Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 353-356 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 353-356 (2553)

ผลประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียในเมล็ดถั่วลิสงของสารสกัดจากเปลือกผลไม้

Antimicrobial activities of fruit peel extract against bacteria in peanut seed

มนัชญา งามศักดิ์ [1], นาตยา อ่องพิมาย[1] และ วรัญญา วรุณศรี [1]
Manatchaya Ngarmsak[1], Nattaya Oungpimai[1] and Warunya Waroonsri[1]

Abstract

The inhibitory effects of crude extracts from 3 fruit peels, pomelo, pomegranate and mangosteen were tested against 4 isolations of bacteria Isolated from peanut seeds *Bacillus licheniformis* (B02), *B. megaterium* (B04) and two isolations of *B. cereus* (B09, B18) on disc diffusion assays. It was found that crude extract from pomegranate peel extract (PME) showed the most active effect and pomelo peel extract (POE) showed lesser effect, then mangosteen peel extract (MGE). The minimum inhibitory concentration (MIC) of PME against *B. licheniformis* was 12% (w/v), and The MIC for *B. megaterium* was 5%. Both isolations of *B. cereus* showed the MIC at 5 %. The MIC for POE against *B. licheniformis* was 15% (w/v). The MIC B. megaterium was at 75%. The MIC for both isolations of *B. cereus* was at 100%. The mixtures made from PME at MIC and POE at 1/2×MIC could inhibited the growth of *B. licheniformis*. The mixtures made from PME at MIC and POE at MIC also could inhibit the growth of *B. licheniformis*. The mixture of PME at MIC and POE at 1/4×MIC could also inhibited the growth of *B. megaterium*. The mixture of PME at MIC and POE at 1/4×MIC could inhibit the growth *B. cereus* isolate 1. The mixture of PME at MIC and POE at 1/2×MIC could also inhibit the growth *B. cereus* isolate 2. From the results obtained it is suggested that the mixtures of PEM and POE can enhance the antibacterial activity.

Key word: Fruit peel extracts, Minimum inhibitory concentration, Peanut seed

บทคัดย่อ

ศึกษาประสิทธิภาพสารสกัดหยาบจากเปลือกส้มโอ เปลือกทับทิมและเปลือกมังคุดในการยับยั้งแบคทีเรีย 4 isolate คือ *Bacillus licheniformis* (B02) *B. megaterium* (B04) *และ B. cereus 2 isolate* (B09, B18) ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วลิสงด้วยวิธี Disc diffusion assay โดยพบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือเปลือกส้มโอ และเปลือกมังคุด ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (MIC) กับแบคทีเรียทั้ง 4 isolate พบว่า แบคทีเรียที่ทดสอบมีความไวต่อสารสกัดจากเปลือกทับทิมและเปลือกส้มโอที่ความเข้มข้นต่างกัน แต่ไม่ไวต่อสารสกัดจากเปลือกมังคุด กล่าวคือ สารสกัดจากเปลือกทับทิมและเปลือกส้มโอสามารถยับยั้ง B02 ได้ที่ความเข้มข้น12% และ15% ตามลำดับ สามารถยับยั้ง B04 ได้ที่ความเข้มข้น 5% และ75% ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับB09 และ B18 สามารถยับยั้งได้ที่ความเข้มข้น 5% และ100% ตามลำดับ พบว่า สารผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมเท่ากับ12% (MIC)และสารสกัดเปลือกส้มโอเท่ากับ 1/2×MIC หรือ MIC สามารถยับยั้ง B02 ได้ ที่ความเข้มข้นของเปลือกทับทิมเท่ากับ MIC และเปลือกส้มโอเท่ากับ 1/4×MIC สามารถยับยั้ง B04 ได้ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมเท่ากับ MIC และ เปลือกส้มโอเท่ากับ 1/4×MIC สามารถยับยั้ง B09 ได้ ที่ความเข้มข้นของเปลือกทับทิม เท่ากับ MIC และเปลือกส้มโอเท่ากับ1/2MIC สามารถยับยั้ง B018 ได้

คำสำคัญ สารสกัดเปลือกผลไม้, ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ยับยั้งการเจริญเติบโต, เมล็ดถั่วลิสง

คำนำ

โครงการวิจัยนี้ได้รับโจทย์วิจัยจากผู้ประกอบการผลิตถั่วลิสงงอกเพื่อการส่งออก ประสบปัญหาว่าเมล็ดถั่วลิสงมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์สูง ทั้งยีสต์รา และแบคทีเรีย ทำให้ส่งผลต่อผลิตภัณฑ์เมล็ดถั่วลิสงงอก เสื่อมเสียง่าย และมีปริมาณจุลินทรีย์สูงไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ผู้ประกอบการมีการใช้คลอรีนในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่พบปัญหาการตกค้างของกลิ่น

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหารและโภชนศาสตร์ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม 44000
[1] Department of Food Technology and Nutrition, Faculty of Technology, Mahasarakharm University, Mahasarakharm44000

และแนวโน้มของผู้บริโภคไม่ต้องการสารเคมีในอาหารมีรายงานวิจัยที่กล่าวว่า ในเปลือกผลไม้มีสารออกฤทธิ์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ เช่น ในเปลือกผลไม้พืชตระกูลส้มมีสาร Linalool citral และ Limonene อยู่มาก (Fisher และ Phillips, 2006) ในเปลือกทับทิมและเปลือกมังคุดพบว่ามีสาร phenolic compound ซึ่งมีผลการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกัน จึงอาจกล่าวได้ว่า เปลือกผลไม้ ได้แก่ เปลือกส้ม เปลือกทับทิม และเปลือกมังคุดมีศักยภาพเป็นสารฆ่าเชื้อธรรมชาติในอาหารได้

อุปกรณ์และวิธีการ

นำเปลือกส้มโอส่วนสีเขียว (อบแห้ง 50°Cเป็นเวลา 3 ชั่วโมง) เปลือกทับทิมสด และเปลือกมังคุดสด บดละเอียด สกัดด้วยเอทานอล 95% โดยกวนสม่ำเสมอเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (25-28°C) ระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศและเก็บสารสกัดไว้ในขวดทึบแสง ที่ 0°C เพื่อรอการทดสอบ แยกแบคทีเรียที่เหลือรอดหลังการล้างเมล็ดถั่วลิสงตามวิธีของผู้ประกอบการ ใช้ถั่วตัวอย่างละ 25 กรัม ตีป่นและ pour plate บน Plate count agar (Criterion, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แยกแบคทีเรียโดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างๆมาบ่มเลี้ยงอีกครั้ง โดยทำการ cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE (Tryptic Soy Agar with Yeast Extract; Criterion, USA) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จำแนกระดับสายพันธุ์โดยใช้ API 20E และ API 20 NE test kit (bioMérieux sa, Marcy l'Etoile, France) ทดสอบประสิทธิภาพ และหาค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบต่อแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้วิธี disc diffusion ดัดแปลงจากวิธีของ Fisher และ Phillips, (2006) ใช้ paper disc ขนาดเส่นผ่าศูนย์กลาง 6 mm ที่มีสารสกัดหยาบจากเปลือกส้มโอ เปลือกทับทิม เปลือกมังคุด เอทานอล 95% (control) และยาปฏิชีวนะ (control) วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE ที่ inoculate แบคทีเรีย (10^8 cfu/ml) จานเพาะเชื้อละ 6 disc (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone ที่เกิดขึ้น ในหน่วย mm ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่พบ inhibition zone (> 8 mm) ให้เป็นค่า MIC เมื่อได้ค่า MIC เตรียมสารผสมของสารสกัดหยาบจากเปลือกผลไม้นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่แยกได้ ด้วยวิธี disc diffusion และ ศึกษาการยับยั้งในเมล็ดถั่วลิสงโดยการคลุกเมล็ดถั่วลิสงด้วยสารสกัดและนำไปเพาะเชื้อ

ผลและวิจารณ์

สารสกัดหยาบที่ได้จากเปลือกส้มโอมีลักษณะสีน้ำตาลไหม้ ข้นเหนียว มีตะกอนปน สารสกัดหยาบที่ได้จากเปลือกทับทิมมีลักษณะสีน้ำตาลไหม้ ข้นเหนียวน้อยกว่าเปลือกส้มโอ และสารสกัดหยาบที่ได้จากเปลือกมังคุดมีลักษณะสีน้ำตาลอมม่วง เหลวไม่ข้นเหนียว ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแต่ละเปลือกไม่เท่ากัน แยกแบคทีเรียที่เหลือรอดหลังการล้างเมล็ดถั่วลิสงได้ 4 isolates ดังนี้ *Bacillus licheniformis* (B02) *B. megaterium* (B04) และ *B. cereus* 2 isolate (B09, B18) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียพบว่าสารสกัดจากเปลือกทับทิม มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด รองลงมาคือเปลือกส้มโอ และเปลือกมังคุด (Table 1 2 และ 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fisher และ Phillips, (2006) ซึ่งพบว่าในเปลือกผลไม้ที่มีสาร Limonene ที่ให้รสขมและสาร Tannin ที่ให้รสฝาดในเปลือกผลไม้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี เมื่อนำมาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 isolates (MIC) พบว่า สารสกัดจากเปลือกทับทิมและเปลือกส้มโอมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบที่ความเข้มข้นต่างกัน กล่าวคือ สารสกัดจากเปลือกทับทิมและเปลือกส้มโอสามารถยับยั้ง B02 ได้ที่ความเข้มข้น 12% และ15% ตามลำดับ และสามารถยับยั้ง B04 ได้ที่ความเข้มข้น 5% และ 75% ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับ B09 และ B18 สามารถยับยั้งได้ที่ความเข้มข้น 5% และ100% ตามลำดับ

Table1 The inhibitory effects of crude extracts from pomelo peel against 4 isolations of bacillus Isolated from peanut seeds. Data are the means ±standard deviation of three replicates.

Concentration (w/v)	Inhibition zone (mm.)			
	B02	B04	B09	B18
25%	12.00±5.66^{b}	7.00±0.00^{a}	6.00±0.00^{a}	6.00±0.00^{a}
50%	9.50±0.71^{a}	7.00±0.00^{a}	7.00±0.00^{a}	6.50±0.71^{a}
75%	12.00±2.83^{b}	9.00±0.00^{b}	8.00±0.00^{b}	7.50±0.71^{ab}
100%	15.50±0.71^{c}	11.00±0.00^{c}	9.50±0.71^{c}	8.50±0.71^{b}

Table 2 The inhibitory effects of crude extracts from pomegranate peel against 4 isolations of bacillus Isolated from peanut seeds. Data are the means ±standard deviation of three replicates.

Concentration (w/v)	Inhibition zone (mm.)			
	B02	B04	B09	B18
25%	12.50±0.71^{a}	17.50±0.71^{a}	14.50±0.71^{a}	13.00±1.41^{a}
50%	14.00±0.00^{b}	19.00±0.00^{b}	16.00±1.41^{ab}	16.00±0.00^{b}
75%	15.50±0.71^{bc}	19.50±0.71^{b}	17.00±0.00^{bc}	17.50±0.71^{b}
100%	17.50±0.71^{c}	22.00±0.00^{c}	19.00±0.00^{c}	20.00±0.00^{c}

Means with different letters within column are significantly different at 5% level according to Duncan's New Multiple range test.

Table 3 The inhibitory effects of crude extracts from mangosteen peel against 4 isolations of bacillus Isolated from peanut seeds. Data are the means ±standard deviation of three replicates.

Concentration(w/v)	Inhibition zone (mm.)			
	B02	B04	B09	B18
25%	6.50±0.71^{a}	6.50±0.71^{a}	7.00±0.00^{a}	7.00±0.00^{a}
50%	8.00±1.41^{a}	8.00±0.00^{ab}	7.50±0.71^{ab}	7.50±0.71^{a}
75%	8.50±0.71^{a}	9.00±0.00^{bc}	8.50±0.71^{b}	8.50±0.71^{ab}
100%	12.50±0.71^{b}	11.00±1.41^{c}	11.00±0.00^{b}	9.50±0.71^{b}

Means with different letters within column are significantly different at 5% level according to Duncan's New Multiple range test.

Table 4 Minimum inhibitory concentrations of pomelo peel and pomegranate peel extract toward Bacilli isolated from peanut seed. Values represent the mean of three replicate trials and standard errors (SD) for the measurements

ID	Minimum Inhibition Concentration: MIC			
	Pomelo peel extract concentration (% w/v)	Inhibition zone (mm.)	Pomergranate peel extract concentration (% w/v)	Inhibition zone (mm.)
B02	15%	16.50±0.71	12%	9.00±1.42
B04	75%	9.00±0.00	< 5%	14.00±0.00
B09	75%	8.00±0.00	< 5%	10.50±0.71
B18	100%	8.50±0.71	5%	8.00±0.00

เมื่อผสมสารสกัดจากเปลือกส้มโอและทับทิมเข้าด้วยกันที่ความเข้มข้นต่างๆ (Table 4) พบว่าสารผสมของสารสกัดที่ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมเท่ากับค่า MIC และสารสกัดเปลือกส้มโอเท่ากับ 1/2×MIC หรือ MIC สามารถยับยั้ง B02 ได้ ที่ความเข้มข้นของเปลือกทับทิมเท่ากับ MIC และเปลือกส้มโอเท่ากับ 1/4×MIC สามารถยับยั้ง B04 ได้ ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเปลือกทับทิมเท่ากับ MIC และ เปลือกส้มโอเท่ากับ 1/4×MIC สามารถยับยั้ง B09 ได้ ที่ความเข้มข้นของเปลือกทับทิม เท่ากับ MIC และเปลือกส้มโอเท่ากับ1/2MIC สามารถยับยั้ง B018 เมื่อนำสารผสมในความเข้มข้นที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ มาทดสอบโดยการคลุกกับเมล็ดถั่วลิสงเป็นเวลา 30 นาทีและวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์นับได้ทั้งหมด พบว่าสารผสมทั้งหมดมีประสิทธิภาพลดจำนวนจุลินทรีย์ลงได้ < 2 log cfu/g ซึ่งยังให้ไม่ให้ประสิทธิภาพดีต่อการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม ต้องมีการศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม หรือใช้ปัจจัยอื่นร่วมด้วย

สรุป

สารสกัดหยาบจากเปลือกส้มโอและเปลือกทับทิมมีศักยภาพในการต้านแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ทั้ง 4 Isolate ที่แยกได้จากเมล็ดถั่วลิสง แต่ต้องศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในเมล็ดถั่วในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เมื่อนำสารสกัดเปลือกทับทิมผสมกับสารสกัดเปลือกส้มโอที่มีประสิทธิภาพรองลงมาจะสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดียิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

งบประมาณบางส่วนของโครงงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโครงงานอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาตรีประจำปี 2551 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

Fisher K. and Phillips C.A. 2006.The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *J of applied microbiology*. 101 (6)1232-1240.