

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพ ที่เตรียมจากผักพื้นบ้านไทยอีสาน

Antimicrobial Activity of Biological Fermented Products from Northeastern Thai Indigenous Vegetables

ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา¹, วันดี รังสิวิจิตรประภา², ไชยวัฒน์ ไชยสุต³

Chutinun Prasitpuriprecha¹, Wandee Rungseewijitprapa², Chaivavat Chaiyasut³

¹กลุ่มวิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

²กลุ่มวิชาเภสัชเคมีและเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

³สาขาวิทยาศาสตร์เภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

Received: 28 March, 2007

Accepted: 20 June, 2007

Abstract

Biological fermented products are obtained from the fermentation of vegetables, fruits and sugar mediated by microorganisms. The objective of this research was to study the antimicrobial activity of three biological fermented products derived from Northeastern Thai vegetables, namely *Careya sphaerica* Roxb., *Cratoxylum formosum* Dyer and *Eugenia grata* (Wight) S.N. Mitra var. *gratum*. Each of them was prepared according to the local wisdom process. After 1 month of fermentation, the products were investigated for antimicrobial activity against 7 microorganisms, i.e. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* by agar disc diffusion method. The antimicrobial activity of the aqueous extracts of these plants was also compared. Results showed that the biological fermented product and the extract of *C. sphaerica* had the effect on *B. subtilis*, *S. aureus*, and *S. typhi*, while the biological fermented product of *C. sphaerica* had the additional effect on *E. coli* and *P. aeruginosa*. Both the biological fermented product and the extract of *E. grata* had the activity against *S. typhi*, but the former showed more inhibitory activity on *B. subtilis* and *S. aureus*. The extract of *C. formosum* had the activity on *S. aureus* but its biological fermented product did not. From the present, it is likely to conclude that the biological fermented products of Northeastern Thai vegetables that showed the appreciably antimicrobial activity were *C. sphaerica* and *S. gratum*, respectively. In detection of the fermentation participating microorganism, *Lactobacillus casei* was found and it existed in the products for about 2-3 weeks of fermentation. These biological fermented products were in the absence of microbial pathogens e.g., *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* and *Clostridium perfringens*. However fungi were over the limit.

Keywords: Biological fermented products, antimicrobial activity, *Careya sphaerica* Roxb., *Cratoxylum formosum* Dyer, *Eugenia grata* (Wight) S.N. Mitra var. *gratum*

บทคัดย่อ

น้ำหมักชีวภาพเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการหมักพืช ผัก ผลไม้กับน้ำตาล โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพจากผักพื้นบ้านอีสาน 3 ชนิด คือ กระโดน, เม็ก และตัว โดยเตรียมตามวิธีภูมิปัญญาชาวบ้าน ทดสอบน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากการหมักนาน 1 เดือนเพื่อหาฤทธิ์ต้านจุลชีพ 7 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Candida albicans* ด้วยวิธี agar disc diffusion การเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพกับสารสกัดด้วยน้ำของพืชทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว พบว่า น้ำหมักชีวภาพจากกระโดนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดของกระโดนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *S. typhi* เท่านั้น น้ำหมักชีวภาพจากเม็กมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. typhi* และ *S. aureus* ในขณะที่สารสกัดของเม็กมีฤทธิ์ต้านเฉพาะเชื้อ *S. aureus* ส่วนสารสกัดตัวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* แต่น้ำหมักชีวภาพจากตัวไม่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด ดังนั้น พืชผักพื้นบ้านอีสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเป็นน้ำหมักชีวภาพเพื่อให้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพดี คือ กระโดน และเม็ก ตามลำดับ นอกจากนี้ ผลการศึกษาระยะเวลามีชีวิตของจุลินทรีย์หมัก พบว่า *Lactobacillus casei* มีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 2-3 สัปดาห์หลังการหมัก ผลการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำหมักชีวภาพ ไม่พบเชื้อก่อโรคที่ต้องห้ามในวัตถุดิบที่มาจากพืช ได้แก่ *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *Clostridium perfringens* แต่มีปริมาณเชื้อราเกินเกณฑ์ที่กำหนดในน้ำหมักชีวภาพของพืชทั้ง 3 ชนิด

คำสำคัญ : น้ำหมักชีวภาพ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ ตัว เม็ก กระโดน

บทนำ

น้ำหมักชีวภาพ (biological fermented product) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการหมักพืช ผัก ผลไม้ และเศษอาหารตามธรรมชาติต่าง ๆ กับน้ำตาลธรรมชาติ เช่น น้ำตาลแดง น้ำตาลอ้อย น้ำผึ้ง เป็นต้น โดยอาศัยการทำงานที่มีประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (indigenous microorganism) หรือ จุลินทรีย์ที่เตรียม (inoculated microorganism) ที่ใช้เริ่มต้นการหมัก (starter) (Thunell, 1986) น้ำหมักชีวภาพมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล ประกอบด้วยจุลินทรีย์ สารอินทรีย์ ธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม อาทิเช่น กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ กลูโคส วิตามิน ฮอโมน เอนไซม์ (เจนวรา และธัญวรรณ, 2546)

ปัจจุบัน ประเทศไทยมีการนำน้ำหมักชีวภาพมาใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งในด้านอุปโภค บริโภคและ กิจกรรม ดังตัวอย่างของชุมชนอโศกที่นำน้ำหมักชีวภาพมาใช้ประโยชน์เป็นน้ำยาซักผ้า น้ำยาล้างจาน สบู่เหลว แชมพูสระผม น้ำยาล้างรถ น้ำยาดับกลิ่น

บูยน้ำ น้ำยาบ้วนปาก ยาทาแก้ผิว-ผ้า หรือใช้บริโภค เป็นยา เป็นต้น ต่อมาได้มีการนำน้ำหมักชีวภาพมาใช้บริโภคเพื่อรักษาผู้ติดเชื้อเอดส์ ผู้ป่วยมะเร็ง และใช้ส่งเสริมสุขภาพสำหรับประชาชนทั่วไป โดยมีความเชื่อว่าสามารถใช้ฟื้นฟูสุขภาพ และส่งเสริมสุขภาพได้ เป็นเหตุให้ประชาชนตื่นตัวมีการผลิตน้ำหมักชีวภาพใช้ด้วยตนเองกันมากขึ้น ในขณะที่ยังขาดข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ยืนยันถึงฤทธิ์ทางชีวภาพ และความปลอดภัยของน้ำหมักชีวภาพ (ไชยวัฒน์, 2547)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพที่ได้จากพืชผักพื้นบ้านอีสาน 3 ชนิด คือ กระโดน ตัว และเม็ก ซึ่งเป็นผักที่มีรสเปรี้ยว นิยมนำมาบริโภคเป็นอาหาร แต่ยังไม่มีความรู้การศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (กมลทิพย์, 2543; สถาบันการแพทย์แผนไทย, 2541; เดช และสงคราม, 2543; มาโนช และคณะ, 2538) นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังคำนึงถึงความปลอดภัยของน้ำหมักชีวภาพที่เตรียมโดย ขบวนการผลิตแบบภูมิปัญญาชาวบ้าน จึงจำลองการ

ผลิตเพื่อทดสอบหาเชื้อก่อโรคบางชนิด รวมทั้งศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักคือเชื้อ *Lactobacillus casei* เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับผู้บริโภคในการพิจารณาเลือกใช้น้ำหมักชีวภาพให้เกิดประโยชน์สูงสุดตามความเหมาะสม ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาน้ำหมักชีวภาพ และสามารถนำไปใช้ในการอ้างอิงเพื่อการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยและมีคุณค่าต่อการบริโภค ซึ่งจะนำไปสู่เกณฑ์มาตรฐานของน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภคต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 พืชผักพื้นบ้าน

ติ้ว (*Cratoxylum formosum* Dyer; Family Guttiferae)

กระโดน (*Careya sphaerica* Roxb.; Family Baringtoniaceae)

แม็ก (*Eugenia grata* (Wight) S.N. Mitra var. *gratum*; Family Myrtaceae)

1.2 จุลินทรีย์หมัก หรือ หัวเชื้อ

Lactobacillus casei

1.3 จุลินทรีย์ทดสอบ

Bacillus subtilis ATCC 6633,
Staphylococcus aureus ATCC 25923,
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228,
Escherichia coli ATCC 25922,
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853,
Salmonella typhi ATCC 13311,
Candida albicans ATCC 10231

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

De man Rogosa and Shape (MRS) Agar and Broth (Merck®), Mueller-Hinton Agar (MHA) (Difco®), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Difco®), Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck®), Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck®)

2. การเตรียมน้ำหมักชีวภาพ

ล้างผักจนสะอาด และนำไปหมักตามอัตราส่วนดังนี้

สูตร 1-พืช: น้ำตาลอ้อย: น้ำ ในอัตราส่วน 3:1:10

สูตร 2-พืช: น้ำตาลอ้อย: น้ำ ในอัตราส่วน 3:1:10

และจุลินทรีย์หมัก 10 %

สูตร 3-น้ำตาลอ้อย: น้ำ ในอัตราส่วน 1:10

สูตร 4-น้ำตาลอ้อย: น้ำ ในอัตราส่วน 1:10

และจุลินทรีย์หมัก 10 %

บรรจุส่วนผสมในภาชนะบรรจุซึ่งเป็นถังน้ำดื่มขนาด 20 ลิตร มีฝาปิดสนิท และเก็บรักษาในอุณหภูมิห้องที่ไม่ถูกแสง แต่ละสูตรทำซ้ำ 3 ถัง (n=3) โดยสูตรที่ 1, 3 และ 4 เป็นตัวควบคุม สูตรที่ 2 เป็นสูตรจำลองการผลิตตามแบบภูมิปัญญาชาวบ้าน ใช้ระยะเวลาการหมัก 4 เดือน

3. การเตรียมสารสกัดพืชผักพื้นบ้าน

ล้างผักจนสะอาด ทำแห้งแล้วบดเป็นผง ชั่งผงพืช 100 กรัม ใส่ลงใน soxhlet apparatus แล้วสกัดด้วยน้ำกลั่น 20 มล. ที่ 50 °ซ 8 ชม. กรองสารสกัด และระเหยแห้งด้วย lyophilizer เก็บสารสกัดที่ -20 °ซ

4. การเตรียมน้ำหมักจุลินทรีย์ทดสอบ

เชื้อแบคทีเรีย

เพาะเชื้อแบคทีเรียใน TSB บ่มที่ 37 °ซ 24 ชม. ปรับเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No. 0.5 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

เชื้อรา

เพาะเชื้อราบน SDA ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 วัน จนถึงระยะสปอร์ เต็ม 0.9% sterile normal saline 5 มล. เพื่อล้างเชื้อ และแยกเอาเส้นใยออก โดยกรองผ่านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับเชื้อราให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mc Farland No. 0.5 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร

5. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หมักและจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดพืช

ละลายและเจือจางสารสกัดจากตัว เมีก และ กระโดน ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มก./มล. กรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 มม. จากนั้น ใส่สารสกัด 50 มก. บน กระดาษซับกลม (paper disc) เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. แล้วนำมา ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion (Jorgensen et al., 1999)

ใช้สำลีพันก้านไม้ปราศจากเชื้อจุ่มในจุลินทรีย์ ทดสอบที่เพาะเลี้ยงใน TSB นำไปป้ายให้ทั่วผิวหน้า ของอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA วาง disc ของสาร ทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 °ซ 24 ชม. (ถ้าเป็นเชื้อ *L. casei* เพาะเลี้ยงบน MRS agar บ่มในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์) อ่านผลโดย วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น ซึ่ง ต้องมีค่าไม่น้อยกว่า 7 มม. จึงถือว่ามียุทธิต้านจุลชีพ การทดสอบนี้มี chloramphenicol 30 มก., tetracycline 30 มก., amphotericin - B 3 มก. เป็น positive control

5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของ น้ำหมักชีวภาพ

กรองน้ำหมักชีวภาพสูตรต่างๆ ที่หมักเป็นเวลา 1 เดือน ด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 มม. จากนั้น ใส่ น้ำหมักชีวภาพ 50 มก. บน paper disc ทำแห้ง แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion

6. การทดสอบหาเชื้อ *L. casei* ในน้ำหมักชีวภาพที่ระยะเวลาต่างๆ

น้ำหมักชีวภาพที่หมักระหว่าง 0-9 สัปดาห์ และ 3-4 เดือน นำมาแยกเชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ซึ่งเป็น selective medium ของ *Lactobacillus* spp. บ่มเพาะที่ 37 °ซ ภายใต้สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตลักษณะโคโลนีที่ แยกออกมาและตรวจเอกลักษณ์ของเชื้อที่แยกได้

7. การทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์โดยรวม และ ทดสอบหาเชื้อก่อโรคบางชนิดในน้ำหมักชีวภาพ

ทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ (ที่ต้องการอากาศ) โดยรวม (total viable aerobic microbial counts) ทั้ง เชื้อแบคทีเรียและรา พร้อมกับทดสอบหาเชื้อก่อโรค 4 ชนิดคือ *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* และ *Clostridium*

perfringens ในน้ำหมักชีวภาพสูตร 2 จากการหมัก 1 สัปดาห์ของพืชทั้ง 3 ชนิด

7.1 การตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ใช้วิธี spread plate โดยเจือจางน้ำหมักชีวภาพด้วย phosphate buffer ในอัตราส่วน 1:10, 1:100 และ 1:1000 เติมสารละลายเจือจาง 0.1 มล. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ใช้แท่งแก้วอเกลียตัวอย่างจนกระจายทั่วพื้นผิวสำหรับการเจริญ ของแบคทีเรีย บ่มที่ 35-37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชม. ส่วนเชื้อราบ่มที่ 20-25 °ซ เป็นเวลา 5 วัน นับจำนวน โคโลนีที่เกิดขึ้น

7.2 การตรวจสอบหาเชื้อก่อโรคบางชนิด

แยกเชื้อในน้ำหมักชีวภาพบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ selective medium ของเชื้อที่ต้องการทดสอบ และตรวจเอกลักษณ์ของเชื้อที่เกิดขึ้นด้วย biochemical test ดังนี้ (สุมาลี, 2542)

***E. coli*:** Eosin Methylene Blue (EMB) agar, TSI (Triple Sugar Iron) agar slant, Indole; Methyl Red; Voges-Proskauer; Citrate (IMViC) test

***S. aureus*:** Mannitol salt agar, Catalase test, Coagulase test

***S. typhi*:** Bismuth sulfite (BS) agar, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar, Hektoen Enteric (HE) agar, TSI agar, Lysine Iron (LI) agar slant, Urease test, Lysine Decarboxylase test, IMViC test

***C. perfringens*:** Tryptose-sulfide cycloserine (TSC) agar, Lecitinase test, Carbohydrate fermentation, Motility test, Stormy fermentation

ผลการทดลอง

1. ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

1.1 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์หลักของสารสกัดพืช

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *L. casei* ของสารสกัดกระโดน ตั้วและเม็ก ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มก./มล. พบว่าสารสกัดทุกความเข้มข้นของพืชทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *L. casei* แสดงว่าสามารถนำเชื้อ *L. casei* มาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักได้ หรือสามารถนำพืชทั้ง 3 ชนิดนี้มาทำเป็นน้ำหมักชีวภาพได้

1.2 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดพืช

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดพืช แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งสารสกัดจากกระโดนต้านจุลชีพดีที่สุด โดยพบว่าเมื่อผลต่อเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* และ *S. typhi* ส่วนสารสกัดตั้วมีผลเฉพาะต่อเชื้อแกรมบวกคือ *S. aureus* และสารสกัดเม็กมีผลต่อเชื้อแกรมลบ คือ *S. typhi* แต่ในความเข้มข้นขนาดสูง (100 มก./มล.) ให้ผลต่อ *B. subtilis* ได้

ตารางที่ 1 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดกระโดน ตั้ว และเม็ก

สารตัวอย่าง (มก./มล.)		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
กระโดน	25	-	+	-	-	+	-	-
	50	+	+	-	-	+	-	-
	100	+	+	+	-	+	-	-
ตั้ว	25	-	+	-	-	-	-	-
	50	-	+	-	-	-	-	-
	100	-	+	-	-	-	-	-
เม็ก	25	-	-	-	-	+	-	-
	50	-	-	-	-	+	-	-
	100	+	-	-	-	+	-	-
Chloramphenicol	30	+	+	+	+	+	+	-
Tetracycline	30	+	+	+	+	+	+	-
Amphotericin B	3	-	-	-	-	-	-	+

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ
+ หมายถึง มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

1.3 ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของน้ำหมักชีวภาพที่หมักนาน 1 เดือน

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ทดสอบของน้ำหมักชีวภาพ แสดงในตารางที่ 2-4 พบว่า น้ำหมักชีวภาพจากกระโดนสูตรที่ 1- พืชและน้ำตาล และสูตร 2 - พืช น้ำตาลและจุลินทรีย์หมัก พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* และ *P. aeruginosa* (ตารางที่ 2) ส่วนน้ำหมักชีวภาพจากตั้วทุกสูตรไม่พบฤทธิ์ต้านจุลชีพ (ตารางที่ 3) ในขณะที่น้ำหมักชีวภาพจากเม็กสูตรที่ 1 - พืช และน้ำตาล และสูตร 2 - พืช น้ำตาลและจุลินทรีย์หมัก พบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *S. typhi* (ตารางที่ 4)

2. เชื้อ *L. casei* ในน้ำหมักชีวภาพที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ผลการตรวจเชื้อ *L. casei* ในน้ำหมักชีวภาพ ในช่วงระยะเวลาการหมักสัปดาห์ที่ 0-9 และระยะเวลาเดือนที่ 3 และ 4 ผลแสดงในตารางที่ 5-7 ปรากฏว่า น้ำหมักชีวภาพจากกระโดน ตั้ว และเม็ก สามารถตรวจพบ *L. casei* ภายในเดือนแรก (ประมาณ 4 สัปดาห์)

ตารางที่ 2ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพจากกระโดน

สูตร	pH	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
พืช + น้ำตาล	4.13	+	+	-	+	+	+	-
พืช + น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	4.20	+	+	-	+	+	+	-
น้ำตาล	3.17	-	-	-	-	-	-	-
น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	2.86	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพจากถั่ว

สูตร	pH	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
พืช + น้ำตาล	3.24	-	-	-	-	-	-	-
พืช + น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	3.25	-	-	-	-	-	-	-
น้ำตาล	2.96	-	-	-	-	-	-	-
น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	2.84	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพจากเม็ก

สูตร	pH	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
พืช + น้ำตาล	3.72	+	+	-	-	+	-	-
พืช + น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	3.69	+	+	-	-	+	-	-
น้ำตาล	3.62	-	-	-	-	-	-	-
น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	3.24	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ
+ หมายถึง มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ

ตารางที่ 5 เชื้อ *L. casei* ในน้ำหมักชีวภาพจากกระโดน

สูตร	ระยะเวลาของน้ำหมักชีวภาพที่ทดสอบ											
	w0	w1	w2	w3	w4	w5	w6	w7	w8	w9	m3	m4
พืช + น้ำตาล	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x	x	x
พืช + น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x	x	x
น้ำตาล	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x	x	x

ตารางที่ 6 เชื้อ *L. casei* ในน้ำหมักชีวภาพจากถั่ว

สูตร	ระยะเวลาของน้ำหมักชีวภาพที่ทดสอบ											
	w0	w1	w2	w3	w4	w5	w6	w7	w8	w9	m3	m4
พืช + น้ำตาล	/	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x	x
พืช + น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	/	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x	x
น้ำตาล	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	/	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x	x

ตารางที่ 7 เชื้อ *L. casei* ในน้ำหมักชีวภาพจากเม็ก

สูตร	ระยะเวลาของน้ำหมักชีวภาพที่ทดสอบ											
	w0	w1	w2	w3	w4	w5	w6	w7	w8	w9	m3	m4
พืช + น้ำตาล	/	/	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x
พืช + น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	/	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x	x
น้ำตาล	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
น้ำตาล + จุลินทรีย์หมัก	/	/	/	/	x	x	x	x	x	x	x	x

หมายเหตุ : / หมายถึง พบเชื้อ *L. casei*

x หมายถึง ไม่พบเชื้อ *L. casei*

m หมายถึง เดือนที่

w หมายถึง สัปดาห์ที่

3. ปริมาณจุลินทรีย์โดยรวม และทดสอบหาเชื้อก่อโรคบางชนิดในน้ำหมักชีวภาพ

3.1 ปริมาณจุลินทรีย์โดยรวม ด้วยวิธี spread plate

ผลการตรวจสอบหาปริมาณจุลินทรีย์โดยรวมในน้ำหมักชีวภาพสูตรที่ 2 จากกระโดน ถั่ว และเม็ก

ในสัปดาห์ที่ 1 ของการหมัก ผลจากตารางที่ 8 พบว่าน้ำหมักชีวภาพทั้งสามชนิด มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนในปริมาณใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 8 ปริมาณจุลินทรีย์โดยรวมในน้ำหมักชีวภาพจากพืช 3 ชนิดที่หมักไว้ 1 สัปดาห์

น้ำหมักชีวภาพของพืช	ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย/มล.	ปริมาณเชื้อรา/มล.	ปริมาณจุลินทรีย์รวม/มล.
แม็ก	1.59×10^4	0.83×10^4	2.42×10^4
ตั่ว	2.66×10^3	0.01×10^3	2.67×10^3
กระโดน	1.23×10^3	0.02×10^3	1.25×10^3

3.2 การตรวจสอบเชื้อก่อโรค

ผลการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* และ *C. perfringens* ในน้ำหมักชีวภาพจากกระโดน ตั่ว และแม็ก ไม่พบเชื้อทั้ง 4 ดังกล่าว

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่า น้ำหมักชีวภาพจากกระโดนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli* และ *P. aeruginosa* ส่วนสารสกัดกระโดนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *S. typhi* เท่านั้น ผลการวิจัยมีความสอดคล้องบางส่วนกับงานวิจัยของอาจารย์และกรชนก (2548) ที่พบว่าสารสกัดด้วย ethyl acetate ของกระโดนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *B. cereus* ส่วนสารสกัดด้วย methanol ของกระโดนมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* และ *Salmonella typhimurium*

น้ำหมักชีวภาพจากแม็กมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. typhi* และ *S. aureus* ในขณะที่สารสกัดแม็กมีฤทธิ์ต้านเฉพาะเชื้อ *S. aureus* ส่วนสารสกัดตั่วมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* แต่น้ำหมักชีวภาพจากตั่วไม่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด ผลการวิจัยมีความสอดคล้องบางส่วนกับงานวิจัยของ เกศรินและคณะ (2549) ที่พบว่าสารสกัดด้วย ethanol ของแม็กมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. subtilis*, *S. aureus* และ *Streptococcus faecalis* สารสกัดด้วย methanol ของตั่วมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* และ *S. faecalis*

สาเหตุที่น้ำหมักชีวภาพส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพดีกว่าสารสกัดพืช อาจเนื่องมาจากสารที่เกิดจากปฏิกิริยาการหมัก อาทิเช่น กรดอินทรีย์, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซินที่เชื้อผลิตออกมา

เป็นต้น (Marshall, 1987) โดยกรดอินทรีย์จะมีฤทธิ์ต้านจุลชีพที่ไม่ทนกรดบางชนิด เช่น *Bacillus* spp., *E. coli* และ *Pseudomonas* spp. น้ำหมักชีวภาพดังที่ปรากฏในตารางที่ 2-4 มีสภาวะเป็นกรดมาก ซึ่งไม่เหมาะแก่การเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด (ยศวีร์, 2549) ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli* และ *C. perfringens* (ศศิธร, 2548) สารแบคทีเรียโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพบางชนิด *L. casei* สามารถสร้าง Caseicin 80 (Buckenhushkes, 1993)

น้ำหมักชีวภาพที่เตรียมตามวิธีภูมิปัญญาชาวบ้านคือ เต็มหัวเชื้อ (สูตร 2: พืช+น้ำตาล+เชื้อ) ให้ฤทธิ์ต้านจุลชีพไม่ต่างจากสูตรที่ไม่เติมหัวเชื้อ (สูตร 1: พืช+น้ำตาล) อาจเป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านจุลชีพของพืชและสารที่เกิดจากกระบวนการหมัก เนื่องจากในธรรมชาติพืชผักจะมีจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีคุณสมบัติในการหมักอยู่ด้วย (Gilliland, 1986) จะเห็นได้จากผลการทดสอบหาเชื้อ *L. casei* ในน้ำหมักชีวภาพ พบว่าน้ำหมักชีวภาพสูตรที่ 1 พบเชื้อ *L. casei* ดังนั้น การเตรียมน้ำหมักชีวภาพ หากมีพืชและน้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่เหมาะสม จะเกิดกระบวนการหมักได้

นอกจากนี้ ผลการศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตของจุลินทรีย์หมัก พบว่าในน้ำหมักชีวภาพของกระโดนจะพบเชื้อ *L. casei* จนถึงสัปดาห์ที่ 2 ของการหมัก ส่วนน้ำหมักชีวภาพของตั่วและแม็กจะพบเชื้อจนถึงสัปดาห์ที่ 3 ของการหมัก การหมักเป็นเวลานาน จะทำให้สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อหมดไป เชื้อจึงเข้าสู่ death phase ดังนั้น หากต้องการนำไปบริโภคเพื่อให้ได้ประโยชน์ของ

probiotic (ไชยวัฒน์, 2547) ควรบริโภคน้ำหมักชีวภาพในช่วงสัปดาห์ที่จุลินทรีย์หมักยังมีชีวิต และหากไม่ต้องการบริโภคน้ำหมักชีวภาพที่มีจุลินทรีย์ ก็ควรหลีกเลี่ยงการบริโภคน้ำหมักชีวภาพในช่วงเวลาดังกล่าว ผลการตรวจสอบหาเชื้อก่อโรค 4 ชนิด คือ *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. perfringens* ในน้ำหมักชีวภาพ ไม่พบเชื้อทั้งหมดนี้ ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านจุลชีพของพืช หรือ สารที่เกิดจากปฏิกิริยาการหมัก หรือ อาจเป็นผลจากการไม่มีเชื้อก่อโรคปนเปื้อนระหว่างขบวนการหมัก เนื่องจากเป็นสภาวะที่มีกรดเกิดขึ้น จะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ แต่อาจทำให้เชื้อราเจริญได้ดี (องอาจและไชยวัฒน์, 2546)

ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของกระทรวงอุตสาหกรรม ที่ มพข. 481/2547 กำหนดมาตรฐานของน้ำหมักชีวภาพ โดยมีรายละเอียดของเกณฑ์จุลินทรีย์ คือ ต้องไม่พบ *S. aureus*, *Salmonella*, *C. perfringens* และปริมาณ *E. coli* เมื่อตรวจด้วยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 2.2 ต่อตัวอย่าง 100 มล. และปริมาณยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 100 ต่อตัวอย่าง 1 มล. ส่วนเกณฑ์มาตรฐานของเครื่องดื่มในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 214 พ.ศ. 2543 ต้องไม่มีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ต้องตรวจไม่พบ *E. coli* ไม่มียีสต์และเชื้อรา และปริมาณ coliform bacteria เมื่อตรวจด้วยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 2.2 ต่อเครื่องดื่ม 100 มล. และเกณฑ์มาตรฐานอาหารพร้อมบริโภคตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ระบุว่า ต้องไม่มียีสต์และเชื้อรา และมีปริมาณจุลินทรีย์โดยรวมน้อยกว่า 1×10^6 /มล. (ไชยวัฒน์, 2547) เมื่อตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์โดยรวม และเชื้อราในน้ำหมักชีวภาพทั้งสามชนิด พบว่ามีปริมาณเชื้อราเกินเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้น หากต้องการเตรียมน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภคหรือเป็นสินค้าในระดับอุตสาหกรรม ควรต้องระวังการปนเปื้อนจากเชื้อรา หรือพัฒนาให้มีสารต้านเชื้อราในสูตร เพราะเชื้อราและยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้และสิ่งแวดล้อม

สรุปผลการทดลอง

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพจากกระโดน และเม็กสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัด แต่น้ำหมักชีวภาพมีฤทธิ์ต้านจุลชีพได้หลายชนิดกว่า ส่วนน้ำหมักชีวภาพจากตัวไม่มีประสิทธิภาพในการต้านจุลินทรีย์ทดสอบทุกชนิด แต่สารสกัดตัวมีฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ทั้งนี้ ฤทธิ์ต้านจุลชีพของน้ำหมักชีวภาพอาจเกิดจากสารที่เกิดจากปฏิกิริยาการหมัก และความเป็นกรดของน้ำหมักชีวภาพ พืชผักพื้นบ้านอีสานที่เหมาะสมสำหรับเตรียมเป็นน้ำหมักชีวภาพเพื่อให้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพดีที่สุด คือ กระโดน และเม็ก ตามลำดับ ดังนั้นการเตรียมน้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภคควรพิจารณาถึงคุณสมบัติของพืชและสารสำคัญที่มีในพืชเป็นหลัก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าต่อการบริโภค ส่วนกระบวนการหมักที่เตรียมตามวิธีภูมิปัญญาชาวบ้าน แบบใช้หัวเชื้อ (สูตรที่ 2) และไม่ใช้หัวเชื้อ (สูตร 1) ให้ฤทธิ์ต้านจุลชีพไม่แตกต่างกัน ช่วงเวลาที่ควรบริโภคน้ำหมักชีวภาพให้ได้ประโยชน์จาก probiotic คือ ช่วงที่เชื้อหมักยังมีชีวิต (ประมาณ 2-3 สัปดาห์หลังการหมัก) และน้ำหมักชีวภาพจากพืชทั้ง 3 ชนิด ตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* และ *C. perfringens* แต่มีปริมาณเชื้อราเกินเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นจึงควรมีการวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตน้ำหมักชีวภาพให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยและมีคุณค่าต่อการบริโภคต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปี 2547 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยทั้ง 3 ท่าน คือ นางสาวอภิญา ธิ์สูงเนิน, นางสาวปิยธิดา รักพงษ์ และนางสาวธัญสินี จำปาลอย

เอกสารอ้างอิง

- กมลทิพย์ กลีภรณ์. 2543. พืชผักพรรณไม้พื้นบ้านอีสาน. สำนักพิมพ์มติชน: กรุงเทพมหานคร: 143 หน้า
- เกศริน เงินหมื่น, พรพิมล พรหมทอง และ ธัญลักษณ์ พินิจเชื้อ. 2549. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของผักพื้นบ้าน และสมุนไพรไทยบางชนิด. สารนิพนธ์เภสัชศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี: 52 หน้า
- เจนวรา แสงจันทร์ และ ธฤชวรรณ สมานพันธ์. 2546. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ทากายนอกจากน้ำหมักชีวภาพ. กระบวนวิชาปัญหาพิเศษภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: 75 หน้า
- ไชยวัฒน์ ไชยสุด. 2547. มาตรฐานและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์น้ำหมักชีวภาพเพื่อการบริโภค. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 288 หน้า
- เดช ผิวอ่อน และ สงคราม พลสงคราม. 2543. การศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพของผักพื้นบ้านอีสาน. โครงการสารนิพนธ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี: 44 หน้า
- ปาจารย์ ทองงอก และ กรชนก แก่นคำ. 2548. ฤทธิ์ต้านจุลชีพของผักพื้นบ้านอีสานไทย. วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน, ปีที่ 1 ฉบับที่ 1: หน้า 40-46.
- มานิช วามานนท์ และคณะ. 2538. ผักพื้นบ้าน: ความหมายและภูมิปัญญาของสามัญชนไทย. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพมหานคร: 164-165.
- ยศวีร์ ดวงจิตเจริญ. 2549. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกจากผักดองและผลิตภัณฑ์น้ำหมักพืช. วิทยาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: 400 หน้า
- ศศิธร ศิริลุน. 2548. จุลนพลศาสตร์ของการหมักลูกยอและฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพของผลิตภัณฑ์ที่ได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: 141 หน้า
- สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. 2541. ผักพื้นบ้านอีสาน. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก กรุงเทพมหานคร: 302 หน้า
- สุมาลี เหลืองสกุล. 2542. จุลชีววิทยาทางอาหาร (ฉบับปรับปรุงใหม่). ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร. พิมพ์ครั้งที่ 3. ชัยเจริญ, กรุงเทพมหานคร: 46-47.
- องอาจ มินวล และไชยวัฒน์ ไชยสุด. 2546. การพัฒนาตำรับน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำหมักชีวภาพจากพืชสมุนไพร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: 49 หน้า
- Buckenhuses HJ. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol Rev* 12: 253-271.
- Gilliland SE. 1986. Concentrated starter cultures. In: bacterial starter cultures for foods, ed. SE Gilliland. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida: 145-157.
- Jorgensen J, Turnidge J, Washington J. 1999. Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Editors. Manual of clinical microbiology, 6th ed. Washington DC: ASM Press: 1526-1543.
- Marshall VM. 1987. Lactic acid bacteria : starters for flavour. *FEMS Microbiol Rev*: 46: 327-336.
- Thunell RK, Sandine WE. 1986. Types of starter cultures. In: bacterial starter cultures for foods, ed. SE. Gilliland. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida: 127-144.