มหาวิทยาลัยฟาฏอนี ร่วมกับ เครือข่ายความร่วมมือ
มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์ และมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

Proceedings

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6

เรื่อง

สร้างสรรค์งานวิจัยเพื่อขับเคลื่อนประเทศ
สู่ความมั่นคง มั่งคั่ง และยั่งยืนในยุค
Thailand 4.0

(วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตรนวัตกรรม)

18 ตุลาคม 2017
ณ อาคารเรียนรวมเฉลิมพระเกียรติ
มหาวิทยาลัยฟาฏอนี

ผลของการเอนแคบซูเลชั่นสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาว (*Citrus aurantifolia* (christm)) ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358

อดุลย์สมาน สุขแก้ว[1], ดาริกา จาเอาะ[2], สุนิตย์ โรจนสุวรรณ[3] และ อีลีหยะ สนิโซ[4]

[1] วศ.ม. (เทคโนโลยีวิศวกรรมพลังงาน), อาจารย์สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[2] ดร. (ฟิสิกส์), อาจารย์สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[3] ดร. (นาโนวิทยาและนาโนเทคโนโลยี), อาจารย์สาขาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
[4]วท.ม. (ฟิสิกส์), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการประยุกต์ใช้สารสกัดโพลีฟีนอลทั้งหมดจากเปลือกมะนาวโดยใช้เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล และน้ำ เป็นตัวทำละลาย ด้วยวิธีการเอนแคบซูเลชั่น แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 พบว่า สารสกัดเปลือกมะนาวที่สกัดด้วยเมทานอลให้ปริมาณสารสกัดสูงสุดเท่ากับ 17.59±0.59 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปลือกมะนาวแห้ง และให้ปริมาณสารโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 1,924.77±2.05 มิลลิกรัมสมมูลต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวแห้ง 1 กรัม เมื่อนำสารสกัดที่คัดเลือกได้มาพัฒนาเป็นแคบซูลด้วยวิธีการเอนแคปซูเลชั่นแล้วมาทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียพบว่าสามารถต้าน *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 เท่ากับ 25.83±0.41และ 23.17±0.41 มิลลิเมตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: โพลีฟีนอล เปลือกมะนาว ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *Bacillus cereus* *Pseudomonas fluorescens*

Effect of Crude Extract Lemon Peels (*Citrus aurantifolia* (christm)) by Encapsulation For Resistance Bacteria of *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358

Adulsman Sukkaew[1], Darika Jaaoh[2], Sunit Rojanasuwan[3] and Eleeyah Saniso[4]

[1] M.Eng. (Energy Engineering Technology), Lecturer of Physics, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University

[2] Dr. (Physics), Lecturer of Physics, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University

[3] Dr. (Nanoscience and Nanotechnology), Lecturer of Physics, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University

[4] MS.C (Physics), Lecturer of Physics, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University

Abstract

This research focuses on the application of total polyphenol extracts from lemon peels were added 95 percent ethanol, methanol and water as a solvent by using encapsulation technique. *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 were tested for antimicrobial activity. The extracts of lemon peels extracted with methanol gave a highest extract content of 17.59 ± 0.59 percent of dry lemon weight. And the total polyphenol content is equal to the maximum. 1,924.77 ± 2.05 Mg equivalent per gram of crude extracts from dried lime crust 1 g. When the extract was selected to be encapsulated development as encapsulation method, the antibacterial activity was found to be resistant to *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 were 25.83±0.41 and 23.17±0.41 mm, respectively.

Keyword: Polyphenol, Lemon peel, Resistance bacteria, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*

บทนำ (Introduction)

มะนาว (*Citrus aurantifolia* (christm)) เป็นพืชผลทางการเกษตรที่สร้างรายได้อย่างมหาศาลให้กับประเทศไทย โดยส่วนใหญ่มักนิยมใช้น้ำมะนาวซึ่งมีรสเปรี้ยวในอุตสาหกรรมอาหารและครัวเรือนเพื่อการปรุงแต่งกลิ่น รส อาหารให้มีความอร่อยมากขึ้น บ้างก็นิยมนำน้ำมะนาวมาผลิตเป็นเครื่องดื่ม ในทางกลับกันเปลือกมะนาวที่เป็นเศษวัสดุเหลือทิ้งและไม่ใช้ประโยชน์ ได้มีรายงานวิจัยก็ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเปลือกมะนาว บ้างก็ใช้ในการสกัดเอนไซม์แพคติเนสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยการย่อยแพคตินในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง และสกัดน้ำมันจากเปลือกมะนาวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เป็นต้น และในบางรายงานวิจัยได้มีการแยกสารจากเปลือกมะนาวเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์และเภสัช โดยพบสารกลุ่ม limonene , terpinene, pinene, myrcene, และ n-dodecano แต่ยังไม่มีรายงานการวิจัยที่มีการประยุกต์ใช้สารสกัดในการต้านแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus aureus* ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อเจ้าถิ่นที่พบทั่วไปในร่างกาย เช่น ทางเดินหายใจ โพรงจมูก ผิวหนัง ทางเดินอาหาร เป็นต้น ทำให้เกิดโรคติดเชื้อบนผิวหนัง มีฝีหนอง อาการอักเสบ บวม ร้อนแดงและมีอาการปวด และแบคทีเรีย *Bacillus cereus ATCC และ Pseudomonas fluorescens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบฉวยโอกาส สามารถทำให้เกิดโรคได้ทั้งคนและสัตว์ โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือผู้ป่วยที่อยู่ในโรงพยาบาล มีโอกาสติดเชื้อชนิดนี้ได้ง่ายและรุนแรง เช่น การติดเชื้อในแผลไฟไหม้และแผลจากสาเหตุอื่นๆ มีผลทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลาย และเสียชีวิตได้ ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดมีมากในโรงพยาบาล อาหาร เครื่องดื่ม และมักส่งผลต่อผู้ป่วยโดยตรง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจในการเอนแคปซูเลชั่นสารสกัดเปลือกมะนาวที่คัดเลือกโดยใช้ตัวทำละลายสกัดต่างชนิดกัน แล้วทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรค (*B. cereus ATCC 11778* และ *P. fluorescens TISTR 358*)

วัตถุประสงค์การวิจัย (Objective)

1. เพื่อคัดเลือกวิธีการสารสกัดจากเปลือกมะนาวโดยตัวทำละลายต่างชนิด
2. เพื่อทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358 โดยใช้สารสกัดเปลือกมะนาวด้วยวิธีการเอนแคปซูเลชั่น

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature Reviews)

สารประกอบโพลีฟีนอลสามารถจัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

โครงสร้างฟีนอลิก เป็นอนุพันธ์ของเบนซินที่มีหมู่ไฮดรอกซิลต่ออยู่เป็นหลัก และ อาจมีหมู่แทนที่ต่าง ๆ แทนที่ในตำแหน่ง ออร์โท(Ortho) เมตา(Meta) หรือพารา(para) ได้อีก สารฟีนอลิกตัวพื้นฐานคือ ฟีนอล ประกอบด้วยวงแหวน เบนซิน 1 วง และหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่ มีมวลโมเลกุล 94.11 เป็น ผลึกรูปเข็ม ไม่มีสี เมื่อโดนอากาศจะมีสีชมพูอ่อน ๆ จุดหลอมเหลว 40.85 องศาเซลเซียส จุด เดือด 182 องศาเซลเซียส สารประกอบฟีนอลิกสามารถละลายได้ในกลีเซอรอล คาร์บอนไดซัลไฟด์ อัลกอฮอล์ อีเธอร์ และคลอโรฟอร์ม โดยตัวอย่างที่พบในสารสกัดเปลือกมะนาว เช่น Tannin, Coumarin, Caffic acid, Vanillin, Ferulic acid, Cinnamic acid, Gallic acid, Ellagic acid เป็นต้น

โครงสร้างฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) เป็นสารที่ประกอบด้วยวงอะโรมาติก ตั้งแต่ 2 วงขึ้นไปโดยมีการจับกับคาร์บอนและ Aromatic hydroxyl ดังแสดงในภาพที่ 2.2 โดยตัวอย่างที่พบในสารสกัดเมล็ดมะม่วง เช่น Flavone, Flavonol และ Xanthone เป็นต้น

ชนิดและปริมาณความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธีแต่โดยทั่วไปมักนิยมวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และ วิธีมาตรฐานทั่วไป เช่น วิธี Folin-Ciocalteau Colorimetry สำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และ วิธี Colorimetric assay สำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เป็นต้น

สารโพลีฟีนอลเป็นสารที่มีอยู่มากในพืชบางชนิดเช่น ทับทิม แอบเปิ้ล มะม่วง ชา องุ่น เบอร์รี่ เป็นต้น โดยสารดังกล่าวมีประโยชน์ คือใช้ในการต้านแบคทีเรียบางชนิดโดยสารโพลีฟีนอลจะเข้าทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และยังสามารถฆ่าสปอร์ของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้ เช่นการใช้สารสกัดจากชามายับยั้ง *Bacillus stearothermophilus* สารสกัดเมล็ดมะม่วงต้าน *Vibrio parahaemolyticus* , *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* (Kabuki และ คณะ, 2000) และจากผลในการต้านแบคทีเรียนั้นสามารถที่จะรักษาโรคบางชนิดได้เช่น โรคฟันผุ โดยสารโพลีฟีนอลช่วยต้านการเจริญของแบคทีเรียในช่องปาก และยังสามารถเคลือบฟันให้มีความแข็งแรงได้

สารประกอบโพลีฟีนอลจะไปยับยั้งการทำงานของระบบเอนไซม์ Cytochrome P-450 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นทำให้เกิดสารก่อโรคมะเร็ง และ ส่งเสริมการเกิด อะพอพโทซิส (Apoptosis) ของเซลล์มะเร็งในต่อมลูกหมาก สารโพลีฟีนอลสามารถยับยั้งการทำงานของ Lipoxygenase และ ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเบสในดีเอ็นเอของ Hela cells

วิธีดำเนินการวิจัย (Research Methodology)

1 การสกัดสารจากเปลือกมะนาว

เก็บรวบรวมเปลือกมะนาว จากตลาดยะลา จังหวัดยะลา โดยเลือกใช้เปลือกที่มีสีเขียวหรือสีเขียวอมเหลือง นำเปลือกมาล้างน้ำ แล้วนำมาหั่นให้มีขนาดเล็กลง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง แล้วบรรจุถุงพลาสติกที่ผนึกถุงแบบสุญญากาศ จากนั้นทำการสกัดสารโดยนำตัวอย่างที่อบแห้งมาบดให้ละเอียด ร่อนให้มีขนาดเท่าๆ กันด้วยตะแกรงขนาด 125 Mesh แล้วสกัดโดยใช้ตัวอย่าง 20 กรัม เติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 100 มิลลิลิตร เขย่าในที่มืด ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมากรองด้วยผ้าขาวบางและหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนการสกัดด้วยน้ำและเมทานอลทำเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น โดยใช้น้ำและเมทานอลแทนเอทานอล แล้วนำไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 80 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แล้วเก็บตัวอย่างในขวดสีชาห่อพาราฟินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (อดุลย์สมาน และคณะ, 2554)

2 การตรวจหาปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดจากสารสกัดเปลือกมะนาว

2.1 วิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดโดยวิธี Folin-Ciocalteau Colorimetry (AOAC, 1990) ใช้กรดแกลลิกเป็นสารละลายมาตรฐาน และรายงานผลเป็นน้ำหนัก มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อน้ำหนักสารสกัดเปลือกมะนาวแห้ง 1 กรัม (mg gallic acid equivalents/g dry of lemon peel extract)

2.2 วิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยใช้วิธี Colorimetric assay (AOAC, 1990) ใช้คาทิชินเป็นสารละลายมาตรฐานและรายงานผลเป็นน้ำหนัก มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อน้ำหนักสารสกัดเปลือกมะนาวแห้ง 1 กรัม (mg catechin equivalents/g dry of lemon peel extract)

3. การเอนแคปซูเลชั่นสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวที่คัดเลือกได้

นำสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวที่คัดเลือกได้มาทำการเอนแคปซูเลชันแบบอนุภาคทรงกลม โดยการหยดสารละลาย อิมัลชันลงไปในสารละลาย 0.3 M $CaCl_2$ ปริมาตร 200 มิลลิลิตรที่มีการกวนอยู่ตลอดเวลาด้วยความเร็วปานกลาง เพื่อทำให้อิมัลชันเป็นอนุภาคทรงกลม จากนั้นนำเม็ดอนุภาคทรงกลมกวนต่อในสารละลาย $CaCl_2$ เป็นเวลา 45 นาที เมื่อได้เม็ดอนุภาคทรงกลมนำเม็ดอนุภาค ทรงกลมจำนวน 1 กรัม นำไปใส่ในบีกเกอร์แก้ว ที่มีกรดไฮโดรคลอริกพีเอช 1.2 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิในการกวนเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที โดยใช้แท่งแม่เหล็กกวน แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียต่อไป

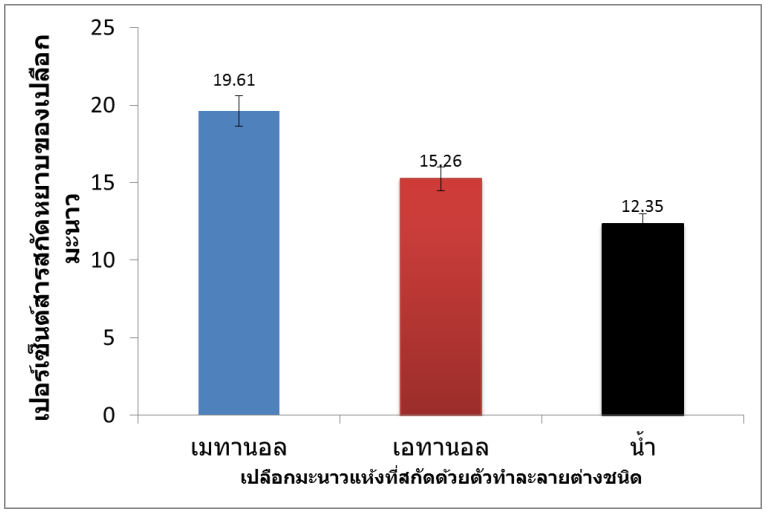
4 ศึกษาฤทธิ์การต้าน *B. cereus ATCC 11778* และ *P. fluorescens TISTR 358*

นำแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ มาเลี้ยงใน Nutrient broth (NB) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ยกเว้น *B . cereus* ATCC 11778 และ*P. fluorescens* TISTR 358 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่น แล้ว spread แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบลงบน plate อาหาร Mueller-Hinton agar (MHA) จากนั้นคีบแคปซูลของวารสกัดนำมาวางบนอาหารในจานเพาะเลี้ยงเก็บในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดขนาดเคลียร์โซนที่เกิดขึ้น ใช้ Tetracycline ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมเป็น Positive control และ DMSO ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ (V/V) เป็น Negative control (สุทธิศักดิ์ และคณะ, 2551)

ผลการวิจัย (Results)

1. ปริมาณน้ำหนักของสารสกัดจากเปลือกมะนาวด้วยเมทานอล เอทานอล และน้ำ

เมื่อนำตัวอย่างเปลือกมะนาวมาหาปริมาณน้ำหนักแห้งของเปลือกมะนาว พบว่ามีน้ำหนักเท่ากับ 73.26±0.75 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวไปสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เมทานอล เอทานอล และน้ำ พบว่ามีปริมาณสารสกัดหยาบเท่ากับ 19.61±0.32, 15.26±0.75 และ 12.35±0.55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปลือกมะนาวแห้ง ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปริมาณสารสกัดหยาบของเปลือกมะนาวที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และน้ำ

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าปริมาณสารสกัดที่สกัดได้จากการใช้ตัวทำละลายเป็นเมทานอล เอทานอล และน้ำมีปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่การใช้น้ำเป็นตัวทำละลายส่งผลให้ปริมาณสารที่แยกออกมากมีปริมาณที่น้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายข้างต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นจะพบว่าตัวทำละลายที่ใช้สกัดจะมีผลต่อปริมาณของสารที่สกัดได้จากเปลือกมะนาว ซึ่งการที่สามารถสกัดสารได้ในปริมาณที่สูง อาจเป็นไปได้ว่า สารเหล่านั้นมีสภาพการมีขั้วตัวทำละลาย และอายุของเปลือกมะนาวที่ใช้สำหรับการสกัดสารแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของศิวาพร และ ณัฏฐนี (2553) ที่ได้ศึกษาการสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดจากเปลือกฝรั่ง ซึ่งพบว่าการใช้ตัวทำละลายเมทาอนลกับเอทานอลให้ปริมาณสารสกัดกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดที่ใกล้เคียงกันเท่ากับ 11.14 กับ 10.89 เปอร์เซ็นต์ แต่จะต่างกับการใช้น้ำที่ให้ปริมาณสารสกัดกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดเพียง 3.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มีความสำคัญต่อการแยกสารกลุ่มที่ต้องการ โดยพบว่าเปลือกมะนาวที่สกัดด้วยเมทานอลให้ค่าร้อยละของสารสกัดแห้งและปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดสูงที่สุด รองลงมาคือ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 และเมื่อสังเกตสีของสารสกัดจะพบว่าการใช้เอทานอล และเมทานอล ในการสกัดสารในเปลือกมะนาว พบลักษณะสีของสารสกัดออกเป็นสีเหลืองออกน้ำตาลแต่ในขณะเดียวกัน การใช้น้ำจะมีลักษณะสีออกเป็นสีน้ำตาลเข้ม

2. ปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดของสารสกัดจากเปลือกมะนาว

การใช้เปลือกมะนาวแล้วสกัดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล และน้ำ แล้วนำสารสกัดหยาบมาตรวจปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมด พบว่ามีปริมาณเท่ากับ 1,924.77±2.05, 1,652.36±0.85 และ 1,031.62±0.72 มิลลิกรัมสมมูลต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ โดยให้เป็นปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 1,265.47±0.96, 1,113.64±2.28 และ 758.34±0.69 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวแห้ง 1 กรัม ส่วนปริมาณฟลาโวนอยทั้งหมดเท่ากับ 659.96±1.90, 545.33±2.82 และ 280.88±0.60 มิลลิกรัมสมมูลของคาเทชินต่อน้ำหนักสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2 จะเห็นได้ว่าในปริมาณโพลีฟีนอลทั้งหมดในเปลือกมะนาวในแต่ละสภาวะที่สกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ (เมทานอล และเอทานอล) และน้ำ จะมีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งเหตุผลเกิดขึ้นเพราะสภาพขั้วของสารสกัดกับตัวทำละลายที่มีความใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของวรรณทิชา และ เพ็ญแข (2545) ที่ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดสารกลุ่มฟลาโวนอยส์จากเปลือกมะนาว โดยพบว่า สารฟลาโวนอยด์เป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพทั้งด้านการป้องกันและรักษาโรคและมีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอนุมูลอิสระนี้เป็นผลให้เกิดโรคหลายชนิดในมนุษย์ ไม่ว่าจะเป็นโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตันและโรคมะเร็ง ทั้งยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของวิตามินเอ และวิตามินซีช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ป้องกันโรคหัวใจ และหลอดเลือด ป้องกันโรคภูมิแพ้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดได้ด้วย สารฟลาโวนอยด์ยังเป็นสารที่สามารถละลายน้ำได้ โดยสารส่วนเกินจะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ จึงไม่มีพิษและผลข้างเคียงใดๆ ซึ่งในงานวิจัยนี้ก็มีผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือพบปริมาณสารฟลาโวนอยส์ที่สูงเช่นเดียวกันดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งในอนาคตต่อไป ถ้าหากมีการสกัดสารให้บริสุทธิ์ก็อาจเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางเภสัชและการแพทย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ได้

3 ฤทธิ์การต้าน *B. cereus* ATCC 25923 และ *S. fluorescens* TISTR 358 จากสารสกัดเปลือกมะนาวที่ห่อหุ้มสารด้วยวิธีเอนแคปซูเลชั่น

ในการศึกษาฤทธิ์การต้าน *B. cereus* ATCC 25923 และ *S. fluorescens* TISTR 358 พบว่าการใช้สารสกัดที่สกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่ป็นเมทานอลมีฤทธิ์การต้านแบคทีเรียทั้งสองสายพันธ์ได้ดีที่สุด เท่ากับ 21.83±0.41 และ 23.17±0.41 มิลลิเมตร เมื่อเทียบกับ Positive control อย่างเห็นได้ชัดเจน ดังแสดงตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดเลือกมะนาวที่สกัดด้วยเมทานอล เอทานอล และนำ ด้วย เมื่อใช้ Tetracycline 30 µg และ DMSO เป็นตัวควบคุม

แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากสารสกัดเปลือกสับปะรด			Tetracycline 30 µg
	เมทานอล	เอทานอล	น้ำ	
B. cereus	25.83±0.41^{c}	22.17±0.51^{b}	17.50±0.84^{a}	18.17±0.52
P. fluorescens	23.17±0.41^{c}	17.17±0.41^{b}	14.83±0.41^{a}	22.25±0.42

* DMSO 75 เปอร์เซ็นต์ (V/V) ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

อักษรกำกับในแนวนอนต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การที่ผลการทดลองเป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากกระบวนการที่จุลินทรีย์ถูกยับยั้งหรือทำลายได้เนื่องจากปัจจัยด้านต่างๆ ซึ่งเกิดจากการทำลายที่ผนังเซลล์หรือการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ พบว่าผนังเซลล์ของ *B. cereus* และ *P. fluorescens* ถูกทำลาย โดยสารกลุ่มโพลีฟีนอลบางชนิดไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่กำลังเจริญเติบโต มีผลทำให้เกิดเป็นโพรโทพลาสต์ (photoplast) ซึ่งถ้าไม่เลี้ยงไว้ในสภาพที่เหมาะสม เซลล์จะแตกได้ นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยอมให้สารผ่าน ซึ่งในเยื่อหุ้มเซลล์มีสมบัติยอมให้สารอาหารผ่านเข้าสู่เซลล์ ถ้าเยื่อหุ้มเซลล์นี้ถูกทำลายจะมีผลทำให้ชะงักการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำให้เซลล์ตายได้ ซึ่งสารกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยส์ มีความสามารถที่ไปเปลี่ยนแปลงสมบัตินี้ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์รั่วไหลออกมา ในสารกลุ่มโพลีฟีนอลสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยสารกลุ่มดังกล่าวมีผลในการยังยั้งการสังเคราะห์ DNA และ RNA โดยจะไปขัดขวางการสร้าง พิวรีนและไพริมิดีน และไปขัดขวางการรวมตัวของนิวคลีโอไทด์เข้าเป็นกรดนิวคลีอิก ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมผิดปกติไป และทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ในที่สุด (Ahmad et al., 2006) ซึ่งจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียชนิด *B. cereus* ถูกต้านได้ดีกว่า *S. fluorescens* ตามกลไกที่ได้กล่าวแล้วในข้างต้น ในการศึกษาปริมาณสารโพลีนอลทั้งหมดจากเปลือกมะนาวที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างชนิดกันคือ เมทานอล เอทานอล และน้ำ ให้ปริมาณสารสกัดแห้งเท่ากับ 1,924.77±2.05, 1,652.36±0.85 และ 1,031.62±0.72 มิลลิกรัมสมมูลต่อกรัมของน้ำหนักสารสกัดหยาบจากเปลือกมะนาวแห้ง 1 กรัม ตามลำดับ โดยผลการศึกษาพบว่าการนำสารสกัดเปลือกมะนาวที่สกัดด้วยเมทานอลห่อหุ้มสารด้วยวิธีเอนแคปซูเลชั่นให้ฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรคทั้งสองชนิดที่ดีกว่า(คือมีความกว้างของเคลียร์โซนสูงสุด) เมื่อเทียบกับสภาวะอื่นที่ใช้ในการทดสอบ

ข้อเสนอแนะ

การสกัดสารจากเปลือกมะนาวอาจทำการสกัดสารโดยทำการตรวจสอบเอกลักษณ์ของสารที่ผ่านการแยกได้ เพื่อใช้ในการทดสอบกับกลุ่มจุลินทรีย์อื่นๆ ตลอดจนการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดให้อยู่ในรูปสารละลายที่สมบูรณ์ สเปรย์ หรือ ฟิล์ม เพื่อสามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้าน เกษตร การแพทย์ และอุตสาหกรรมอาหารต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง (References)

วรรณทิชา ลาภศิริ และ เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์ (2545). การสกัดสารฟลาโวนอยด์ จากเปลือกมะนาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวาพร ศิวเวช และ ณัฏฐินี ใจสะอาด (2553). การสกัดสารประกอบฟีนอลิกจากเปลือกมันฝรั่ง. การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 51 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์, สุเมธ ตันตระเธียร, ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา และจันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก. (2551) ประสิทธิภาพของสารต้านการเจริญของจุลินทรีย์ของสารสกัดจากเมล็ดมะม่วง. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อดุลย์สมาน สุขแก้ว, สุเมธ ตันตระเธียร และสุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์. (2554). การใช้สารสกัดเมล็ดมะม่วง (*Mangifera indica* L.) ร่วมกับกรดแลคติกเพื่อลดแบคทีเรียในเนื้อสัตว์. การประชุมวิชาการระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 7. มหาวิทยาลัยราชภัพระนคร,1-13 น.

Ahmad, M.M., Rehman S.U., Anjum, F.M. and Sultan, J.I. (2006). Genetic variability to essential oil composition in four citrus fruit species. *Pakistan Journal of Botany*, 38(2), 319-324.

AOAC. (1990). Official methods of analysis. 17th ed. Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

Ballesteros, L.F., Ramirez, M.J., Orrego, C.E., Teixeira, J.A. and Mussatto, S.I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, **237**, 623-631.