	7.4±0.24	ND	ND	ND	ND
48	ND	7.6±0.23	7.1±0.19	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีหน่วยเป็น w/v

ตารางที่ 10 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

Incubation time (hour)	Diameter of inhibition zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	ND	ND	7.3±0.20
24	6.4±0.13	ND	10.1±0.25
36	7.5±0.22	ND	10.2±0.25
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 11 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

Incubation time (hour)	Diameter of inhibition zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	7.4±0.19	ND	ND
24	8.0±0.01	ND	10.1±0.12
36	6.6±0.21	ND	10.1±0.17
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติต่างๆของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ในสภาวะของเกลือและกรดแล้ว จะมีการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่จำแนกได้อีกชนิดหนึ่งควบคู่กันไป โดยในการทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ในน้ำเกลือความเข้มข้นต่างๆ ตั้งแต่ 5-10 %(w/v) จากตารางที่ 12 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 และ 6 %(w/v) มีการผลิตเอนไซม์ protease ในชั่วโมงที่ 24 36 และชั่วโมงที่ 48 และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %(w/v) มีการผลิตเอนไซม์ protease ในชั่วโมงที่ 24 โดยมี clear zone เท่ากับ 6.6±0.20 แต่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ protease ของเชื้อในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 8 9 และ 10 %(w/v) มิลลิเมตร และจากตารางที่ 13 พบว่าความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) มีการผลิตเอนไซม์ cellulase ในชั่วโมงที่ 24 และ 36 แต่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ cellulase ของเชื้อในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 6 7 8 9 และ 10 %(w/v) นอกจากนี้การทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ในสภาวะความเป็นกรด จากตารางที่ 14 และ 15 พบว่าที่สภาวะความเป็นกรดสูง (pH 2) เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ไม่มีการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ส่วนที่ pH เท่ากับ 4 เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ในชั่วโมงที่ 18 และ 24

ตารางที่ 12 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

Incubation time (hour)	Average of clear zone diameter (mm)						
	0% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl	10% Nacl
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	8.5±0.20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	7.9±0.21	6.7±0.06	6.5±0.20	6.6±0.20	ND	ND	ND
36	7.4±0.20	6.6±0.12	6.5±0.10	ND	ND	ND	ND
48	9.6±0.10	7.1±0.06	6.7±0.00	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)
ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีหน่วยเป็น w/v

ตารางที่ 13 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

Incubation time (hour)	Average of clear zone diameter (mm)						
	0% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl	10% Nacl
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	6.6±0.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	6.7±0.15	6.8±0.20	ND	ND	ND	ND	ND
36	6.5±0.06	6.5±0.15	ND	ND	ND	ND	ND
48	7.0±0.12	ND	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)
ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีหน่วยเป็น w/v

ตารางที่ 14 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

Incubation time (hour)	Average of clear zone diameter (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	8.9±0.15	ND	6.8±0.10
24	7.5±0.15	ND	6.6±0.23
36	7.2±0.29	ND	ND
48	9.4±0.15	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 15 : ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

Incubation time (hour)	Average of clear zone diameter (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND
18	6.6±0.31	ND	6.6±0.25
24	6.6±0.12	ND	6.5±0.17
36	ND	ND	ND
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

คุณสมบัติการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อ*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 2 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ในชั่วโมงที่ 24 และ 36 ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 %(w/v) มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *E. coli* ที่ชั่วโมงที่ 12 และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %(w/v) เชื้อมีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 18 และสำหรับการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp. จากตารางที่ 17 พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *Salmonella* sp. ในชั่วโมงที่ 18 ส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือ 6 %(w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 36 และ 48 และที่ความเข้มข้นของเกลือ 7 %(w/v) มีการสร้างแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 18 แต่อย่างไรก็ตามในสภาวะความเข้มข้นของเกลือ 8 9 และ 10 %(w/v) เชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. สำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ในสภาวะความเป็นกรดสูง (pH 2) จากตารางที่ 18 และ 19 พบว่าเชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. ส่วนในสภาวะที่มี pH เท่ากับ 4 พบว่าเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 มีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. ในชั่วโมงที่ 12 และ 18

ตารางที่ 16 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

Incubation time (hour)	Diameter of inhibition zone (mm)						
	0% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl	10% Nacl
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	6.6±0.35	ND	ND	ND	ND
18	ND	ND	ND	6.4±0.00	ND	ND	ND
24	6.4±0.13	6.4±0.14	ND	ND	ND	ND	ND
36	7.5±0.22	7.5±0.19	ND	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีหน่วยเป็น w/v

ตารางที่ 17 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

Incubation time (hour)	Diameter of inhibition zone (mm)						
	0% NaCl	5% NaCl	6% NaCl	7% NaCl	8% NaCl	9% NaCl	10% Nacl
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	7.4±0.19	6.5±0.08	ND	6.5±0.16	ND	ND	ND
24	8.0±0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND
36	6.6±0.21	ND	7.4±0.24	ND	ND	ND	ND
48	ND	ND	7.1±0.19	ND	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีหน่วยเป็น w/v

ตารางที่ 18 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *E. coli* ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

Incubation time (hour)	Diameter of inhibition zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	8.5±0.06
18	ND	ND	7.8±0.15
24	6.4±0.13	ND	ND
36	7.5± 0.22	ND	ND
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

ตารางที่ 19 : ผลการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้ง *Salmonella* sp. ของ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด

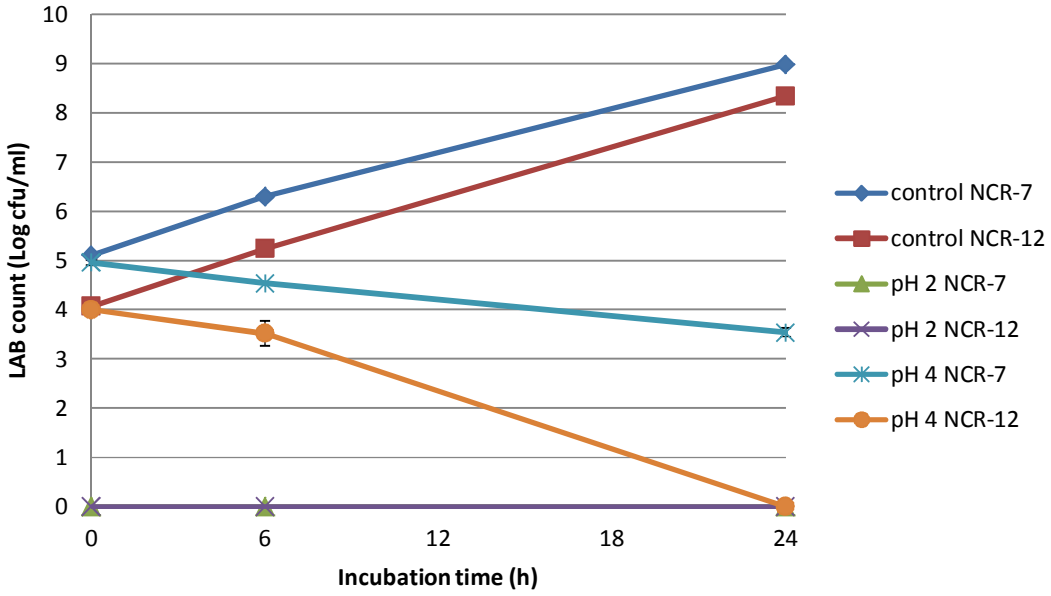
Incubation time (hour)	Diameter of inhibition zone (mm)		
	control	pH 2	pH 4
0	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND
12	ND	ND	9.4±0.39
18	7.4±0.19	ND	7.6±0.39
24	8.0±0.01	ND	ND
36	6.6±0.21	ND	ND
48	ND	ND	ND

หมายเหตุ: ND หมายถึง not detected (ตรวจไม่พบ)

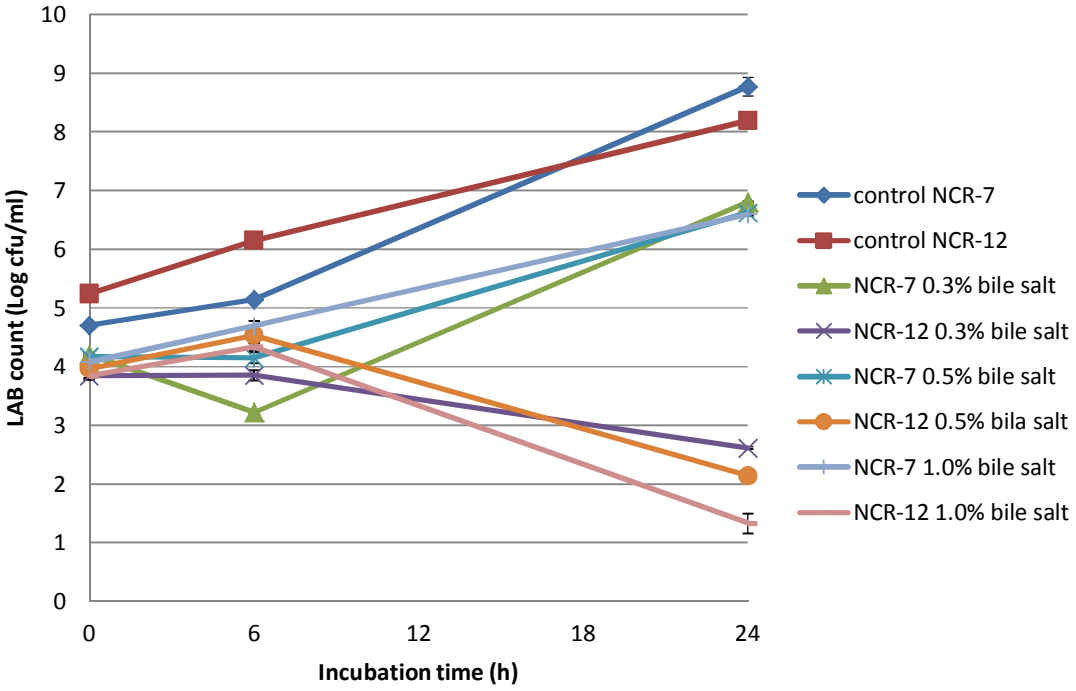
3. การทดสอบความเป็นโปรไบโอติกของกล้าเชื้อ

3.1 Acid tolerance test และ Bile tolerance test

นำแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ยืนยันสายพันธุ์ และทดสอบความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือและกรดแล้วไปทำการประเมินศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกได้จากผลเชอร์รี่เปรี้ยว ด้วยการทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรด pH 2-4 (Acid tolerance test) และการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี (Bile salt tolerance) พบว่า (รูปที่ 7) แบคทีเรียกรดแล็กติก *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีความสามารถในการอยู่รอดและทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรด pH เท่ากับ 4 ได้ดีกว่า *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 เช่นเดียวกันกับผลการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีที่ 0.3 0.5 และ 1.0% พบว่า (รูปที่ 8) *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 สามารถเจริญและทนต่อสภาวะที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้นสูงสุด 1.0% ได้ดีกว่า NCR-12 เช่นกัน โดยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง NCR-7 ลดลงจากเริ่มต้น 1-2 Log cfu/g เมื่อเทียบกับ NCR-12 ที่เวลาเดียวกันจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกไม่สามารถเจริญและอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะเกลือน้ำดี 1.0%



รูปที่ 7 : ความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด (Acid tolerance) ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ความสามารถในการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะกรดของ NCR-7 (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7) และ NCR-12 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12) ที่ปรับความเป็นกรดที่ pH 2 และ pH 4

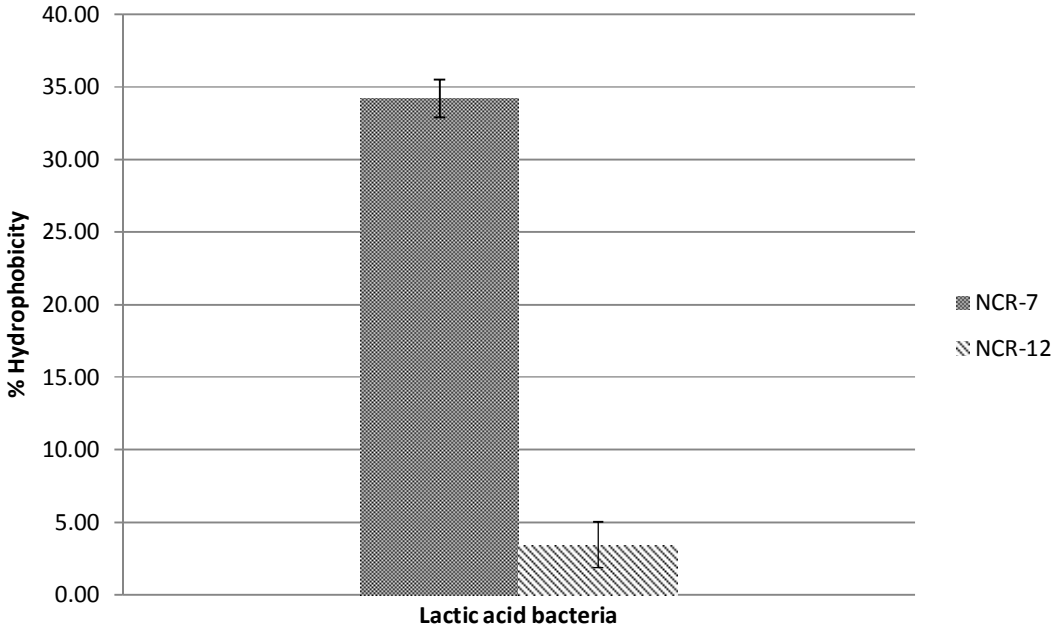


รูปที่ 8 : ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (Bile salt tolerance) ของแบคทีเรียกรดแล็กติก ความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีน้ำดี (Bile salt) ของ NCR-7 (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7) และ NCR-12 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12) ที่ปรับความเข้มข้นน้ำดี (Bile salt) เท่ากับ 0.3% 0.5% และ 1.0%

3.2 Hydrophobicity assay

การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะที่เป็นปัจจัยสำคัญของโปรไบโอติกที่จะต้องสามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ของ host หรือสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยการทดสอบหาค่า hydrophobicity ด้วยวิธี hydrophobicity assay (Boris S et al., 1998) ซึ่งเป็นการทดสอบในระดับหลอดทดลอง (In-vitro) ทดสอบกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่จำลองสภาพขั้วในลำไส้มนุษย์ ได้แก่ n-Hexadecane (Soledad B. et al., 1998; Srikanjana KLAYRAUNG et al., 2008) เพื่อคำนวนหา %Hydrophobicity ของแบคทีเรียที่เป็น criteria หนึ่งที่จะมาใช้ในการคัดกรองแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยอาศัยกลไกการจับกับพื้นผิวของเซลล์แบคทีเรียในลักษณะ van der Waals และ electrostatic forces กับอีพิเทอเรียลเซลล์ในลำไส้ ผลการทดสอบ (รูปที่ 9) พบว่า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีค่าความเป็น hydrophobicity เท่ากับ 34.20% ซึ่งสูงกว่า *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ที่มีค่าเท่ากับ 3.46% ซึ่ง %Hydrophobicity นี้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 40% ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าที่จะได้รับพิจารณาความเป็น Hydrophobicity (Anwar A. et al., 2014) อย่างไรก็ตามยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่ทำการศึกษาความเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. โดยจากงานวิจัยของ Riina A. Kekkonen และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาความเป็นโปรไบโอติกของ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. ทดสอบในเซลล์ human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) พบว่า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. เป็นแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติก ดังนั้นจากการประเมินดังกล่าวเป็นการทดสอบเบื้องต้น ที่สามารถสรุปได้ว่า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีความสามารถเป็นโปรไบโอติก อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดความแม่นยำในการยืนยันความเป็นโปรไปโอติกจะต้องนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้นี้ไปทดสอบการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร การทดสอบการเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมันและแป้ง การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Hemolytic activity) ทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amine production) (Phanida Kuasuwan et al., 2014) รวมถึงการทดสอบกับ cell line และหรือในสัตว์ทดลองต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



รูปที่ 9 : %Hydrophobicity ของแบคทีเรียกรดแล็กติก NCR-7 (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7) และ NCR-12 (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12)

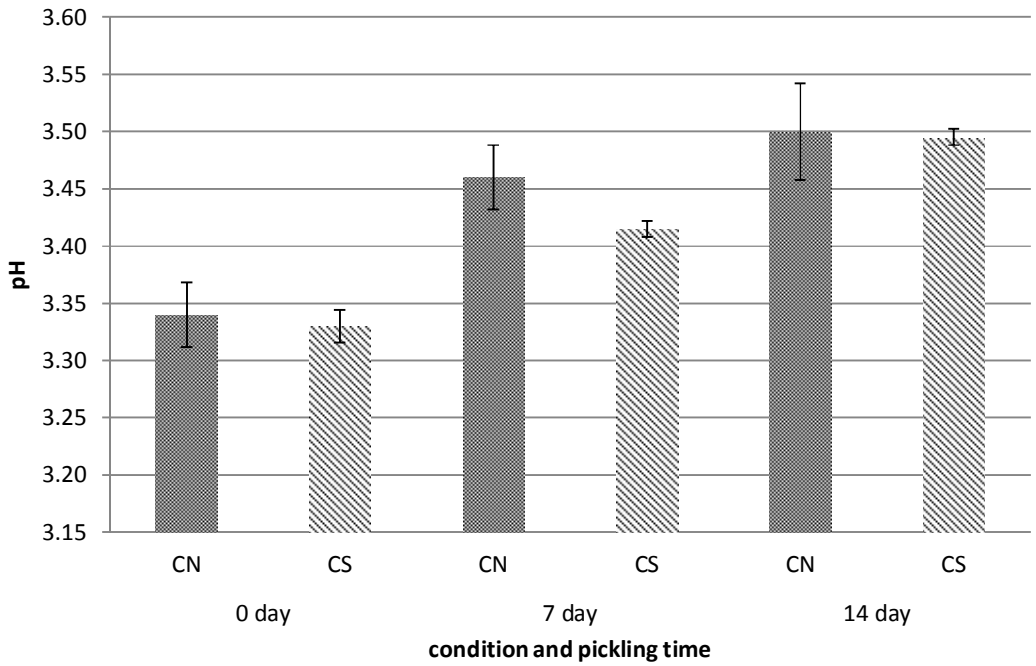
ตอนที่ 2 การนำกล้าเชื้อไปใช้ในกระบวนการดองสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง

จุลินทรีย์ที่เป็นกล้าเชื้อที่คัดแยกได้ 2 ชนิด นั่นคือ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 เมื่อผ่านการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกแล้วทำให้ทราบว่า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกสูงกว่า *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 จึงถือว่ามีคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อที่ดีกว่า เหมาะแก่การนำกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 นี้มาเป็นกล้าเชื้อหลักในกระบวนการดองผักและผลไม้ ในที่นี้คือ เชอร์รี่เปรี้ยว โดยการทำหน้าที่ของกล้าเชื้อจะช่วยให้เกิดกลิ่นรส ลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง และสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยธาตุอาหารหลัก (macronutrient) ในวัตถุดิบเชอร์รี่เปรี้ยว โดยเกิดกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต ได้เป็นสารต่างๆ เช่น กรดแล็กติก คาร์บอกไดออกไซด์ เอธานอล กรดอะซิติก กรดอินทรีย์ แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) เป็นต้น ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และได้สารอาหารที่เป็นประโยชน์เพิ่มขึ้น ทั้งยังทำหน้าที่เป็นสารกันเสียหรือสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage bacteria) และจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร (pathogenic bacteria) ซึ่งกระบวนการดองแบบดั้งเดิม (conventional) จะทำการดองด้วยวิธีธรรมชาติด้วยการทำหน้าที่ของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบอยู่แล้ว เมื่อมีสภาวะที่เหมาะสม แบคทีเรียกรดแล็กติกก็จะเจริญและเกิดกระบวนการหมักดองต่อไป แต่หากไม่มีการควบคุมกระบวนการหมักที่ดีแล้วอาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่เป็นยีสต์ รา หรือจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่น เข้ามาในระหว่างกระบวนการหมักอาจทำให้กระบวนการหมักไม่สมบูรณ์ เกิดฝ้า เกิดฟอง มีกลิ่นเหม็น หรือมีเชื้อราขึ้นที่ผิวหน้าได้ การเติม

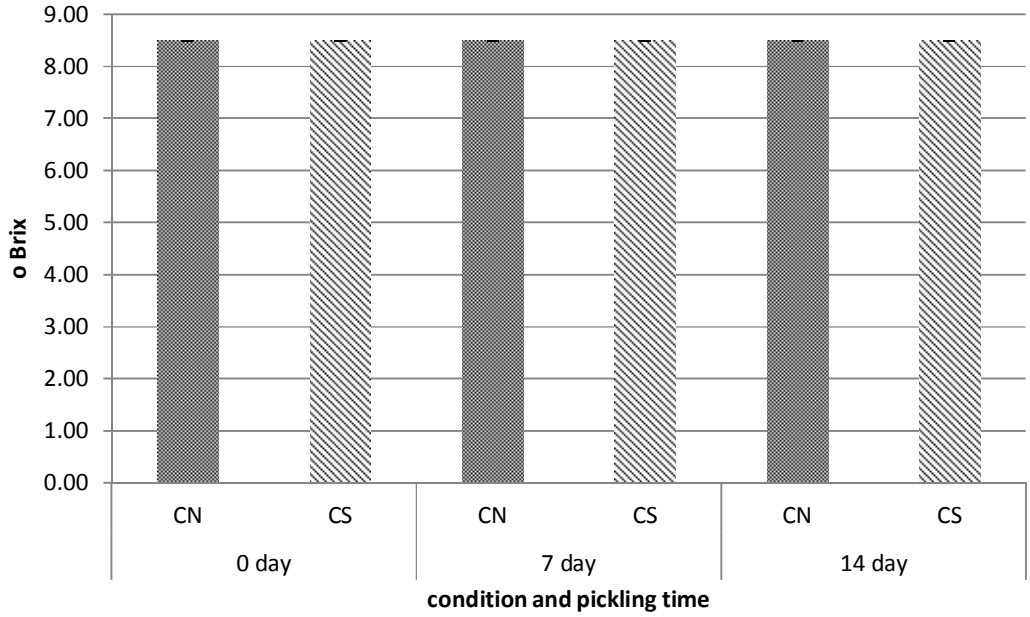
กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก นั่นคือ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* (NCR-7) ลงไป จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการหมักให้ดีขึ้น มีความสม่ำเสมอ และได้ผลิตภัณฑ์ผักดองที่มีคุณภาพตามต้องการ ซึ่งจะต้องมีการตรวจสอบและควบคุมทั้งคุณภาพด้านเคมี จุลินทรีย์ และกายภาพของผลิตภัณฑ์ให้เหมาะสม และเป็นไปตามมาตรฐานกำหนด

1. คุณภาพทางเคมีของผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่สำคัญด้านหนึ่งคือ คุณภาพด้านเคมี โดยทำการตรวจวิเคราะห์ทั้งค่า pH °Brix ปริมาณสารประกอบฟีนอลิค ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโทไซยานิน สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณวิตามินซี ในระหว่างกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยว ตั้งแต่วันที่ 0 7 และวันที่ 14 เมื่อพิจารณาค่า pH ที่พบในแต่ละช่วงการดอง (จากรูปที่ 10) เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าเชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7%(w/v) โดยการดองแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีค่าความเป็นกรดลดลง นั่นคือมีค่า pH เพิ่มสูงขึ้น แต่ยังคงมีค่าไม่เกินค่ามาตรฐานของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองกำหนดไว้ คือต้องมีค่า pH ไม่เกิน 3.50 ในขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (soluble solid) ในแต่ละช่วงของกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยว จากรูปที่ 11 พบว่ามีค่าคงที่ตลอดกระบวนการดอง



รูปที่ 10 : ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนไประหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 (CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7)



รูปที่ 11 : ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ในน้ำ (soluble solid) ในระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 (CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7)

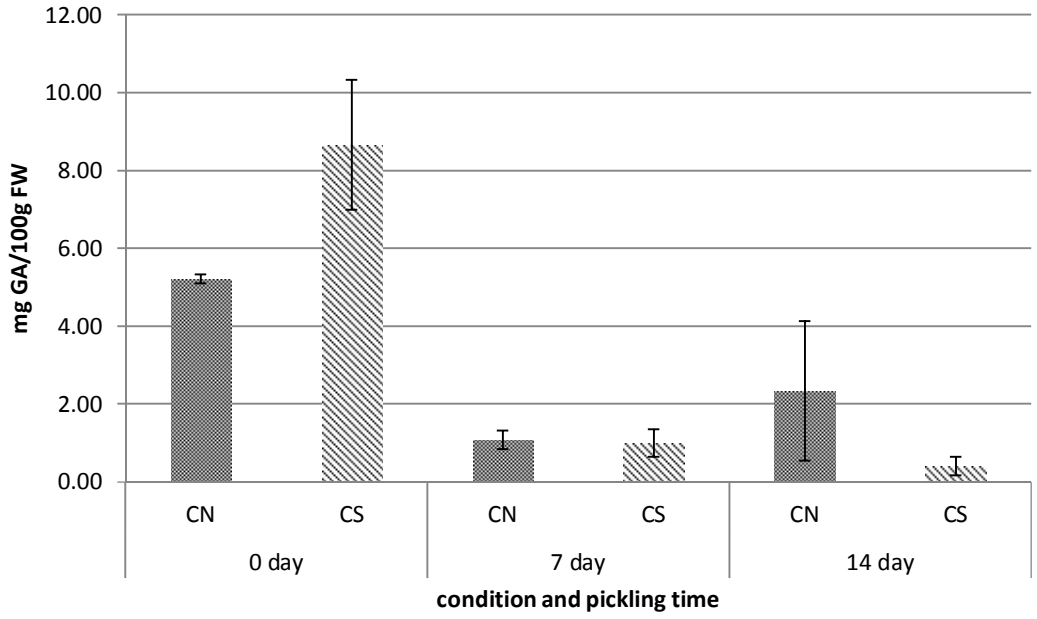
การศึกษาการต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7 %(w/v) ด้วยวิธีธรรมชาติโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และเชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยเติมเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 จะติดตามปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน galic acid ได้สมการดังนี้ y = 10.449x + 0.7658 (R^2 = 0.9901) พบว่าการดองทั้งสองวิธีมีปริมาณสารฟีนอลิกลดลง (รูปที่ 12) กล่าวคือการดองด้วยวิธีธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อในวันที่ 0 7 และ 14 มีปริมาณฟีนอลิกเป็น 5.21±0.119 1.08±0.238 และ 0.40±0.238 mg GAE/g และการดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp.*mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ในระหว่างการดองวันที่ 0 7 และ 14 มีปริมาณฟีนอลิก 8.66±1.668 0.99±0.357 และ 0.40±0.238 mg GAE/g ตามลำดับ ในกระบวนการดองส่งผลให้อัตราของปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเพิ่มขึ้นจาก 17.11±5.00 เป็น 31.21±2.07mg catechin/100g ในขณะที่การดองแบบไม่เติมกล้าเชื้อมีปริมาณของฟลาโวนอยด์ลดลงอย่างต่อเนื่อง คือ 35.46±16.91 mg catechin/100g เหลือเพียง 23.13±5.21 g catechin/100g ในวันที่ 14 (รูปที่ 13) ส่วนการติดตามปริมาณสารแอนโทไซยานินพบว่าสภาวะการดองทั้งสองแบบคือการดองแบบธรรมชาติและการดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีปริมาณแอนโทไซยานินลดลงจากวันเริ่มต้นการดอง คือการดองแบบธรรมชาติมีปริมาณแอนโทไซยานิน ในวันที่ 0 7 และ 14 เป็น 0.30±0.12 0.30±0.00 และ 0.15±0.00 mg/L และการดองโดยการเติมกล้าเชื้อในวันที่ 0 7 และ 14 มีปริมาณแอนโทไซยานิน 0.30±0.24 0.07±0.06 และ 0.00±0.18 mg/L (รูปที่ 14) สุดท้ายนี้ยังพบว่าในกระบวนการดองโดยการเติมกล้าเชื้อส่งผลให้มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphynyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 คือสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ร้อยละ 90.33±0.07 และลดลงในวันที่ 14 เหลือ ร้อยละ 85.31±0.00 แต่สมบัติการต้านอนุมูลอิสระยังมีปริมาณมากกว่าวันเริ่มต้นการดอง (วันที่0) เช่นเดียวกับการดองโดยไม่เติม

กล้าเชื้อนั้นมีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในวันที่ 7 คือ ร้อยละ 92.49±0.30 หลังจากนั้นมีค่าลดลงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการดอง คือ ร้อยละ 85.31±0.00 ในวันที่ 14 (รูปที่ 15)

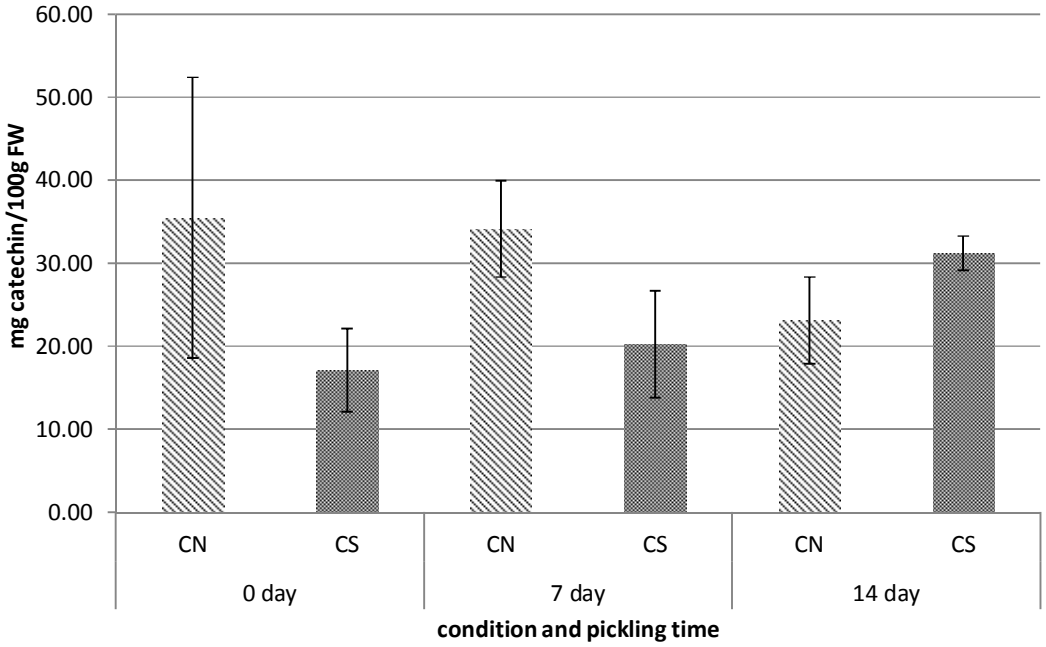
ตารางที่ 20 : ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ระหว่างการดองเซอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7

เวลา	กระบวนการดอง	ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant)			
		Total phenolic	Total flavanoid	Anthocyanin	DPPH antioxidant
0 day	CN	5.21±0.119	35.46±16.91	0.30±0.12	77.38±6.30
	CS	8.66±1.668	17.11±5.00	0.30±0.24	79.28±0.30
7 day	CN	1.08±0.238	34.15±5.80	0.30±0.00	92.49±0.30
	CS	0.99±0.357	20.23±6.44	0.07±0.06	90.33±0.07
14 day	CN	2.34±1.787	23.13±5.21	0.15±0.00	86.15±0.15
	CS	0.40±0.238	31.21±2.07	0.00±0.18	85.31±0.00

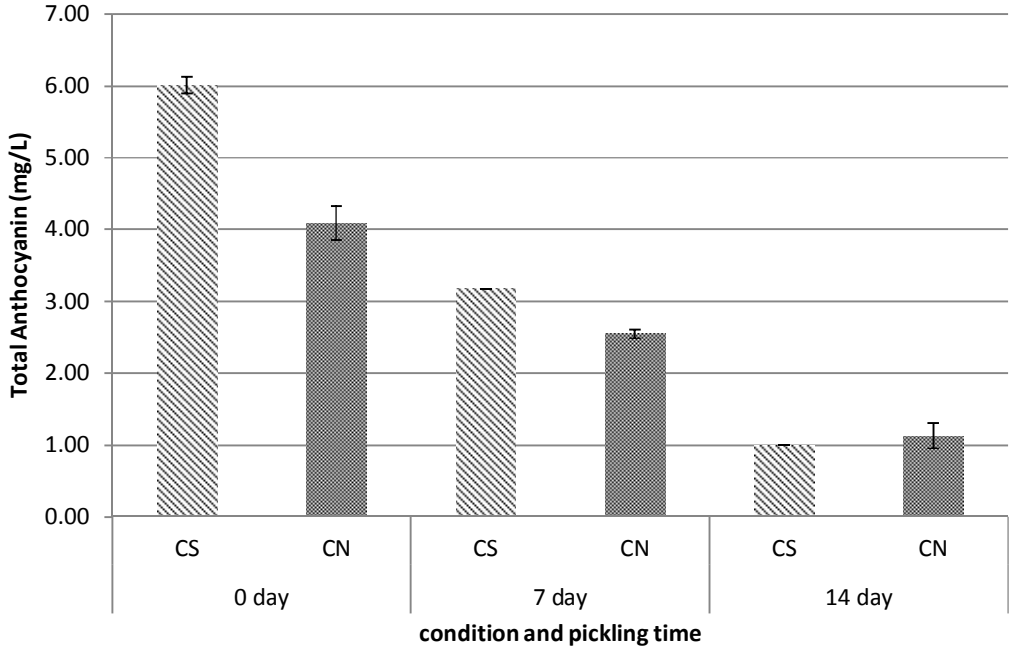
หมายเหตุ CN คือ เซอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ
CS คือ เซอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7



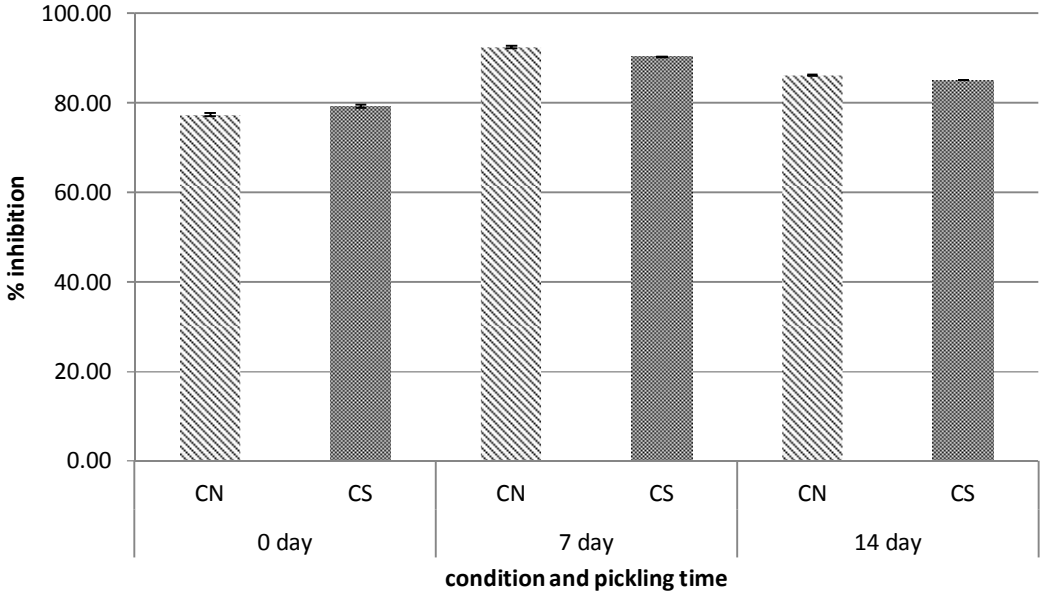
รูปที่ 12 : ปริมาณสารประกอบฟีนอลิคทั้งหมด (Total phenolic content) ในระหว่างการดองเซอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 (CN คือ เซอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เซอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7)



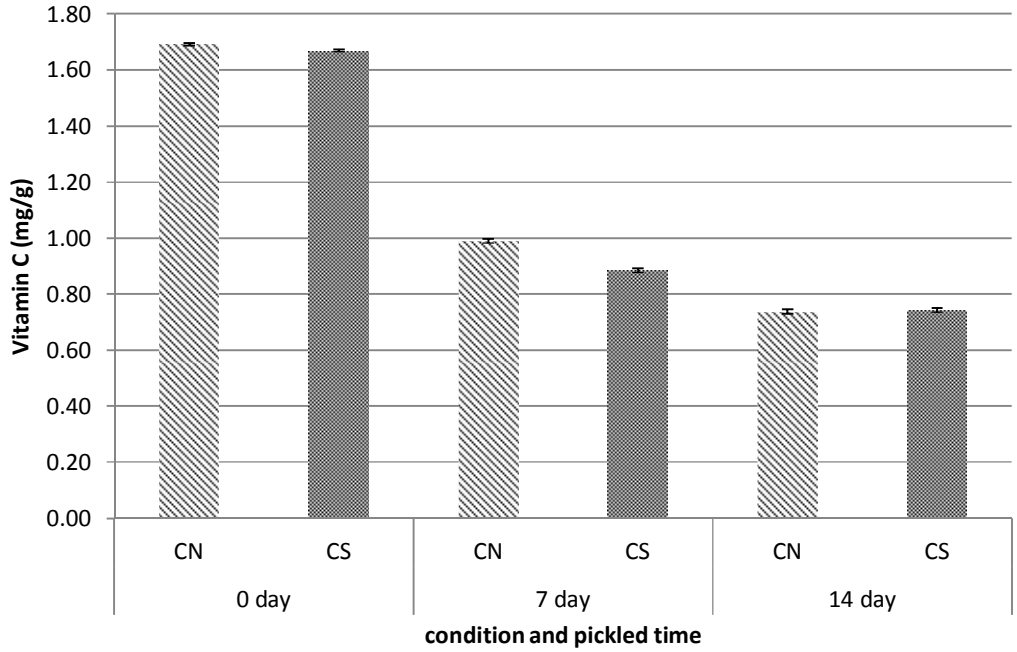
รูปที่ 13 : ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total flavonoid) ในระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 (CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7



รูปที่ 14 : ปริมาณแอนโทไซยานินระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 (CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7



รูปที่ 15 : สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ 2,2-diphynyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 (CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7



รูปที่ 16 : ปริมาณวิตามินซีที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 (CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของวิตามินซีในกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7%(w/v) โดยการดองแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณกรดแอสคอบิกมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง กล่าวคือการดองแบบธรรมชาติมีปริมาณวิตามินซีลดลงจากวันที่ 0, 7 และ 14 เป็น 1.69±0.00, 0.99±0.01 และ 0.740.01mg/g ส่วนการดองโดยการเติมกล้าเชื้อมีปริมาณวิตามินซีเป็น 1.67±0.00, 0.89±0.01 และ 0.74±0.01 mg/g ดังรูปที่ 16

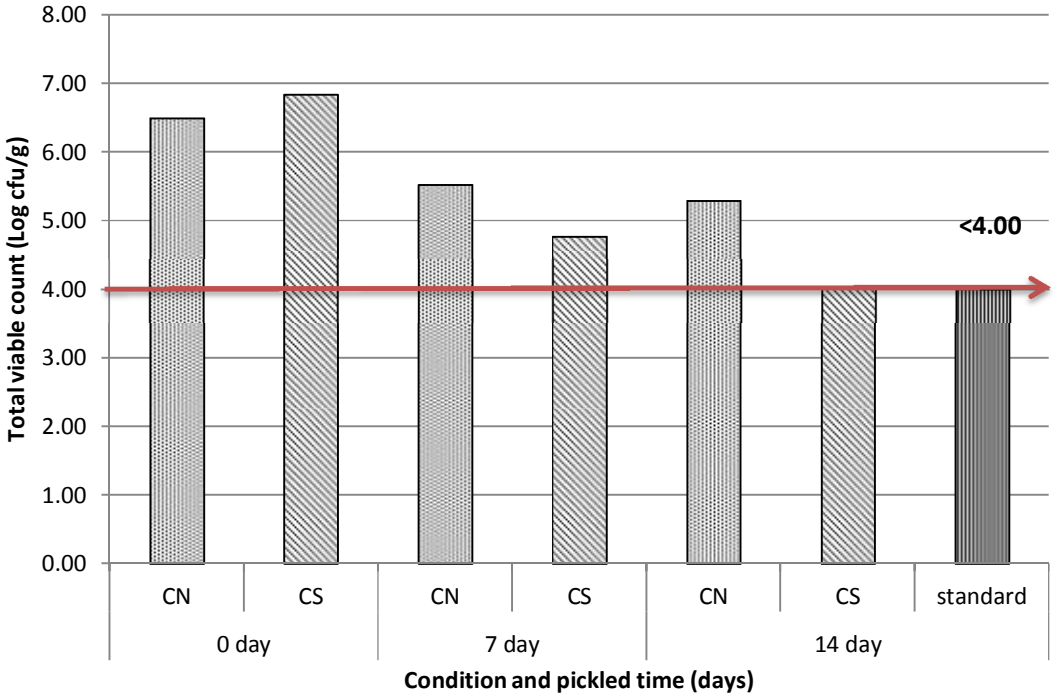
2. คุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เชอร์รี้เปรี้ยวดอง

การปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการผลิต หรือในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อทั้งคุณภาพและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ เป็นคุณภาพด้านสำคัญที่จำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์ให้มีค่าไม่เกินมาตรฐานกำหนด โดยทำการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียกรดแล็กติก ยีสต์และรา ซึ่งจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง (มผช. 160-2546) ได้กำหนดให้มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกิน 4.00 Log cfu/g และปริมาณยีสต์และราไม่เกิน 2 Log cfu/g จากตารางที่ 21 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการดองวันที่ 14 มีปริมาณยีสต์และราไม่เกินมาตรฐานกำหนด คือมีค่าเท่ากับ 1.86 Log cfu/g แต่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเกินมาตรฐานกำหนดเล็กน้อย คือมีค่าเท่ากับ 4.03 Log cfu/g เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดอาจมีการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียจำเป็นในกระบวนการดอง และมีกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ที่เติมเพื่อส่งเสริมกระบวนการดองรวมอยู่ด้วย ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจึงอาจมีค่าสูงกว่ามาตรฐานกำหนดได้ (รูปที่ 17 และ 18)

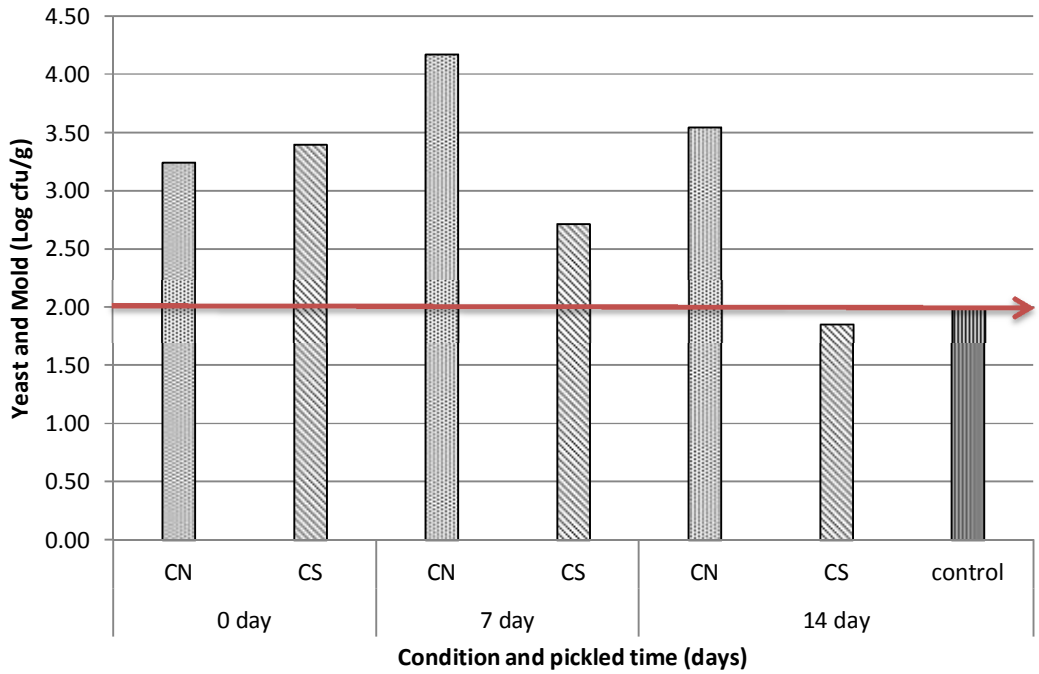
ตารางที่ 21 : ผลการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง

เวลา (วัน)	กระบวนการดอง	ดัชนีคุณภาพและความปลอดภัย (Log cfu/g)		
		total bacteria	lactic acid bacteria	yeast & mold
		เกณฑ์มาตรฐาน		
		< 4.00[(1)]	-	<2.00[(1)]
0	CN	6.49	3.89	3.24
	CS	6.84	6.18	3.4
7	CN	5.52	6.14	4.17
	CS	4.77	7.35	2.72
14	CN	5.29	4.12	3.55
	CS	4.03	4.37	1.86

หมายเหตุ : CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ
CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7
(1)= มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนผลไม้ดอง (มผช. 160-2546)



รูปที่ 17 : จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดองเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง (มผช. 160-2546); CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7



รูปที่ 18 : จำนวนยีสต์และราในผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดองเทียบกับมตราฐานผลิตภัณฑ์ผลไม้ดอง (มผช. 160-2546); CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7

3. คุณภาพทางกายภาพของผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง

คุณลักษณะทางกายภาพของการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วยน้ำเกลือ 7%(w/v) เมื่อผ่านกระบวนการดองเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเชอร์รี่ที่ได้นั้นมีสีซีดลง เนื่องจากมีการใช้เกลือในการดอง ซึ่งเกลือนั้นจะทำหน้าที่ดึงน้ำออกจากเชอร์รี่เปรี้ยว รวมถึงสภาวะการดองที่เป็นกรดจึงส่งผลต่อเนื้อสัมผัสและสีที่เปลี่ยนแปลงไป ยังพบว่าหลังกระบวนการดองนั้น เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 สามารถคงรูปเดิมได้ ไม่เละ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นหอมที่มีลักษณะเฉพาะ แตกต่างจากการดองแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อซึ่งหลังการดองผลิตภัณฑ์ที่ได้นั้นจะค่อนข้างเละ ไม่คงรูปเดิม และมีกลิ่นหอมฉุน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้กล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ในการดองเชอร์รี่นั้นทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะทางกายภาพที่มีความสม่ำเสมอ และสามารถควบคุมได้

รูปที่ 19 : คุณลักษณะทางกายภาพของการดองเชอร์รี่เปรี้ยวด้วย *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ; CN คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองแบบธรรมชาติไม่มีการเติมกล้าเชื้อ CS คือ เชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7

บทที่ 4
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

การคัดแยกจุลินทรีย์จากผลสดเชอร์รี่เปรี้ยว (*Malpighia glabra* L.) ทำให้ได้จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกจำนวน 2 ไอโซเลท ที่ให้ผลการทดสอบเอนไซม์คาตาเลสเป็นลบ ได้แก่ NCR-7 และ NCR-12 ส่วนการทดสอบการใช้น้ำตาล (O/F test) พบว่า NCR-7 เกิดออกซิเดชั่นและหมักน้ำตาลกลูโคสได้ ส่วน NCR-12 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ในกรณีที่ไอโซเลทอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และในการทดสอบความสามารถการผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร พบว่า NCR-7 และ NCR-12 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. ได้ ส่วนการทดสอบกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ amylase protease cellulase และ pectinase พบว่าทั้ง NCR-7 และ NCR-12 สามารถแสดงกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ได้ การทดสอบดังกล่าวข้างต้นแสดงถึงคุณสมบัติเบื้องต้นของความเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกของ NCR-7 และ NCR-12 เมื่อทำการยืนยันสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเลท โดยนำไปทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ทำให้ทราบว่า NCR-7 มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* คิดเป็นร้อยละ 99.90 ส่วน NCR-12 มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* คิดเป็นร้อยละ 99.90 ส่วนการทดสอบความสามารถในการเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยวของทั้ง *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 โดยทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะที่มีเกลือและมีสภาวะเป็นกรด (pH เท่ากับ 2 และ 4) ซึ่งการทดสอบในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5-8 %(w/v) พบว่า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 สามารถเจริญได้ดีที่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 และ 6 %(w/v) ส่วนในสภาวะที่เป็นกรด ที่ pH เท่ากับ 2 มีการเจริญลดลงหลังชั่วโมงที่ 6 แต่ที่ pH เท่ากับ 4 เชื้อดังกล่าวมีการเจริญเพิ่มขึ้นหลังชั่วโมงที่ 6 สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 พบการเจริญสูงสุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) ในสภาวะความเป็นกรดที่ pH เท่ากับ 4 มีการเจริญดีกว่าที่ pH เท่ากับ 2 โดยที่ pH 2 มีการเจริญลดลงอย่างต่อเนื่อง และในการทดสอบกิจกรรมของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ในการผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ protease และ cellulase ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 5-10 %(w/v) และมีความเป็นกรด ผลการทดสอบพบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 6 และ 7 %(w/v) เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase แต่ที่ความเข้มข้นของเกลือสูง 8 9 และ 10 %(w/v) ไม่พบการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ส่วนในสภาวะที่เป็นกรดพบว่าไม่มีการผลิตทั้งเอนไซม์ protease และ cellulase ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง (pH เท่ากับ 2) ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ แต่ที่สภาวะที่มี pH เท่ากับ 4 พบการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase สำหรับคุณสมบัติการผลิตสารแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในสภาวะเกลือและกรดนั้น พบว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5 6 และ 7 %(w/v) เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. ได้ แต่ในสภาวะความเข้มข้นของเกลือ 8 9 และ 10 %(w/v) เชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซิน ส่วนในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง ที่ pH เท่ากับ 2

เชื้อไม่มีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิดเช่นเดียวกัน แต่ที่ pH เท่ากับ 4 มีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. ในส่วนของการทดสอบกิจกรรมของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 ในการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ในสภาวะที่มีเกลือและมีความเป็นกรด พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 5 6 และ 7 %(w/v) มีการผลิตเอนไซม์ protease และมีการผลิตเอนไซม์ cellulase ในสภาวะความเข้มข้นของเกลือ 5 %(w/v) แต่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ cellulase ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 6 7 8 9 และ 10 %(w/v) และในสภาวะความเป็นกรดพบว่าที่สภาวะความเป็นกรดสูง (pH 2) เชื้อไม่มีการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ส่วนที่ pH เท่ากับ 4 มีการผลิตเอนไซม์ protease และ cellulase ในด้านคุณสมบัติการผลิตสารแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค 2 ชนิด ได้แก่ *E. coli* และ *Salmonella* sp. พบว่าสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ 5 6 และ 7 %(w/v) เชื้อมีการสร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. แต่ในสภาวะความเข้มข้นของเกลือสูงเท่ากับ 8 9 และ 10 %(w/v) เชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้ง 2 ชนิด และในสภาวะความเป็นกรดสูง (pH 2) พบว่าเชื้อไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินเช่นเดียวกัน แต่ในสภาวะที่มี pH เท่ากับ 4 มีการผลิตแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของทั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. ทั้งนี้จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดที่จำแนกได้นั้นเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติก ที่ถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) ที่จะใช้ในอาหารได้ และโดยส่วนใหญ่แบคทีเรียกรดแล็กติกจะมีความเป็นโปรไบโอติก (probiotic) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อบริโภคแล้วก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ ช่วยปรับสมดุลและส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ จึงทำการประเมินความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นของกล้าเชื้อที่คัดเลือกจากผลเชอร์รี่เปรี้ยวทั้ง 2 ชนิด โดยการทดสอบ acid tolerance bile salt tolerance และ hydrophobicity assay ได้ผลการทดสอบว่า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีความสามารถเจริญและทนต่อสภาวะที่เป็นกรด คือที่ pH ในช่วง 2-4 และทนต่อ bile salt ที่ 0.3–1% ได้ดีกว่า *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 นอกจากนั้นเมื่อนำไปทำการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะด้วย hydrophobicity assay พบว่า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีความสามารถในการยึดเกาะสูงกว่า *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* NCR-12 จากการทดสอบข้างต้น ถือเป็นการประเมินเบื้องต้นที่สามารถกล่าวได้ว่า *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 มีความสามารถเป็นโปรไบโอติก อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดความแม่นยำในการยืนยันความเป็นโปรไบโอติกจะต้องนำแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ได้นี้ไปทดสอบคุณสมบัติด้านอื่นๆ เช่น การทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร การทดสอบการเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ การทดสอบกับ cell line และหรือในสัตว์ทดลองต่อไป

เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของกล้าเชื้อทั้ง 2 ชนิดแล้ว จะทำให้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการนำ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์เชอร์รี่เปรี้ยวดอง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ และเป็นไปตามมาตรฐานกำหนด โดยทำการทดสอบผลการใช้กล้าเชื้อในกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยวทั้งในด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ผลการทดสอบด้านเคมีในระหว่างกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยว ตั้งแต่วันที่ 0 7 และวันที่ 14 เมื่อพิจารณาค่า pH พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 7%(w/v) โดยการดองแบบธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และแบบที่มีการเติมกล้าเชื้อ มีค่าความเป็นกรดลดลง นั่นคือมีค่า pH เพิ่มสูงขึ้น แต่ยังคงมี

ค่าไม่เกินค่ามาตรฐานของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดองกำหนดไว้ คือต้องมีค่า pH ไม่เกิน 3.50 ในขณะที่ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (soluble solid) ในแต่ละช่วงของกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยว พบว่ามีค่าคงที่ตลอดกระบวนการดอง และจากการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระในกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยว พบว่าการดองโดยการเติมกล้าเชื้อมีปริมาณฟลาโวนอยด์เพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากเชอร์รี่เปรี้ยวเป็นผลไม้ที่มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์หลายประเภท ได้แก่ cyaniding 3-sophoroside, cyanidin 3-glucosylrutinoside, cyanidin 3-glucoside และ cyanidin 3-rutinoside แล้วยังพบ cyanidin 3-arabinosylrutinoside, pelargonidin 3-glucoside และ peonidin 3-rutinoside (Kirakosyan et al., 2010 ;Kim et al., 2005) ในขณะที่การดองแบบธรรมชาติและการดองโดยการเติมกล้าเชื้อนั้นมีผลให้ปริมาณสารฟีนอลิก และแอนโทไซยานินลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาในการดองเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากโครงสร้างของฟีนอลิก และแอนโทไซยานินจัดเป็นสารประกอบไซยานิดิน 3 กลูโคไซด์ (cyaniding 3-glucoside) (C3G) และ พีโอนิดิน 3 กลูโคไซด์ (peonidin 3-glucoside) (P3G) ที่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ เมทานอล และอะซิโตน เป็นต้น ระหว่างกระบวนการดองจึงเกิดการสูญเสียปริมาณสารแอนโทไซยานินมากขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป โดยพบว่าปริมาณสารแอนโทไซยานินลดลงมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อสิ้นสุดการดองในวันที่ 14 อย่างไรก็ตามเชอร์รี่ดองที่ได้นั้นยังคงมีประสิทธิภาพการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ให้ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันเพิ่มสูงขึ้นด้วย เนื่องจากปริมาณสารฟลาโวนอยด์ที่เพิ่มขึ้น และสารแอนโทไซยานินที่ยังคงหลงเหลืออยู่ ส่วนปริมาณของวิตามินซีเมื่อเวลาผ่านไป พบว่ากรดแอสคอบิกมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่ก็ยังคงมีวิตามินซีหลงเหลืออยู่ ส่วนผลการทดสอบด้านจุลินทรีย์ในกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยว พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการดอง มีปริมาณยีสต์และราไม่เกินมาตรฐานกำหนด คือมีไม่เกิน 2 Log cfu/g แต่มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเกินมาตรฐานกำหนดเล็กน้อย (เกิน 4.00 Log cfu/g) เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียทั้งหมดอาจมีการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งเป็นกล้าเชื้อในการดอง จึงอาจทำให้มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินกว่ามาตรฐานกำหนดได้ และสำหรับผลการทดสอบด้านกายภาพในกระบวนการดองเชอร์รี่เปรี้ยว เมื่อผ่านกระบวนการดองเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเชอร์รี่เปรี้ยวที่ดองโดยมีการเติมกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 สามารถคงรูปเดิมได้ ไม่เละ และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นหอมที่มีลักษณะเฉพาะ แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum* NCR-7 ที่ใช้ในการดองเชอร์รี่ ที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะทางกายภาพที่มีความสม่ำเสมอ และสามารถควบคุมคุณภาพได้ตามต้องการ

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาความสามารถของกล้าเชื้อในการให้คุณลักษณะความเป็นโปรไบโอติก และสภาวะของการหมักที่เหมาะสม ทำให้เชื่อได้ว่า กล้าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถใช้ในกระบวนการหมัก (pickling) ที่เป็นผลไม้ในกลุ่มเปรี้ยวชนิดอื่นๆ ได้ ซึ่งเป็นประโยชน์สำหรับการปรับใช้กับผลไม้ในท้องถิ่นนั้นๆ ได้

บรรณานุกรม

กองโภชนาการ กรมอนามัย. (2530). ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนที่กินได้ 100 กรัม. องค์การทหารผ่านศึก.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ผลไม้ดอง (มผช. 160/2546).

Anwar A. Abdulla, Thikra A. Abed and A. M. Saeed. (2014). Adhesion, Autoaggregation and Hydrophobicity. British Microbiology Research Journal. 4(4): 381-391.

ASTM, D5465-93. (1998). Standard Practice for Determining Microbial Colony Counts from Waters Analyzed by Plating Methods.

Bylka, W., Matlawska, I., and Pilewski, N.A. (2004). Natural flavonoids as antimicrobial agent. Journal of the American Naturaceutical Association. 7: 24-31.

Ballesteros, C., Palop, L. and Sánchez, I. (1999). Influence of sodium chloride concentration on the controlled lactic acid fermentation of Almagro eggplants. International Journal of Food Microbiology 53: 13-20.

Chrzanowski, G., Sempruch, C., and Sprawka, L. (2007). Investigation of phenolic acids in leaves of blackcurrant (Ribes nigrum L.) and sour cherry (Prunus cerasus L.) [On-line]. Available: http://www.ejpau.media.pl/volume10/issue4/art-42.htm

Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P. (2004). Bacteriocins: Biological tools for Biopreservation and shelf-life extension. International Dairy Journal 16: 1058-1071.

FDA, Bacterial Analytical Manual, Maturin, LJ and JT Peeler. 2011, June. Chapter 3: Aerobic Plate Count. (Online). Available URL: http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm063346.htm

Goldin, Barry R. Probiotics and health. (2011). In Probiotics and health claims. Iowa : Wiley-Blackwell, P: 1-16.

Hutkins, R.W. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods 1st ed. Blackwell Publishing, USA.

Kacem, M. and Karem, N-E. (2006). Microbiological study of naturally fermented Algerian Green olives: isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts along with the effects of brine solutions obtained at the end of olive fermentation on Lactobacillus plantarum growth. Grasas y Aceites 57 (3): 292-300.

Karovičová and Kohajdová. (2003). Lactic acid fermented vegetable juices. Horticultural Science 30 (4): 152-158.

Kim, D-O., Heo, H.J., Kim, Y.J., Yang, H.S., and Lee, C.Y. (2005). Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. J. Agric. Food Chem**.** 53: 9921-9927.

Kim, D-O., and Padilla-Zakour, O.I. (2004). Jam Processing Effect on Phenolics and Antioxidant

Capacity in Anthocyanin-rich Fruits: Cherry, Plum, and Raspberry. J. Food Sci. 69: 395-400.

Kirakosyan, A., Seymour, E.M., Noon, K.R., Llane, D.E.U., Kaufman, P.B., Warber, S.L., and Bolling, S.F. (2010). Interactions of antioxidants isolated from tart cherry (*Prunus cerasus*) fruits. Food Chemistry. 122: 78-83.

Kuehl, K.S., Perrier, E.T., Elliot, D.L., and Chesnutt, J.C. (2010). Efficacy of tart cherry juice in reducing muscle pain during running: a randomized controlled trial. Journal of the International Society of Sports Nutrition. 17: 1-6.

Pedisic, S., Levaj, B., Dragovic-Uzelac and Kos, K. (2007). Physicochemical composition, phenolic content and antioxidant activity of sour cherry cv. Marasca during ripening. Agricultural Conspectus Scientificus. 72 : 295-300.

Phanida Kuasuwan, Wilawan Charernjiratrakul and Duangporn Kantachote. (2014). Selection of Probiotic Lactic acid Bacteria to be Used as Starter Culture for Pickles Production. Graduate research conference. P:667-676.

Piccolella, S., Fiorentino, A., Pacifico, S., D'Abrosca, B., Uzzo, P., and Monaco, P. (2008). Antioxidant properties of sour cherries (*Prunus cerasus* L.) : role of colorless phytochemicals from the methanolic extract of ripe fruits. J. Agric. Food Chem. 56: 1928-1935.

Pigeon, W.R., Carr, M., Gorman, C., and Perlis, M.L. (2010). Effect of a tart cherry juice beverage on the sleep of older adults with insomnia: A pilot study. J. Med. Food. 13: 1-5.

Rauhaa, J-P., et al. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. International Journal of Food Microbiology. 56: 3-12.

Riina A Kekkonen, Elina Kajasto, Minja Miettinen, Ville Veckman, Riitta Korpela, Ilkka Julkunen. (2008). Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN-γ production. World J Gastroenterol. 28; 14(8): 1192-1203.

Soledad boris et al., (1998). Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens. INFECTION AND IMMUNITY. P; 1985–1989.

Srikanjana KLAYRAUNG et al., (2008). Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated from Thai Traditional Food. Sci Pharm. 76: 485–503.

Tanganurat, W., Quinquis, B., Leelawatcharamas, V. and Bolotin, A. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables. Journal of Basic Microbiology 49: 377-385.

Tural, S., and Koca, I. (2008). Physico-chemical and antioxidant properties of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.) grown in Turkey. Scientia Horticulturae. 116: 362-366.

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก
วิธีการทดสอบทางจุลชีววิทยาและเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่สำคัญในการหมัก

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยใช้ loop เขี่ย single colony มาใส่ในอาหารเหลวปริมาตร 10 ml ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar จากนั้นแยกส่วนใสด้วยวิธีการ centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000x*g* ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วปิเปตดูดส่วนใสปริมาตร 40 µl หยดลงหลุมอาหารแข็งที่เจาะด้วยที่เจาะหลุมวุ้น (cork borer) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ amylase cellulase protease และ pectinase โดยอาหารที่ใช้ในการวิเคราะห์มีดังนี้

Amylase อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย starch2 g/l peptone 1 g/l yeast extract 1 g/l และ agar 15 g/l

Protease อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย skim milk 5 g/l yeast extract10 g/l peptone 20 g/l glucose 20 g/l และ agar 15 g/l

Cellulase อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย cellulose 5 g/l $NaNO_3$ 1 g/l K_2HPO_4 1 g/l, KCl 1 g/l $MgSO_4$.$4H_2O$ 0.5 g/l yeast extract 0.5 g/l glucose 1 g/l และ agar 15 g/l

Pectinase ประกอบด้วย pectin 10 g/l $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g/l K_2HPO_4 6 g/l KH_2PO_4 2 g/l $MgSO_4$ 0.1 g/l และ agar 15 g/l

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลายไอโอดีนเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดกรองการผลิตเอนไซม์ amylase cellulase และ pectinase เกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้นาน 5 นาที หลังจากนั้นวัดขนาดส่วนใส (clear zone) ด้วยเวอร์เนียคาร์ลิบเปอร์

2. การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวม ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu

ทำการเจือจางตัวอย่างเชอร์รี่ดอง 100 กรัม ด้วยน้ำกลั่น 10 เท่าในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร (เพื่อใช้ตลอดการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี) ดูดสารที่ได้จากการเจือจาง 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1.58 มิลลิลิตร และ Folin reagent 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม Na_2CO_3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยควบคุมไม่ให้สัมผัสแสง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร ปริมาณฟีนอลสามารถวัดเทียบได้กับสารมาตรฐานโดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg GAE/g sample; GAE = Gallic acid Equivalent)

<u>วิธีการเตรียมกราฟสารมาตรฐาน gallic acid</u>

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (Stock 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) gallic acid ปริมาตร 10 20 30 40 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ 990 980 970 960 950 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นใส่หลอดทดลอง 20 ไมโครลิตร เติม folin reagent 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1-8 นาที (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) เติม Na_2CO_3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยไม่ให้สัมผัสแสง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu

ปิเปตตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร และเติม 5% $NaNO_2$ 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) 5 นาที หลังจากนั้นเติม 10 % ($AlCl_3$) 150 µl 1 M NaOH 0.5 ml และเติมน้ำกลั่น 275 ไมโครลิตร ผสมให้เค้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ปริมาณ Flavonoids สามารถวัดเทียบได้กับสารมาตรฐาน โดยใช้ Catechin เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg CTC/g sample; CTC = Catechin)

<u>วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน Flavonoids</u>

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (Stock 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 ml ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 5 มิลลิลิตร ส่วนหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แทนแล้วเติมสารละลาย 5% $NaNO_2$ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงไป เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีจากนั้นเติมสารละลาย 10% $AlCl_3$ 0.3 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาที นำมาเติมสารละลาย 1 M NaOH 2 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

2.3 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของการต้านอนุมูลอิสระ (DPPH radical scavenging activity)

ปิเปตตัวอย่าง 250 ไมโครลิตร และเติม 75 ไมโครลิตร ของ 0.2 mM DPPH ที่ละลายในเอทานอล 95 % (v/v) และผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร จากนั้นทำการคำนวณกิจกรรม DPPH radical scavenging โดยใช้สูตร DPPH radical scavenging activity (%) = (1 - absorbance of sample/absorbance of control (DI water)) × 100.

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม

เตรียมสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ 0.025 M ที่ pH 1.0 โดยละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ 1.86 กรัม ในน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร วัดค่า pH และปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้ pH 1.0 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และเตรียมสารละลายโซเดียมอะซีเตต 0.4 M ที่ pH 4.5 โดยละลายโซเดียมอะซีเตต 54.43 กรัม ในน้ำกลั่น 960 มิลลิลิตร วัด pH และปรับค่าด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้ pH 4.5 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ชุดแรกนำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ละลายในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิลิตร ที่ pH 1.0 ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที อีกชุดหนึ่งให้นำตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร ละลายในสารละลายโซเดียมอะซีเตต 5 มิลลิลิตร ที่ pH 4.5 ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 และ 700 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ Blank ซึ่งใช้น้ำกลั่น แล้วคำนวณหาปริมาณแอนโทไซยานิน (Wrolstad et al., 2005) จากสมการนี้

สมการ $A = (A510\text{-}A700)pH1.0 - (A510 - A700)pH\ 4.5$

โดยที่ ปริมาณแอนโทไซยานิน = $(A \times Mw \times DF \times 1000)/(\varepsilon \times 1)$

A_{510} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 นาโนเมตร

A_{700} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 700 นาโนเมตร

Mw = มวลโมเลกุลของแอนโทไซยานิน = 449.2

DF = Dilution factor

ε = molar absorptivity (26,900)

1 = path length (cm)

2.5 **การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี (AOAC Method, 967.21)**

ปิเปตสารละลายผสมของ Metaphosphoric acid และ Acetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และตัวอย่างที่จะทำการวิเคราะห์ 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการไทเทรตตัวอย่างกับสารละลาย Indophenol จนถึงจุดยุติสีชมพู อ่านค่าปริมาตร Indophenol ที่ใช้ไป แล้วคำนวณหาปริมาณกรดแอสคอบิกในตัวอย่างด้วยสูตร ในกรณีการทำ blank จะปิเปตสารละลายผสมของ Metaphosphoric acid และ Acetic acid ปริมาตร 7 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วทำการไทเทรตกับสารละลาย Indophenol จนถึงจุดยุติสีชมพู อ่านค่าปริมาตร Indophenol ที่ใช้ไป แล้วคำนวณหักลบ Blank

$$\frac{mg\ of\ ascorbic\ acid}{ml} = (X\text{-}B) \times \frac{F}{E} \times \frac{V}{Y}$$

เมื่อ X = ค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่ใช้ในการไทเทรต (ml)

B = ค่าเฉลี่ยของ Blank ที่ใช้ในการไทเทรต (ml)

F = titer of dye คำนวณจากสูตร

$$\frac{mg\ ascorbic\ acid\ in\ volume\ of\ standard\ solution\ titrated}{(average\ ml\ dye\ used\ to\ titrate\ standard) - (average\ ml\ dye\ used\ to\ titrate\ blank)}$$

E = ml assayed (2 ml)

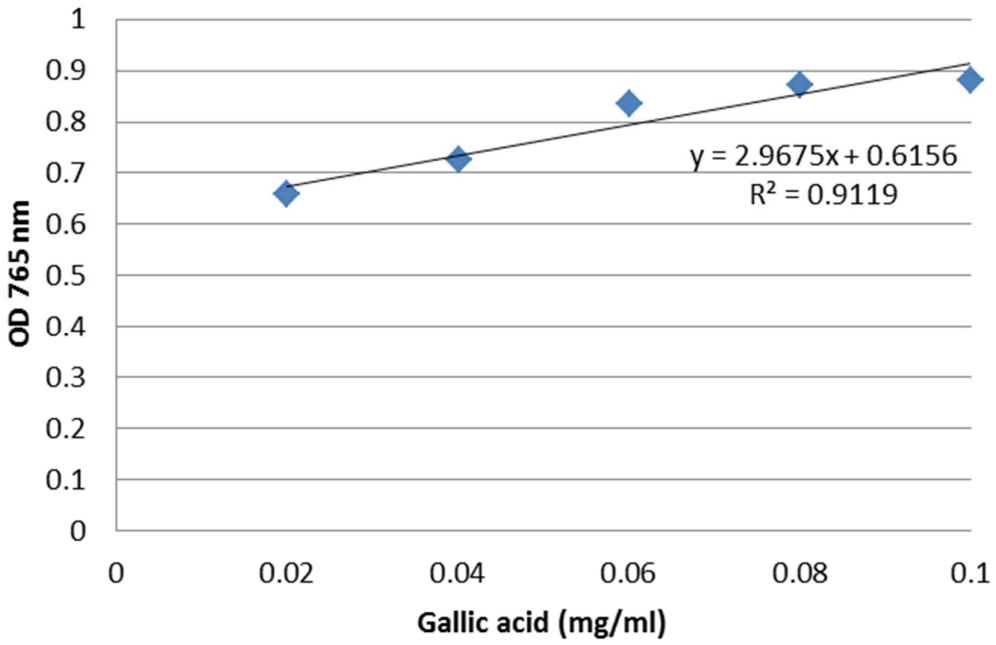
V = ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายที่วิเคราะห์ (7 ml)

Y = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ในการไทเทรต (7 ml)

ภาคผนวก ข
ผลการทดลอง

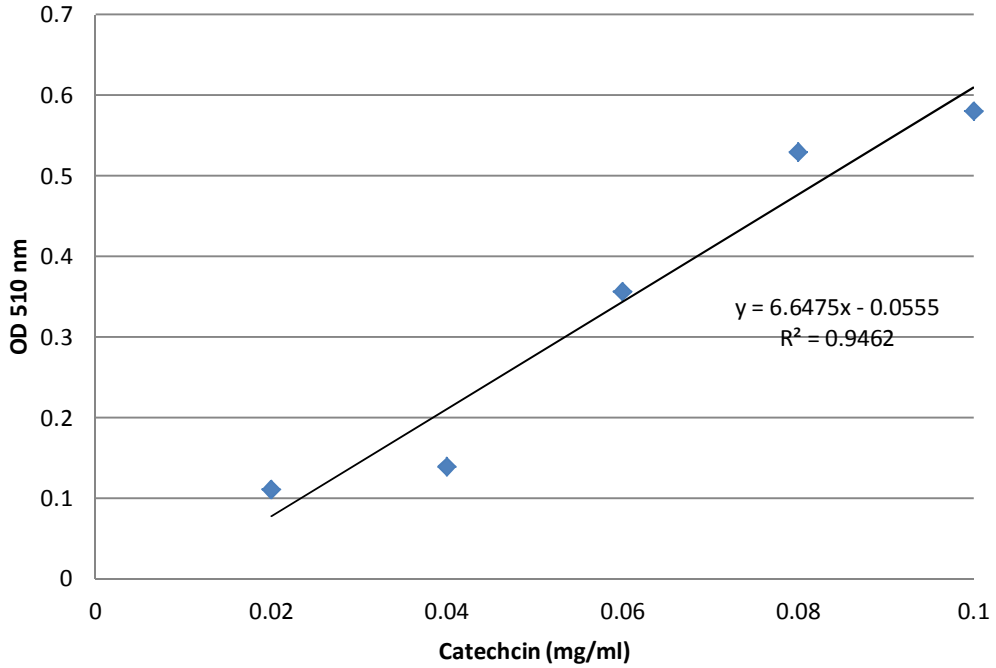
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Total phenolic



รูปที่ 20 : กราฟมาตรฐานของ Gallic acid

2. กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์ Flavonoids



รูปที่ 21 : กราฟมาตรฐานของ Catechin

3. ผลการทดสอบด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ของกล้าเชื้อ

รูปที่ 22 : ผลการทดสอบการจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ของกล้าเชื้อรหัส NCR-7

รูปที่ 23 : ผลการทดสอบการจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL medium ของกล้าเชื้อรหัส NCR-12

ประวัติผู้วิจัย

<u>หัวหน้าโครงการ</u>

นางปิยะวรรณ กาสลัก

นางปิยะวรรณ กาสลัก เกิดเมื่อวันที่ 12 เดือนมีนาคม พ.ศ.2502 ณ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (ชีววิทยา)จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2523 จบการศึกษาระดับปริญญาโท (Biotechnology and Biochemistry) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2536 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก (Applied Sciences and Biotechnology) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2539

นางปิยะวรรณ กาสลัก ได้มีผลงานทางวิชาการดังต่อไปนี้

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gasaluck, P. 1994. "Thai Fermented Fish Sauce." In Proceedings of the International Seafood Research Meeting of Mie University, Mie Academic Press, September 30.

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

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

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

Gasaluck, P., Midorigawa, Y., Imai, M. and Yoshimura, H. 1990. Enteropathogenic *E. coli*

(ETEC) Isolation in Northeast Thailand and Their Resistance to Antibiotics. Mie Medical Journal Vol 40 (3):379-384.

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

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

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

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

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

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

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

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “สมบัติวิทยากระแสและการประยุกต์ใช้เอ็กโซโพลี-แซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากถั่วเหลืองหมักด้วยกล้าเชื้อบาซิลัส สับทิลิสในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ” 2558 รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

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

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

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

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

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

วิจัยแห่งชาติ)

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การศึกษาผลการเติม แคลเซียมเบนโท-ไนต์ ในอาหารสัตว์ต่อการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา” 2553 รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การพัฒนากุนเชียงไขมันต่ำ” 2553 รับสนับสนุนจากทุนศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมเขต 6 จังหวัดนครราชสีมา

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

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

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

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

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ เกิดเมื่อวันที่ 7เดือน กันยายน พ.ศ. 2508 ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (พยาบาล) จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2530 จบการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร จาก Dalhousie University ประเทศเคนาดา เมื่อปี พ.ศ. 2543 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก วท.ด. (เทคโนโลยีอาหาร) จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี เมื่อปี พ.ศ. 2549

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ ได้มีผลงานทางวิชาการดังต่อไปนี้

Singthong, J., Oonsivilai, R., Oonmetta-aree., and Ningsanond, S. 2014. Bioactive compounds and encapsulation of Yanang (Tiliacora Triandra) leaves. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. Vol. 931-932: 76 – 84.

Chaicharoenaudomrung, N., Oonsivilai, A., Oonsivilai, R. 2014. Chlorophylls contents in Echinocactus grusonii extract. Advanced Materials Research. Vol. 931-932: 1507-1511.

Samruan, W., Gasaluck, P., and Oonsivilai, R. 2014. Total phenolics and flavonoid contents of soybean fermentation by Bacillus subtilis SB-MYP-1. Advanced Materials Research. Vol. 931-932: 1587 – 1591.

Chirinang, P., Oonsivilai, R., and Kulrattanarak, T. 2014. Ultrasound assisted extraction for preparation dietary fiber from cassava pulp. Advanced Materials Research. Vol. 931-932: 1502 -1506.

Samruan, W. Oonsivilai, A., and Oonsivilai, R. 2012. Soybean and fermented soybean extract antioxidant activities. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 72: 1169-1172.

Oonsivilai, R., Oonsivilai, A., and Piwondee, A. 2012. Effect of Rang Chuet Extract on Rat Liver Xenobiotic-Metabolizing Enzyme. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 72: 1142-1144.

Singthong j., R. Oonsivilai, J. Oonmetta-aree, S. Ningsanond. 2012. Phytochemical profiles, antioxidant activity, and cytotoxicity of Cissampelos pareira (Krueo Ma Noy) extract on Caco-2 cells. The 14th Food Innovation Asia Conference 2012. BITEC, Bangna, Bangkok, June 14-15, Poster Presentation.

Posridee, K., Sripa, B., Jitsomboon, B. and Oonsivilai, R. 2012. The Sub-chronic oral toxicity study of Rang Chute extracts. IFT Annual Meeting 2012, Las Vegas, USA, June 23-29, Poster Presentation.

Oonsivilai, R., Singthong, J. Oonmetta-aree, J., and Ningsanond, S. 2012. Bioactivity,

antioxidant activity, and cytotoxicity of Yanang, Kreu-Ma Noy, and Rang Chuet extracts. IFT Annual Meeting 2012, Las Vegas, USA, June 23-29, Poster Presentation.

Oonsivilai, R., Chanphuak, C., Srisutor, P., Kulrattanarak, T., Sutheerawattananond, M., and Oonsivilai, A. 2011. Dietary Fiber Prepared from Cassava byproduct. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 60: 1120-1123.

Oonsivilai, R., Manatwiyangkool, J. and Oonsivilai, A. 2011. Extraction Condition of Phaseolus vulgaris. . World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 60: 382-385.

Singthong, J. **Oonsivilai, R**., Oonmetta-aree., and Ningsanond, S. 2011. Phytochemical profile, antioxidant activity and cytotoxicity of Tiliacora triandra (Colebr.) Diels. (Yanang) extracts on Caco-2-cells. The 5th Thailand Congress of Nutrition 2011. September 5-7. Oral Presentation.

Posridee, K., Sripa, B. Jitsomboon, B., and **Oonsivilai, R. 2011. Acute oral toxicity study of *Thunbergia laurifolia* Linn. Extracts**.** Asean Food Conference 2011. June, 16-18.

Manatwiyangkool, J. **Oonsivilai, R. 2011. Modification of method for phaseolamin extraction from white kidney beans (Phaseolus vulgaris.). Asean Food Conference 2011. June, 16-18.

Posridee, K., Sripa, B. Jitsomboon, B., and **Oonsivilai, R. The acute oral toxicity determination (LD50) of Rang Chute extract. 3rd SUT Graduate Conference. November 21-23, 2010.

Manatwiyangkool, J. **Oonsivilai, R. 2010. Phaseolamin in white kidney beans (Phaseolus vulgaris.). 4th Thailand Congress of Nutrition. Sep, 5-7.EX-P-11(P33).

****R. Oonsivilai**, N. Chaijareonudomroung, Y. Huantanom., and A. Oonsivilai. 2010. Extraction condition of *Echinocactus grusonii*. World Academy of Science, Engineering and Technology Journal. 70: 366: 369.

****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2010. Differential evolution application in temperature profile of fermenting. WSEAS TRANSACTION on SYSTEMS. Issue. ISSN: 1109-2777. Issue 6(9): 618-628.

*****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2010. Temperature profiling during fermenting processing differential evolution. Proceeding of the 9th WSEAS International conference on energy and environment. February 23-25, Cambridge, London

Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R. 2009. A genetic algorithm application in natural cheese products. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 1, Vol 8, January, ISSN : 1109 – 2777, pp: 44 – 54.

*****Oonsivilai, R** and Oonsivilai, A. 2008. Apply a genetic algorithm to natural cheese product. Proceeding of the 8th WSEAS International conference on applied computer science (ACS'08). ISSN 1790 – 5109, pp: 269 – 274.

Oonsivilai, A. and **Oonsivilai, R. 2008 Parameter Estimation of Frequency Response Twin-Screw Food Extrusion Process using Genetic Algorithm. WSEAS TRANSACTIONS on SYSTEMS. Issue 7 Volume 7, July, ISSN: 1109 – 2777.

****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2008. Genetic Algorithm Approach to Twin-Screw Food Extrusion Process Frequency Domain Parameter Estimation. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Applied Computer & Applied Computational Science (ACACOS' 08), Hangzhou, China, April 6-8. pp: 645 – 650.

Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (Thunbergia laurifolia Lindl.) Extracts. As. J. Food Ag-Ind. 1(02): pp 116 – 128.

****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β-glucan suspensions. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modeling and Optimization, Beijing, China, September 15-17.

****Oonsivilai, R**. and Oonsivilai, A. 2007. Probabilistic neural network for β-glucan suspensions. Proceeding of the 7th WSEAS International Conference on Simulation, Modeling and Optimization, Beijing, China, September 15-17.

Oonsivilai, R., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. Presented at FoSTAT 2007. BITEC, June 14-15, Bangkok, Thailand.

Oonsivilai, R., Cheng, C., Bomser, J.A., Ferruzzi, M.G., and Ningsanond, S. 2007. Phytochemical profiling and detoxification properties of *Thunbergia Laurifolia* Lindl (Rang Chuet) extracts. Journal of Ethnopharmacology 114: 300– 306.

Oonsivilai, R., Cheng, C., Ningsanond, S., Bomser, J.A. and Ferruzzi, M.G. 2006. Induction of quinone reductase activity in murine hepatoma cells by extracts of *Thunbergia Laurifolia* Lindl. *FASEB Journal*. Vol. 20, no. 4, Part 1: A154.

Speers, R. A., Patelakis, S.J.J., A. T. Paulson, and **Oonsivilai, R**. 2004. Shear rate during brewing operations. MBAA TQ vol. 41, no. 3, pp. 241-247.

Oonsivilai, R., Speers, R.A. and Paulson, A.T. 2000. Effects of pH, maltose and ethanol on the physical properties of model beta-glucan suspensions. Presented at IOB 2000, Institute of Brewing, Asia-Pacific Section 26th Convention, Mar. 19-24, Singapore, SGP.

Oonsivilai, R. Patelakis, S.J.J., Speers, R.A., and Paulson, A.T. 1999. Rheological and filtration properties of beta-glucan polymers in the brewing process. CIFST Annual Meeting, Presentation #OR-12, June 6-9, Kelowna, BC.

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วเหลืองและถั่วขาวที่ผ่านการหมัก 2556

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ การเตรียมสารสกัดอุดมด้วยวิตามินซีจากหัวไชเท้า ทุนวิจัย สกว.

2550

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเจี่ยวกู้หลาน ทุนวิจัย SUT-UBI

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ iTAP: การเตรียมโรงงานเพื่อขอการรับรองระบบ GMP

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์สาหร่ายเส้นแก้ว

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ UBI: การยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์สาหร่ายเส้นแก้ว

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ iTAP: โครงการการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาล้างเครื่องซักผ้า

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ การศึกษาการปรับแต่งกระบวนการหมักเบียร์ที่เหมาะสมโดยใช้ profile ของอุณหภูมิเป็นตัวกำหนด

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ UBI: การพัฒนาผลิตภัณฑ์เคอรี่พัพฟ์

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ UBI: การพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำจิ้มสุกี้

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ ฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดรางจืด ย่านางและ เครือหมาน้อย

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ การศึกษาพิษกึ่งระยะยาวของสารสกัดรางจืด

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ iTAP: การพัฒนาผลิตภัณฑ์ชาเห็ดกึ่งสำเร็จรูป

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ การสกัดฤทธิ์ทางชีวภาพ และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของไกลโคไซด์จากกระบองเพชรและลีลาวดี

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ การเตรียมสารสกัดน้ำมันเมล็ดทับทิมด้วยวิธีสกัดเย็น

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ ผู้เชี่ยวชาญโครงการ iTAP : การผลิตเครื่องดื่มเชิงหน้าที่จากสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ

นางรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย์ หัวหน้าโครงการ การประยุกต์ใช้ neural network สำหรับหาค่าความเข้มข้นวิกฤตในสารละลาย beta-glucan แหล่งทุน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ 2543

ที่อยู่ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัด นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 0-4422 - 4232 โทรสาร 0-4422 – 4387

Email address: roonsivi@sut.ac.th

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี